VI CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE

PIBIC/CNPq/UFCG-2009

BIOATIVIDADE DE EXTRATO HIBROALCOOLICO DE SUCUPIRA SOBRE A MICROBIOTICA FÚNGICA DE SEMENTES DE AMENDOIM BRS HAVANA

Gleryston Thiago G. da Silva[1], Dyalla Ribeiro de Araújo[2], Francisco de Assis C. Almeida[3] Josivanda P. Gomes[3], Niédja Marizze Cezar Alves[2] Renan G. da Silva[1]

RESUMO

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a bioatividade do extrato hidroalcóolico de sucupira sobra a microbiótica fúngica de amendoim acondicionado em embalagens de algodão, dentro e fora do fruto, durante 12 meses, em condições de laboratório sem controle de temperatura e umidade relativa do ar. Identificado o *A. flavus* foi isolado e cultivado em meio de cultura BDA. As sementes contaminadas foram utilizadas com inóculo para os experimentos. O tratamento das sementes foi realizado utilizando-se 10 mL do extrato de sucupira para cada 300 g de sementes, nas doses de 0 (controle), 10, 40, 70 e 100 mL (extrato:água). Depois de tratadas foram dividas em dois lotes, um deles foi inoculado o *Aspergillus flavus*, ficando o outro apenas com o extrato aplicado. Depois as sementes de cada lote foram acondicionadas e armazenadas. Para a análise de variância utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 2 x 5 x 6 com 4 repetições. E, com base nos resultados, concluiu-se que: as sementes inoculadas armazenaram-se com teor de umidade inferior as não inoculadas; as maiores doses do extrato de sucupira utilizadas no procedimento não inoculado contribuíram para redução da incidência de fungos; a umidade das sementes armazenadas dentro do fruto foi inferior à umidade das sementes armazenadas fora do fruto; a incidência de fungos no amendoim armazenado em casca foi menor que a do amendoim armazenado fora da casca.

Palavras-chave: *Aspergillus flavus*, *Arachis hypogaea,* armazenamento

BIOACTIVE EXTRACT HIBROALCOOLICO OF SUCUPIRA FUNGAL MICROBIOTA ON SEED PEANUT "BRS HAVANA"

ABSTRACT

This work was carried out to evaluate the bioactivity of the hydroalcoholic extract of "sucupira" on the fungal microflora of peanut, packaged in cotton, inside and outside of the fruit during 12 months in the laboratory without controlled temperature and relative humidity. Being identified the A. flavus it was isolated and grown in culture medium BDA. The seeds were contaminated with inoculum used for experiments. The seed treatment was performed by using 10 mL of the extract of "sucupira" for each 300 g of seeds, in doses of 0 (control), 10, 40, 70 and 100 mL (extract:water). After treated the seeds were divided into two lots, one of the *Aspergillus flavus* was inoculated, leaving the other with only the applied extract. After that the seeds of each batch were packaged and stored. For the analysis of variance, it was used the completely randomized design (CRD) in the factorial scheme 2 x 5 x 6, with 4 replications. And, based on the results, it was concluded that: the inoculated seeds are stored with lower moisture content than the non inoculated one; the higher doses of the sucupira extract used in the non inoculated procedure contributed to reducing the incidence of fungi; the moisture content of seeds stored within the fruit was lower than the one of the seeds stored outside of the fruit; the incidence of fungi in stored groundnut in shell was lower than in the peanuts stored outside of the shell.

Keywords: *Aspergillus flavus*, *Arachis hypogaea*, storage

INTRODUÇÃO

No Nordeste Brasileiro o amendoim representa uma cultura de ampla importância socioeconômica com aproximadamente 5% da produção nacional, sendo referenciado como uma opção altamente viável para a agricultura familiar, por contribuir para a diversificação com outras culturas e para a auto-sustentabilidade da pequena propriedade agrícola (SANTOS et al., 2005). O cultivo do amendoim, nesta região, destaca-se por ser de fácil manejo, ciclo curto e preço atraente no mercado, além de se constituir uma fonte adicional agregadora de renda em razão das várias formas de produtos que podem ser processados, e que incentivam a agroindústria regional. No entanto, seus produtores não utilizam técnicas avançadas no cultivo e na pós-colheita. Dessa forma, o baixo nível tecnológico tem contribuído para o agravamento dos problemas de ordem fitossanitária, entre os quais se destacam a contaminação por fungos e aflatoxinas, os quais podem ocorrer durante a formação da semente, na colheita, no transporte e no seu armazenamento, que interagindo com fatores ambientais podem ser capazes de acelerar o processo de deterioração.

O aumento significativo do consumo aliado ao da produção e da produtividade deve-se ao rendimento dos sistemas de produção e a aplicação de práticas que possibilitem manter a qualidade fisiológica e sanitária das sementes durante seu armazenamento. As sementes de amendoim podem ser armazenadas no próprio fruto, conferindo uma maior proteção aos grãos, ou fora deles, necessitando de um controle mais efetivo para a manutenção de sua qualidade.

