

Fungos Associados a Amêndoas de Cupuaçu Fermentadas e Armazenadas

Virgínia de Souza Álvares¹, Joana Maria Leite de Souza², Paulo Eduardo França de Macedo³, Lorena Bezerra da Silva⁴, Esdras Sivaldo Honorato Santos⁵ e Marcus Arthur Marçal de Vasconcelos⁶

¹Engenheira-agrônoma, doutora em Fitotecnia, pesquisadora da Embrapa Acre, Rio Branco, AC.

²Engenheira-agrônoma, doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Acre, Rio Branco, AC.

³Engenheiro-agrônomo, mestre em Fitopatologia, analista da Embrapa Acre, Rio Branco, AC.

⁴Graduanda em Engenharia Agrônoma, Universidade Federal do Acre, estagiária na Embrapa Acre, Rio Branco, AC.

⁵Graduando em Ciências Biológicas, União Educacional do Norte, bolsista Pibic/CNPq na Embrapa Acre, Rio Branco, AC.

⁶Engenheiro-agrônomo, doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pesquisador da Embrapa Acre, Rio Branco, AC.

Resumo – O descascamento manual das amêndoas de cupuaçu foi citado na literatura científica, mas não há relato dos fungos associados durante seu posterior armazenamento. Este trabalho teve como objetivo relatar a incidência de fungos em amêndoas de cupuaçu fermentadas e armazenadas em sacos de rafia à temperatura ambiente por 75 dias. Amêndoas fermentadas e secas foram submetidas a diferentes tratamentos (T1 = sem despeliculação e T2 = com despeliculação), ambos armazenados em sacos de rafia à temperatura ambiente por 75 dias. Antes do armazenamento e a cada 15 dias, as amêndoas foram analisadas quanto à detecção de fungos. Foram identificados seis gêneros de fungos e três espécies de *Aspergillus* nas amêndoas armazenadas, com maior frequência de *Aspergillus fumigatus* e *A. flavus*. Antes do armazenamento, as amêndoas já estavam contaminadas, sendo importante a verificação da qualidade inicial da matéria-prima para armazenamento e do ambiente de fermentação e secagem, uma vez que as condições climáticas amazônicas são favoráveis à proliferação de fungos.

Termos para indexação: fermentação, microbiota fúngica, qualidade.

Introdução

O cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) é uma fruta nativa da região Amazônica brasileira. Das suas sementes, quando convenientemente fermentadas, secas e torradas, pode-se obter um produto análogo ao chocolate conhecido como cupulate® (Vilalba, 2003). O preparo do cupulate® e também o descascamento das amêndoas já foram descritos, respectivamente, por Nazaré et al. (1990) e Cohen e Jackix (2005), mas esses autores não citam o armazenamento posterior das amêndoas fermentadas. Pereira et al. (2018) armazenaram amêndoas de cupuaçu fermentadas e despeliculadas por 30 dias em diferentes condições e relataram elevada contaminação fúngica, principalmente, quando em temperatura ambiente, sem, contudo, identificar a microbiota presente nas amêndoas. A identificação de fungos associados em amêndoas armazenadas tem sido realizada em diversas matérias-primas, como castanha-do-brasil (Baquião, 2012), noz-pecã (Terabe et al., 2008), cacau (Copetti, 2009), dentre outras. Quando existe a presença de fungos filamentosos nos últimos dias do processo fermentativo são relatados sabores indesejáveis e deterioração em amêndoas de cacau (Copetti et al., 2011). Assim, o impacto econômico da contaminação fúngica está diretamente relacionado à perda de qualidade do produto que inclui alterações organolépticas,

mudanças químicas e nutricionais, bem como a produção de micotoxinas, tornando-o impróprio para o consumo (Paster; Bullerman, 1988).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a incidência de fungos em amêndoas de cupuaçu fermentadas, despeliculadas, secas e armazenadas em sacos de ráfia à temperatura ambiente por 75 dias.

