



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE TECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA
ARMAZENAMENTO E PROCESSAMENTO DE PRODUTOS AGRÍCOLA



**AVALIAÇÃO DA AFLATOXINA EM SEMENTES DE AMENDOIM
ARMAZENADAS E DO ÓLEO DE NIM (*Azadirachta indica*) NO
CRESCIMENTO MICELIAL DO FUNGO *Aspergillus flavus***

ROSÂNGELA DA SILVA COSTA

CAMPINA GRANDE – PB
FEVEREIRO DE 2007

ROSÂNGELA DA SILVA COSTA

**AVALIAÇÃO DA AFLATOXINA EM SEMENTES DE AMENDOIM
ARMAZENADAS E DO ÓLEO DE NIM (*Azadirachta indica*) NO
CRESCIMENTO MICELIAL DO FUNGO *Aspergillus flavus***

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Campina Grande, em cumprimento às exigências para obtenção do Título de Mestre.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ARMAZENAMENTO E PROCESSAMENTO DE
PRODUTOS AGRÍCOLAS

ORIENTADORES: Dr. FRANCISCO DE ASSIS CARDOSO ALMEIDA
Dra. TAÍS DE MORAES FALLEIRO SUASSUNA

**CAMPINA GRANDE – PB
FEVEREIRO DE 2007**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

C837a

2007 Costa, Rosângela da Silva.

Avaliação da aflatoxina em sementes de amendoim armazenadas e do óleo de nin (*Azadirachta indica*) no crescimento micelial do fungo *Aspergillus flavus*/Rosângela da Silva Costa. — Campina Grande: 2007. 63f. : il

Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Tecnologia e Recursos Naturais.

Referências.

Orientadores: Dr. Francisco de Assis Cardoso Almeida e Dr^a.Taís de Moraes Falleiro Suassuna.

1. Fungos Micotoxicogênicos. 2. Armazenamento. 3. Aflotoxina Controle Alternativo. I. Título.

CDU 582.282.123.4 (043)

ROSÂNGELA DA SILVA COSTA

**AVALIAÇÃO DA AFLATOXINA EM SEMENTES DE AMENDOIM
ARMAZENADAS E DO ÓLEO DE NIM (*Azadirachta indica*) NO
CRESCIMENTO MICELIAL DO FUNGO *Aspergillus flavus***

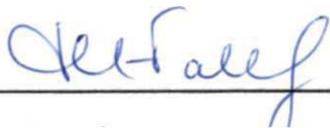
APROVADA EM: / __ /

BANCA EXAMINADORA PARECER



A handwritten signature in blue ink, enclosed in a blue oval, followed by the word "Aprovado" written in blue ink.

Dr. FRANCISCO DE ASSIS CARDOSO ALMEIDA
Orientador/ Dr. Prof. Associado da UFCG



A handwritten signature in blue ink.

Dra. TAÍS DE MORAES FALLEIRO SUASSUNA
Orientadora/Ira.Pesquisadora da Embrapa Algodão

Dra. JOSIVANDA P. GOMES DE GOUVEIA
Examinadora/ Dra. Prof. da UFCG/Coordenadora do
Curso de Pós-graduação em Engenharia Agrícola

Dra. KÁTIA CRISTINA DE OLIVEIRA
GURJÃO Examinadora/ Dra. Prof. da EAFS

*“Feliz aquele que transfere
o que sabe e aprende o que
ensina!”*

CORA CORALINA

Ao meu Deus, o maior de todos os professores.

OFEREÇO

Aos meus pais, Odilon Pereira da Costa e Maria de Fátima da Silva Costa, por estarem ao meu lado, pelo incentivo e amor.

HOMENAGEIO

Ao meu companheiro, amigo e amante, Guttemberg, que tanto me ajudou nas horas difíceis.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela graça da vida e por estar ao meu lado durante toda a jornada;

Ao Professor Dr. Francisco de Assis Cardoso Almeida, meu orientador, pela paciência, ensinamentos e amizade;

A Pesquisadora Dra. Taís de Moraes Falleiro Suassuna, minha orientadora, pelo auxílio nos trabalhos, durante a condução dos experimentos, na Embrapa Algodão;

A Pesquisadora Dra. Sayonara Maria Lia Fook, pelo grande carinho, respeito, apoio, consideração, e prestimosos auxílio e ensinamento para o desenvolvimento e condução dos experimentos desenvolvidos;

A Pesquisadora Rosa Maria Mendes Freire, pelos prestimosos ensinamentos e colaboração, pela grande contribuição, atenção e carinho, e pela valiosa amizade, dedicação e paciência, sem as quais os experimentos não teriam sido desenvolvidos;

Ao Pesquisador Wirtton Macedo Coutinho pela grandiosa orientação para montagem do experimento com no laboratório de Fitopatologia da Embrapa.

A Dra. Josivanda P. Gomes de Gouveia, Coordenadora de Pós-graduação da UFCG, pela amizade, apoio, colaboração, respeito, ensinamentos e incentivos, durante todos os momentos do curso;

Ao Pesquisador Dr. Raul Porfírio de Almeida, pelos ensinamentos e apoio prestados;

A Embrapa Algodão pela grande oportunidade concedida para a realização do estágio e apoio para a realização dos experimentos;

Aos Professores e Funcionários da Universidade Federal de Campina Grande, pelo incentivo e amizade;

Aos Colegas de curso e da Embrapa Algodão pela amizade e incentivo;

Ao CNPq, pela bolsa de estudo concedida;

A Todos aqueles que, de alguma forma, colaboraram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	PÁGINA
LISTAS DE TABELAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE ANEXOS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUÇÃO.	1
1.1. OBJETIVO	3
1.1.1. Objetivo geral	3
1.1.2. Objetivos específicos	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Características botânicas do <i>Arachis hypogaea</i>	4
2.2. Importância Econômica.	5
2.3. Qualidade fisiológica de semente	6
2.4. Armazenamento	7
2.4.1. Fatores que influenciam na contaminação do amendoim por fungos micotoxicogênicos no armazenamento	8
• Temperatura	9
• Teor de umidade	9
• Impurezas	11
• Presença de insetos e ácaros	11
• Condições físicas dos grãos	12
• Período de armazenagem	12
• Atmosfera de armazenamento	13
2.5. Embalagens	13
2.6. Micotoxinas	14
2.6.1. Fungos micotoxicogênicos	15
2.6.2. Aflatoxinas	16
2.6.3. Micotoxicoses	17
2.7. Uso de extratos naturais e óleos no controle de patógenos	18

3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1. Armazenamento das sementes de amendoim	19
3.1.1. Local de condução do experimento	19
3.1.2. Delineamento estatístico	19
3.1.3. Origem das sementes	20
3.1.4. Análises realizadas	22
• Teste de germinação e vigor (primeira contagem da germinação)	22
• Determinação do teor de umidade	22
• Determinação da aflatoxina	23
Preparação dos padrões	23
Preparo das amostras para análise	23
Extração e limpeza das amostras	24
Identificação das Aflatoxinas	27
3.2. Avaliação do crescimento micelial do fungo <i>Aspergillus flavus</i>	29
3.2.1. Obtenção dos Isolados	29
3.2.2. Delineamento estatístico	29
3.2.3. Análises realizadas	30
• Crescimento micelial	30
• Germinação dos esporos	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	32
4.1. Armazenamento	32
4.1.1. Germinação	33
4.1.2. Primeira contagem da germinação	35
4.1.3. Teor de umidade	38
4.1.4. Aflatoxina	41
4.2. Influência do óleo de nim no desenvolvimento do fungo <i>Aspergillus flavus</i>	42
4.2.1. Crescimento micelial	42
4.2.2. Germinação de esporos	45
5. CONCLUSÃO	46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

LISTA DE TABELAS

TABELAS		PÁGINA
TABELA 1.	Composição média do amendoim do tipo Valência	5
TABELA 2.	Quantidade de amendoim produzida ($t.ha^{-1}$) na Região Nordeste nas safras de 2001 a 2005.	6
TABELA 3.	Umidades recomendadas para armazenagem e comercialização de vários produtos	10
TABELA 4.	Teor de umidade (base seca), germinação e vigor de semente amendoim antes do armazenamento (P_0)	21
TABELA 5.	Análise de variância da germinação, do vigor e da umidade, de sementes de amendoim da variedade BR 1, acondicionadas em dois ambientes (condições ambiente e câmara seca), dois tipos de embalagem (papel multifoliado e polietileno trançado), com e sem casca e quatro períodos de armazenamento (45, 90, 135, 180 dias)	33
TABELA 6.	Valores médios de germinação (%) para a interação Embalagem x beneficiamento de sementes de amendoim da variedade BR 1, armazenadas por 180 dias.	35
TABELA 7.	Valores médios de vigor (%) para a interação beneficiamento x ambiente de armazenamento, de sementes de amendoim da variedade BR 1, armazenadas por 180 dias.	36
TABELA 8.	Valores médios de umidade (%) para a interação ambientes de armazenamento x embalagens, de sementes de amendoim da variedade BR 1, armazenadas por 180 dias.	39
TABELA 9.	Valores médios de umidade (%) para a interação ambiente de armazenamento x beneficiamento, de sementes de amendoim da variedade BR 1, armazenadas com e sem casca.	39
TABELA 10.	Valores médios de umidade* (%) para a interação embalagens x beneficiamento, de sementes de amendoim da variedade BR 1, armazenadas com e sem casca.	40
TABELA 11.	Análise de variância e da regressão do crescimento micelial de três isolados do fungo <i>Aspergillus flavus</i> submetidos a cinco concentrações do óleo de nim (<i>Azadiractha indica</i>)	43
TABELA 12.	Taxa de crescimento micelial de isolados de <i>Aspergillus flavus</i> , em resposta ao uso de cinco diferentes concentrações de óleo de nim.	43

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS		PÁGINA
FIGURA 1.	Máquina de descascar amendoim (Foto do autor)	21
FIGURA 2.	Moinho de oleaginosas (Foto do autor)	24
FIGURA 3.	Extração da Aflatoxina	25
FIGURA 4.	Extração e limpeza das amostras (Fotos do autor)	26
FIGURA 5.	Esquema de Cromatofolha (cromatografia de camada delgada)	26
FIGURA 6.	Cuba de revelação	27
FIGURA 7.	Modelo de placa do teste de derivação química	28
FIGURA 8.	Valores médios de germinação (%) de sementes de amendoim, da variedade BR1, armazenadas em condição de câmara seca (A1) e em condição ambiente (A2), por 180 dias	34
FIGURA 9.	Valores médios de vigor (%) de sementes de amendoim, da variedade BR1, armazenadas em câmara seca (A1) e em condição ambiente (A2), por 180 dias.	36
FIGURA 10.	Valores médios de vigor (%) de sementes de amendoim, da variedade BR1, armazenadas em embalagens de papel multifoliado (EM1) e de polietileno trançado (EM2), por 180 dias.	37
FIGURA 11.	Valores médios de vigor (%) de sementes de amendoim, da variedade BR1, armazenadas com casca (AC) e sem casca (AS), por 180 dias.	37
FIGURA 12.	Valores médios de umidade (%) de sementes de amendoim, da variedade BR1, armazenadas com casca (AC) e sem casca (AS), por 180 dias.	40
FIGURA 13.	Comparativo das taxas de crescimento micelial dos isolados analisados, nas diferentes concentrações.	44

LISTA DE ANEXOS

ANEXOS		PÁGINA
ANEXO I	Estruturas químicas das aflatoxinas	59
ANEXO II	Normas de fiscalização das micotoxinas	60
ANEXO III	Metodologia de extração da aflatoxina	63

RESUMO

Avaliação da aflatoxina em sementes de amendoim armazenadas e do óleo de nim (*Azadirachta indica*) no crescimento micelial do fungo *Aspergillus flavus*.

A aflatoxina é uma toxina comumente encontrada no amendoim, produzida por fungos micotoxigênicos, em que se destacam *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. O ataque desses microrganismos pode produzir diferentes alterações em sementes e em grãos, sendo as mais importantes à diminuição do poder germinativo das sementes, as alterações na cor natural dos grãos, nas qualidades organolépticas, no valor nutritivo e no bom aproveitamento industrial do amendoim e seus subprodutos, além de produzir substâncias tóxicas. A busca por produtos de baixo custo que controle esses microrganismos com eficiência tem sido uma constante. Nota-se que, vários efeitos são observados quando esses fungos são expostos a produtos a base de nim (*Azadirachta indica*), como as alterações morfológicas e toxicogênicas. Tendo em vista os problemas causados por esses microrganismos, com o presente trabalho objetivou-se determinar as condições de armazenamento, tipos de embalagens e período de armazenagem, visando reduzir significativamente os teores de aflatoxina em sementes de amendoim e avaliar a ação do óleo de nim (*Azadirachta indica*), no desenvolvimento micelial do fungo *Aspergillus flavus*. Para atender os objetivos, foram instalados dois experimentos. O primeiro foi em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, seguindo de um esquema fatorial de 2 x 2 x 2 x 4, representado por ambientes de armazenamento (A₁ – câmara seca; A₂ – condições ambientes), embalagem (EM₁ – saco multifoliado; EM₂ – saco de polietileno trançado), beneficiamento (AM₁ – amendoim sem casca; AM₂ – amendoim com casca) e período de armazenamento (P₁ – após 45 dias; P₂ – após 90 dias; P₃ – após 135 dias; P₄ – após 180 dias). O segundo experimento foi distribuído em esquema fatorial de 3 x 5 representado por: diferentes isolados do fungo *Aspergillus flavus* (IM – isolado de Mogeiro; IP – isolado de Patos; ICG – isolado de Campina Grande) e variações das concentrações do óleo de nim no meio de cultura (C₀ – testemunha; C₁ – 3,125 %; C₂ – 6,25 %; C₃ – 12,5 %; C₄ – 25 %) com quatro repetições. Dos resultados obtidos, conclui-se que, as condições de ambiente, embalagens, beneficiamento e período de armazenamento influenciaram na qualidade fisiológica da semente e não favoreceram ao surgimento da aflatoxina; e a concentração de 25 % de óleo de nim inibiu significativamente a taxa de crescimento micelial do fungo *Aspergillus flavus*.

ABSTRACT

Evaluation of aflatoxin in stored peanut seeds and neem oil (*Azadirachta indica*) in the mycelial growth of *Aspergillus flavus* fungus.

The aflatoxin is a toxin commonly found in peanuts, produced by mycotoxigenic fungi, where appear mainly *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. The attack of these fungi may cause different alterations in seeds and grains, being the most important the decrease in the germinative power in seeds, the alterations in the natural color of the grains, in the organoleptical qualities, in the nutrition facts and in the industrial uses of peanuts and its by products, besides of producing toxic substances. The search for low-cost products that can control these micro-organisms with efficiency has been constant, but many effects are observed when these fungi are exposed to products made from neem (*Azadirachta indica*), such as the morphological and toxicogenic alterations. Having in mind the problems caused by these micro-organisms, the present work aimed the determination of the storage conditions, kind of packages and storage periods, aiming to reduce significantly the aflatoxin rate in peanut seeds and evaluate the action of neem oil (*Azadirachta indica*), in the mycelial development of the *Aspergillus flavus* fungus. To reach the objectives, two experiments were installed. The first one with entirely casual delineation with four repetitions, followed by a factorial scheme of 2 x 2 x 2 x 4, represented by storage environments (A₁ – dried chamber; A₂ – environmental conditions), package (EM₁ – multi-ply bag; EM₂ – woven polyethylene bag), processing (AM₁ – peanut without peel; AM₂ – peanut with peel) and storage period (P₁ – after 45 days; P₂ – after 90 days; P₃ – after 135 days; P₄ – after 180 days). The second experiment was distributed in factorial scheme of 3x5 represented by: different isolated of *Aspergillus flavus* fungus (IM – isolated of Mogreiro; IP – isolated of Patos; ICG – isolated of Campina Grande) and variation of the neem oil concentrations in the culture medium (C₀ – testimony; C₁ – 3,125 %; C₂ – 6,25 %; C₃ – 12,5 %; C₄ – 25 %) with four repetitions. From the results found, we concluded that the environment conditions, packages, processing and storage period have influenced in the physiological quality of the seed and have not favored the aflatoxin appearance; and the concentration of 25 % of neem oil inhibited significantly the mycelial growth rate of the *Aspergillus flavus* fungus.

1. INTRODUÇÃO

O amendoim (*Arachis hypogaea*) é conhecido mundialmente por oferecer várias opções alimentares e possuir sabor agradável. É um produto rico em óleo e proteínas, possuindo também, teores satisfatórios de algumas vitaminas (FREIRE et al., 2005). É uma importante matéria prima para as indústrias alimentícias, pois é constituído, em média, por 46 % de óleo, apresentando um alto teor calórico (FREIRE, 1997). É a quarta oleaginosa mais produzida, perdendo apenas para a soja, o algodão e a colza, sendo China, Índia e Estados Unidos os principais produtores mundiais (FREITAS et al., 2005).