Os fungos são os principais microorganismos que causam a deterioração em sementes, sendo os do gênero *Aspergillus* os de maior incidência em sementes de amendoim, destacando-se as espécies *A. flavus* e *A. parasiticus* e *Penicillium* ssp, os quais se multiplicam rapidamente por toda a massa de semente armazenada quando encontram condições favoráveis, afetando assim o poder germinativo das sementes como também ocasionando alterações bioquímicas, organolépticas e nutricionais.

O procedimento para se combater esses patógenos normalmente se dar pela aplicação de produtos químicos. Método que se torna cada vez mais questionável devido à resistência que muitas espécies podem desenvolver a contaminação do meio ambiente e até dos próprios consumidores.

Atualmente é reconhecida a necessidade de uma política que reduza o número de inseticidas e fungicidas químicos relacionados ao retardo e até mesmo a inibição das ações microbianas de caráter deteriorante. Com isso, a aplicação de extratos vegetais no controle de fungos constitui uma alternativa para substituição dos fungicidas químicos, pela simplicidade de execução, menores riscos de intoxicação, poluição do ambiente e do solo, como também colaborando no segmento de produtos orgânicos, que vem crescendo rapidamente nos últimos anos.

Diversos estudos relatam que os componentes principais encontrados nas plantas que possuem propriedades para controle de patógenos são os compostos fenólicos. De acordo com SCALBERT (1991), substratos ricos em taninos inibem o desenvolvimento de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus, Botrytis, Colletotrichum, Penicillium* e *Trichoderma.*

As sementes de sucupira (*Pterodon emarginatus*) são caracterizadas por apresentar elevado teor de compostos fenólicos, principalmente taninos, assim, a utilização de extrato de sucupira no tratamento de sementes de amendoim durante o armazenamento poderá vir a ser uma alternativa viável no controle de fungos, em especial o *Aspergillus flavus,* como também dos metabólitos por estes produzidos. Ademais, se registra a facilidade na obtenção desse produto, geralmente disponível

na propriedade, aliada a seu fácil manejo, baixo custo e eficiência no controle, tornando compatível com a realidade sócio-econômica da maioria dos pequenos produtores que fazem a agricultura familiar em especial.

Com base nessas considerações, objetivou-se com o presente trabalho estudar a ocorrência de fungos durante o armazenamento nas sementes de amendoim BRS Havana tratadas com diferentes doses do extrato de sucupira (0, 10, 40, 70 e 100%), armazenadas dentro e fora do fruto em ambiente sem controle de temperatura e umidade relativa do ar.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas (LAPPA) da Unidade Acadêmica de Engenharia Agrícola (UAEA) do Centro de Tecnologia e Recursos Naturais (CTRN), da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), em Campina Grande, PB.

As sementes de amendoim BRS Havana foram adquiridas de um produtor que compõe parte de um projeto de produção integrada junto à Embrapa Algodão – Campo Experimental Barbalha, no Distrito Missão Nova, Município Missão Velha, CE.

A microbiótica fúngica foi avaliada utilizando-se a metodologia do papel de filtro umedecido (NEERGAARD, 1979). Dez sementes, por repetição, foram distribuídas em placas de Petri, contendo três discos de papel de filtro (Ø = 9,5 cm) esterilizados e umedecidos com água destilada. Depois deixadas em ambiente não controlado do LAPPA durante oito dias. Transcorrido esse período, as sementes contidas nas placas foram individualmente examinadas em microscópio estereoscópico para a visualização das colônias dos fungos presentes. Considerando as características das colônias nas sementes de amendoim procedeu-se o isolamento do *Aspergillus flavus*, retirando-se fragmentos micelianos (2 mm de diâmetro), das margens das colônias e inoculando em meio de cultura BDA (composto de 200 g de batata; 20 g de dextrose; 20 g de Ágar-ágar e 1000 mL de água destilada) esterilizado em autoclave a 121 ºC por 30 minutos contido em placas de Petri. A partir das colônias formadas, observaram-se as de *A. flavus* que desenvolveram sem contaminação retirando fragmentos miceliano e inoculando no centro de placas de petri contendo meio de cultura Czapek, utilizado como padrão para se observar as características das culturas de fungos do gênero *A. flavus* e *Penicillium*, como forma, cor e produção de pigmento.

Identificado o *A. flavus* este foi cultivado em meio de cultura BDA contido em tubos de ensaio. Produzindo o inóculo este foi multiplicado em uma massa de sementes de amendoim previamente aquecida em estufa a 105 ºC por uma hora, e esfriada em temperatura ambiente. Os fungos foram inoculados a massa de sementes contida em recipiente de vidro, agitando-se manualmente e em seguida distribuídas em placas de Petri contendo três discos de papel de filtro esterilizados umedecidos com água destilada. Depois deixados a temperatura ambiente, e transferidos para uma nova massa de sementes de amendoim seguindo o mesmo procedimento antes que houvesse o esgotamento total do substrato, essas sementes contaminadas foram utilizadas com inóculo para os experimentos.