Material e métodos

As amêndoas de cupuaçu fermentadas e secas foram obtidas no projeto Reça (Reflorestamento Econômico Consorciado e Adensado), localizado em Nova Califórnia e Extrema, estado de Rondônia, em janeiro de 2019. A fermentação foi realizada em caixas de madeira por 7 dias, com adição de solução de sacarose a 30%, e o processo de secagem foi realizado em secador solar também por 7 dias. Após a secagem as amêndoas foram transportadas para a Embrapa Acre, em Rio Branco, e armazenadas no Laboratório de Tecnologia de Alimentos. As amostras foram divididas em dois lotes, sendo a película das amêndoas mantida no primeiro lote e retirada no segundo, de acordo com a metodologia descrita por Souza (2013), com modificações, constituída de três etapas: tratamento térmico com imersão em solução despeliculante, seguido de enxágue (lavagem) com agitação/esfregação e neutralização em solução ácida. Após a neutralização e constatada a ausência de base pelo teste da fenolftaleína 0,1%, as amêndoas foram submetidas à secagem em estufa a 40 °C por 24h para eliminação do excesso de umidade.

As amêndoas fermentadas e secas, com e sem película, foram armazenadas em temperatura ambiente de 26 °C e 81% UR, por 75 dias para verificação da vida de prateleira. Os tratamentos foram: T1 = amêndoas com película; e T2 = amêndoas sem película. O acondicionamento foi realizado em embalagens de ráfia, com capacidade para 500 g. No momento do armazenamento e a cada 15 dias, as amêndoas foram analisadas quanto à detecção de fungos, conforme o *Manual de análise sanitária de sementes* (Brasil, 2009). Para isso, as amêndoas, com e sem película, foram imersas em solução de hipoclorito de sódio 1%, por 3 minutos e, em seguida, após secagem rápida em papel-filtro esterilizado, distribuídas asepticamente sobre o meio BDA contendo 50 ppm de cloranfenicol. Foram colocadas duas amêndoas por placa de petri, com diâmetro de 9 cm, com três repetições, sendo cada repetição composta por cinco placas com duas amêndoas cada. As placas com as amêndoas foram colocadas em câmara de incubação, sob luz fluorescente branca à temperatura de 25 ± 2 °C pelo período de 7–8 dias. O exame inicial foi feito a olho nu, observando a possível formação e tipo de colônias desenvolvidas. Cor, textura, morfologia geral e presença de corpos de frutificação foram indicativos para o reconhecimento das espécies fúngicas. As amêndoas foram examinadas individualmente ao microscópio estereoscópico, sendo em seguida realizadas a montagem de lâminas e observação de microestruturas fúngicas ao microscópio para identificação das espécies. Os resultados foram expressos, de maneira descritiva, em frequência de ocorrência dos fungos (%) e variação da infecção durante o armazenamento. A percentagem de infecção foi calculada baseada na quantidade de amêndoas com colônias fúngicas desenvolvidas em relação ao número total de amêndoas plaqueadas. A contaminação fúngica ao longo do armazenamento foi apresentada de forma descritiva por meio da ocorrência de fungos para cada espécie, em cada tempo de armazenamento.

Resultados e discussão

Detectou-se, ao longo de todo o armazenamento, uma gama de fungos nas amêndoas de cupuaçu fermentadas e secas, tanto com película quanto sem. Nas amêndoas com película (Figura 1A) foram identificados quatro gêneros de fungos, sendo estes: *Aspergillus* (espécies *A. fumigatus* e *A. flavus*), *Rhizopus* sp., *Acremonium* sp. e *Geotrichum* sp. Já nas amêndoas sem película (Figura 1B), além desses citados foram identificados *A. niger*, *Curvularia lunata* e *Penicillium* spp.