A umidade que o produto contém ao ser estocado, pode influenciar significativamente no desenvolvimento de fungos micotoxicogênicos, pois a mesma varia com as condições do ambiente de armazenamento, da embalagem e do período de armazenamento. Segundo RESNIK (1984), a umidade é um dos fatores que determina a atividade da microflora em sementes e grãos armazenados.

Ao ser colhido, o amendoim apresenta entre 35 a 45 % de umidade, por isso, o mesmo deve ter sua umidade reduzida através de secagem, para ser armazenado com segurança (BOLONHEZI et al., 2005). ALMEIDA et al., (1998), através de pesquisas, mostraram que sementes de amendoim armazenadas fora dos frutos são mais susceptíveis ao ataque de microrganismos, e esta contaminação aumenta com o uso de embalagens inadequadas. Com isso, verifica-se a contaminação do amendoim por toxinas.

A aflatoxina é uma toxina comumente encontrada no amendoim, produzida por fungos micotoxicogênicos, em que se destacam os fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Os metabólitos secundários produzidos por esses fungos, seja no campo ou no armazenamento, são dependentes das condições do ambiente ou do substrato, e são nocivos à saúde humana e animal (DHINGRA & COELHO NETO, 1998).

Esses fungos invadem os grãos em diferentes fases que caracterizam a contaminação por micotoxinas: antes e durante a colheita, na secagem e no armazenamento ou em todas essas etapas. A contaminação por micotoxinas é geralmente um processo aditivo (ATHIÉ et al., 1998).

O ataque desses fungos pode produzir diferentes alterações em sementes e em grãos, sendo as mais importantes: à diminuição do poder germinativo das sementes, as alterações na cor natural dos grãos, nas qualidades organolépticas, no valor nutritivo e no bom aproveitamento industrial do amendoim e seus subprodutos, além de produzir substâncias tóxicas (CHRISTENSEN, 1988).

A utilização de fungicidas para o controle de patógenos em sementes e grãos armazenados é uma realidade, porém, a utilização de métodos alternativos ainda é uma opção a ser explorada, e que precisa ser pesquisada, para que venha se torna uma alternativa economicamente viável, principalmente para as pequenas propriedades rurais.

A busca por produtos de baixo custo que controle microrganismos com eficiência tem sido uma constante. A utilização de produtos vegetais (extratos e óleos) vem sendo testada para o controle de diversos patógenos (SANTOS et al., 2001; SALGADO & CAMPOS, 2003; SCHWAN-ESTRADA, 2003). Para o fungo *Aspergillus flavus*, o uso de óleos para inibir seu crescimento, tem sido alvo de diversas pesquisas, entre elas estão os trabalhos realizados por MONTES-BELMONT e CARVAJAL (2003) e SHIN (2003), com óleos essenciais de plantas.

Vários efeitos são observados quando estes fungos são expostos a produtos a base de nim (*Azadirachta indica*), como as alterações morfológicas e toxicogênicas causadas pela exposição do fungo *Aspergillus parasiticus* ao extrato de folhas e sementes de nim (RAZZAGHI-ABYANEH et al, 2005). O mesmo ocorreu em pesquisa realizada por ZERINGUE e BHATNAGAR (1994), quando submergiu culturas de *Aspergillus flavus* em produtos a base de nim.

A problemática da contaminação por micotoxinas e seus efeitos exigem um esforço multidisciplinar para controlar a presença da toxina no cultivo e evitar o seu desenvolvimento durante o manejo de pré e pós-colheita. Por esta razão, ações com o objetivo de minimizar o efeito negativo da presença de aflatoxina em produtos do amendoim devem ser incluídas nos planos de controle das pesquisas acadêmicas.

1.1. OBJETIVO

1.1.1. Objetivo geral

Determinar condições de armazenamento, tipos de embalagens e período de armazenagem, visando reduzir significativamente os teores de aflatoxina. Avaliar a ação do óleo de nim (*Azadirachta indica*), no controle do crescimento do *Aspergillus flavus* **in vitro**.

1.1.2. Objetivos específicos

- Determinar a presença de aflatoxina durante todo o período de armazenamento;
- Avaliar a influência dos ambientes de armazenagem (condições ambientes e câmara seca) nos teores de aflatoxina;
- Verificar a relação das embalagens (papel multifoliado e polietileno trançado), na conservação da qualidade fisiológica e sanitária das sementes;
- Quantificar o crescimento radial e germinação de três diferentes isolados do fungo *Aspergillus flavus*, submetidos a cinco concentrações com óleo de nim.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características botânicas do *Arachis hypogaea*

O amendoim (*Arachis hypogaea*) é originário da América do Sul, pertence à família *Fabaceae* e ao gênero *Arachis*. Distingue-se dos demais representantes da família por apresentar uma estrutura particular de frutificação chamada de ginóforo ou peg (SANTOS & GODOY, 1999).

O florescimento do amendoim tem início de 28 a 30 dias após o plantio para cultivares do tipo ereto e de 36 a 38 dias para cultivares do tipo ramador. A duração da floração varia com a cultivar e as condições ambientais (SANTOS & GODOY, 1999).

Segundo SANTOS et al., (1993), no período de floração podem ser identificadas quatro fases: a primeira por um florescimento lento, geralmente na primeira semana, a segunda por um rápido aumento do florescimento, a terceira é representada por um pico, que equivale há 50 dias após a floração nas plantas de porte ereto e 60 dias nas do tipo ramador e, finalmente a quarta fase que apresenta um acentuado declínio, culminando com o final da floração.

O ginóforo (peg) é uma estrutura que se desenvolve na base do ovário (região meristemática), sendo parecida com uma haste. Tal estrutura é dotada de geotropismo positivo, forçando o ovário para o interior do solo, onde a vargem é desenvolvida. O início da formação da vargem ocorre de sete a nove dias após a emissão do ginóforo.

As sementes do amendoim apresentam-se com formas elípticas, arredondadas ou ovaladas, possuindo uma coloração que vai do vermelho a roxa, creme ou marrom avermelhada, variando de acordo com a variedade (ARAÚJO, 1986).

A variedade BR1 apresenta alta precocidade e resistência à seca, tem ciclo de 89 dias após emergência e rendimento de amêndoas em torno de 71 %, possui baixo teor de óleo e alto teor de proteína, e apresenta sementes de coloração avermelhada. Por estas características é indicada para o mercado de consumo *in natura* e para indústrias de alimentos. É uma

variedade que se enquadra no perfil do produtor do semi-árido nordestino (SANTOS et al., 2005).

2.2. Importância econômica

Havendo um bom manejo pós-colheita, como beneficiamento, secagem e armazenamento adequado, haverá rentabilidade no cultivo da cultura do amendoim. A importância econômica da cultura está baseada no seu valor protéico e no alto teor de óleo encontrado em suas sementes (TABELA 1). Os grãos de amendoim no contexto nacional destinam-se tanto à indústria de alimentos como à indústria de óleo e farelo (BORSARI FILHO, 2007).

TABELA 1. Composição média do amendoim do tipo Valência

Constituinte	Média (%)
Umidade	1,07
Lipídios	45,83
Proteínas	30,11
Carboidratos¹	21,26
Cinzas	2,80

Fonte: FREIRE, 1997.

¹ – Obtido por diferença

Mundialmente, na safra 2005/2006 foram produzidos aproximadamente, 33 milhões de toneladas de amendoim. Deste total, 53 % foram destinadas à produção de alimentos, ficando os 47 % restantes destinados à produção de óleos e farelos (USDA, 2007).

No Brasil neste mesmo ano de foram produzidos 315 239 toneladas (IBGE, 2007a) sendo o estado de São Paulo o principal produtor. No nordeste, a demanda é superior a 50 000 toneladas/ano, em grãos, para atender a indústria de alimentos e o consumo “*in natura*”, porém, a produção da região só atende a uma pequena parte, sendo o restante importado de outras regiões e estados, principalmente de São Paulo e do exterior, como a Argentina (BELTRÃO, 2001).

O amendoim é uma cultura socioeconômica para a região nordeste, sendo viável para a agricultura familiar, principalmente por possuir um ciclo curto e ser resistente às condições climáticas da região, a qual favorece o sabor adocicado das amêndoas (SANTOS et al., 2005).

No ano de 2005 a produção do Nordeste foi de 11 871 t.ha⁻¹, em que a Paraíba participou com 1 275 t.ha⁻¹. Apresentando-se como o terceiro maior produtor regional, perdendo para Sergipe e Bahia (IBGE, 2007a). Observa-se uma diminuição da quantidade de amendoim produzido na região Nordeste, quando comparado às safras dos anos 2003 e 2004 (TABELA 2). A produção de amendoim obtida na safra de 2006 foi de 259 200 t, referente ao mês de agosto do mesmo ano (IBGE, 2007 b).

TABELA 2. Quantidade de amendoim produzida (t.ha⁻¹) na Região Nordeste nas safras de 2001 a 2005.

REGIÃO	SAFRAS				
	2001	2002	2003	2004	2005
Nordeste	6 009	7 122	12 546	15 734	11 871
Maranhão	16	33	56	75	153
Piauí	18	72	48	47	35
Ceará	488	704	557	530	698
Paraíba	340	388	728	975	1 275
Pernambuco	311	112	378	406	983
Alagoas	63	31	30	24	40
Sergipe	1 326	1 330	1 344	1 343	1 444
Bahia	3 447	4 452	9 405	12 334	7 243

Fonte: IBGE, 2007a.

2.3. Qualidade fisiológica de semente

A análise de sementes é de fundamental importância para o controle de qualidade, sementes de boa qualidade irão desenvolver plantas vigorosas, uniformes e apresentarão uma boa emergência no campo, refletindo diretamente na produtividade (ALMEIDA et al., 1997).

A viabilidade de sementes (Contagem do 5º dia e germinação) é um fator de avaliação muito utilizado no desenvolvimento de pesquisas (BHERING, et al., 2003; ABDO et al., 2005), pois, através destes testes pode ser determinada a qualidade fisiológica das sementes.

Essa qualidade pode ser mantida ao longo do armazenamento (MACEDO, 1998), porém, quando as condições de estocagem são inadequadas, a qualidade fisiológica diminui (AFONSO JÚNIOR et al., 2000), refletindo diretamente na sua viabilidade. Segundo CATUNDA et al., (2003), a viabilidade das sementes pode variar de acordo com o ambiente, a embalagem e a umidade de armazenamento. Em trabalhos realizados com sementes de milho, a menor germinação obtida foi influenciada pela incidência de fungos durante a estocagem (CIRIO & LIMA, 2003).

ROSSETO et al. (2003) demonstraram que a germinação do amendoim pode variar de acordo com o tratamento dado a semente antes da estocagem. Nos resultados encontrados por AZEREDO et al. (2005) notou-se que o período de armazenamento diminuir o potencial de germinação de sementes de amendoim.

2.4. Armazenamento

O armazenamento de grãos, quando é tecnicamente conduzido, mantém a composição química dos produtos (carboidratos, proteínas, gorduras, fibras, minerais e vitaminas) no seu estado natural, além de controlar os fatores físicos como temperatura e umidade.

O local de estocagem deve ser ventilado, seco, com boa cobertura, de preferência com paredes duplas, e piso de concreto. Deve ter estruturas de ventilação, ser protegido de chuva e de insetos, pássaros e roedores, com flutuação mínima de temperatura. As sementes e grãos devem ser distribuídos de maneira uniforme, favorecendo a dispersão do calor e umidade. Dessa forma, há redução das áreas favoráveis a proliferação de insetos, que causam picos de aquecimento e umidade, favorecendo o crescimento do fungo que produz a aflatoxina. Umidade relativa do local menor que 70 % e temperatura entre 0 e 10 °C propiciam ótimas condições de armazenamento. Recomenda-se medir a temperatura em intervalos fixos, para

monitorar a ocorrência de temperaturas altas, que indicam atividade microbiana ou de insetos (FONSECA, 2005).

Em produtos armazenados, os fungos, bolores ou mofos podem ocasionar diversos problemas, devido à ação direta nos produtos. Desenvolvendo-se sobre sementes podem causar perda do seu poder germinativo, afetar a qualidade por descoloração, produzir aromas desagradáveis, podendo diminuir o valor nutritivo das proteínas, na maioria dos produtos, dos óleos e gorduras, por hidrólise, como é o caso do amendoim, soja etc., além de prejudicar seriamente o aspecto externo dos alimentos, produzindo substâncias tóxicas e abrindo caminho para outros agentes de deterioração como às leveduras, bactérias e insetos (FONSECA, 2006).

O ponto-chave para prevenir contaminação por aflatoxina durante o armazenamento é evitar a reidratação dos grãos e sementes (DHINGRA & COELHO NETO, 1998).

2.4.1. Fatores que influenciam na contaminação do amendoim por fungos micotoxicogênicos no armazenamento

Os fungos de armazenagem estão associados com resíduos culturais e partículas de solo entre os grãos colhidos, com alto teor de umidade. Além disto, o fungo *Aspergillus flavus*, comumente encontrado no amendoim, tem o solo como sua principal fonte de inóculo primário (REIS & TREZZI CASA, 1999).

Segundo ALMEIDA et al. (1998), sementes de amendoim armazenadas nos frutos apresentam resistência ao surgimento de fungos, o mesmo não ocorre para as sementes sem casca, nas quais, a contaminação por microrganismos aumenta com o tempo de armazenamento.

Quando o amendoim é armazenado em condições adequadas não ocorre o desenvolvimento dos fungos micotoxicogênicos e, conseqüentemente, não existe a produção da aflatoxina. QUEIROZ et al. (2006) demonstrou que sementes de amendoim armazenadas em condições ambientes e em câmara fria, não apresentaram contaminação por aflatoxina durante todo o período de armazenamento.

Em estudos conduzidos por ALVES (1995) percebeu-se que amendoins contaminados com aflatoxina antes do armazenamento, continuaram contaminadas durante a estocagem. Por esta razão, que a distribuição de aflatoxina em locais de armazenamento, apresenta-se de

forma heterogênea, dificultando a precisão na determinação dos teores dessa toxina, no ambiente de estocagem (WHITAKER et al., 1994).

Segundo LAZZARI (1993), os fatores mais importantes que determinam o desenvolvimento de fungos armazenados são: temperatura, grau de umidade dos grãos, impurezas, presença de insetos e ácaros, condições físicas dos grãos, período de armazenamento e atmosfera de armazenamento.

- **Temperatura**

O efeito da temperatura sobre os grãos e sementes não é muito pronunciado quando o conteúdo de umidade é baixo, porém, é válido o princípio de que quanto mais baixa a temperatura do produto, seguro e prolongado pode ser o tempo de armazenagem. Temperaturas elevadas afetam a viabilidade das sementes. Em umidades relativas mais altas, sementes mortas são mais susceptíveis à invasão por fungos. Temperaturas elevadas também provocam alterações bioquímicas nos grãos e, durante a secagem natural ou artificial, diminuindo a qualidade do produto (ATHIÉ et al., 1998).

A temperatura para produção de aflatoxina é influenciada pelo tipo de substrato. De acordo com DIENER e DAVIS (1966), 25 °C foi a temperatura ótima para a produção dessa toxina em amendoins submetidos à solução nutritiva.

Estudos realizados por SCHINDLER et al. (1967) notou-se a influência da temperatura na produção máxima de aflatoxinas em culturas desses fungos, observando também que algumas temperaturas devem ser evitadas, pois aumentam significativamente os teores de aflatoxina em grãos e sementes.

- **Teor de umidade**

O teor de umidade é um dos fatores que rege a conservação dos grãos e sementes armazenadas, portanto, o seu acompanhamento deve ser feito em todas as etapas de produção, beneficiamento e armazenamento (ATHIÉ et al., 1998).

A umidade contida nos grãos estabelece uma umidade relativa ao seu redor, que pode favorecer ao crescimento fúngico. A umidade do ambiente pode também determinar o grau de umidade dos grãos, quando em equilíbrio. Os fungos de armazenamento são aqueles capazes de crescer em substratos com atividade de água na faixa de 65 % a 90 % (ATHIÉ et al., 1998).

As umidades de armazenagem variam com o tipo de produto trabalhado, inclusive os que possuem maior percentual de óleo devem ser armazenados mais secos como é o caso do amendoim (WEBER, 2005).

A umidade final desejada dos grãos e sementes saindo do secador e indo para armazenagem depende das condições de comercialização. O Ministério da Agricultura e a CONAB determinam as faixas de umidade em base úmida para armazenagem de diversos produtos, como pode ser observado na TABELA 3 (WEBER, 2005).

TABELA 3. Umidades recomendadas para armazenagem e comercialização de vários produtos

Produtos	CONAB		Ministério da Agricultura (% bu)
	Faixa ideal (% bu)	Tolerância Máxima (% bu)	
Amendoim	07-08	9	12
Arroz em casca	12-13	14	13
Arroz polido	12-13	14	14
Soja	11-12	13	14
Sorgo	12-13	14	14

Fonte: WEBER, 2005.