O extrato hidroalcoólico foi obtido a partir de sementes de sucupira (*Pterodon emarginatus*), adquiridas em feira livre de produtos naturais em Campina Grande, PB.

O material foi triturado em moinho de martelo, depois pesado em balança, em seguida umedecido com uma pequena quantidade de álcool etílico a 70% (v v^{-1}), e finalmente colocado em percolador para extração (ALMEIDA et al., 2003).

O tratamento das sementes foi realizado utilizando-se 10 mL do extrato de sucupira para cada 300 g de sementes, nas doses de 0 (controle), 10, 40, 70 e 100 mL (extrato:água). Em seguida as sementes foram distribuídas sobre folhas de papel jornal, ficando por um período de 24 h a temperatura ambiente, com a finalidade de retirar o excesso de extrato na superfície das sementes.

As sementes tratadas foram divididas em dois lotes, um deles foi inoculado o *Aspergillus flavus*, utilizando 0,0632 g de inóculo para cada 300 g de sementes, e outro ficando apenas com o extrato aplicado. Depois as sementes de cada lote foram acondicionadas em embalagens de algodão, para em seguida serem armazenadas durante 12 meses em condições de laboratório sem controle de temperatura e umidade relativa do ar.

O tratamento dos frutos do amendoim (vagens) deu-se da mesma foram e para as mesmas doses que o das sementes, modificando apenas a proporção do extrato hidroalcoólico (40 mL de extrato para cada 600 g de frutos).

As sementes e os frutos depois de tratados e acondicionadas nas embalagens de algodão foram avaliadas trimestralmente quanto ao teor de umidade (%) e micoflora (%).

O teor de umidade das sementes foi determinado pelo método padrão da estufa a 105 ± 2 °C, onde três sub-amostras de 10 g foram colocados em recipientes metálicos previamente secos e pesados. Posteriormente, estes foram levados a estufa onde permaneceram por 24 h. Após esse período foram retirados e esfriados em dessecador por uma hora, onde se obteve o peso final dos recipientes mais a amostra seca. Os resultados foram expressos em porcentagem de peso em base úmida (BRASIL, 1992).

Na determinação da micoflora foi utilizado o método do papel de filtro (NEERGAARD, 1979). Dez sementes foram distribuídas em placas de *Petri*, contendo dois discos de papel de filtro (Ø = 9,5 cm) esterilizados e umedecidos com água destilada esterilizada, utilizando 4 repetições por tratamento, e deixadas em ambiente não controlado do LAPPA durante oito dias. Transcorrido esse período, as sementes contidas nas placas foram individualmente examinadas para a visualização das colônias de fungos presentes, e quando necessário uma confirmação utilizou-se o microscópio estereoscópico. A quantificação deu-se considerando a porcentagem de sementes infectadas por fungos e o gênero presente.

Os dados obtidos foram avaliados com uso do Programa Computacional Assistat (SILVA & AZEVEDO, 2006) versão beta 7.4. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 2 x 5 x 6 com 4 repetições, representado o primeiro experimento por: sementes inoculadas e não inoculadas com o fungo (*Aspergilllus flavus*); concentração do extrato de sucupira, e período de armazenamento, respectivamente e, igualmente o segundo com modificação do primeiro fator que foi substituído por sementes dentro e fora dos frutos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Armazenamento das sementes inoculadas e não inoculadas com o *A. flavus*

Teor de umidade

Mediante a Tabela 4.1 verifica-se que entre as doses do extrato utilizado no tratamento das sementes, o teor de umidade foi igual estatisticamente para todas as doses com o procedimento não inoculado (7,44%), exceto para D_{70} que se igualou a D_{100} e foi estatisticamente inferior as demais.

Tabela 4.1. Valores médios do teor de umidade (%) para a interação Doses x Procedimento de sementes de amendoim tratadas com extrato hidroalcoólico de sucupira, inoculadas e não inoculadas com *A. flavus* durante 12 meses de armazenamento

Doses (mL)	Procedimento	
	Não inoculado (NI)	Inoculado (I)
D_0	7,43 aA	6,72 dB
D_{10}	7,40 aA	7,04 abB
D_{40}	7,54 aA	7,18 aB
D_{70}	7,25 bA	6,93 bcB
D_{100}	7,39 abA	6,85 cdB
DMS (C)	0,15	
DMS (L)	0,11	

As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade

Para o procedimento inoculado (I) as sementes tratadas nas doses D_{10} e D_{40} mL armazenaram o amendoim com maior teor de umidade (7,11%) seguido das doses de D_{70}, D_{100} e D_0. Entre os procedimentos o NI com o fungo *Aspergillus flavus* armazenou as sementes, em todas as doses utilizadas no estudo, com teor de umidade superior estatisticamente, ao procedimento das sementes que receberam o fungo *A. flavus*

O comportamento do teor de umidade das sementes de amendoim para procedimento deve-se, provavelmente, a maior população dos fungos na massa de sementes inoculada com o *A. flavus* que para o exercício de suas funções vitais utilizaram desse nutriente. Afirmativa que pode ser evidenciada com os resultados obtidos para incidência de *A. flavus* (Tabela 4.4), onde estes indicam que os fungos devem ter utilizado da água livre, presente nas sementes, para exercerem suas atividades essenciais, resultando o procedimento inoculado com teor de umidade inferior ao não inoculado.

