



CONTROLE DA AFLATOXINA EM SEMENTES DE AMENDOIM ARMAZENADAS COM EXTRATO HIDROALCOOLICO DE NIM

Simone Aparecida da Silva Lins¹, Francisco de Assis Cardoso Almeida², Rosa Maria Mendes Freire³, Niedja Marizze Cezar Alves⁴, Rosângela da Silva Costa⁵

RESUMO

Foi avaliado o controle de aflatoxina em sementes de amendoim inoculadas e não inoculadas com *Aspergillus flavus*, armazenadas em embalagem pet e polietileno, mediante o tratamento com extratos hidroalcoolicos de nim. O delineamento empregado foi o inteiramente casualizado, seguindo o esquema fatorial. A identificação e quantificação da aflatoxina foram realizadas por cromatografia em camada delgada (CCD). O limite de detecção para a aflaxina B₁ foi de 1,94 µg kg⁻¹. Sendo os valores obtidos na recuperação da aflatoxina de 87,67 a 109,57%, respectivamente para as sementes inoculadas e não inoculadas com *Aspergillus flavus* e seus CV 3,986 a 6,67%, concomitantemente. A presença de aflatoxina acima do permitido pela legislação brasileira para comercialização do amendoim (20 µg kg⁻¹) deu-se com as sementes inoculadas com *Aspergillus flavus* tratadas com extrato de nim a 70%. As sementes tratadas com o extrato de nim, submetidas à embalagem de pet e inoculadas antes do armazenamento com o *Aspergillus flavus* apresentaram aflatoxina, o contrario deu-se com a embalagem de polietileno trançado.

Palavras-chave: nim, aflatoxina e *aspergillus flavus*

CONTROL OF AFLATOXIN IN SEEDS PEANUT STORED WITH HYDROALCOHOLIC EXTRACT OF NEEM

ABSTRACT

The control of aflatoxin in peanut seeds inoculated and not inoculated with *Aspergillus flavus*, stored in pet and polyethylene packagings, through the treatment with water extracts of neem. The design used was the entirely randomized following the factoria scheme. The identification and quantification of aflatoxin were performed by thin-layer chromatography (TLC). The detection limit for aflaxina B₁ was 1.94 µg kg⁻¹. The values obtained in the recovery of aflatoxin were from 87.67 to 109.57%, respectively for seeds inoculated and not inoculated with *Aspergillus flavus* and its CV from 3.986 to 6.67%, accordingly. The presence of aflatoxin above the allowed by the Brazilian legislation for marketing of peanuts (20 µg kg⁻¹) was made with the seeds inoculated with *Aspergillus flavus* treated with neem extract at 70%. Seeds treated with the extract of neem, subject to the packaging of pet before storage and inoculated with *Aspergillus flavus* showed aflatoxin, the opposite took place with the packaging of braided polyethylene.

Keywords: neem, aflatoxin, *Aspergillus flavus*

¹ Aluna de Curso de Química Industrial, Departamento de Química, UEPB, Campina Grande, PB, E-mail: simone_quimicaperfeita@hotmail.com

² Agrônomo, Professor. Doutor, Unidade Acadêmica de Engenharia Agrícola, UFCG, Campina Grande, PB, E-mail: almeida@deag.ufcg.edu.br

³ Química Industrial, Pesquisadora. Mestre, Embrapa Algodão, Campina Grande, PB, E-mail: rosa@cnpa.embrapa.br

⁴ Eng. Agrícola. Mestre, Unidade Acadêmica de Eng. Agrícola, Campina Grande, PB, E-mail: niedjamarizze@gmail.com

⁵ Agrônoma. Mestre, Unidade Acadêmica de Eng. Agrícola, UFCG, PB, E-mail: airanrosa@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

As micotoxinas são agentes químicos resultantes da atividade metabólica secundária de fungos em crescimento. Dentre as principais micotoxinas encontradas a mais estudada é a aflatoxina, devido seu caráter marcadamente carcinogênico, mutagênico e teratogênico, com efeitos crônicos ou agudos em animais e humanos (BRAGA, 2003).

As aflatoxinas (AFs) constituem um grupo de toxinas produzidas pelos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* e são identificadas como B₁, B₂, G₁ e G₂.

Sendo que as letras B e G devem-se ao fato destas apresentarem fluorescência azulada e esverdeada, respectivamente, quando observadas sob luz ultravioleta. Conforme existe atualmente mais de 400 micotoxinas que causam severos prejuízos a saúde, sendo que no grupo das aflatoxinas o componente mais potente é a aflatoxina B₁.