O teor de umidade de uma semente determina o nível de atividade metabólica da mesma. Se o teor de água for superior a 40 e 60 %, verifica-se a protrusão da plântula pelo fenômeno de germinação, ocorre à respiração das sementes, dos microrganismos e insetos. Tendo em vista que o alto teor de água pode afetar a qualidade da semente, não só no período de armazenagem, como também, durante as operações de beneficiamento (CARVALHO & NAKAGAWA, 2000).

Valores de umidade considerados seguros para um adequado armazenagem do produto são conhecidos e devem ser respeitados para que a qualidade dos grãos se mantenha durante a estocagem.

Grandes volumes de grãos exigem amostragens numerosas e resultados rápidos são difíceis de serem obtidos em tempo hábil para tomada de decisões sobre a qualidade do produto e o processamento a que devem ser submetidas (VALENTINI et al., 1998).

As sementes com alta taxa de óleo não absorvem, ou absorvem menos água, pois os óleos são hidrófobos. Por exemplo, a uma temperatura de 25 °C e 70 % de umidade relativa, a soja tem o conteúdo de água de equilíbrio de 11,5 % e o trigo de 13,9 % (GONÇALVES FRANCISCO, 2001).

O método de medição de umidade, baseado em quantidades conhecidas de sementes que determinada à umidade por pesagens "antes" e "depois" da secagem, pode variar com o tempo e temperatura de determinação, Isso vai depender do tipo de semente, e se elas estão inteiras ou moídas. Apesar de ser considerado padrão para medição de umidade de sementes e grãos no Brasil, não existe uma combinação de tempo e temperatura de secagem aceita universalmente (LUZ, 2006).

Através da remoção de umidade pela secagem, natural ou artificial, torna-se possível a conservação de produtos agrícolas durante o armazenamento. A secagem também é importante no que concerne à produção e comercialização de produtos agrícolas (ATHIÉ et al., 1998). De acordo com AFONSO JÚNIOR et al. (2000), sementes com elevado teor de umidade, são mais susceptíveis a perda da viabilidade durante o período de armazenamento.

- **Impurezas**

A presença de materiais estranhos no lote de grãos armazenados, como restos culturais e de solo são, em potencial, absorventes e retentores de umidade. A umidade contida nesses materiais pode ser transferida para a massa do grão armazenado em níveis acima do necessário, facilitando o desenvolvimento de microrganismos (MACHADO, 1999).

- **Presença de insetos e ácaros**

A presença de insetos e ácaros em grãos armazenados favorece o desenvolvimento de fungos no armazenamento. Esses insetos conduzem os esporos no espaço intergranular da

massa de grãos e sementes armazenados, além de causarem danos aos grãos e sementes, facilitando a penetração desses microrganismos. Segundo WRIGHT (1986), a infestação de insetos em local de armazenagem, facilita a contaminação por micotoxinas.

Os danos provocados por insetos podem ser evitados ou reduzidos pelas operações de secagem, limpeza e controle químico dos insetos no campo, porém, no armazenamento, o controle de insetos associados é dificultado em função da necessidade de se adequar às condições ambientais do armazém com o uso de inseticidas (BERJAK, 1987).

- **Condições físicas dos grãos**

A injúria mecânica é tida como um dos mais sérios problemas da produção de sementes. Sendo consequência, na maior parte, da mecanização presente nas atividades agrícolas, apresentando-se como um problema inevitável. Uma semente pode ser mecanicamente injuriada durante a semeadura, o beneficiamento, o armazenamento, o transporte e a colheita. O conhecimento de como ocorre e dos fatores que intervêm na sua intensidade, pode facilitar seu controle (CARVALHO & NAKAGAWA, 2000).

Grãos danificados são mais susceptíveis a invasão por fungos que grãos inteiros. Os danos mais comuns são os resultantes das operações de colheita e beneficiamento e os causados por insetos. Na colheita e beneficiamento, os danos agravam-se com o tipo de máquina empregada, regulagem e grau de umidade dos grãos. Desta forma, grãos com alto teor de umidade, ao passar pelas máquinas sofrem diversos danos, muitas vezes não visíveis ao olho nu, os quais estão predispostos à contaminação cruzada por associação de fungos desde o campo (TICELLI, 2001).

- **Período de armazenagem**

O período de armazenamento está diretamente relacionado com todos os outros fatores que determinam o desenvolvimento fúngico em grãos armazenados. Para que os lotes de grãos sejam armazenados por um período longo, se faz necessário que os procedimentos de

secagem e de beneficiamento tenham sido corretamente executados, deixando os grãos livres de impurezas, com baixo nível de contaminação fúngica e baixo teor de água (DHINGRA, 1985).

A interação dos fatores ambientais temperatura e umidade relativa do ar, com a umidade da semente e danos mecânicos, podem favorecer a atividade fúngica durante o período de armazenamento (PAIVA et al., 1995), causando a deterioração durante a estocagem do produto.

- **Atmosfera de armazenamento**

Os fungos de grãos armazenados são predominantemente aeróbios, porém, a quantidade mínima de oxigênio que eles requerem para germinação dos esporos, crescimento e esporulação são variáveis. Diferentes cepas de *Aspergillus* variam muito com relação ao seu requerimento por oxigênio, podendo desenvolver-se em pequenas concentrações. Todavia, a temperatura e a umidade são os fatores mais utilizados para controle da contaminação (RESNIK, 1984).

2.5. Embalagens

Segundo LABUZA citado por ALVES (1995), os filmes utilizados em embalagens têm sido estudados exclusivamente em análise de armazenamento de alimentos desidratados.

Na embalagem o alimento é separado do ambiente externo com finalidade de reduzir a taxa de transporte de oxigênio ou vapor de água. A embalagem representa importância capital no esquema de produção de sementes, a sua eficiência dependerá dos resultados na conservação da qualidade e dos atributos que se pretende preservar na semente (ROTTA, 1974).

O tipo de embalagem influencia diretamente na conservação da qualidade das sementes, como ocorreu em trabalhos realizados por ALMEIDA et al., (1999) e AZEVEDO et al., (2003) com sementes de gergelim.

Segundo VASCONCELOS et al., (1992) as embalagens de polietileno liso proporcionaram melhores resultados em termos de manutenção da qualidade fisiológica de sementes de café do que o saco de aniagem. Para o amendoim, em estudos realizados por ALVES (1995), a embalagem de aniagem utilizada no armazenamento permitiu a troca de umidade entre o ar circundante e o produto, porém não impediu o desenvolvimento de aflatoxina.

De acordo com AZEREDO et al., (2005), embalagens metálicas são inadequadas para o armazenamento de amendoim sem casca em condições não controladas, pois não conservam a qualidade fisiológica das sementes durante o período de armazenamento.

Muitas embalagens permitem a atividade de água entre o produto e o ambiente, propiciando o desenvolvimento fúngico, porém, em levantamento realizado com embalagens hermeticamente fechadas de amendoim comercial, apesar de não permitirem a troca de umidade, o produto apresentou contaminação por aflatoxina em todos os lotes avaliados (GLÓRIA et al., 2006), mostrando que a maioria das contaminações ocorre nos processos que antecede o acondicionamento final do produto.

2.6. Micotoxinas

As micotoxinas são metabólitos tóxicos produzidos por algumas espécies de fungos, principalmente dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Muitas delas revelam efeitos tóxicos e degenerativos no consumidor, sendo nefrotóxicas e possivelmente carcinogênicas e teratogênicas (DHINGRA & COELHO NETO, 1998).

No amendoim, a micotoxina mais importante é a aflatoxina (dos tipos B e G), produzida por *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* principalmente em grãos com teores elevados de umidade (MANUAL DE SEGURANÇA ..., 2004).

Os efeitos de algumas micotoxinas são agudos, com sintomas de doenças severas surgindo rapidamente, outras micotoxinas promovem efeitos crônicos ou cumulativos na saúde, incluindo a indução do câncer e deficiência imunitária. Existem cinco grupos de micotoxinas: A. Deoxynivalenol/nivalenol; B. Zearalenona; C. Ochratoxina; D. Fumonisina; e E: Aflatoxina (MACHADO, 1999).

As micotoxinas de maior importância para a saúde humana em países tropicais são as fumonosinas e as aflatoxinas (MACHADO, 1999). Essas toxinas podem ser definidas como produtos microbianos que podem causar danos, e que estão reconhecidamente envolvidos no desenvolvimento de doenças (PASCHOLATI, 1995).

A contaminação de grãos e outros alimentos por fungos produtores de micotoxinas, sempre foi tratada como um problema de armazenamento, porém a contaminação pode ocorrer no campo (ROSSETO et al., 2003).

A presença de várias micotoxinas muitas vezes ocorre em apenas um produto, como foi descrito por SEKIYAMA et al., (2005) em produtos alimentícios a base de milho, resultado este, que corrobora com o encontrado por KAWASHIMA e VALENTE SOARES (2006).

A ocorrência desses fungos tem sido frequentemente relatadas nos mais diversos produtos. Como micotoxinas produzidas por *Fusarium graminearum* em cereais de inverno, da região sul do Brasil (GERALDO et al., 2006), em plantas medicinais de uso terapêutico (BUGNO et al., 2006), em amostras de sorgo (SILVA, 2004), e em produtos a base de milho (AMARAL et al., 2006; KAWASHIMA & VALENTE SOARES, 2006).

2.6.1. Fungos micotoxicogênicos

Dos microrganismos que invadem os grãos, os fungos são os mais tolerantes a baixa disponibilidade de água e são, conseqüentemente, importantes causas de deterioração de grãos e sementes (FONSECA, 1999).

Esses fungos, na grande maioria, são transportados pelo vento a longas distâncias. Os esporos também são dispersos durante a colheita do material, como também nos processos de limpeza e secagem. Alguns fungos podem também invadir os grãos durante o seu desenvolvimento ou após a maturação no campo. Ao crescerem produzem calor e umidade propiciando condições para os demais fungos se desenvolverem, com isso, se dá o processo de decomposição da massa de grãos, o qual é acelerado sempre que as condições de umidade e temperatura sejam favoráveis ao seu crescimento. Os principais danos dessa atividade consistem na redução do peso do grão, na redução da germinação e do vigor das sementes e na redução da qualidade do produto pelo aumento da deterioração, incluindo a presença de micotoxinas (REIS & TREZZI CASA, 1999).

A contaminação pode ser resultante de fungos filamentosos ou pluricelulares, os quais são produtores de substâncias tóxicas e estão freqüentemente associados com os alimentos. Os fungos do gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* estão largamente distribuídos na natureza, portanto, muitas vezes a contaminação não está restrita a poucas cepas de fungos, ao contrário é muito comum entre os fungos (ATHIÉ et al., 1998).

2.6.2. Aflatoxinas

O gênero *Aspergillus* pertence ao grupo *Hyphomycetos*, os quais são caracterizados pela formação de conidióforos, ou seja, hifas especializadas e produtoras de conídios com formas e arquitetura variáveis (PEREIRA et al., 2002).

A aflatoxina é um termo coletivo para um grupo de toxinas produzidas por cepas de *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* que apresentam comportamento ecológico e biológico bem distintos durante o seu desenvolvimento em um substrato favorável a sua produção. São altamente relacionadas e formam um grupo exclusivo de compostos heterocíclicos altamente oxigenados (como pode ser observado no ANEXO I). As duas principais formas de aflatoxinas são B e G (B₁, B₂, G₁ e G₂). A diferença estrutural entre elas é responsável pela altíssima variação na toxidez de cada uma, sendo a aflatoxina B₁ a mais tóxica e a mais comum de todas (DHINGRA & CORLHO NETO, 1998).

A ocorrência de aflatoxina em amendoim foi estudada em 1960, ano em que na Inglaterra, houve grande perda de peruzinhos alimentados com a ração em cuja composição entrava torta de amendoim (FONSECA, 1999).

No Brasil os primeiros estudos foram realizados em 1961, com relatos de toxidez em farelos de amendoim utilizados na alimentação de suínos e comprovados em testes com cobaias, a partir daí o efeito da aflatoxina foi estudado também na criação de aves e bovinos (FONSECA, 1999). Nesse momento observou-se o desenvolvimento de diversos estudos na área. Com o intuito de conhecer todos os efeitos dessa toxina.

Estudos realizados por FONSECA (1968), que avaliou a ocorrência de aflatoxina em tortas e farelos de amendoim no Estado de São Paulo, indicaram que as tortas provenientes da safra das “águas” apresentaram maior toxidez que as da “seca”, e que o material mesmo produzido no período da “seca” apresentaram alta faixa de toxidez.

A fonte primária do inóculo pode ser na forma de esporos. A umidade presente no solo facilita a propagação, seja através de restos culturais, lixo ou insetos. A propagação secundária pode ser através das partes florais (brácteas, pedúnculo, tronco). Deste modo, as partes florais são umas importantes fontes de produção dos conídios do fungo, podendo ser dispersos através do vento, de insetos os quais pode transportar conídios de uma planta a outra. Os fatores que influenciam a formação de aflatoxina são: substrato (solo ou o ambiente aéreo), umidade, danos mecânicos ou causados por insetos, stress causado pela seca, fertilidade do solo, densidade das populações de plantas (DIENER et al. 1995).

2.6.3. Micotoxicoses

As micotoxicoses são estados patológicos causados por micotoxinas fúngicas presentes nos alimentos nos quais os agentes se desenvolvem. Existem múltiplas micotoxicoses. As mais importantes são as provocadas pelos fungos: *Aspergillus flavus*, *A. Parasiticus*, *Fusarium graminearum*, *F. moniliforme*, *F. sporotrichioides*, *Claviceps purpureae* e *Acemonium coenophialum* (FEITOSA, 2005).

As toxinas produzidas por esses fungos são altamente resistentes, suportando até 260 °C e são produzidas de três a sete dias. As micotoxinas causam menor produtividade e maiores incidências de doenças, devido à imunossupressão e lesões de órgãos vitais como fígado (em animais). Esses sintomas só serão expressos de acordo com a quantidade de toxinas ingeridas (ANEXO II- Teores de aflatoxina permitidos nos alimentos), podendo ser letais ou revelar-se como quadro crônico, relacionado com a ação insidiosa e cumulativa sobre o estado geral do animal. Os seres humanos, quando expostos às aflatoxinas por meio da ingestão de alimentos contaminados por essas micotoxinas, podem apresentar diversos sintomas, como: vômitos, edema pulmonar, dor abdominal, coma, convulsões e morte. Aflatoxicoses agudas foram encontradas nos seres humanos em muitas partes do mundo, mais particularmente em países subdesenvolvidos (FEITOSA, 2005). Em estudos realizados por OLIVEIRA e GERMANO (1997) foi possível verificar a relação dos mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular em homens.

2.7. Uso de extratos naturais e óleos no controle de patógenos

As sementes de amendoim são freqüentemente contaminadas por fungos. Esta contaminação pode se dá nas sementes no campo (ROSSETO et al., 2003) e após a colheita (ITO et al., 1992).

A utilização de extratos vegetais como defensivo agrícola já é uma prática comum em pequenas hortas, por combaterem uma série de fungos, porém, os extratos apresentam na sua composição concentrações muito baixas dos princípios ativos, fazendo com que se comercialize muita água com valor de produto. A alternativa para este fato é a utilização dos óleos essenciais dessas plantas, pois as concentrações dos princípios ativos, contido nos óleos, são altas (INNECCO, 2003).

Na atualidade diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas, com o objetivo de melhor definir quais plantas podem ser utilizadas e quais patógenos podem ser controlados através da utilização de óleos e extratos. (SCHWAN-ESTRADA, 2003).

Os fungos comumente encontrados no amendoim são o *Aspergillus flavus* e o *A. parasiticus*, porém, pesquisas com óleos e extratos (folha e sementes) de nim (*Azadirachta indica*) têm mostrado potencial no controle direto desses fungos (ALLAMEH et al., 2002).

O uso de óleos naturais pode inibir a produção de aflatoxina em colônias de *Aspergillus parasiticus* (HASAN & MAHMOUD, 1999), resultado semelhante foi obtido por JUGLAL et al. (1998) para o mesmo fungo.

A utilização de óleos essenciais para o controle do *Aspergillus flavus* em milho causou a inibição no desenvolvimento do fungo, reduzindo significativamente a contaminação (MONTES – BELMONT & CARVAJAL, 2003). Extratos de agave (*Agave striata* e *A. asperrima*) diminuíram as percentagens de micotoxinas produzidas por *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* (SANCHEZ et al., 2005).

O uso dos componentes presentes em óleos e extratos no controle de patógenos se mostra com excelente ação antifúngica, apresentando-se como uma alternativa natural de uso (BETTIOL, 1991; TRIPATHI & DUBEY, 2004).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Armazenamento das sementes de amendoim

3.1.1. Local de condução do experimento

O trabalho foi desenvolvido pela Unidade Acadêmica de Engenharia Agrícola (UAEAg) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), juntamente com a Embrapa Algodão. Os experimentos foram instalados na cidade de Campina Grande (22 °C e 79 % URa) e no laboratório de Sementes do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba (CCA/UFPB), localizado na Cidade de Areia. O primeiro representava as condições ambientes e o segundo foi montado na câmara seca (25 °C e 64 % URa) do laboratório de Sementes.