Para a interação Tempo x Procedimento (Tabela 4.2), tem-se para o procedimento NI em T_9 o maior teor de umidade das sementes (8,30%), a qual foi estatisticamente superior a todos os demais que se comportaram de forma diferente estatisticamente sendo $T_0 > T_6 > T_3 > T_{12}$. Com relação ao procedimento I ao longo do armazenamento a estatística detectou igualdade para T_3, T_6 e T_{12}, que foram superadas por T_0 e T_9 o qual foi inferior a T_0. Entre o procedimento, a exceção de T_0 que não se

registrou diferenças estatísticas, e do T_{12} em que foi superior no inoculado, o teor de umidade das sementes de amendoim foi estatisticamente inferior no procedimento I frente ao NI.

O comportamento do teor de umidade das sementes de amendoim para a interação Tempo x Procedimento ao longo do armazenamento e para as condições que foram submetidas deve-se a embalagem permeável a qual foram acondicionadas (saco de algodão) que permite a troca de umidade com a atmosfera do ambiente de armazenamento, oscilando com a variação desta atmosfera, isto é, tal oscilação deve-se às variações climáticas ocorridas durante a realização do experimento que tem influência sobre as sementes armazenadas em embalagens permeáveis.

Tabela 4.2. Valores médios do teor de umidade (%) para a interação Tempo x Procedimento de sementes de amendoim tratadas com extrato hidroalcoólico de sucupira, inoculadas e não inoculadas com *A. flavus* durante 12 meses de armazenamento

Tempo (meses)	Procedimento	
	Não inoculado (NI)	Inoculado (I)
T_0	8,13 bA	8,13 aA
T_3	6,67 dA	6,21 cB
T_6	7,86 cA	6,15 cB
T_9	8,30 aA	7,95 bB
T_{12}	6,04 eB	6,28cA
DMS (C)	0,15	
DMS (L)	0,11	

As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade

DINIZ et al. (2001), estudando o acondicionamento de sementes de amendoim em embalagens de papel e metálica, também constataram influência das condições ambientais na umidade das sementes, as quais quando foram armazenadas em embalagem metálica permitiu uma maior uniformidade do teor de umidade das sementes até os 12 meses de armazenamento por ser uma embalagem impermeável, enquanto as armazenadas em embalagens de papel houve variações no teor de umidade com o tempo.

Igualmente ALMEIDA et al. (1999), verificaram que a embalagem e as condições da umidade relativa e temperatura de locais de armazenamento exercem influência sobre o teor de umidade das sementes.

Analisando-se a Tabela 4.3, verifica-se para os tempos dentro de cada dose que em T_3 e T_{12} não foi registrado variação estatística no teor de umidade entre as doses, já para o T_0 as doses D_{70} e D_{100} apresentaram igualdade estatística, diferindo das demais, sendo D_{40} à dose que apresentou maior teor de umidade (8,99%).

No T_6 as doses D_0 e D_{40} (7,23%) foram estatisticamente iguais e superiores às demais doses que obtiveram igualdade estatística (D_{10} = D_{70} = D_{100} = 6,86%). Para T_9 houve igualdade estatística entre $D_{10,}$ D_{40} e D_{70}, as quais diferiram de D_0 e D_{100}, a qual foi estatisticamente igual a demais doses.

Tabela 4.3. Valores médios do teor de umidade (%) para a interação Doses x Tempo das sementes de amendoim tratadas com extrato hidroalcoólico de sucupira, inoculadas e não inoculadas com *A. flavus* durante 12 meses de armazenamento

Doses (mL)	Tempo (meses)				
	T_0	T_3	T_6	T_9	T_{12}
D_0	7,05 dB	6,49 aC	7,22 aB	8,33 aA	6,28 aC
D_{10}	8,50 bA	6,43 aD	6,96 bC	8,08 bB	6,15 aE
D_{40}	8,99 aA	6,43 aD	7,24 aC	8,08 bB	6,06 aE
D_{70}	8,12 cA	6,42 aC	6,80 bB	8,04 bA	6,07 aD
D_{100}	8,01 cA	6,45 aC	6,83 bB	8,10 abA	6,23 aC
DMS (C)			0,24		
DMS (L)			0,24		

As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade

Com relação ao fator tempo observam-se variações em todas as doses do extrato aplicadas conforme o tempo de armazenamento. Essas variações do teor de umidade quanto às doses de extrato aplicado e o tempo de armazenamento podem mais uma vez ser evidenciadas devido ao acondicionamento das sementes em embalagens de algodão, permitindo a troca de umidade dessas com a umidade atmosférica do ambiente. Dados esse que corroboram com SANTOS (2003), onde foi observado variações no teor de umidade de sementes de milho tratadas com extratos vegetais ao longo do armazenamento.