A contaminação do amendoim por micotoxinas é decorrente, principalmente, de falhas no controle da umidade e da temperatura em fases e etapas da cadeia produtiva, propiciando condições favoráveis ao desenvolvimento dos fungos toxigênicos. O controle é dificultado pelas condições climáticas e por características próprias da cultura, como a formação das vagens no solo. Portanto, o amendoim é um produto altamente suscetível à contaminação e ao crescimento de bolores produtores de aflatoxinas, os quais comprometem seriamente a segurança do alimento, destinados ao consumo tanto humano quanto animal (SUASSUNA, et al., 2005).

É importante ressaltar que o nível de micotoxinas pode ser extremamente variável entre grãos e sementes de um mesmo lote e o processo de coleta de amostras é uma etapa crítica no monitoramento de estas.

Os níveis máximos de aflatoxina permitidos em alimentos e matérias-primas estão previstos na legislação brasileira (RDC n° 247 de 15/10/2002 da ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária) determina que nos grãos de milho e de amendoim, o somatório da concentração das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, não excedam 20µg/kg. Esta resolução internacionalizou as normas do Mercosul GMC/RES n°. 56/94 (BRASIL, 2002).

Diversos fatores influenciam na preservação da qualidade das sementes, entre os quais as condições de produção, beneficiamento e armazenamento (Popinigis, 1985). De acordo com Pedrosa et al. (1999), as condições ideais para a conservação das sementes são aquelas em que as suas atividades metabólicas são reduzidas ao mínimo, mantendo-se baixas a umidade relativa e a temperatura no ambiente de armazenamento. Nesse contexto, a embalagem constitui-se um dos fatores mais importantes durante o armazenamento de sementes, por conferi-las maior proteção, principalmente, contra a umidade, que é um dos fatores determinante para a produção de aflatoxina por fungos toxigênicos (Popinigis 1985).

Extratos e óleos de plantas com potencial inseticida vêm sendo utilizados como alternativa para o controle de fungos. O uso de componentes presentes em óleos e extratos de diversas plantas tem sido utilizado no controle de patógenos com excelentes resultados para fungos, apresentando-se como uma alternativa natural de uso (COSTA, 2007).

Diante da propriedade inibitória de extratos vegetais sobre o desenvolvimento micelial de fungos e da importância das espécies do grupo *Aspergillus flavus*, que apresentam potencial para síntese de aflatoxina, estudou-se com o presente trabalho o efeito do extrato hidroalcolólico de nim no controle de aflatoxina em sementes de amendoim, com e sem inóculos de *Aspergillus flavus*, armazenadas em embalagem de polietileno trançado e pet, durante 12 meses de armazenamento.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas (LAPPA) da Unidade Acadêmica de Engenharia Agrícola do Centro de Tecnologia e Recursos Naturais, da Universidade Federal de Campina Grande, e no Laboratório de Química da Embrapa Algodão, ambos em Campina Grande, PB.

Material

As sementes de amendoim, cultivar BRS Havana, utilizadas nos experimentos foram adquiridas junto a um produtor que contempla um projeto de produção integrada com a Embrapa Algodão, no distrito Missão Nova, município de Missão Velha, CE. As sementes, da cultivar com e sem inóculos de *Aspergillus flavus* foram tratadas com o extrato vegetal de nim e armazenadas em embalagens de Pet e polietileno trançado, por 12 meses.

Análise estatística

Com os dados obtidos observaram-se as influências das concentrações do extrato de nim, o tratamento das sementes com e sem inoculo e as embalagens utilizadas. O delineamento foi o inteiramente casualizado em que os fatores foram distribuídos em esquema fatorial. O programa computacional utilizado foi o Assistat, versão 7.4. beta, no qual foram feitas as análises de variância (ANOVA) e comparação das médias pelo teste de Tukey a 1 % de probabilidade.