3.1.2. Delineamento estatístico

Os dados obtidos experimentalmente foram analisados em um delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, seguindo o esquema fatorial de 2 x 2 x 2 x 4 separados da seguinte forma:

Ambientes de armazenamento

A₁ – câmara seca

A₂ – condições ambiente

Embalagens

EM₁ – saco multifoliado

EM₂ – saco de polietileno trançado

Beneficiamento

AM₁ – amendoim sem casca

AM₂ – amendoim com casca

Períodos de armazenamento

P₁ – 45 dias

P₂ – 90 dias

P₃ – 135 dias

P₄ – 180 dias

O ensaio foi constituído por 128 tratamentos, com exceção do período inicial (P₀), sendo 64 tratamentos de amendoim sem casca e 64 de amendoim com casca.

Os dados obtidos, experimentalmente, foram submetidos à análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade, e para os fatores quantitativos empregou-se a análise de regressão na variância sendo considerado para a escolha da melhor equação a significância do teste F, e o R² acima de 0,60 . O programa utilizado para a realização das análises estatísticas foi o ASSISTAT, versão 7.4 beta (SILVA & AZEVEDO, 2006).

3.1.3. Origem e acondicionamento das sementes

As sementes de amendoim, da variedade BR 1, utilizadas no experimento foram provenientes de um campo experimental pertencente a Embrapa Algodão, localizado na Cidade de Patos, PB.

Para obtenção das mesmas, as vagens depois de colhidas e secas ao sol foram acondicionadas e transportadas do centro de origem à cidade de Campina Grande em sacos de polietileno trançado. Ao chegarem à Embrapa Algodão, alguns dos sacos foram pesados e separados para o beneficiamento o qual foi realizada em máquina semi-mecânica utilizada para descascar grandes quantidades de frutos de amendoim. O total de amendoins sem casca e com casca, utilizados no experimento foi de 12 kg e 17 kg, respectivamente.

Foi realizada uma caracterização inicial do produto quanto à umidade, germinação, vigor (contagem do 5º dia) e aflatoxina, como podem ser observados na TABELA 4.

TABELA 4. Teor de umidade (base seca), germinação e vigor de semente de amendoim antes do armazenamento (P_0).

Características avaliadas	Período inicial (P_0)
Umidade Inicial (%) bs	6,45
Germinação do amendoim (%)	75
Vigor (Contagem do 5º dia) (%)	50
Aflatoxina	Não foi detectada

As sementes com e sem casca foram acondicionados em embalagens de polietileno trançado e papel multifoliado. A quantidade de amendoim, sem casca e com casca, utilizado para o enchimento de cada embalagem foi de 160 g e 220 g, respectivamente. Após o enchimento das embalagens, de acordo com o tratamento, as mesmas foram identificadas e transportadas para o local de armazenagem, onde foram distribuídas ao acaso.

A cada quarenta e cinco dias eram tiradas amostras referentes a um determinado período de armazenamento para a realização das análises. O período de armazenamento teve a duração de seis meses, com início em julho de 2006 e término em janeiro de 2007.

A separação da semente da vagem do amendoim com casca armazenado, deu-se em máquina semi-mecânica própria para esta operação, FIGURA 1.



FIGURA 1 – Máquina de descascar amendoim (Foto do autor)

Em cada período foram feitas as determinações de vigor, germinação, umidade e aflatoxina separadas da seguinte forma: 200 sementes para o teste de germinação; quatro repetições de 15 g de sementes para a determinação do teor de umidade; e as demais sementes

foram moídas para a da análise de aflatoxinas, no laboratório de Química da Embrapa Algodão.

3.1.4. Análises realizadas

- **Teste de germinação e vigor (primeira contagem da germinação)**

Os testes de germinação e vigor foram realizados em casa de vegetação, com umidade e temperatura controladas (25 °C e 60 % URa), utilizando-se 200 sementes por tratamento, distribuídos em quatro repetições de 50 sementes, tendo como substrato a vermiculita. A semeadura foi feita em bandeja plástica de 45 cm x 30 cm x 7 cm, correspondente ao comprimento, largura e altura, respectivamente.

Durante o teste foram realizadas duas avaliações, a primeira no 5º dia de instalação do experimento a qual consideramos o vigor e a segunda no 10º dia. Por ocasião de cada leitura contaram-se as plântulas normais, as anormais e as sementes não germinadas (duras e dormentes), seguindo os critérios contidos nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992).

- **Determinação do teor de umidade**

O teor de umidade foi determinado pelo método oficial da estufa descrito na Regras para Análises de Sementes (BRASIL, 1992), em que a umidade é obtida por diferença de peso entre a massa inicial e a final, depois da remoção da água pela ação do calor.

A porcentagem de umidade foi calculada com base no peso úmido aplicando-se a seguinte fórmula:

$$U = 100 \frac{(P - p)}{P - t}$$

Em que:

U = Umidade (%)

P = Peso inicial – o peso do recipiente e sua tampa mais o peso da semente úmida

p = Peso final – o peso do recipiente e sua tampa mais o peso da semente seca

t = Tara – o peso do recipiente com sua tampa

O teor de umidade foi realizado durante todo o período de armazenamento e os foram resultados expressos em percentagem pela média aritmética das quatro repetições.

- **Determinação da aflatoxina**

Preparação dos padrões

Os padrões de Aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ na forma de cristais, utilizados no ensaio, foram adquiridos nos Laboratórios Sigma Co U.S.A.

Realizou-se a preparação dos padrões de acordo com a metodologia descrita por SCOTT (1990). A dissolução dos padrões foi feita em metanol e a absorbância lida em 360 nm em um espectrofotômetro, no qual foram registrados os valores necessários para realização do cálculo de concentração, que é feito através da formula:

$$\mu\text{g}(\text{aflatoxina}) / \text{mL} = \frac{AxCFxPMx1000}{E}$$

Em que:

A = absorbância

CF = fator de calibração do espectrofotômetro

PM = peso molecular da aflatoxina

E = absortividade molar

Preparo das amostras para análise

O amendoim separado para realização da análise foi triturado em moinho de oleaginosa (FIGURA 2), e passado em uma peneira de 14 “mesh”, para obtenção da textura adequada requerida à realização das extrações.

Depois de peneirado, cada amostra foi acondicionada em embalagem hermeticamente fechada e colocada em freezer onde se mantiveram até a realização da extração.



FIGURA 2. Moinho de oleaginosas (Foto do autor)

Extração e limpeza das amostras

Para as extrações de aflatoxina adotou-se a metodologia descrita por RODRIGUES-AMAYA e SOARES (1989), melhorada por QUEIROZ (2006), conforme fluxograma da FIGURA 3 com suas respectivas fases FIGURA 4, cujo detalhamento encontra-se no ANEXO III.

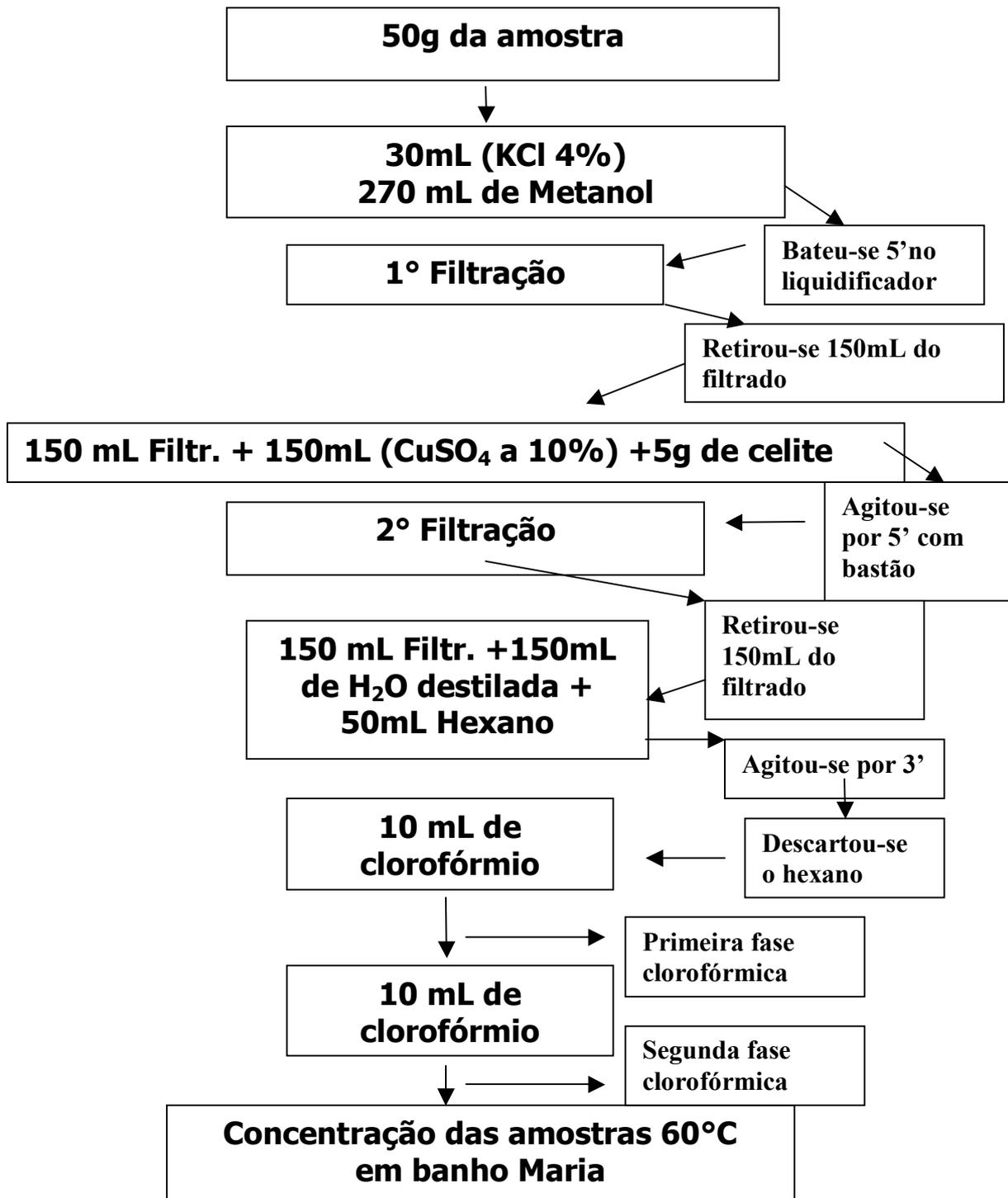


FIGURA 3. Extração da aflatoxina

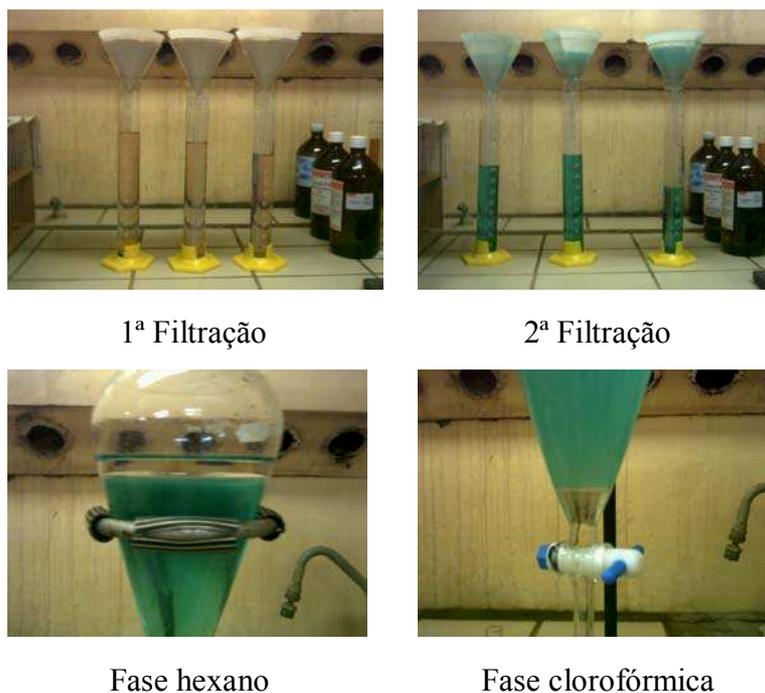


FIGURA 4. Extração e limpeza das amostras (Fotos do autor)

Após a concentração das amostras, estas foram mantidas sob refrigeração em freezer até o momento da análise cromatográfica, quando o concentrado foi ressuspenso em 500 μ l de metanol e agitado manualmente por 30 segundos.

A cromatografia foi realizada com quatro repetições em cromatofolhas de alumínio com 20×20 cm, de espessura 0.2 mm, da marca Merck (KIESEL GEL-60 / 1.05553).

As cromatofolhas foram marcadas a 2 cm da margem, que é o ponto de partida (Start), distanciando-se 10 cm da linha de chegada da fase móvel (Front) e a separação de 1 cm para a aplicação dos padrões e das amostras como pode ser observado no esquema da FIGURA 5:

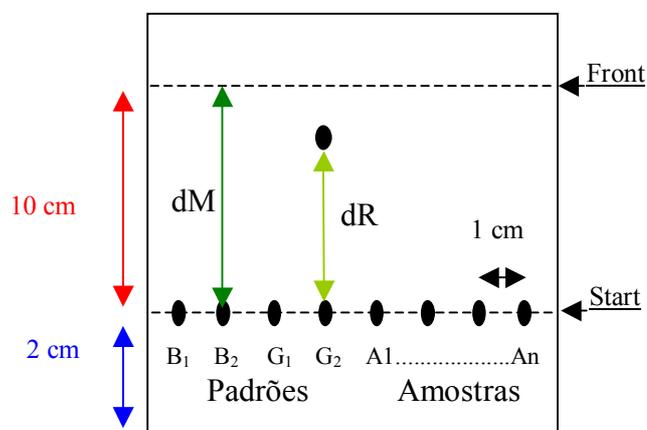


FIGURA 5. Esquema de Cromatofolha

Identificação das Aflatoxinas

A triagem das aflatoxinas nas amostras foi realizada através de cromatografia em camada delgada, utilizando-se cromatofolhas de alumínio e a mistura tolueno, acetato de etila e ácido fórmico, nas proporções de 60: 30: 10, respectivamente, como fase móvel.

Nas cromatofolhas foram aplicados 10 μ l das amostras e 10 μ l dos padrões B₁, B₂, G₁ e G₂, distribuídos individualmente em pontos marcados nas placas, conforme FIGURA 5. Após a aplicação dos padrões e amostras, as placas foram colocadas em uma cuba que continha a fase móvel. Após a eluição, a cromatofolha foi retirada da cuba (FIGURA 6) e esperou-se a evaporação da solução para que a mesma fosse colocada na câmara com luz ultravioleta de 366 nm.

Quando a amostra aplicada apresentava manchas comparáveis aos padrões, a mesma era submetida ao teste de confirmação por meio de pulverização da placa com uma solução de ácido sulfúrico a 20 % e submetida à luz ultravioleta. As manchas positivas apresentavam uma coloração amarelada.

Nas amostras que foram detectadas aflatoxinas foi realizada uma nova cromatografia para a identificação, mediante a cor, a intensidade da fluorescência e a comparação dos R_fs (fator de retenção) das amostras com a dos padrões das aflatoxinas. Nesse procedimento utilizou-se a fase móvel clorofórmio e acetona, nas proporções de 90:10, respectivamente, como também foi alterado a aplicação da amostra de 10 μ l para 20 μ l, com o objetivo de melhor visualização das aflatoxinas.

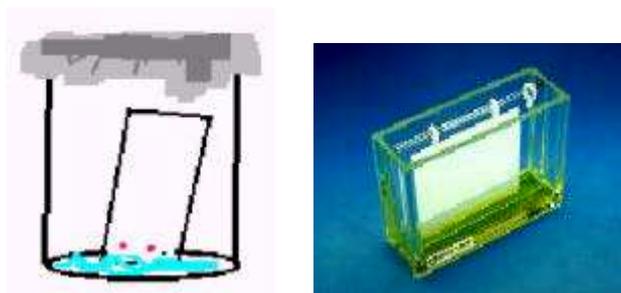


FIGURA 6. Cuba de revelação

A segunda confirmação para a aflatoxina B₁, nas amostras que deram positivas, foi através do teste de derivação química, para a qual foi utilizada a metodologia de SCOTT (1990). Este teste é usado como forma de reduzir resultados falso-positivos.

Preparou-se uma solução de ácido trifluoracético com água, na proporção de 1:2, respectivamente, sendo colocado em vidro âmbar e identificado. Homogeneizou-se manualmente e aplicou-se 2 µl da solução obtida em cima das amostras e padrões que desejava-se visualizar a derivação química (FIGURA 7). A placa foi colocada em estufa a 40° C por 10 min., após este tempo a mesma foi retirada da estufa deixada esfriar e eluída na fase móvel clorofórmio e acetona, nas proporções de 90:10, respectivamente.