Incidência de fungos

Os valores médios da incidência de fungos presentes nas sementes de amendoim armazenadas ao longo de um ano para a interação Doses x Procedimento (Tabela 4.4) revelaram para procedimento dentro de cada dose, superioridade estatística para as sementes inoculadas I com o *Aspergillus flavus* frente ao procedimento NI e, o contrário deu-se com o comportamento dos fungos *A. niger* e *Rhizopus*, isto é, o procedimento NI foi estatisticamente superior ao I para todas as doses.

Dentro de cada dose a incidência de *A. flavus* no procedimento inoculado (I) não apresentou diferença estatística, enquanto que no procedimento NI a menor ocorrência desse fungo foi encontrado em D_{70} (41,50%) e a maior em D_0 e D_{10} (81,50 e 70,00% respectivamente). Igual comportamento estatístico se verificou para o *A. niger* no procedimento I. Em NI a menor ocorrência de *A. niger* deu-se em D_0 (17,54%), seguido de D_{70} e D_{100} (31,52%), com igualdade estatística para D_{10} e D_{40}, onde se registraram as maiores incidências desse fungo. Com relação à *Rhizopus* a maior incidência para o procedimento NI foi constatado na dose D_0 (74,01%) e a menor em D_{100} (24,53%), seguida das demais doses ($D_0 = D_{40} = D_{70}$) que estatisticamente não diferiram. Igual comportamento se obteve para D_0 no procedimento I e D_{100} que estatisticamente foi igual a D_{40} e D_{70}.

Tabela 4.4. Valores médios da incidência (%) de fungos para a interação Doses x Procedimento de sementes de amendoim tratadas com extrato hidroalcoólico de sucupira, inoculadas e não inoculadas com *A. flavus* durante 12 meses de armazenamento

Doses (mL)	Procedimento					
	NI	I	NI	I	NI	I
	A. flavus		*A. niger*		*Rhizopus*	
D_0	81,50 aA	79,50aA	17,54 cA	2,08 aB	74,01 aA	28,52 aB
D_{10}	70,00 bB	80,50 aA	30,52 aA	2,08 aB	31,01 bA	5,55 bB
D_{40}	56,00 cB	82,50aA	32,52 aA	4,06 aB	33,51 bA	1,09 cB
D_{70}	41,50 dB	83,00aA	22,52 bA	2,08 aB	30,01 bA	1,09 cB
D_{100}	58,50 cB	82,00aA	23,52 bA	2,08 aB	24,53 cA	4,56 bcB
DMS (C)	3,74		2,91		4,42	
DMS (L)	2,67		2,08		3,16	

As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade; NI: não inoculado; I: inoculado

A análise geral dos dados evidencia para o período de armazenamento (12 meses) das sementes de amendoim tratadas com o extrato hidroalcoólico de sucupira que as maiores doses utilizadas no procedimento NI contribuíram para a redução de incidência dos fungos estudados, como também para o *Rhizopus* o qual teve comportamento similar no procedimento I. A superioridade da incidência de *A. flavus*, principalmente no procedimento I deve-se, provavelmente, a uma competição antagônica que ocorre com o *A. flavus* frente ao *A. niger* e *Rhizopus*.

Essa competição intraespecífica dos fungos por substrato pode ocorrer de forma ativa, quando ocorre inibição por contato entre os fungos, na alteração do substrato, ou quando há parasitismo fúngico; ou de forma passiva, no qual não ocorre uma inibição de um fungo pelo outro, porém, há uma competição por espaço ou por nutrientes essenciais. Sendo assim, houve vantagem do *Aspergillus flavus* sobre os demais fungos, competindo por espaço ou nutrientes. Estas considerações estão de acordo com NAKAI (2006) que trabalhou com distribuição de fungos e aflatoxinas em variedade de amendoim armazenado, verificando assim que a influência mútua entre os fungos pode ocorrer de modo antagônico.

Segundo BARRETO (2001), os fungos do gênero *Rhizophus* têm pouca importância quanto a sua incidência em sementes, porém, se as sementes apresentarem elevada contaminação com esse patógeno, essas deverão ser desinfestadas.