Isolamento e desenvolvimento do fungo

As sementes de amendoim foram lavadas com hipoclorito de sódio e água destilada, posteriormente colocada em placas de petri com meio de cultura apropriado e incubadas a 22 ± 2 °C por 48 h. Depois, em um microscópio, foram identificadas as colônias de fungos presentes e, em seguida, isolou-se apenas o *Aspergillus flavus*, que foi transferido para meio de cultura apropriado. Em seguida, estes foram multiplicados em uma massa de amendoim previamente aquecida em estufa a 105 °C por uma hora, e esfriada em temperatura ambiente. Após inoculação do fungo nessa massa, ela foi agitada manualmente, e distribuída em placas de Petri, contendo três discos de papel de filtro, sendo dois na base e um em cobertura, esterilizados e umedecidos com água destilada esterilizada. Sendo o desenvolvimento do fungo *Aspergillus flavus*, nestas condições, feitas a temperatura ambiente. Salienta-se que durante a incubação (desenvolvimento) estes foram transferidos, sempre que necessário, antes que houvesse o esgotamento total do substrato.

Determinação da aflatoxina

A cada três meses, durante o período de armazenamento foram utilizadas amostras de sementes de cada tratamento e submetidas aos testes das determinações de aflatoxina.

a) Preparo da amostra

As amostras oriundas do armazenamento foram trituradas em moinho de hélice, semelhante a multiprocessador e, com auxílio de peneira de 14 mesh, obteve-se a granulometria necessária. As amostras foram colocadas em embalagens plásticas fechadas e acondicionadas em refrigerador até o momento da análise.

b) Preparo das soluções-padrão

Os padrões das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, na forma de cristais, foram adquiridos do Laboratório Sigma. A metodologia do preparo das soluções-padrão foi realizada de acordo com AOAC (Official Method 970.44; 2005), usando-se o seguinte processo: as aflatoxinas individualmente foram diluídas em metanol, originando as soluções-mãe com concentrações de 20 µg mL⁻¹. Em seguida, foram preparadas as soluções de trabalho com concentrações variadas para utilização na triagem e quantificação das aflatoxinas. A concentração final das soluções padrão das aflatoxinas foi determinada através de sua absorbância em espectrofotômetro e calculada, segundo a equação abaixo descrita:

$$\text{Concentração aflatoxina } (\mu\text{g} / \text{mL}) = \frac{A \times PM \times 1000}{\varepsilon}, \text{ em que:}$$

A - absorbância; PM - peso molecular; ε - Absortividade molar da micotoxina.

c) Procedimento analítico

As extrações para identificação e confirmação das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, nas amostras, foram realizadas de acordo com o método de análise desenvolvido por SOARES & RODRIGUES-AMAYA (1989), melhorada por QUEIROZ (1998), que é um método de baixo custo, precisão e exatidão e viável de ser executado em pequenos laboratórios. De acordo com o método, a extração de toxinas foi realizada com solvente orgânico (metanol) e solução de cloreto de potássio 4%; a purificação do extrato foi feita com solução de sulfato de cobre 10% e celite (agente filtrante), que tem por finalidade retirar todas as substâncias interferentes, como pigmentos e ácidos graxos. Na partição líquido-líquido utilizou-se solvente orgânico (hexano), para desengorduramento, e clorofórmio, para extração das aflatoxinas (Figura 1).

Em seguida, o extrato foi evaporado em banho-maria (em até 60 °C) e mantido sob refrigeração em freezer, até o momento da análise cromatográfica.



Figura 1. Processo de extração das aflatoxinas das amostras de sementes de amendoim

A triagem das aflatoxinas nas amostras (Figura 2) foi realizada através de cromatografia em camada delgada (CCD), em duplicata, utilizando-se cromatofolhas de alumínio e a mistura tolueno - acetato de etila - ácido fórmico (60:30:10), como sistema solvente. A aplicação é feita a 2 cm da base da placa e a eluição é feita até 10 cm a partir do ponto de aplicação.

De acordo com a técnica utilizada, a identificação da aflatoxina foi feita através da comparação com Rfs, cor e intensidade de fluorescência das manchas correspondentes às amostras comparadas com as manchas dos padrões. A visualização das aflatoxinas em câmara de luz ultravioleta, de comprimento de ondas de 366 nm.

Para confirmação das amostras, em que houve suspeita da presença de algum tipo de aflatoxina, foi realizada nova leitura, utilizando-se o sistema solvente clorofórmio-acetona (90:10), e em seguida novamente submetidas à leitura em câmara de luz ultravioleta.