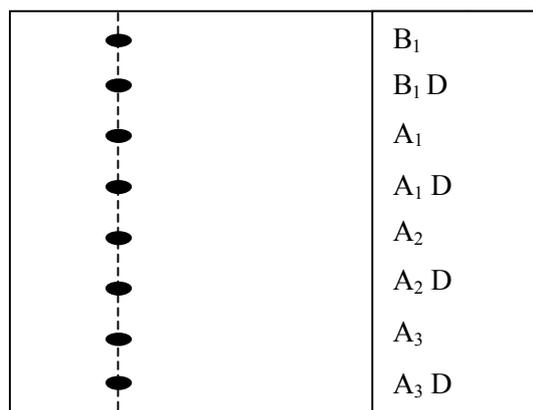


FIGURA 7. Modelo de placa do teste de derivação química

3.2. Avaliação do crescimento micelial do fungo *Aspergillus flavus*

O trabalho foi desenvolvido através da parceria da UFCG/Embrapa Algodão, sendo o experimento conduzido no laboratório do setor de Fitopatologia da Embrapa Algodão, na cidade de Campina Grande, PB, no período compreendido de dezembro de 2006 a fevereiro de 2007.

3.2.1. Obtenção dos Isolados

O fungo *Aspergillus flavus* foi isolado a partir de sementes de amendoim de três diferentes regiões do Estado da Paraíba, Patos, Mogeiro e Campina Grande. As sementes foram lavadas com hipoclorito de sódio a (3%) e depois com água destilada, as mesmas foram secas e colocadas em placas de petri, contendo o meio BDA. Em cada placa foram colocadas oitos sementes. Após um período de incubação de 48 horas, a 24 °C e sob luz constante na BOD, foi realizado o isolamento direto do fungo com o auxílio de um bastão de vidro e microscópio óptico, os quais foram retirados do bordo das colônias, transferidos para um meio de BDA, identificadas de acordo com a origem de cada semente.

3.2.2. Delineamento estatístico

As taxas de crescimento do *Aspergillus* foram analisadas em um delineamento inteiramente casualizado, seguindo o esquema fatorial de 3 x 5 com quatro repetições, representado pelos os isolados (IM – isolado de Mogeiro; IP – isolado de Patos; ICG – isolado de Campina Grande) e as concentrações do óleo de nim no meio de cultura (C₀ – testemunha; C₁ – 3,125 %; C₂ – 6,25 %; C₃ – 12,5 %; C₄ – 25 %).

Os valores da taxa de crescimento micelial foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação das médias foi determinada pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade, os dados também foram submetidos à análise de regressão. O programa

utilizado para a realização das análises estatísticas foi o ASSISTAT, versão 7.4 beta (SILVA & AZEVEDO, 2006).

3.2.3. Análises realizadas

- **Crescimento micelial**

O meio BDA foi preparado e depois de pronto foi medido e distribuído em erlenmeyer de 500 mL, na quantidade de 200 mL e esterilizado em autoclave. O óleo de nim (*Azadirachta indica*) foi adicionado ao meio de BDA, de modo a se obter concentrações de 3,125; 6,25; 12,5; e 25 %. As quantidades de óleo adicionadas referem-se à quantidade de meio retirada de cada erlenmeyer. Placas contendo somente BDA serviram como testemunhas.

Preparou-se uma solução com Agar-água esterilizada que, quando apresentou uma temperatura de 40 °C, foi colocada em placas de petri, contendo os isolados (a partir de colônias com quatro dias de idade, crescidas em placas com BDA, sob luz contínua e a 24 °C), sendo agitada com um alça de vidro. Após este procedimento verteu-se o conteúdo da placa em uma outra placa esterilizada, tampou-se e identificou-se.

Utilizaram-se discos de 5 mm de papel de filtro, que foram transferidos individualmente para o centro de cada uma das placas componentes de cada tratamento após serem embebidos na solução com fungo e Agar-água. A incubação foi realizada sob luz contínua, a uma temperatura de 24 °C, por um período de seis dias. Para cada tratamento, foram utilizadas quatro placas de petri. Para montagem do experimento final, foi necessária a realização de testes preliminares com as concentrações determinadas.

A avaliação do efeito dos extratos sobre o crescimento micelial, realizada do 1º ao 6º dia após a repicagem, foi feita através de medições do crescimento do diâmetro da colônia em dois eixos ortogonais, e posteriormente, calculada a média.

- **Germinação dos esporos**

A suspensão de esporos foi preparada adicionando-se 20 mL de água destilada esterilizada. A qual foi ajustada para 10^5 esporos / mL, utilizando-se hemacitômetro. As concentrações do óleo de nim, testadas e preparadas, foram vertidas em lâminas de microscopia utilizando-se uma pipeta automática. Foi adicionado sobre o meio de cultura, ajustado as diferentes concentrações do óleo de nim (3,125; 6,25; 12,5; e 25 %), 100 µl da suspensão de esporos dos isolados de *Aspergillus flavus*. A testemunha foi constituída por placas contendo o meio Agar-água, sem adição do óleo. As lâminas foram acondicionadas em caixas de plástico, tipo gerbox, e mantidas em temperatura de 25 ± 2 °C durante 10 horas, depois desse período a germinação dos conídios foi avaliada com microscópio óptico, no qual foram tiradas fotografias para a contagem dos esporos germinados e não germinados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Armazenamento

O resumo das análises de variância e os coeficientes de variação correspondentes a germinação, vigor e umidade obtidos em função das sementes de amendoim da variedade BR1 armazenadas em ambiente natural e câmara seca, com e sem casca, acondicionadas em embalagens de papel multifoliado e polietileno trançado, por quatro períodos de armazenamento, encontram-se na TABELA 5. Para a germinação os efeitos significativos foram: ambiente, embalagem, período de armazenamento e as interações, ambiente versus período de armazenamento e embalagem versus beneficiamento. Para o vigor observa-se que os efeitos significativos foram ambiente, embalagem, beneficiamento e as interações, ambiente versus beneficiamento, ambiente versus período de armazenamento, embalagem versus período de armazenamento e beneficiamento versus período de armazenamento. Para o fator umidade os valores significativos foram observados para ambiente, embalagem, beneficiamento, período de armazenamento e as interações, ambiente versus embalagem, ambiente versus beneficiamento, embalagem versus beneficiamento e beneficiamento versus período de armazenamento.

TABELA 5. Resumo da análise de variância da germinação, do vigor e da umidade, de sementes de amendoim da variedade BR 1, acondicionadas em dois ambientes (condições ambiente e câmara seca), dois tipos de embalagem (papel multifoliado e polietileno trançado), com e sem casca e quatro períodos de armazenamento (45, 90, 135, 180 dias).

F.V.	Quadrados Médios			
	G.L.	Germinação	Vigor	Umidade
Ambiente (F1)	1	73,50781 [*]	212,69531 ^{**}	0,61744 ^{**}
Embalagem (F2)	1	89,44531 ^{**}	745,94531 ^{**}	1,40072 ^{**}
Beneficiamento (F3)	1	5,69531 ^{ns}	46,32031 [*]	0,33518 ^{**}
Período de armazenamento (F4)	3	48,65365 ^{**}	11,88281 ^{ns}	0,58071 ^{**}
F1xF2	1	23,63281 ^{ns}	0,07031 ^{ns}	1,75079 ^{**}
F1xF3	1	15,82031 ^{ns}	51,25781 ^{**}	0,24939 [*]
F1xF4	3	120,02865 ^{**}	29,52865 ^{**}	0,05390 ^{ns}
F2xF3	1	61,88281 [*]	6,57031 ^{ns}	0,30713 ^{**}
F2xF4	3	14,38281 ^{ns}	168,44531 ^{**}	0,05487 ^{ns}
F3xF4	3	17,50781 ^{ns}	32,52865 ^{**}	0,32839 ^{**}
F1x2x3	1	279,07031 ^{**}	0,07031 ^{ns}	0,80804 ^{**}
F1x2x4	3	4,23698 ^{ns}	5,61198 ^{ns}	0,12567 [*]
F1x3x4	3	13,38281 ^{ns}	32,34115 ^{**}	0,06635 ^{ns}
Int.F2x3x4	3	3,52865 ^{ns}	43,65365 ^{**}	0,04694 ^{ns}
F1x2x3x4	3	4,71615 ^{ns}	23,69531 [*]	0,02423 ^{ns}
Resíduo	96	11,93490	7,05990	0,03990
Total	127			
CV (%)		6.04017	6.42308	2.63216

^{**} Significativo ao nível de 1 % de probabilidade ($p < .01$); ^{*} Significativo ao nível de 5 % de probabilidade ($.01 < p < .05$); ^{ns} Não significativo ($p > .05$).

4.1.1. Germinação

Os resultados referentes à interação ambiente versus período de armazenamento podem ser observados na FIGURA 8, na qual se notam oscilações na germinação durante todo o período de armazenamento. Observa-se que as maiores percentagens de germinação foram obtidas nas condições de câmara seca no terceiro e quarto período. Provavelmente, vários fatores podem ter influenciado esses resultados.

A alta variabilidade nos percentuais de germinação durante os períodos de armazenagem foi ocasionado pela falta de seleção das sementes antes da estocagem, aliado a esse fator podem ser citado, a presença de insetos em alguns tratamentos e ao substrato

utilizado. Quanto à redução da germinação durante o armazenamento, quando comparado aos valores de caracterização (TABELA 4). Isso se deve ao fato, que os percentuais de germinação das sementes podem ser influenciados pela qualidade inicial das mesmas e também pela sua própria estrutura física e genética, além, de sofrerem a influência do ambiente de armazenamento. Segundo trabalho realizado por AZEREDO et al., (2005), com armazenamento de amendoim com e sem casca, por um período de 12 meses, nas condições ambiente e câmara seca, também foi verificado a redução dos percentuais de germinação ao longo do período de armazenamento. Para TICELLI (2001), a germinação do amendoim pode diminuir por danos mecânicos, ocasionados pelo descascamento. Segundo ALMEIDA et al., (1999), a germinação de gergelim foi reduzida ao longo do armazenamento e a qualidade fisiológica da semente influenciada pelo local de estocagem.

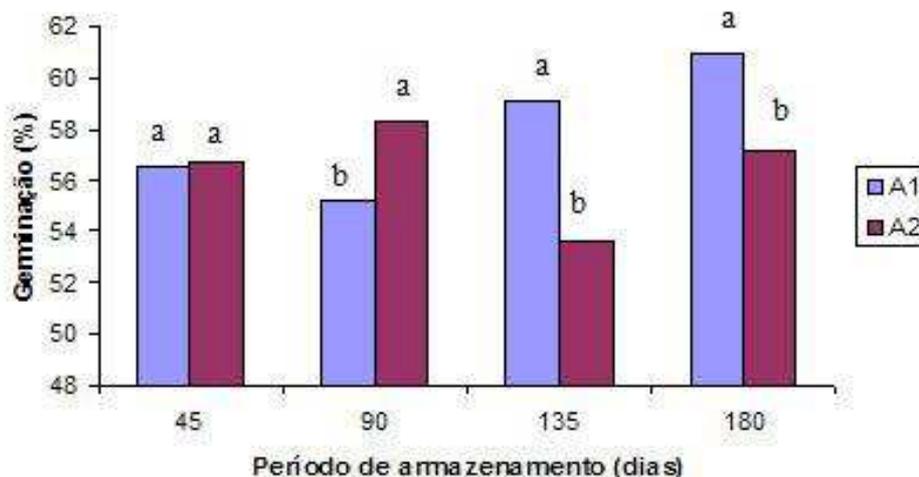


FIGURA 8. Valores médios de germinação (%) de sementes de amendoim, da variedade BR1, armazenadas em condição de câmara seca (A1) e em condição ambiente (A2), por 180 dias.

O comportamento da germinação das sementes de amendoim, da variedade BR 1, com ou sem casca, armazenadas nas embalagens de papel multifoliado e polietileno trançado, pode ser observado na TABELA 6.

Ao compararmos o efeito entre embalagens, nota-se que as médias de germinação das sementes estocadas com casca, nas duas embalagens estudadas não diferiram estatisticamente entre si. No entanto, para o amendoim armazenado fora do fruto, as embalagens de papel multifoliado obtiveram maior germinação do que as de polietileno trançado.

Quanto à influência do beneficiamento na germinação, observa-se que os amendoins armazenados nos frutos apresentaram maior germinação nas duas embalagens estudadas, quando comparada aos amendoins estocados sem casca. Porém, só foi observado diferença estatística no amendoim armazenado nas embalagens de papel multifoliado. Neste caso verifica-se que as sementes armazenadas sofrem a influência da umidade, da temperatura, do tipo de embalagem e do beneficiamento sofrido pela semente. MORAES (1996), afirmou que sementes de amendoim armazenadas dentro dos frutos conservam melhor a viabilidade. Já para GURJÃO (1995), sementes de amendoim armazenadas fora dos frutos estão mais susceptíveis ao ataque de pragas.

TABELA 6. Valores médios de germinação (%) para a interação Embalagem x beneficiamento de sementes de amendoim da variedade BR 1, armazenadas por 180 dias.

Embalagens	Beneficiamento	
	Amendoim com casca	Amendoim sem casca
Papel multifoliado	58,9375 aA	57,1250 aB
Polietileno trançado	56,8438 aA	55,8750 bA

DMS para colunas = 1,7146 (classificação em letras minúsculas); DMS para linha = 1,7146 (classificação em letras maiúsculas). As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente

4.1.2. Primeira contagem da germinação

Observando-se os resultados da interação ambiente versus beneficiamento para o vigor das sementes de amendoim, da variedade BR1, armazenadas por 180 dias (TABELA 7). Nota-se que os percentuais de vigor, no ambiente de câmara seca, apresentaram diferença estatística para os amendoins armazenados com e sem casca. No entanto, na condição ambiente, o vigor do amendoim com casca foi significativamente maior que os sem casca. Entretanto, ao comparar os ambientes verifica-se que o vigor do amendoim com casca não diferiu estatisticamente nos dois ambientes de armazenamento. O amendoim sem casca apresentou maior vigor nas condições de câmara seca.

TABELA 7. Valores médios de vigor (%) para a interação beneficiamento x ambiente de armazenamento, de sementes de amendoim da variedade BR 1, armazenadas por 180 dias.

Beneficiamento	Ambientes de armazenamento	
	Câmara seca	Condição ambiente
Amendoim com casca	42,6250 aA	42,6875 aA
Amendoim sem casca	41,3125 aA	38,8438 bB

DMS para colunas = 1,3187 (classificação em letras minúsculas); DMS para linha = 1,3187 (classificação em letras maiúsculas). As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Vigor inicial (P_0) = 50 %.

Na FIGURA 9, verifica-se que as sementes de amendoim armazenadas nas condições de câmara seca apresentaram um decréscimo do vigor durante o período de armazenamento, o qual oscilou de 44,87 % a 42 %, mantendo-se significativamente superior ao vigor das sementes armazenadas sob condições ambientes, as quais variaram de 39,5 % a 40,12 %. Nas condições de câmara seca, não houve diferenças estatísticas no vigor das sementes com e sem casca

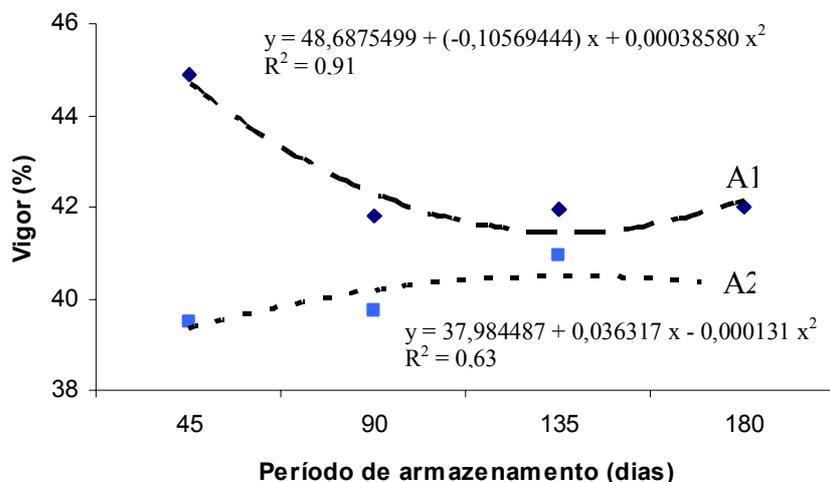


FIGURA 9. Valores médios de vigor (%) de sementes de amendoim, da variedade BR1, armazenadas em câmara seca (A1) e em condição ambiente (A2), por 180 dias.

Ainda referido-se ao vigor, na FIGURA 10 pode ser observado que as sementes armazenadas nas embalagens de papel multifoliado apresentaram maior vigor do que as armazenadas em polietileno trançado, numa variação de 42,06 % a 46,12% e 42,31 % a 36 %, respectivamente, para as citadas embalagens.