VIEGAS et al. (2005), verificaram um efeito inibitório no desenvolvimento micelial de *A. flavus* com emprego de óleos essenciais de bubilho de alho e da casca de canela e com BARRÊTO et al. (2004) os quais verificaram também que o uso do extrato curtido *Agave sisalana*, controlou os fungos *Aspergillus* sp. e *Fusarium* sp., em torno de 47,20 e 39,53%, respectivamente em sementes de algodoeiro.

Para a interação Tempo x Procedimento da incidência de fungos (Tabela 4.5), tem-se para o procedimento dentro de cada tempo, superioridade estatística para as sementes inoculadas I frente às NI da incidência de *A. flavus*, à exceção do T_0 que foram estatisticamente iguais em ambos os procedimentos. O contrário deu-se para o comportamento do *A. niger* e *Rhizopus*, isto é, o procedimento NI foi estatisticamente superior ao procedimento I para todos os tempos, à exceção do T_0 que revelou igualdade estatística para os fungos do gênero *Rhizopus*, e o procedimento I foi estatisticamente superior ao NI para o *A. niger*.

Analisando o fator tempo, a incidência de *A. flavus* no procedimento I não apresentou diferença estatística, enquanto no procedimento NI a maior ocorrência deu-se em T_0 (81,50%), seguido do T_3, que foi estatisticamente superior a T_6 e T_{12}, com menor ocorrência em T_9 (41,50%). O *A. niger* assim como o *Rhizopus* comportaram-se de modo diferente, visto que, no procedimento NI a maior incidência do *A. niger* ocorreu no T_{12} (50,00%), e a menor em T_0, seguida de T_3 que estatisticamente não diferiu de T_9, sendo este superior a T_6. No procedimento I houve maior ocorrência desse fungo em T_0 (10,00%), seguido de T_{12} o qual foi estatisticamente igual T_9, e superior a T_3 e T_6, períodos estes onde ocorreu menor incidência. Com relação ao *Rhizopus* no procedimento NI a maior ocorrência foi verificada no T_9 (52,00%) e a menor em T_0 (5,05%). Igual comportamento obteve-se no T_0 para o procedimento I sendo este estatisticamente igual ao T_3 e T_9, e inferior ao T_6 e T_{12}, que foi o período de maior ocorrência desses fungos nas sementes armazenadas para este procedimento.

Tabela 4.5. Valores médios da incidência (%) de fungos para a interação Tempo x Procedimento de sementes de amendoim tratadas com extrato hidroalcoólico de sucupira, inoculadas e não inoculadas com *A. flavus* durante 12 meses de armazenamento

Tempo (meses)	Procedimento					
	NI	I	NI	I	NI	I
	A. flavus		*A. niger*		*Rhizopus*	
T_0	81,50 aA	79,50aA	0,00 dB	10,00aA	5,05 dA	5,05 cA
T_3	70,00 bB	80,50 aA	27,00 bA	0,00 bB	41,52 cA	3,07 cB
T_6	56,00 cB	82,50aA	23,52cA	0,00 bB	47,50 bA	10,54 bB
T_9	41,50 dB	83,00 A	26,00 bA	1,09 dB	52,00 aA	5,07 cB
T_{12}	58,50 cB	82,00 A	50,00 aA	4,07cdB	47,00 bA	17,08 aB
DMS (C)	3,74		3,87		4,42	
DMS (L)	2,67		2,77		3,16	

As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade; NI: não inoculado; I: inoculado

De modo geral evidencia-se que, a incidência de fungos nas sementes de amendoim tratadas com o extrato hidroalcoólico de sucupira, aumentam com o passar do tempo de armazenamento, quer seja no procedimento I como no NI, a exceção do *A. flavus* que comportou-se diferentemente dos demais fungos. Esses dados diferem em parte dos obtidos por DINIZ et al. (2001), que verificaram redução na incidência de *A. niger* ao longo do armazenamento em todos os tratamentos e embalagens, porém menor incidência de *A. flavus* nas sementes tratadas com fungicida.

Tabela 4.6. Valores médios da incidência (%) de fungos para a interação Doses x Tempo de sementes de amendoim tratadas com extrato hidroalcoólico de sucupira, inoculadas e não inoculadas com *A. flavus* durante 12 meses de armazenamento