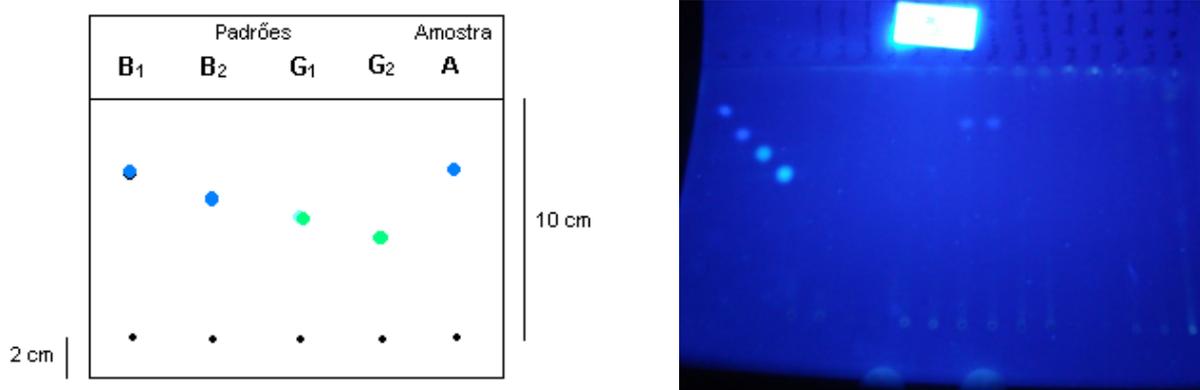


Figura 2. Esquema representado uma placa unidimensional de CCD (cromatografia em camada delgada) e uma placa real sob luz ultravioleta

A quantificação das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ foi feita através da comparação visual da intensidade de fluorescência da mancha da amostra, com a fluorescência das manchas dos padrões aplicados na placa em concentrações crescentes, em alíquotas de 0,4, 0,6, 0,8, 1 e 2 µL. Repetições com novas alíquotas de padrões ou de amostras foram feitas quando se faziam necessários, para a obtenção de uma melhor aproximação da intensidade da fluorescência entre a mancha suspeita e o padrão.

O cálculo da concentração de aflatoxinas foi feito através da seguinte fórmula:

$$\mu\text{g toxina} / \text{kg amostra} = \frac{S \times Y \times V}{W \times Z}$$

em que: S - microlitros do padrão da toxina com fluorescência equivalente à da amostra; Y - concentração do padrão em µg µL⁻¹; V - volume final, em µL, do extrato da amostra (500 µL); Z - microlitros aplicados do extrato final; e, W - peso da amostra em gramas, no extrato final (8,35 g).

Teste de recuperação da aflatoxina B₁

O teste de recuperação consistiu em contaminar uma farinha de amendoim isenta de aflatoxinas. Pesou-se amostras de 50 g em três repetições e acrescentou-se uma solução do padrão B₁ (Figura 3) nos níveis de 7,8 µg kg⁻¹ para amostras inoculadas e não inoculadas e, sem tratamento, 12,68 µg kg⁻¹ para amostras inoculadas e, com diferentes concentrações de extrato de nim, 17,6 µg kg⁻¹ para amostra sem inoculação e, com diferentes concentrações de extrato de nim. Posteriormente, após 24 h procedeu-se à extração para verificar o percentual de aflatoxina B₁, recuperada através da metodologia utilizada. A recuperação foi calculada pela relação entre a quantidade de toxina quantificada e a adicionada no início do procedimento analítico executado de forma completa.



Figura 3. Preparo e contaminação, das amostras de sementes de amendoim, com aflatoxina B₁, para teste de recuperação

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Teste de recuperação

O resultado do teste de recuperação não apresentou fluorescência característica das aflatoxinas G₁, B₂ e G₂, sendo observada somente a presença de aflatoxina B₁. Segundo PRADO et al. (2008) o teste de recuperação caracteriza o desempenho do método analítico, e que o limite de detecção da metodologia é de 1,94µg/kg.

Os níveis de contaminação de aflatoxina B₁, tida como pertencente ao grupo 1 dos possíveis carcinógenos, e os valores recuperados a partir de amostras fortificadas, bem como a média e as percentagens de recuperação e coeficiente de variação, estão apresentados nas Tabelas 1 e 2.

Nas amostras de amendoim inoculado e não inoculado com *Aspergillus flavus* e contaminadas com aflatoxina B₁ (Tabela 1), observou-se valores de recuperação da aflatoxina que variaram de 6,594 e 8,79 µg kg⁻¹, tendo como média de recuperação 98,62% e coeficiente de variação médio de 5,56%.