Nas amêndoas sem película percebe-se uma maior frequência média de ocorrência de *A. fumigatus* e *A. flavus* com uma variação da infecção de 26,7% a 90% para *A. fumigatus* e de 0% a 93,3% para *A. flavus* (Tabela 1). Observa-se essa maior contaminação, principalmente, até 45 dias de armazenamento (Figura 1B). Já nas amêndoas com película a maior frequência de ocorrência foi de *A. fumigatus* e *Acremonium* sp., com uma variação da infecção de 16,7% a 76,7% para o primeiro e de 0% a 37,3% para o segundo (Tabela 1), sendo essa última espécie encontrada apenas até 30 dias de armazenamento (Figura 1A). Contudo, mesmo antes do armazenamento, as amêndoas já estavam contaminadas, sendo importante verificar o ambiente de fermentação e secagem, principalmente devido às condições climáticas amazônicas, de elevada pluviosidade e temperatura, que favorecem a proliferação de fungos. Souza et al. (2018), em amêndoas de cupuaçu fermentadas com película e sem armazenamento, identificaram maior frequência de *A. penicillioides*, *A. flavus* e *A. niger*. Essas espécies também são encontradas em outras amêndoas semelhantes. Em amostras de cacau fermentadas e armazenadas provenientes de Serra Leoa, Guinéa Equatorial e Equador, Sanchez-Hervas et al. (2008) também observaram predominância de *Aspergillus* seções Flavi e Nigri. Embora Copetti (2009) tenha encontrado *A. flavus* em grandes proporções em amêndoas de cacau fermentadas durante a estocagem, não foi a espécie de maior frequência de isolamento, sendo *A. fumigatus* encontrado, mas em pequenas proporções nessa fase de produção. Também Baquião (2012), analisando castanhas-do-brasil armazenadas, relatou uma maior contaminação das amêndoas por *A. flavus*, *Fusarium* spp. e *A. nomius*. O desenvolvimento fúngico ocorre em várias fases de produção, desde o campo até o armazenamento (Rosseto et al., 2005). Contudo, uma preocupação maior é a predominância de *A. flavus*, uma vez que, como relatado por Pitt e Hocking (2009), está entre as espécies de maior capacidade de produção de aflatoxina da seção Flavi e as aflatoxinas possuem afinidade por substratos oleaginosos, como amendoim, castanha-do-brasil, nozes, pistache e avelãs (Pitt; Hocking, 2009). Entretanto, como citado por Rosseto et al. (2005), em uma mesma espécie de fungo há cepas produtoras e não produtoras. Durante o armazenamento podem ocorrer novas infecções, que são favorecidas por condições de temperatura e umidade elevadas. Esses fungos contaminantes, geralmente, estão presentes no ambiente. Essas novas infecções, por estarem mais externas e serem de microrganismos com rápido crescimento, podem dificultar a identificação daqueles que tenham infectado primeiramente a amêndoa.

Observa-se que algumas espécies foram encontradas apenas após o armazenamento, como *Rizopus* sp., *Geotrichum* sp. e *Penicillium* spp. para amêndoas sem película (Figura 1B). Essas espécies são consideradas patógenos secundários, presentes naturalmente nos ambientes. Além disso, apresentam rápido crescimento e alta habilidade competitiva em meios de cultura, fato que dificulta a visualização e identificação das demais espécies. *Geotrichum candidum* foi encontrada por Copetti (2009) durante a fermentação, secagem e estocagem de amêndoas de cacau e foi citada como uma espécie que cresce bem em condições de microaerofilia e alta atividade de água. *Penicillium* também está entre os principais gêneros capazes de produzir metabólitos secundários tóxicos para humanos e animais, sendo a espécie *Penicillium paneum* encontrada em amêndoas de cacau durante a fermentação (Copetti, 2009).