Doses (mL)	Tempo (meses)				
	T_0	T_3	T_6	T_9	T_{12}
	A. flavus				
D_0	15,00 aC	92,50 aB	96,25 aAB	98,75 aA	100,00 aA
D_{10}	15,00 aD	77,50 bC	86,25 bB	100,00 aA	97,50 aA
D_{40}	15,00 aD	61,25 cC	72,50 cB	98,75 aA	98,75 aA
D_{70}	15,00 aE	58,75 cD	65,00 dC	75,00 cB	97,50 aA
D_{100}	15,00 aC	78,75 bB	83,75 bAB	85,00 bA	88,75 bA
DMS (C)			5,91		
DMS (L)			5,91		
	A.Niger				
D_0	5,05 aB	16,3 aA	0,00 dC	7,55 cB	20,05 cA
D_{10}	5,05 aC	17,55 aAB	21,30 aA	21,30 aA	16,30 cB
D_{40}	5,05 aC	17,55 aB	15,05 bB	16,30 bB	37,50 aA
D_{70}	5,05 aC	10,05 bB	10,05 cB	8,80 cBC	27,55 bA
D_{100}	5,05 aC	6,30 bC	12,55 bcB	11,30 cB	28,80 bA
DMS (C)			4,61		
DMS (L)			4,61		
	Rhizopus				
D_0	5,05 aD	42,50 aC	57,50 aB	60,00 aB	91,25 aA
D_{10}	5,05 aB	23,77 bA	28,75 bA	23,78 bA	10,05 dB
D_{40}	5,05 aC	23,80 bA	17,55 cAB	16,30 cB	23,80 bA
D_{70}	5,05 aB	18,80 bA	18,80 cA	20,05 bcA	15,05 cdA
D_{100}	5,05 aB	2,57 cB	22,50 bcA	22,55 bcA	20,05 bcA
DMS (C)			6,99		
DMS (L)			6,99		
	Penicillium				
D_0	0,00 bA	0,00 Ba	0,00 bA	0,00 bA	32,50 aA
D_{10}	0,00 bA	0,00 bA	0,00 bA	0,00 bA	32,50 aA
D_{40}	0,00 bA	0,00 bA	0,00 bA	0,00 bA	25,00 aB
D_{70}	0,00 bA	0,00 bA	0,00 bA	0,00 bA	22,50 aB
D_{100}	0,00 bA	0,00 bA	0,00 bA	0,00 bA	25,00aB
DMS (C)			4,74		
DMS (L)			4,70		

As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Mediante os dados contidos na Tabela 4.6 para a interação Doses x Tempo, observa-se a incidência de fungos em cada tempo para todas as doses, e que o *A. flavus* no T_0 foi estatisticamente

igual para todas as doses, visto ser um período de caracterização. No T_3 houve um maior controle nas doses D_{40} e D_{70} as quais foram estatisticamente iguais, seguido de D_{10} e D_{70} que também obtiveram igualdade estatística, superando a incidência das sementes que não receberam tratamento (D_0). Comportamento similar ocorreu no T_6, contudo a dose de maior controle foi a D_{70} diferindo estatisticamente das demais doses, onde D_{100} e D_{10} obtiveram igualdade estatística, diferindo de D_{40} e D_0. Para T_9 o maior controle deu-se também na D_{70}, seguida da D_{100}, e das demais doses ($D_{40} = D_{10} = D_0$) que estatisticamente não diferiram. Aos 12 meses de armazenamento se constatou diferença estatística em D_{100} superando as demais doses (D_0, D_{10}, D_{40} e D_{70}) no controle do *A. flavus*.

Em análise ao efeito de cada dose em função do tempo tem-se para todos os fungos aumento da incidência com relação à testemunha a medida que aumentou o tempo de armazenamento, onde se obteve para o *A. flavus* um melhor controle com a dose D_{70} ($T_0 > T_3 > T_6 > T_9 > T_{11}$), seguido de D_{40} que apresentou o mesmo comportamento de D_{70}, exceto em T_9 e T_{12} onde não se registrou diferença estatística na incidência do *A. flavus*. Comportamento similar ocorreu para o *A. niger* e o *Rhizopus*, e a incidência de *Penicillium* somente se deu em T_{12}.

Este comportamento é característico dos fungos de armazenamento que ao encontrarem condições favoráveis de substrato, temperatura e umidade se multiplicam, aumentando a sua incidência na massa de semente armazenada.

Em síntese aos resultados da Tabela 4.6, a dose D_{70} mostrou-se mais eficiente ao controle de fungos, contudo houve um crescimento da infestação com o avanço do tempo de armazenamento. Fato que se deve, provavelmente, aos princípios ativos das plantas que tem como função principal atuar como meio de defesa contra fatores externos, contudo o potencial de ação desses nas plantas pode variar de acordo com a espécie vegetal, condições de solo e clima durante seu desenvolvimento e, até mesmo, com a metodologia utilizada para sua extração, podendo resultar em diferentes reações aos extratos aplicados, como em suas doses e, também, durante o tempo de armazenamento pode ocorrer uma redução da sua eficiência no controle de fungos, principalmente pela diminuição da ação dos princípios ativos contidos no extrato vegetal, provavelmente alterando o comportamento desses fungos e até favorecendo o desenvolvimento de estruturas de resistência como os esporos. Essa afirmação em parte encontra apoio no trabalho de RIBEIRO & BEDENDO (1999) que demonstraram que a concentração de extratos tem efeito sobre a inibição ou não de fungos, verificando que o extrato de alho inibiu o crescimento micelial de fungos, em porcentagens variáveis de 5,3 a 67,6%, porém não atuou de modo expressivo sobre a produção de conídios. Em contraposição, os extratos de hortelã, mamona e pimenta promoveram inibição menos acentuada do crescimento de micélio, porém reduziram drasticamente a produção de conídios em níveis variáveis de 41 a 84%, de acordo com as concentrações crescentes dos mesmos, e MIETH et al. (2007) estudando a aplicação de extratos de hortelã no controle da micoflora de sementes de cedro, verificaram que ao aplicar o extrato de hortelã em pó na concentração de 30% houve a inibição do crescimento das espécies de fungos *Aspergillus* spp. e, para o mesmo extrato, porém destilado a inibição foi observada na concentração de 20 e 30%. Contudo o extrato não foi eficiente por favorecer a incidência de *Rhizopus* spp.