Tabela 1. Resultados de recuperação de amostras de amendoim inoculados e não inoculados com *Aspergillus flavus* e contaminadas artificialmente com aflatoxina B₁

Tratamento	Quantidade adicionada (µg kg ⁻¹)	Quantidade recuperada (µg kg ⁻¹)	Média (µg kg ⁻¹)	Recuperação (%)	Coeficiente de variação (%)
Sem inoculação	7,8	8,06	8,547	109,57	4,93
		8,79			
		8,79			
Inoculado	7,8	6,594	6,838	87,67	6,18
		7,326			
		6,594			
Média			7,69	98,62	5,56

Nos resultados de recuperação da aflatoxina B₁, das amostras de amendoim inoculadas e não inoculadas com *Aspergillus flavus*, tratadas com extrato de nim e armazenado em embalagem do tipo Pet (Tabela 2), observou-se uma média de recuperação de 101,5 % e coeficiente de variação médio de 5,33 %.

Tabela 2. Resultados de recuperação de amostras de amendoim inoculados e não inoculados com *Aspergillus flavus*, contaminadas artificialmente com aflatoxina B₁, tratadas com extrato de nim e armazenado em embalagem Pet

Tratamento	Quantidade adicionada ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Quantidade recuperada ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Média ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recuperação (%)	Coefficiente de variação (%)
Sem inoculação	17,568	17,58	18,07	102,86	3,986
		19,05			
		17,58			
Inoculado	12,68	13,187	12,698	100,14	6,67
		13,187			
		11,72			
Média			15,384	101,5	5,33

Em análise a totalidade dos dados, tem-se que o valor médio de recuperação para a aflatoxina variou de 87,67 a 109,57%, com média geral 100,06%. O coeficiente de variação foi de 5,44%, considerado aceitável, que de acordo com SOARES (1987), para o caso de micotoxinas contaminadas, este pode variar de 0 a 27%. E, quanto a recuperação, por Howirtz citado por PRADO et al. (2008) ao afirmar que para a análise de micotoxinas consideram-se como aceitáveis valores de recuperação entre 70 a 120% e coeficiente de variação inferior a 30%.

Amostras, tratadas com extrato de nim, provenientes do armazenamento de 3 meses.

Não foi detectada nenhuma espécie de aflatoxina nas amostras de caracterização. Segundo COSTA (2007), este comportamento na caracterização deve-se, provavelmente, ao fato de que o fungo *Aspergillus flavus* necessita de ambiente adequado e tempo para se desenvolver. Tal fato está aliado ao baixo teor de umidade nas sementes na ocasião da caracterização da aflatoxina (6,8%).

As amostras provenientes do armazenamento de 3 meses, armazenadas em embalagem pet, ao serem submetidas a análises para determinação de aflatoxina, apresentaram positividade, para aflatoxina B₁, apenas para as que foram tratadas com extrato de nim a 70% sem inoculação com *Aspergillus flavus* e, com 100% com o *Aspergillus flavus* inoculado.

Na Tabela 3 tem-se o resumo da análise de variância e o coeficiente de variação correspondente à quantidade de aflatoxina ($\mu\text{g kg}^{-1}$) das sementes de amendoim com e sem inóculos de *Aspergillus flavus*, tratadas com concentrações de 70 e 100% de extratos de nim, onde se observa efeito altamente significativo para os fatores e sua interação.

Tabela 3. Análise de variância da quantidade de aflatoxina ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de sementes de amendoim com e sem inóculo de *Aspergillus flavus*, tratadas com concentrações de 70 e 100% de extrato de nim

Fator de variação	G.L.	Q.M.
Conc. do extrato (F1)	1	107,38451**
Inóculo (F2)	1	107,38452**
Int. F1 x F2	1	966,02142**
Tratamentos	3	393,59681**
Resíduo	4	0,00000
Total	7	
C.V. (%)		0.00005

**Significativo a 1 % de probabilidade pelo teste de Tukey

Os dados da Tabela 4 indicam a quantidade de aflatoxina ($\mu\text{g kg}^{-1}$) para a interação concentrações do extrato x inóculo nas sementes de amendoim, variedade BRS Havana, armazenadas por um período de 3 meses.