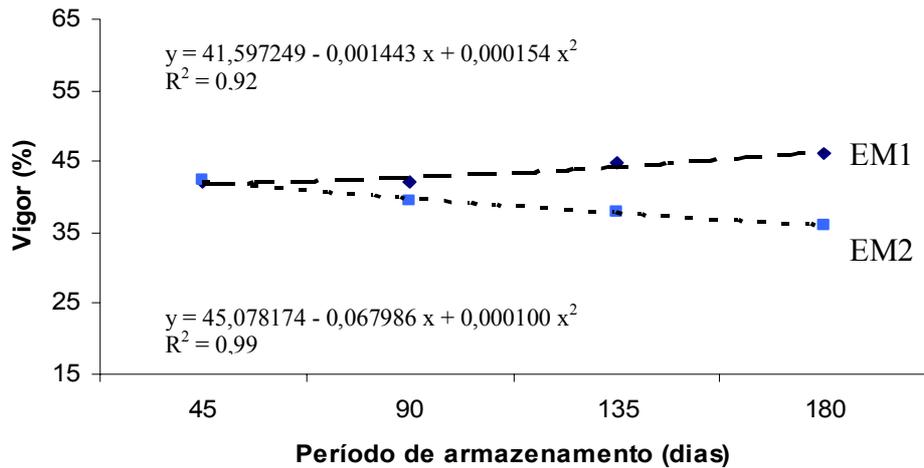


FIGURA 10. Valores médios de vigor (%) de sementes de amendoim, da variedade BR1, armazenadas em embalagens de papel multifoliado (EM1) e de polietileno trançado (EM2), por 180 dias.

Na interação beneficiamento versus período de armazenamento (FIGURA 11), o vigor do amendoim com casca diferiu estatisticamente do sem casca, durante o período de armazenamento, exceto para os períodos 2 (90 dias) e 3 (135 dias). Os valores médios variaram de 43,31 % a 42,68 %, para o amendoim com casca, e de 41,06 % a 39,44 %, para o amendoim sem casca.

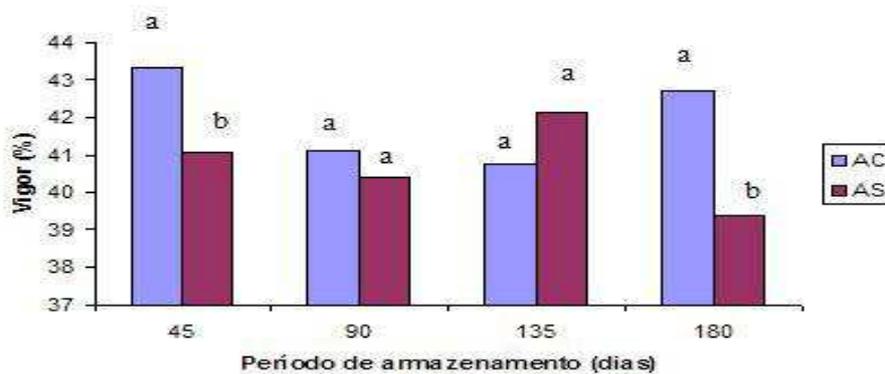


FIGURA 11. Valores médios de vigor (%) de sementes de amendoim, da variedade BR1, armazenadas com casca (AC) e sem casca (AS), por 180 dias.

Nos resultados de vigor obtidos durante o armazenamento, verifica-se a influência da atmosfera de armazenamento sobre a conservação da viabilidade das sementes. Seja o fator

beneficiamento, embalagem ou ambiente de armazenamento, a qualidade da semente não é melhorada durante o período de estocagem. Observa-se ainda, que houve um decréscimo do vigor durante o período de armazenamento quando comparado a caracterização inicial, isso ocorre independente dos ambientes de armazenamento, beneficiamento e embalagens, porém, este decréscimo pode ser verificado com maior frequência nas sementes sem casca. Estes resultados corroboram com os encontrados por RESENDE et al. (1996) e AZEREDO et al., (2005) os quais verificaram que as sementes perdem vigor mais rapidamente sob condições não controladas. Em trabalhos realizados por ALMEIDA et al. (1999), também foi verificado o decréscimo da viabilidade de sementes durante o período de armazenamento.

A conservação da qualidade fisiológica das sementes armazenadas está diretamente ligada ao tipo de embalagem empregada (POPINIGS, 1985), e as condições ambiente que essas sementes estão submetidas. Isso vai influenciar a preservação do vigor das sementes. Dessa forma, as melhores condições para manutenção da qualidade fisiológica das sementes são aquelas de baixa umidade relativa do ar e temperatura.

Como pode ser observado nos resultados obtidos, a variação no vigor das sementes durante o período de armazenamento, principalmente pela falta de seleção, mostra a importância de utilizar sementes com potencial fisiológico conhecido, assim reduziria a grande variabilidade.

4.1.3. Teor de umidade

Os valores médios de umidade das sementes de amendoim armazenadas por 180 dias, referente à interação ambientes x embalagens, encontram-se na TABELA 8, na qual pode ser observada que nas condições de câmara seca as sementes de amendoim armazenadas em papel multifoliado apresentaram menor teor de umidade do que as das embalagens de polietileno trançado. Na condição ambiente, não houve diferenças estatística entre as médias das embalagens. Ao compararmos os ambientes de armazenamento desta mesma interação, verificou-se que a umidade das sementes armazenadas na embalagem de papel multifoliado nas condições de câmara seca, foi significativamente menor do que na condição ambiente, no entanto, entre as embalagens de polietileno trançado não foi observado diferenças estatística.

TABELA 8. Valores médios de umidade (%) para a interação ambientes de armazenamento x embalagens, de sementes de amendoim da variedade BR 1, armazenadas por 180 dias.

Embalagens	Ambientes de armazenamento	
	Câmara seca	Condição ambiente
Papel multifoliado	7,2981 bB	7,7413 aA
Polietileno trançado	7,6709 aA	7,6463 aA

DMS para colunas = 0,0991 - classificação em letras minúsculas; DMS para linhas = 0,0991 - classificação em letras maiúsculas. As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si. * Umidade inicial = 6,45 % em base seca.

Para a interação ambiente de armazenamento x beneficiamento apresentado na TABELA 9, verificou-se que, a umidade do amendoim com casca acondicionado sob condições de câmara seca não diferiu estatisticamente dos sem casca, no entanto, sob condições ambiente a umidade das sementes de amendoim com casca armazenada apresentaram-se significativamente inferior as sem casca. Na comparação dos ambientes não foi observado diferenças estatística para os amendoins sem casca acondicionados nos dois ambientes, porém, o amendoim com casca do ambiente de câmara seca apresentou-se com umidade superior aos da condição ambiente.

TABELA 9. Valores médios de umidade (%) para a interação ambiente de armazenamento x beneficiamento, de sementes de amendoim da variedade BR 1, armazenadas com e sem casca.

Beneficiamento	Ambientes de armazenamento	
	Câmara seca	Condição ambiente
Amendoim com casca	7,6150 aA	7,4244 bB
Amendoim sem casca	7,6656 aA	7,6516 aA

DMS para colunas = 0,0991 (classificação em letras minúsculas); DMS para linhas = 0,0991 (classificação em letras maiúsculas). As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

* Umidade inicial = 6,45 % em base seca.

Os valores de umidade dos amendoins com e sem casca acondicionados nas embalagens de papel multifoliado e polietileno trançado referente à interação embalagens x beneficiamento são encontrado na TABELA 10. De acordo com os resultados apresentados nessa tabela, nota-se que nas embalagens de papel multifoliado, o amendoim com casca apresentou menor umidade do que os sem casca, os quais diferiram estatisticamente entre si. Resultados semelhantes foram observados para embalagem de polietileno trançado. Na comparação entre embalagens verificou-se que os amendoins com casca apresentaram maior

umidade em papel multifoliado e os amendoins sem casca não apresentaram diferença significativa entre as embalagens.

TABELA 10. Valores médios de umidade* (%) para a interação embalagens x beneficiamento, de sementes de amendoim da variedade BR 1, armazenadas com e sem casca.

Beneficiamento	Embalagens	
	Papel multifoliado	Polietileno trançado
Amendoim com casca	7,5847 bA	7,3844 bB
Amendoim sem casca	7,6959 aA	7,6916 aA

DMS para colunas = 0,0991 (classificação em letras minúsculas); DMS para linhas = 0,0991 (classificação em letras maiúsculas). As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

*Umidade inicial = 6,45 % em base seca.

A variação de umidade durante o período de armazenamento dos amendoins com e sem casca, pode ser observada na FIGURA 12, onde nota-se que o amendoim sem casca, apesar de apresentar umidade significativamente menor quando comparado aos com casca nos três primeiros períodos de armazenamento, apresentou um aumento significativo no teor de umidade no quarto período. Os teores de umidade das sementes sem e com casca variaram entre 7.38 % a 7.85 % e 7.56 % a 7.69 %, respectivamente.

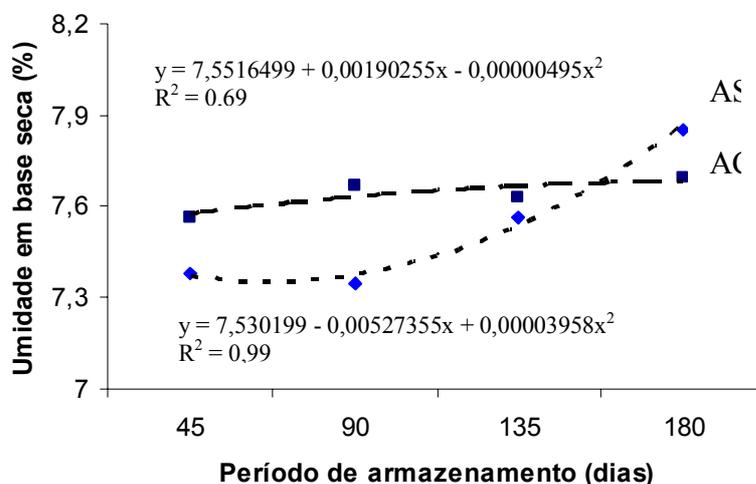


FIGURA 12. Valores médios de umidade (%) de sementes de amendoim, da variedade BR1, armazenadas com casca (AC) e sem casca (AS), por 180 dias.

Durante o período de armazenamento, tanto nas condições ambientes, como em câmara seca, a umidade variou em maior escala nos amendoins sem casca. Em relação aos ambientes de armazenamento, uma maior umidade pode ser verificada nas condições ambientes. Essa alta umidade atingida se dá pelas variações da atmosfera não controlada de armazenamento, a que as sementes foram submetidas.

Em síntese aos resultados apresentados, nota-se que a embalagem de papel multifoliado para ambos os beneficiamentos e ambientes conservou as sementes das variações do ar circundante, quando comparado aos de polietileno trançado. Quanto ao beneficiamento, as sementes com casca apresentaram umidades inferiores ao sem casca independente do ambiente de armazenamento. Estes resultados corroboram com os encontrados por MORAES (1996), no armazenamento de amendoim com e sem casca. AZEREDO et al. (2005) no armazenamento de amendoim sem casca também verificou o aumento da umidade durante o período de armazenamento. AFONSO JÚNIOR et al. (2000), verificaram que a umidade das sementes e suas interações afetaram a germinação das sementes de soja durante o período de armazenamento.

4.1.4. Aflatoxina

Não foi observado o surgimento de aflatoxina no amendoim armazenado. Este comportamento deve-se, provavelmente, ao fato de que o fungo *Aspergillus flavus* necessita de ambiente adequado e tempo para se desenvolver. Ademais, é de se relatar que o teor de umidade das sementes se apresentava baixo, o qual, não favorecia o desenvolvimento do fungo.

Estes resultados encontram apoio nos de ALVES (1995), que analisou teores de aflatoxina em sementes de amendoim armazenadas em diferentes embalagens, em que observou-se que as condições de armazenamento não influenciaram no surgimento da aflatoxina em sementes de amendoim que não estavam contaminadas, porém, aquelas que se apresentavam contaminadas antes do armazenamento aumentaram seus teores durante o período de estocagem.

A umidade que as sementes adquiriram durante o período de armazenamento não foi suficiente para que o fungo *Aspergillus flavus*, presente nas sementes, produzisse a aflatoxina. PEREIRA et al., (2002), afirmaram que a atividade de água para o crescimento do fungo *A. flavus* é de 95 %. No entanto, nestas condições, se a semente possuir 11 % de umidade estes fungos se desenvolvem e produzem a aflatoxina.

A ausência de contaminação nas sementes durante os períodos de armazenamento indica que as condições das sementes, aliadas às embalagens e ao ambiente de armazenamento, influenciaram positivamente no controle dessa toxina, garantindo a qualidade

final do produto. Os resultados obtidos corroboram com os encontrados por QUEIROZ et al., (2006), no armazenamento de amendoim em câmara fria e condições naturais, no qual, as condições de armazenamento não permitiram a produção de aflatoxina, durante o período de 180 dias.

4.2. Influência do óleo de nim no desenvolvimento do fungo *Aspergillus flavus*

4.2.1. Crescimento micelial

A análise de variância da taxa de crescimento micelial do fungo *Aspergillus flavus* (cm), para diferentes concentrações de óleo de nim (*Azadirachta indica*) obtida experimentalmente, revelou valores significativos para as concentrações utilizadas no experimento, e a interação isolado x concentrações, os quais podem ser observado na TABELA 11.

Os resultados da interação, isolados x concentrações para taxa de crescimento do fungo *Aspergillus flavus*, em diferentes concentrações do óleo de nim, encontram-se na TABELA 12, e a influência do óleo de nim sobre os isolados pode ser encontrada na FIGURA 13. Ao compararmos o efeito das concentrações de óleo de nim entre os isolados, nota-se que, na concentração C₀ não houve diferença estatística na taxa de crescimento entre os mesmos. Na C₁, o crescimento do isolado de Mogeiro não diferiu estatisticamente dos demais isolados, entretanto, verifica-se que o isolado de Patos obteve a maior média da taxa de crescimento nesta concentração. Para C₂, os isolados de Patos e de Campina Grande obtiveram as maiores taxas de crescimento quando comparadas a de Mogeiro. Em C₃, o crescimento micelial do isolado de Mogeiro apresentou-se estatisticamente superior às concentrações de Patos e Campina Grande, as quais, não diferiram entre si. Para a última concentração (C₄), o isolado de Patos foi o que sofreu o maior efeito na taxa de crescimento micelial, no entanto, não apresentou diferença estatística quando comparado ao o isolado de Mogeiro. O isolado de Campina Grande apresentou maior taxa de crescimento micelial, porém, também não diferiu estatisticamente do isolado de Mogeiro. As reduções no na taxa de crescimento comprova a eficiência da ação do óleo de nim

TABELA 11. Análise de variância e regressão do crescimento micelial de três isolados do fungo *Aspergillus flavus* submetidos a cinco concentrações do óleo de nim (*Azadiractha indica*)

Fonte de variação	G.L.	QM	R ²
Isolados	2	0,00417 ^{ns}	
Concentrações do óleo de nim	4	3,05334 ^{**}	
I solados x Concentrações	8	0,03152 ^{**}	
Resíduo	45	0,00281	
Total	59		
Coeficiente de variação (%)			3.80474
Isolado de Mogeiro			
Linear	1	3,67842 ^{**}	0,73337
Quadrática	1	0,21502 ^{**}	0,90312
Cúbica	1	0,11449 ^{**}	0,99966
CV(%)			2,91229
Isolado de Patos			
Linear	1	4,61041 ^{**}	0,80325
Quadrática	1	0,08331 ^{**}	0,99452
Cúbica	1	0,00110 ^{ns}	
CV(%)			3,92885
Isolado de Campina Grande			
Linear	1	3,42225 ^{**}	0,72552
Quadrática	1	0,17831 ^{**}	0,97299
Cúbica	1	0,00306 ^{ns}	
CV(%)			4,44107

* Significativo ao nível de 5 % de probabilidade ($.01 < p < .05$)

** Significativo ao nível de 1 % de probabilidade ($p < .01$); ^{ns} Não significativo ($p \geq .05$)

TABELA 12. Taxa de crescimento micelial de três isolados de *Aspergillus flavus*, em resposta ao uso de cinco diferentes concentrações de óleo de nim.

Isolados	Condição ambiente				
	C ₀ (testemunha)	C ₁ (3,125 %)	C ₂ (6,25 %)	C ₃ (12,5 %)	C ₄ (25 %)
Mogeiro	2,1850 aA	1,5775 abB	1,2350 bC	1,1850 aC	0,8650 abD
Patos	2,1475 aA	1,6450 aB	1,3825 aC	0,9450 bD	0,8000 bE
Campina Grande	2,1100 aA	1,5300 bB	1,3825 aC	0,9800 bD	0,9225 aD
	DMS _C = 0,1065		DMS _L = 0,0908		

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

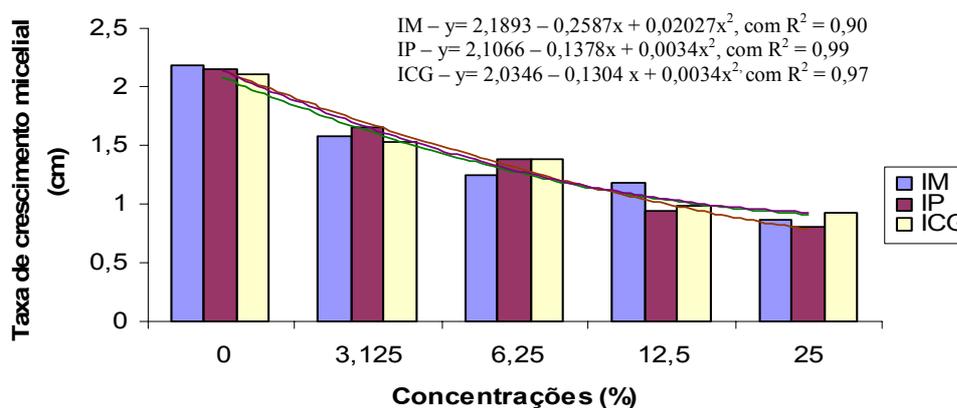


FIGURA 13. Comparativo das taxas de crescimento micelial dos isolados analisados, nas diferentes concentrações.