CONCLUSÕES

- As sementes de amendoim inoculadas armazenaram-se com teor de umidade inferior as não inoculadas em 6,21%.
- Os fungos detectados nas amostras de amendoim vindo do campo e durante o armazenamento das sementes não inoculadas e inoculadas, foram: *A. flavus*, *A. niger*, *Rhizopus* e *Penicillium*, com predominância do *A. flavus*, e aumento da incidência pelo aumento do tempo de armazenagem.
- As maiores doses do extrato de sucupira (D_{100} = 100%, D_{70} = 70%,) utilizadas no procedimento não inoculado contribuíram para redução da incidência de fungos.
- Houve menor ocorrência do *A. niger* e *Rhizopus* no procedimento inoculado, com a predominância do *A. flavus*.
- A umidade das sementes de amendoim armazenadas dentro do fruto foram inferiores as armazenadas fora do fruto em media 1,89%.
- Os fungos detectados nas sementes de amendoim dentro e fora do fruto vindo do campo e durante o armazenamento foram: *A. flavus*, *A. niger*, *Rhizopus* e *Penicillium*, com predominância do *A. flavus*, que aumentou sua incidência no decorrer no armazenamento.
- A incidência de fungos no amendoim armazenado em casca foi menor em que a do amendoim armazenado fora da casca.
- A aplicação do extrato de hidroalcoólico de sucupira às sementes de amendoim dentro e fora do fruto controlou a incidência de fungos, principalmente *A. flavus*.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de Iniciação Científica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S.A. de; ALMEIDA, F. de A.C.; ARAÚJO, M.E.R.; SANTOS, N.R. dos; SILVA, J.A. da. Extratos botânicos como alternativa de controle do caruncho do feijão *vigna* (*Callosobruchus maculattus*) In: XXXII Congresso de Engenharia Agrícola, 2003, Goiânia, Go, **Anais...**2003, 4p.CDRom.

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

BARRETO, R.W. **Fungos fitopatogênicos.** Viçosa: Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, UFC, 2001. 48p.

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

DINIZ, E.; SILVA., C.L.; MUNIZ, M.B.; QUEIROGA, V. de P.; BRUNO, R.L. de A. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) Armazenadas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.3, n.1, p.61-72, 2001.

MIETH, A.T.; PIVETA, G.; PACHECO, C.; HAMANN, F.; RODRIGUES, J.; MUNIZ, M.F.B.; BLUME, E. Microflora e qualidade fisiológica de sementes de cedro (*Cedrella fissilis*) tratadas com extrato natural de hortelã (*Mentha piperita*). **Revista Brasileira de Agroecologia,** v.2, n.2, p.1191-1195, 2007.

NEERGAARD, P. **Seed pathology.** 2 ed. London: Mac Millan Press, 1979. v.2, 1191p.

RIBEIRO, L.F.; BEDENDO, I.P. Efeito inibitório de extratos vegetais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* - agente causal da podridão de frutos de mamoeiro. **Scientia Agricola**, v.56, n.4, p.1267-1271, 1999.

SANTOS, R.C. dos; GODOY, J.I. de; FÁVERO, A.P. **Melhoramento do amendoim**. In: SANTOS, R. C. O agronegócio do amendoim no Brasil**.** Campina Grande: Embrapa Algodão, p 123-192, 2005.
SANTOS, N.R. **Efeitos de extratos vegetais com relação à mortalidade do caruncho (*Sitophilus zeamais* L.) e a qualidade fisiológica de sementes de milho armazenadas.** Campina Grande: UFCG, 2003. 57p. Dissertação Mestrado
SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry,** v.30, n.12, p.3875-3883, 1991.
SILVA, F.A.S. e; AZEVEDO, C.A.V. de. A new version of the assistat-statistical assistance software. In: World Congress on Computers in Agriculture, 4, Orlando. **Anais...** Orlando: American Society of Agricultural Engineers, 2006. p.393-396.
VIEGAS, E. de C; SOARES, A.; CARMO, M.G.F. do; ROSSETO, C.A.V. Toxidade de óleos essenciais de alho e casca da canela contra fungos do grupo *Aspergillus flavus*. **Horticultura Brasileira,** v.23, n.4, 2005.