Tabela 4. Quantidade de aflatoxina ($\mu\text{g kg}^{-1}$) para a interação concentrações do extrato x inóculo nas sementes de amendoim da variedade BRS Havana, armazenadas por 3 meses

Concentrações do extrato (%)	Inóculo	
	Sementes com inóculo	Sementes sem inóculo
70	0,0000 bB	29,3050 aA
100	14,6500 aA	0,0000 bB

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem a 1 %, pelo teste de Tukey

Em análise aos dados desta tabela (Tabela 4) tem-se para o inóculo dentro de cada concentração que as sementes sem inóculo de *Aspergillus flavus*, tratadas com o extrato de nim a 100% não apresentaram aflatoxina após os três meses que permaneceram acondicionadas em embalagens de peti em condições do LAPP, sem controle de temperatura e umidade relativa do ar. Enquanto, que as sementes não inoculadas e tratadas com extrato de nim a 70% manifestaram uma quantidade de aflatoxina, depois do período de armazenamento ($29,3050 \mu\text{g kg}^{-1}$), superior a permitida pela legislação para a sua comercialização ($20 \mu\text{g/kg}$). Comportamento contrário deu-se com as sementes inoculadas com *Aspergillus flavus*, porém com concentração tolerada pela legislação brasileira para a sua comercialização ($14,65 \mu\text{g kg}^{-1}$), apesar de estatisticamente bem superior à concentração de 70% em que não se registrou aflatoxina depois dos 3 meses de armazenamento ($0,0 \mu\text{g kg}^{-1}$).

Observando-se o comportamento das concentrações dentro do inóculo, verifica-se comportamento estatístico contrário ao obtido para o inóculo dentro de cada concentração, isto é, as sementes tratadas com extratos a 100% apresentaram aflatoxina somente quando inoculadas e a 70% quando não inoculadas.

Com relação a estes resultados, a literatura consultada reporta trabalhos somente *in vitro* com extratos vegetais nesta linha de pesquisa ARROTEIA (2007).

Ademais, formação de micotoxinas é dependente de uma série de fatores, como umidade, pH, temperatura, presença de oxigênio, constituição do substrato, lesões à integridade dos grãos causadas por insetos ou dano mecânico/térmico, quantidade de inóculo fúngico, bem como a interação e competição entre as linhagens fúngicas.

É importante ressaltar, também, que o nível de micotoxinas pode ser extremamente variável entre grãos e sementes de um mesmo lote e o processo de coleta de amostras é uma etapa crítica no monitoramento de micotoxinas.

ALMEIDA et.al. (2007) avaliando a produção de aflatoxinas em sementes de amendoim armazenadas em condições de temperatura ambiente e câmara seca ao longo de 180 dias, acondicionadas em embalagens de polietileno e papel multifoliado, não observaram presença da mesma no período inicial, tendo sido constatada aos 90, 135 e 180 dias a aflatoxina B₁, em distintos tratamentos.

Amostras, tratadas com extrato de nim, provenientes do armazenamento de 6 e 9 meses

As amostras submetidas às análises nos períodos de 6 e 9 meses não apresentaram positividade para aflatoxina.

Amostras, tratadas com extrato de nim, provenientes do armazenamento de 12 meses

O resumo das análises de variância correspondente á quantidade de aflatoxina das sementes de amendoim com e sem inóculo de *Aspergillus flavus*, tratadas na concentração de 70% com o extrato de nim e acondicionadas com embalagens pet e polietileno trançado (Tabela 5).

Tabela 5. Análise de variância da quantidade de aflatoxina ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de sementes de amendoim com e sem inóculo de *Aspergillus flavus*, tratadas na concentração de 70 % de extrato de nim e acondicionadas com embalagens pet e polietileno trançado

Fator de variação	G.L.	Q.M.
Embalagem (F1)	1	5.19649 **
Inóculo (F2)	1	5.19649**
Int. F1 x F2	1	279.02310 **
Tratamentos	3	96.47203**
Resíduo	8	0,00000
Total	11	
C.V. (%)		0.00622

**Significativo a 1 % de probabilidade pelo teste de Tukey

Os dados da Tabela 6 indicam a quantidade de aflatoxina ($\mu\text{g kg}^{-1}$) para a interação tipo de embalagem x inóculo nas sementes de amendoim da variedade BRS HAVANA, armazenadas por período de 12 meses.