A inibição do crescimento micelial do fungo *Aspergillus flavus*, em meio de cultura contendo nim, é uma resposta às propriedades existentes nas folhas e sementes desta planta. Segundo ZERIGUE e BHATNAGAR (1994), os produtos a base de nim possuem uma complexa mistura de compostos voláteis com propriedades antifúngicas que afetam o desenvolvimento do *Aspergillus* e, conseqüentemente, inibem a produção da aflatoxina.

De acordo com ALLAMED et al., (2002), colônias de *Aspergillus* submergidas em extratos de folhas de nim reduzem a produção de aflatoxina em 23 %. Esta redução está relacionada com o mecanismo de ação do produto sobre o fungo. RAZZAGHI-ABYANEH et al., (2005) verificaram as alterações morfológicas e deformações do vacúolo citoplasmático de *Aspergillus parasiticus* submetidos a extrato de folhas de nim.

Porém, as diferenças de fungitoxidade de um produto sobre a inibição da taxa de crescimento micelial de um patógeno, muitas vezes estão relacionadas à sensibilidade dos isolados testados. MARQUES et al., (2004) observaram que alguns fungos são mais resistentes ao efeito do óleo de nim, do que outros.

O óleo de nim usado para o desenvolvimento dos ensaios comprovou a ação antifúngica, pois, reduziu significativamente o crescimento micelial do fungo *Aspergillus flavus*, porém, novos estudos são necessários a fim de melhor comprovar a eficiência deste produto no controle do *Aspergillus flavus* em grãos e sementes.

4.2.2. Germinação de esporos

Foram montados os ensaios para a avaliação da germinação dos esporos de *Aspergillus flavus*, com o intuito de verificar o efeito das concentrações testadas no experimento anterior. Verificou-se que a metodologia adotada dificultava a contagem dos esporos germinados, devido à formação de bolhas no meio, pela presença do óleo de nim.

Os poucos esporos visualizados tinham a sua morfologia modificada, porém, os mesmos não foram representativos para a conclusão dos testes. Sugere-se, portanto, que sejam realizados trabalho nessa linha com o objetivo de definir novos protocolos para a realização desse teste.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nos experimentos e levando-se em consideração as condições em que o mesmo foi conduzido, estabeleceu-se as seguintes conclusões:

- Sementes de amendoim, da variedade BR 1, armazenadas dentro e fora do fruto, apresentaram redução na germinação durante o período de armazenamento;
- Independente da embalagem, as sementes sem casca apresentaram menor vigor do que as com casca;
- Sementes de amendoim armazenadas na embalagem de polietileno trançado absorveram maior teor de umidade durante o período de armazenamento;
- As condições de câmara seca favoreceram para a conservação da qualidade fisiológica das sementes;
- Os ambientes, as embalagens e os períodos de armazenamento utilizados não favoreceram ao surgimento da aflatoxina;
- A umidade contida nos grãos não favoreceu o desenvolvimento do fungo *Aspergillus flavus*;
- A concentração de 25 % de óleo de nim inibiu significativamente a taxa de crescimento micelial do fungo *Aspergillus flavus*;
- Não foi verificada diferença estatística no crescimento micelial entre os três isolados do fungo *Aspergillus flavus* submetidos às diferentes concentrações de óleo de nim.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDO, M.T.V.N.; PIMENTA, R.S.; PANOBIANCO, M.; VIEIRA, R.D. Teste de vigor para avaliação de sementes de pepino. **Revista Brasileira de Sementes**. Brasília: 2005. v.27, n.1, p.195-198.

AFONSO JUNIOR, P.C.; CORRÊA, P.C.; QUEIROZ, D.M. Modelamento da perda de qualidade de sementes de soja, em função das condições iniciais da atmosfera no armazenamento. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. Campina Grande: 2000. v.4, n.3, p.403-408.

ALLAMEH, A.; ABYANEH, M.R.; SHAMS, M.; REZAEI, M.B.; JAIMAND, K. Effects of neem leaf extract on production of aflatoxins and activities of fatty acid synthetase, isocitrate dehydrogenase and glutathione-transferase in *Aspergillus parasiticus*. **Mycopathologia** 154. Iran, p.79-84. 2002.

ALMEIDA F.A.C.; MATOS, V.P.; CASTRO, J.R. de; DUTRA, A.S. Avaliação da qualidade e conservação de sementes a nível de produtor. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA, 26,1997. **Anais...** Campina Grande, 1997. IMPRESSO

ALMEIDA, F.A.C.; MORAES, J. S.; SANTOS, R.C.; ALMEIDA, R.P.; ARAÚJO, E. Influência do beneficiamento, da embalagem e do ambiente na qualidade sanitária do amendoim. **Revista de Oleaginosa fibrosa**. Campina grande: 1998. v.2, n.2, p. 97-102. maio/agosto.

ALMEIDA, F.A.C.; FONSECA, K. S.; GOUVEIA, J.P.G. Influência da embalagem e do local de armazenamento na qualidade fisiológica de sementes de gergelim. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. Campina Grande: 1999. v.3, n.2, p.195-201.

ALVES, D. G. **Avaliação do nível de aflatoxina em amendoim (*Arachis hypogaea*) armazenado após secagem natural e artificial**. 1995. 65F. Dissertação (Mestrado em engenharia Agrícola)-Centro de Pré-processamento de Produtos Agropecuários, Faculdade de Engenharia Agrícola, Campinas-SP.

AMARAL, K. A. S.; NASCIMENTO, G. B.; SEKIYAMA, B. L. *et al.* Aflatoxina em produtos à base de milho comercializados no Brasil e risco para saúde humana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 2006. v.26, n.2, p.336 – 342. abr./jun. ISSN 0101-2061.

ARAÚJO, G. A. **Culturas temporárias: cana, algodão, fumo, mandioca, feijão e outros cereais**. Rio de Janeiro: EDIOURO DO CAMPO, 1986.

ATHIÉ, I.; CASTRO, M.F.P.M.; GOMES, R.A. R.; VALENTINI, S.R. de T. **Conservação de grãos**. Campinas: Fundação cargill, 1998.p.236.

AZEVEDO, M.R.Q.A; GOUVEIA, J.P.G; TROVÃO, D.M.M; QUEIROGA, V.P. Influência das embalagens e condições de armazenamento no vigor de sementes de gergelim. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. Campina grande: 2003. v.7, n.3, p.519-524.

AZEREDO, G.A.; BRUNO, R.L.A.; LOPES, K.P.; SILVA, A.; DINIZ, E.; LIMA, A.A. Conservação de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) em função do beneficiamento e ambiente de armazenamento. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. Goiás: 2005. v.35, n.1, p.37-44.

BELTRÃO, N. E. de N. A cultura do amendoim na agricultura familiar brasileira. 2001. Disponível em: <<http://www21.Sede.Embrapa.br/noticias/artigos/2001/artigo>> Acesso em: 13 de outubro de 2005.

BERJAK, P. Stored seeds: the problems caused by micro-organisms (with particular reference to the fungi). In: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE SEMENTES. **Seed pathology**. Passo Fundo: International advanced course, 1987. v.1, p. 93-107.

BETTIOL, W. (Ed.). **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Jaguariúna. EMBRAPA-CNPDA. 1991.

BHERING, M. C., DIAS, D. C. F. S.; BARROS, D.I.; SANTOS DIAS, L. A.; TOKUHISA, D. Vigor evaluation of watermelon seeds by accelerated aging test. **Revista Brasileira de Sementes**. Dec. 2003, v.25, n.2, p.1-6. ISSN 0101-3122

BOLONHEZI, D.; GODOY, I.J.; SANTOS, R.C.; Manejo cultural do amendoim. In: SANTOS, R.C. (Ed). **O agronegócio do amendoim**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2005, p. 195-244.

BORSARI FILHO, S. Potencial da cultura do amendoim como fonte de matéria prima para o PNPB. Piracicaba, 2007. Disponível em: <[http:// www21.Sede.Embrapa.br/noticias/artigos/2001/artigo](http://www21.Sede.Embrapa.br/noticias/artigos/2001/artigo)> Acesso em: 25 de janeiro de 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária: Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992.p.365

BUGNO, A.; ALMODOVAR, A. A. B.; PEREIRA, T. C. *et al.* Ocorrência de Fungos toxicogênicos em drogas vegetais. **Brazilian Journal Microbiology**. 2006. v.37, n.1, p.47-51.jan/mar. ISSN 1517-8382.

CARVALHO, N. M. de; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Jaboticabal: FUNEPE, 2000. p.588. ISBN: 85-87632-01-09

CATUNDA, P.H.A.; VIEIRA, H.D.; SILVA, R.F.; POSSE, S.C.P. Influência do teor de água, da embalagem e das condições de armazenamento na qualidade de sementes de maracujá amarelo. **Revista Brasileira de Sementes**. Brasília: 2003. v.25, n.1.

CHRISTENSEN, C.M. Storage fungi. In: BEUCHAT, L. R.(ed). **Food and bererage mycology**. West Port, CT: AVI Publishing Co, 1988

CIRIO, G.M.; LIMA, M.L.R.Z.C. Métodos de detecção do gênero *Aspergillus* em sementes de (*Zea mays L.*) em 270 dias de armazenamento. **Visão Acadêmica**. Curitiba: 2003.v.4, n. 1, p.19-23.

DHINGRA, O. D.; COELHO NETTO, R. A . **Micotoxinas em grãos**. Viçosa: RAPP, 1998. v. 6, p.51-101.

DHINGRA, O. D. Prejuízos causados por microrganismo durante o armazenamento de sementes. **Revista Brasileira de Sementes**. Brasília: 1985. v.7, n.1, p.139-145.

DIENER, U. H.; DAVIS, N. D. Aflatoxin production by isolates of *Aspergillus flavus*. **Phytopathology**. 1966, v. 56, p. 1390-1393.

DIENER, U. L.; COLE, R.J.; SANDERS, T.H.; PAYNER, G.A.; LEE, L.S.; KLICH, M. A. Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. **Annual review of phytopathology**. 1995. p. 1-21. CD-ROM.

DINIZ, S.P. S. S. **Micotoxinas**. Campinas: Editora Rural, 2002. p.181.

FEITOSA, M. L. Micotoxicoses. 2005. Disponível em: <www.cca.ufes.br/cakc/micotoxicoses.htm> Acesso em: 07 de outubro de 2005.

FONSECA, H. **Levantamento do teor de aflatoxina em tortas e farelos de amendoim (*Arachis hypogaea*) no Estado de São Paulo**. 1968. 64F. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – USP. São Paulo.

FONSECA, H. Fatores que influenciam na ocorrência de micotoxinas no milho. In: MOLIN, R.; VALENTINI, M.L. (Ed.). **Simpósio sobre micotoxinas em grãos**. São Paulo: Fundação Cargill e Fundação ABC, 1999. p. 9-19. ISBN: 85-7467-007-03.b

FONSECA, H. **Preservação e controle de micotoxinas em produtos agrícolas**. 2005. Boletim técnico n.7. Disponível em: <www.micotoxinas.com.br> Acesso em: 29 de agosto de 2005. p.5.

FONSECA, H. Legislação sobre micotoxinas. 2006. Disponível em: <www.micotoxinas.com.br> Acesso em: 11 de dezembro de 2007. p.12.

FREIRE, R.M.M. **Estudo de aminoácido em genótipos de amendoim (*Arachis hypogaea* L.)**. 1997, 118p. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

FREIRE, R.M.M; NARAIN, N.; OLEIVEIRA MIGUEL, A.M.R.; SANTOS, R.C. Aspectos nutricionais de amendoim e seus derivados. In: SANTOS, R.C. (Ed). **O agronegócio do amendoim**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2005.p.391-420.

FREITAS, S. M. de; MARTINS, S. S.; NOMI, A. K.; CAMPOS, A. F. Evolução do mercado brasileiro do amendoim. In: SANTOS, R. C. dos (Ed.). **O agronegócio do amendoim**. Campina Grande: EMBRAPA ALGODÃO, 2005. Cap. 1. p. 15-44.

GERALDO, M. R. F.; TESSMANN, D. J.; KEMMELMEIER, C. Produção de micotoxinas por *Fusarium graminearum* isolados em cereais de inverno (trigo, triticale e cervada) associados com Giberela na Região Sul do Brasil. **Brazilian Journal Microbiology**. 2006. v.37, n.1, p.58-63.jan./mar. ISSN 1517-8382.

GLÓRIA, E.M; ROMERO, A.C.; CARVALHO, A.P.P; DOMINGUES, M.A.C.; GONÇALVES, P.V.M. Perfil da contaminação entre embalagens de produtos de amendoim. **Ciência e Tecnologia de alimentos**. Campinas. 2006. v.6, n.3, p.660-665.

GONÇALVES FRANCISCO, F. **Avaliação da qualidade sanitária e fisiológica de sementes de feijão, com diferentes graus de umidade, em armazenamento hermético a temperaturas constantes**. 2001, 81F. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola), Universidade Estadual de Campinas, SP.

GURJÃO, K.C.O. **Qualidade fisiológica e sanitária de sementes armazenadas de amendoim (*Arachis hypogaea* L.), produzidas no semi-árido nordestino**. 1995, 87F. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola), Universidade Federal da Paraíba.

HASAN, H.A.; MAHMOUD, A.L. Inhibitory effect of oils on lipase and mycotoxin production. **Lett. Appl. Microbiolgy**. 1999. v.29, n.4, p. 238-241.

IBGE_a. Produção do amendoim no Nordeste. 2007. Disponível em: < ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Producao_Agricola_Municipal_%5Banual%5D/2005/ > Acesso em: 13 de janeiro de 2007.

IBGE_b. Confronto das Safras de 2005 e 2006 - Brasil - Agosto 2006. 2007. Disponível em: < <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa08200605.shtm> > Acesso em: 13 de janeiro de 2007.

INNECCO, R. Efeito de óleos essenciais de plantas medicinais como defensivo agrícola. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, suplemento, p. S 57, 2003.

ITO, M.F.; BACHI, L.M.A.; MARINGONI, A.C.; MENTEN, J.ºM. Comparação de método para detecção de *Aspergillus ssp.* e *Penicillium ssp.* em sementes de amendoim (*Arachis hypogaea* L.). **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.18, n.3. , p.262-268, 1992.

JUGLAL, S.; GOVINDEN, R. ODHAV, B. Spice oils control f co-occurring mycotoxin-producing fungi. **Journal Food Prot.** 1998. v.61,n.5, p. 616- 619.

KAWASHIMA, L. M.; VALENTE SOARES, L. M. Incidência de fumonisina B₁, aflatoxina B₁, G₁ e G₂, ocratoxina A e zearalenona em produtos de milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 2006. v.26, n.3, p.516 – 521. jul./set. ISSN 0101-2061.

LAZZARI, F.L. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. Curitiba: edição do autor, 1993. p.134.

LUZ, M.L.G.S. **Determinação de umidade dos grãos**. 2006. (PDF). Universidade Federal de Pelotas.

MACEDO, E.C. **Influencia da embalagem e do armazenamento na qualidade fisiológica sanitária de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum*) e de arroz (*Oryza sativa* L.) e efeito de herbicidas sobres os fungos associados**. 1998. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Campinas, SP.

MACHADO, J. A. Melhoramento genético de cereais visando micotoxinas. In: MOLIN, R.; VALENTINI, M.L. (Ed.). **Simpósio sobre micotoxinas em grãos**. São Paulo: Fundação Cargill e Fundação ABC, 1999. p. 41-56. ISBN: 85-7467-007-03.

MANUAL de segurança e qualidade para cultura do amendoim. Brasília: Campo PAS, 2004. p. 19 (serie qualidade e segurança de alimentos). ISBN: 85-7383-231-2

MARQUES, R. P.; MONTEIRO, A. C.; PEREIRA, G. D. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações de

óleo de nim (*Azadiracha indica*). **Ciência Rural**. Santa Maria, 2004, vol. 34, n. 6, p. 1675-1680.

MINISTÉRIO da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Resolução - RDC nº 274, de 15 de outubro de 2002.** 2006. Disponível em:< <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=1653&word=aflatoxina#>> Acesso em: 11 de dezembro de 2006.