Tabela 6. Quantidade de aflatoxina ($\mu\text{g kg}^{-1}$) para a interação tipos de embalagem x inóculo nas sementes de amendoim da variedade BRS Havana, tratadas com o extrato de nim a 70% e armazenadas por 12 meses

Tipo de Embalagem	Inóculo	
	Sementes com inóculo	Sementes sem inóculo
Pet	8,3281 aA	0,0000 bB
Polietileno Trançado	0,0000 bB	10,9603 aA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem a 1 %, pelo teste de Tukey

Em análise aos dados desta tabela (Tabela 6), verifica-se que o amendoim submetido aos dois tipos de embalagem, pet e polietileno trançado, diferiu estatisticamente para os estados com e sem inóculo das amostras. Tem-se para o inóculo dentro de cada tipo de embalagem que as sementes sem inóculo de *Aspergillus flavus*, tratadas com o extrato de nim a 70% não apresentaram aflatoxina após os 12 meses que permaneceram acondicionadas em embalagens de pet em condições do LAPPA, sem controle de temperatura e umidade relativa do ar. Para as sementes acondicionadas em embalagem do tipo polietileno trançado, não inoculadas e tratadas com extrato de nim a 70% manifestaram uma quantidade de aflatoxina, depois do período de armazenamento ($10,9603 \mu\text{g kg}^{-1}$), inferior à permitida pela legislação para a sua comercialização ($20 \mu\text{g kg}^{-1}$). Comportamento contrário deu-se com as sementes inoculadas com *Aspergillus flavus*, mas obedecendo a legislação brasileira, ou seja, a contaminação foi inferior ($8,3281 \mu\text{g kg}^{-1}$) a permitida pela legislação para sua comercialização.

Para o comportamento do tipo de embalagem dentro do inóculo, verifica-se comportamento estatístico contrário ao obtido para o inóculo dentro de cada tipo de embalagem, isto é, as sementes tratadas com extratos a 70%, submetida aos tipos de embalagem apresentaram aflatoxina somente quando inoculadas e armazenadas em embalagem pet e quando não inoculadas armazenadas em embalagem de polietileno trançado.

Pode-se inferir, através da análise da Tabela 6, que as sementes tratadas com o extrato de nim e submetidas à embalagem tipo pet só apresentou aflatoxina quando já estavam inoculadas, e quando não estavam a embalagem não favoreceu o desenvolvimento de aflatoxina. Já as amostras submetidas à embalagem tipo polietileno trançado apresentou aflatoxina ainda que não estive inoculada com o fungo.

Tais resultados corroboram com estudos feitos por COSTA (2007), no qual embalagens do tipo polietileno trançado proporcionaram aumento da umidade das sementes de amendoim armazenados por 180 dias, sendo a umidade um ponto crítico e fator de desenvolvimento de aflatoxina.

Na Tabela 7 observa-se a análise de variância e o coeficiente de variação correspondente a quantidade de aflatoxina ($\mu\text{g kg}^{-1}$) das sementes de amendoim com e sem inóculo de *Aspergillus flavus*, tratadas com concentrações de 10 e 70 % de extratos de nim e acondicionadas em embalagem pet, onde se observa efeito altamente significativo para os fatores e sua interação.

Tabela 7. Análise de variância da quantidade de aflatoxina ($\mu\text{g kg}^{-1}$), tipos Afla B₁ e Afla B₂, das sementes de amendoim inoculadas com *Aspergillus flavus*, tratadas com concentrações de 10 e 70% de extrato de nim e acondicionadas com embalagem pet

Fator de variação	G.L.	Q.M.
Dose do extrato de nim (F1)	1	20,78143 **
Tipo de aflatoxina (F2)	1	0,56004**
Int. F1 x F2	1	20,78322**
Tratamentos	3	14,04156**
Resíduo	8	0,00000
Total	11	
C.V. (%)		0,00104

**Significativo a 1 % de probabilidade pelo teste de Tukey

Na Tabela 8 estão dispostos a quantidade de aflatoxina ($\mu\text{g kg}^{-1}$) para a interação tipos de aflatoxina (B₁ e B₂) x concentração do extrato nas sementes de amendoim da variedade BRS HAVANA, inoculadas com *Aspergillus flavus* e armazenadas por período de 12 meses.

Tabela 8. Quantidade de aflatoxina ($\mu\text{g kg}^{-1}$) para a interação tipos de aflatoxina (B_1 e B_2) x concentração do extrato nas sementes de amendoim da variedade BRS Havana, inoculadas com *Aspergillus flavus* armazenadas por 12 meses

Concentrações do extrato	Tipo da aflatoxina	
	B_1	B_2
10 %	0.0000 bB	3.0641 aA
70 %	5.2640 aA	3.0640 bB

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem a 5%, pelo teste de Tukey

Na Tabela 8, encontra-se os resultados da interação tipos de aflatoxina x concentração do extrato nas sementes de amendoim, variedade BRS Havana, inoculadas com *Aspergillus flavus* e armazenadas por 12 meses.