MONTES-BELMONT, R.; CARVAJAL, M. Control, of *Aspergillus flavus* im maize with plant essential oils their components. **Arch. Pharm. Res.** 2003. v.26, n. 5, p.389-393.

MORAES, J.S. **Qualidade fisiológica de sementes de amendoim (*Arachis hypogaea* L) acondicionadas em três embalagens e armazenadas em duas microrregiões do Estado da Paraíba.** 1996, 99F. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola), Universidade Federal da Paraíba.

PASCHOLATI, S. F. Fitopatógenos: Fitotoxinas e Hormônios. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos.** 3ªed. São Paulo: CERES, 1995. Cap. 20, p. 365-392.

PAIVA, L.E.; LOBO, JR.M.; COELHO, R.M.S.; ÁVILA, Z.R.; MACHADO, J. R.; OLIVEIRA, J.A.; VIEIRA, M. G.G. Efeito de *Aspergillus flavus* sobre sementes de soja envelhecidas por diferentes períodos. **Informativo ABRATES** (Resumo), 1995.v.5, n.2, p.102.

PEREIRA, M.M.G.; CARVALHO, E.P.; PRADO, G. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. **B.CEPPA**. Curitiba, 2002. v.20, n.1, p.141-156.

POPINIGIS, F. **Fisiologia de sementes.** Brasília: AGIPLAN, 1985, 285p

QUEIROZ, M.S.R.; NARAIN, N.; FREIRE, R.M.M; FARIAS, S.R.; SANTOS, R.C. Determinação de aflatoxinas em sementes de amendoim, armazenadas em condições ambiente

e em câmara fria. **Revista Brasileira de Oleaginosas Fibrosas**. Campina Grande. 2006. v.10, n.1/2, p.1009-1015

RAZZAGHI-ABYANEH, M.; ALLAMEH, A.; TIRAIHI, T.; SHAMS-GHAHFAROKHI, M.; GHORBANIAN, M. Morphological alterations in toxigenic *Aspergillus parasiticus* exposed to neem (*Azadirachta indica*) leaf and seed aqueous extracts. **Mycopathologia**, 2005, n. 159, p. 565-570.

REIS, E. R.; TREZZI CASA, R. Ciclos biológicos e Epidemiologia: *Aspergillus*, *penicillium*, *Diploidia* e *Fusarium*. In: MOLIN, R.; VALENTINI, M.L. (Ed.). **Simpósio sobre micotoxinas em grãos**. São Paulo: Fundação Cargill e Fundação ABC, 1999. p. 20-39. ISBN: 85-7467-007-03.

RESENDE, J.C.F; REIS, M.S.; ROCHA, V.S.; SEDYIAMA, T.; SEDYIAMA, C.S. Efeito da época da colheita e condição de armazenamento na qualidade fisiológica de sementes de soja (*Glycine max(L.)*). **Ceres**: 1996. v. 43, n. 245, p. 17-27.

RESNIK, S.L. Factores que inidenen la aparición de micotoxinas desde la producción primaria hasta el almacenamiento. **Proceedings de la jornada nacional sobre micotoxinas y micotoxicosis**. Santiago, Chile: Serie La Platina,.n.13,p.25-40, 1984.

RODRIGUES-AMAYA, D.B; SOARES, L.M.V. Survey of aflatoxin, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian food by using mult toxin thin-layer chromatographic method. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.72, p.22-26, 1989.

ROSSETO, C.A.V.; LIMA, T.M.; VIEGAS, E.C.; SILVA, O.F.; BITTENCOURT, A. M. Efeito da calagem, da colheita e da secagem na qualidade sanitária do amendoim na seca. **Pesquisa Agropecuária brasileira**. Brasília, 2003, v.38, n.5, p. 567-573.

ROSSETO, C.A.V.; SILVA, O.F.; ARAÚJO, A.E.S. Influência da calagem, da época de colheita e da secagem na incidência de fungos e aflatoxinas em grãos de amendoins armazenados. **Ciência Rural**. Santa Maria, 2005, v. 35, n. 2, p. 309-315.

ROTTA, B. **Embalagens**. In: CURSO DE ARMAZENAMENTO E BENEFICIAMENTO PARA EMCARREGADOS DE ARMAZÉNS. Pelotas, 1974. p.70-73 (CENTREISUL.documentos).

SALGADO, S.M.L.; CAMPOS, V.P. Extratos naturais de patogenicidade e reprodução de *Meloidogyne exigua* em cafeeiro e de *Meloidogyne incógnita* Raça 3 em feijoeiro. **Nematologia Brasileira**. Piracicaba, v.27, n.1,p.41-48, 2003.

SANCHEZ, E.; HEREDIA, N.; GARCIA, S. Inhibition of growth and mycotoxin production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* by extracts of Agave species. **International Journal Food Microbiology**.2005. v.98, n.3, p.271-279.

SANTOS, R.C.; GUIMARÃES, M.B.; MORAIS, J. de S.; BRITO, S .de F.M. **Fenologia, reprodução e crescimento de genótipos de amendoim do Nordeste brasileiro**. Campina Grande: EMBRAPA-CNPA, 1993. p.8 (EMBRAPA-CNPA. Pesquisa em andamento, 16).

SANTOS, R.C.; GODOY, I.J. de. Hibridação em amendoim. In: BORÉM, A. (Ed.). **Hibridação artificial de plantas**. Viçosa: UFV, 1999. Cap.3, p. 83-100.

SANTOS, M.P.; ALVES, E.S.S.; SANTOS, R.B.; VENTURA, J.A.; FERNANDES, P.M.B. Eficiência “*in vitro*” de óleos essenciais no controle de *Fusarium subglutinans* f. sp. Ananás agente etiológico Fusariose do abacaxizeiro. **Fitopatologia Brasileira**. Fortaleza, v.26(suplemento), p. 335, 2001

SANTOS, R. C.; GODOY, J. I.; FAVEIRO, A. P. Melhoramento do amendoim. In: SANTOS, R. C. dos (Ed.). **O agronegócio do amendoim**. Campina Grande: EMBRAPA ALGODÃO, 2005. Cap. IV. p. 126-192.

SCHINDLER, A. F.; PALMER, J. G.; EISENBERG, W. V. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* as related to various temperatures. **Applied Microbiology**. Washington: American Society for Microbiology, 1967. v.15, n.5. September

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Potencial de óleos essenciais de vegetais como indutores de resistência: plantas medicinais. **Summa phytopathologica**. Piracicaba, v.29, n.1, p. 124-125, 2003.

SCOTT, P.M. Natural poisons. In: HELRICH, K. **Official methods of analysis of the association analytical chemists food composition, additives, natural contaminants**. 15 ed. Arlington: AOAC, 1990. v.2, p.1184-1213.

SEKYIAMA, B. L.; RIBEIRO, A. B.; MACHINSKI, P. A. *et al.* Aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em produtos alimentícios à base de milho. **Brazilian Journal Microbiology**. 2005. v.36, n.3, p.289-294.jul/set. ISSN 1517-8382.

SHIN, S. Anti-Aspergillus activities of plant essential oils and their combination effects with ketoconazole or amphotericin B. **Mycopathologia**. 2002. v.154, n.2, p.79-84

SILVA, J. B. da; DILKIN, P.; FONSECA, H. *et al.* Avaliação da toxicidade das cepas de *Aspergillus flavus* e *Fusarium spp.* isoladas de amostras de sorgo. **Brazilian Journal Microbiology**. 2004. v.35, n.3, p.182-186.jul/set. ISSN 1517-8382.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C.A.V. de. A new version of the assistat statistical assistance software. In: World Congress on Computers in Agriculture, 4. Orlando-FL-USA: **Anais**...Orlando: America Society of Agricultural Engineers, 2006. p. 393-396.

TICELLI, M. **Danos mecânicos em sementes de amendoim (*Arachis hypogaea*) colhidas em diferentes estágio de maturação**. 2001. 59F. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas – São Paulo.

TRIPATHI, P.; Dubey, N. K. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, 2004, v. 32, n. 3, p. 235-245

USDA. United States Department of Agriculture. 2007. Disponível em:< www.usda.gov/wps/portal/usdahome > Acesso em: 25 de janeiro de 2007.

VALENTINI, S.R.T.; CASTRO, M.F.P.M.; ALMEIDA, F.H. Determinação do teor de umidade de milho utilizando aparelho de microondas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.18, n.2, May/July. 1998

VASCONCELOS, L.M.; GROTH, D.; RAZERA, L.F. Efeito de processos de secagem, diferentes graus de umidade e tipos de embalagens na conservação de sementes de café (*Coffea arábica* L. CV. CATUAÍ VERMELHO). **Revista Brasileira de sementes**. Brasília, 1992. v.14, n.2, p.181-188.

WEBER, E.A. **Excelência em beneficiamento e armazenamento de grãos**. Panambi, CERES, 2005. p.586.

WHITAKER, T.B.; GIESBRECHT, F.G.; WU, J.; HAGLER JR, W.M.; DOWELL, F.E. Predicting the distribution of aflatoxin test results from farmers stock peanuts. **Journal of AOAC Internacional**. 1994. v.77, n. 3, p. 659-666.

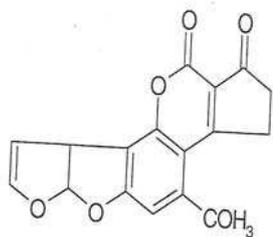
WRIGHT, V. F.; Assessment of insect infestation in stored maize and their relationship to *Aspergillus flavus* contamination. 1986. Boletim N.41. Disponível em:< www.micotoxinas.com.br> Acesso em: 29 de agosto de 2005. p.5.

ZERINGUE, H.J.; BHATNAGAR, D. Effect of neen leaf volatiles on submerged cultures of aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus*. **Applied and environmental microbiology**. 1994. v.60, n.10, p.3543-3547.

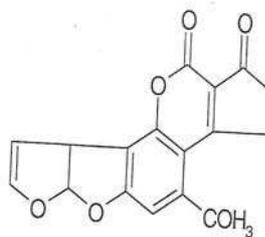
ANEXOS

ANEXO I

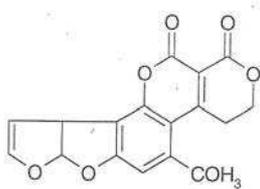
Estruturas químicas das aflatoxinas



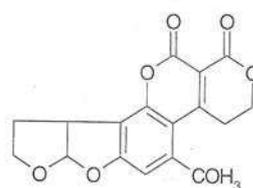
B1- Formula química $C_{17}H_{12}O_6$



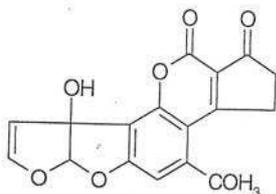
B2- Formula química $C_{17}H_{14}O_6$



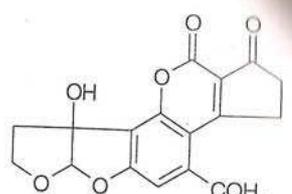
G1- Formula química $C_{17}H_{12}O_7$



G2- Formula química $C_{17}H_{14}O_7$



M1- Formula química $C_{17}H_{12}O_7$



M2- Formula química $C_{17}H_{14}O_7$

Fonte: DINIZ, 2002

ANEXO II

Normas de fiscalização das micotoxinas

Resolução Brasileira

Os produtos a base de amendoim que são comercializados no Brasil, são regulamentados pela resolução RDC nº 274, da ANVISA, de 15 de outubro de 2002. Publicada no Diário Oficial da União, de 16/10/2002, que estabelece o limite máximo de 20ppb para contaminação por aflatoxinas (B₁,B₂,G₁,G₂) em amendoim com casca, descascado, cru ou torrado e produtos na forma de pasta e manteiga. Para leite fluído e leite em pó (M1) = 0,5 µg/L 5,0 µg/kg respectivamente (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2006).

Segundo o Ministério da Agricultura. Portaria MA/SNAD/SFA No. 07, de 09/11/88 - publicada no Diário Oficial da União de 09 de novembro de 1988 - Seção I, página 21.968, 1988: Para qualquer matéria prima a ser utilizada diretamente ou como ingrediente para rações destinadas ao consumo animal: Aflatoxina (máximo) = 50 µg/kg (FONSECA, 2006).

Resolução do Mercosul¹

Legislação comum a todos integrantes:

- GMC / RES. No.56/94
- Leite fluído: AFM1 = 0,5 µg/L (ppb)
- Leite em pó: AFM1 = 5,0 µg/kg (ppb)
- Milho em grão: AFs B1,B2,G1,G2 = 20 µg/kg
- Farelo de milho: AFs B1,B2,G1,G2 = 20 µg/kg
- Amendoim em casca e descascado, cru ou torrado: AFs B1,B2,G1,G2 = 20µg/kg
- Pastas, cremes e manteiga de amendoim: AFs B1,B2,G1,G2 = 20 µg/kg

¹ FONSECA (2006)

Resolução da União Européia²

Legislação comum para todos os membros (FONSECA, 2006):

- Amendoim, nozes em geral e frutas sêcas para consumo direto ou como ingrediente de alimentos: Aflatoxina B1= 2 µg/kg; Totais (B1+B2+G1+G2) = 4 µg/kg;
- Amendoim a ser submetido à seleção ou outro tratamento físico: B1=8 ppb; AFTotais=15µg/kg;
- Nozes e frutas sêcas a serem submetido à seleção ou outro tratamento físico: B1=5 ppb; AFTotais=10 µg/kg;
- Cereais e produtos processados para consumo direto ou como ingrediente para alimentos: B1=2 µg/kg; AFTotais= 4 µg/kg;
- Leite *in natura* ou destinado para elaboração de produtos à base de leite, e leite tratado termicamente: Aflatoxina M1= 0,05 ng/L;
- Especiarias e temperos: Aflatoxina B1 = 5 µg/kg; AFTotais = 10 µg/kg;
- Cereais crus: Ocratoxina A = 5 µg/kg;
- Produtos derivados de cereais para consumo direto: Ocratoxina A = 3 µg/kg;
- Frutas secas: Ocratoxina A = 10 µg/kg;
- Castanha-do-Brasil: aflatoxinas = 4 µg/kg;
- Alimentos infantis: patulina = 10 µg/kg.

Legislação específica para Rações:

- Matéria prima para rações: Aflatoxina B1 = 50 µg/kg
- Produtos de amendoim, copra, palma, algodão, babassu, milho: 20 µg/kg
- Ração pronta: Aflatoxina B1 = 10 µg/kg
- Rações completas para suínos e aves, exceto animais jovens: B1 = 20 µg/kg

² FONSECA (2006)

- Rações completas para gado de engorda, ovinos, caprinos, exceto animais jovens:
B1 = 50µg/kg
- Rações completas para novilhos e cordeiros: B1 = 10 µg/kg
- Complementos de rações: B1 = 5 µg/kg
- Complementos de rações para porcos e aves: B1 = 30 µg/kg
- Complementos de rações para gado, ovinos e caprinos, exceto animais em lactação, novilhos, cordeiros, cabritinhos: B1 = 50 µg/kg
- Matérias primas - Produtos de amendoim, copra, palma, algodão, babaçu, milho =
B1 = µg/kg.

Resolução dos Estados Unidos³

- Alimentos: B1, B2,G1,G2 = 20 µg/kg
- Alimentos prontos de trigo: Deoxinivalenol = 1000 µg/kg
- Laticínios: M1 = 0,5 µg/kg

³ FONSECA (2006)

ANEXO III

Metodologia de extração da aflatoxina

- ✓ Pesar 50 g da amostra de amendoim;
- ✓ Adicionar 30 mL da solução aquosa de cloreto de potássio (KCl) a 4 % e 270 mL de metanol. Agitar em liquidificador por 5 min em velocidade baixa e filtrou-se em papel de filtro;
- ✓ Retirar 150 mL do filtrado e transferir para um becker de 600 mL, no qual é adicionado 150 mL da solução de sulfato cúprico (CuSO_4) a 10 % e 5 g de celite; Agitar com o auxílio de um bastão de vidro e filtrar do mesmo modo;
- ✓ 150 mL do filtrado é transferido para o funil separação de 500 mL, sendo adicionado 150 mL de água destilada e 50 mL de hexano e agitado por 3 min;
- ✓ Esperar a separação das fases e colocar o filtrado em um becker de 600 mL, descartando-se o hexano. Repetir a mesma operação por três vezes, apenas trocando o hexano e descartando-o após a agitação e a separação das fases;
- ✓ Colocar o filtrado novamente no funil de separação, e adicionar 10 mL de clorofórmio e foi agitar por mais 3 min;
- ✓ Após a separação das fases recolher a alíquota de 5 mL da fase clorofórmica em frasco de vidro âmbar de 10 mL e tampar. Repetir o procedimento recolhendo mais 5 mL da fase clorofórmica no mesmo frasco de vidro. Homogeneizar a fase Clorofórmica manualmente por 30 segundos;
- ✓ Concentrar a amostra em banho-maria (60 °C) até evaporação total do clorofórmio.