Dentro de concentração constatou-se aflatoxina do tipo B1 somente na concentração de 70%, e nas concentrações de 10 e 70% com a aflatoxina na B2, sendo a 10% a quantidade de aflatoxina estatisticamente superior a 70%.

Dentro dos tipos de aflatoxina na concentração de 70% a B1 foi estatisticamente superior a B2, em 58 %, indicando o efeito da concentração no dessa micotoxina.

Este resultado encontra apoio nos obtidos por ARROTEIA (2007), o qual atestou que em amostras de maçãs tratadas com extrato de nim e contaminadas com micotoxinas, as menores concentrações do extrato obtiveram mais êxito no controle da micotoxina, fato atribuído a lipossolubilidade dos compostos bioativos presentes no extrato do nim, e que a umidade da água influi na absorção desses compostos.

CONCLUSÕES

- As sementes de amendoim, cultivar BRS Havana, não inoculadas com *Aspergillus flavus* e tratadas com extrato de nim a 70% se contaminaram com aflatoxina, assim como as sementes inoculadas com *Aspergillus flavus* tratadas com extrato de nim a 100%.
- A presença de aflatoxina acima do permitido pela legislação brasileira para comercialização do amendoim ($20 \mu\text{g kg}^{-1}$) deu-se com as sementes inoculadas com *Aspergillus flavus* tratadas com extrato de nim a 70%.
- Os valores obtidos na recuperação da aflatoxina foram de 87,67 a 109,57%, respectivamente para as sementes inoculadas e não inoculadas com *Aspergillus flavus* e seus CV 3,986 a 6,67%, concomitantemente.
- As sementes tratadas com o extrato de nim, submetidas à embalagem de pet e inoculadas antes do armazenamento com o *Aspergillus flavus* apresentaram aflatoxina, o contrario deu-se com a embalagem de polietileno trançado.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela bolsa de Iniciação Científica, a UFCG e Embrapa Algodão pelo uso de suas instalações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, A.L.B; ALMEIDA, F.de A.C.; COSTA, R. da S.; ALBUQUERQUE, E.M.B. Avaliação da aflatoxina em sementes de amendoim. **Revista Pesquisa**, Campina Grande. v.1, n.1, p.1-8, 2007.
- AOAC. AOAC INTERNATIONAL. Natural Toxins. In: **Official Methods of Analysis**, Arlington, Virginia, AOAC (Chapter 49) 2005, p.3-5.
- ARROTEIA, C.C.; KEMMELMEIERL, C.; MACHINSKI, M.J. Efeito dos extratos aquoso e oleoso de Nim [*Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae)] na produção de patulina em maçãs contaminadas por *Penicillium expansum*. **Ciência Rural**, v.37, n.6, p.1518-1523, 2007.

BRAGA, S.M.L.F.M. **Desenvolvimento de metodologia analítica para ensaios de aflatoxinas em *maytenus ilicifolia mart* comercializados no estado da Paraíba.** 2003. 158f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos), Centro de Ciência Biológicas e da Saúde. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

BRASIL. **Ministério da Saúde: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).** Resolução - RDC Nº 274 de 15/10/2002. Dispõe sobre os limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, amendoim e milho. Diário Oficial [da] República República Federativa do Brasil. Brasília, 2002.

COSTA, R.S. **Avaliação da aflatoxina em sementes de amendoim armazenadas e do óleo de nim no crescimento micelial de *Aspergillus flavus*.** 2007. 67p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola), Centro de Tecnologia e Recursos Naturais. Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande.

MALLMANN, C.A.; SANTURIO, J.M.; Wentz, I. Aflatoxinas - Aspectos clínicos e toxicológicos em suínos. **Ciência Rural**, v.24, n.3, p.635-643.1994.

MAROCHI, M.A.; VALENTE SOARES, L.M. Uma metodologia para determinação de tricotecenos e zearalenona em grãos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.1, p.1-8, 1993.

PEDROZA, J.P.; CIRNE, M.L. da M.R.; MEDEIROS, J.M.N. Teores de bixina e proteína em sementes de urucum em função do tipo e do período de armazenagem. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.3, n.1, p.121-123. 1999.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente.** Brasília, Agiplan. 1985. 289p.