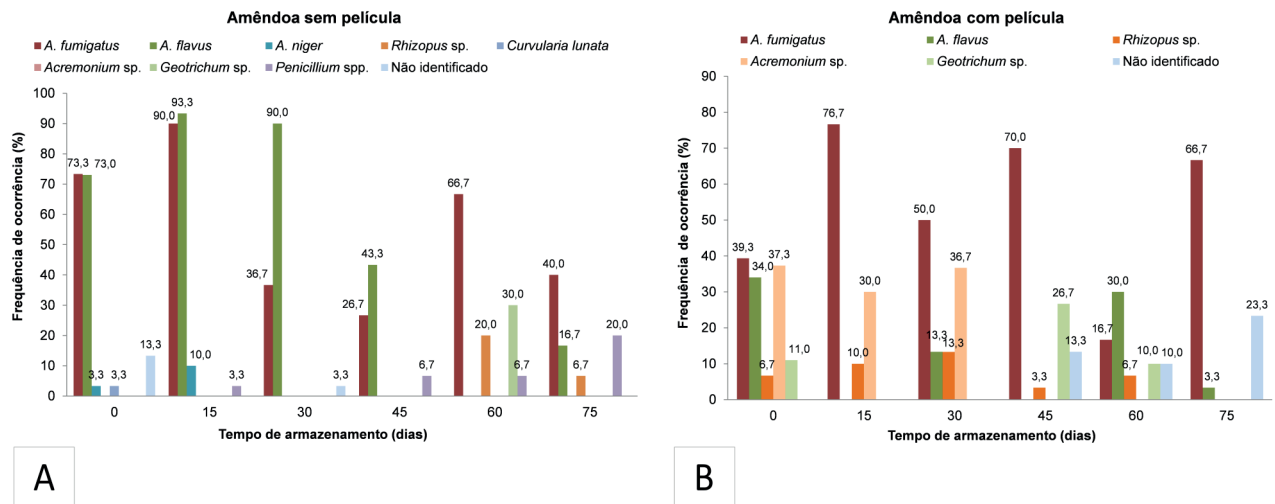


Figura 1. Frequência de ocorrência de fungos em amêndoas de cupuaçu fermentadas, com película (A) e sem película (B), e armazenadas à temperatura ambiente em sacos de ráfia.

Tabela 1. Frequência média de ocorrência e variação do nível de infecção por fungos em amêndoas de cupuaçu fermentadas e secas, com e sem película, durante o armazenamento.

Espécie	Tipo de amêndoa armazenada	Frequência média de ocorrência durante o armazenamento (%)	Varição da infecção durante o armazenamento (%)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Sem película	55,6	26,7–90,0
	Com película	53,2	16,7–76,7
<i>Aspergillus flavus</i>	Sem película	52,7	0–93,3
	Com película	13,4	0–34,0
<i>Aspergillus niger</i>	Sem película	2,2	0–10,0
	Com película	0,0	-
<i>Rhizopus</i> sp.	Sem película	4,4	0–20,0
	Com película	6,7	0–13,3
<i>Curvularia lunata</i>	Sem película	0,6	0–3,0
	Com película	0,0	-
<i>Acremonium</i> sp.	Sem película	0,0	-
	Com película	17,3	0–37,3
<i>Geotrichum</i> sp.	Sem película	5,0	0–30,0
	Com película	7,9	0–26,7
<i>Penicillium</i> spp.	Sem película	6,1	0–20,0
	Com película	0,0	-

Embora tenha sido encontrada uma considerável diversidade de fungos nas amêndoas de cupuaçu fermentadas durante o armazenamento, acredita-se que muitos possam ser eliminados durante o processamento, em função principalmente da temperatura de torração que pode alcançar aproximadamente 144 °C, conforme Cohen et al. (2004). Assim, deve-se verificar a presença de fungos, em especial produtores de toxinas, nas amêndoas processadas. Além disso, é necessário também verificar a presença de toxinas nas amêndoas.

Conclusões

Foram detectados fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Curvularia*, *Acremonium*, *Geotrichum* e *Penicillium* nas amêndoas de cupuaçu fermentadas, despelculadas e secas durante o armazenamento em sacos de ráfia à temperatura ambiente.

Agradecimento

Aos produtores do projeto Reça pela colaboração neste trabalho e ao CNPq pelo auxílio financeiro por meio da bolsa de iniciação científica.

Referências

- BAQUIÃO, A. C. **Fungos e micotoxinas em castanha-do-brasil, da colheita ao armazenamento**. 2012. 142 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/arquivos-publicacoes-insumos/2946_regras_analise__sementes.pdf. Acesso em: 2 ago. 2019.
- COHEN, K. O.; JACKIX, M. N. H. Estudo do liquor de cupuaçu. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 182-190, 2005.
- COHEN, K. O.; MATTIETTO, R.; JACKIX, M. N. H. **Processo de torração das amêndoas e nibs de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*)**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2004. 21 p. (Embrapa Amazônia Oriental. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 35).
- COPETTI, M. V. **Microbiota do cacau: fungos e micotoxinas do cacau ao chocolate**. 2009. 173 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- COPETTI, M. V.; IAMANAKA, B. T.; FRISVAD, J. C.; PEREIRA, J. L.; TANIWAKIA, M. H. Mycobiota of cocoa: From farm to chocolate. **Food Microbiology**, v. 28, n. 8, p. 1499-1504, dez. 2011.
- NAZARÉ, R. F. R. de; BARBOSA, W. C.; VIÉGAS, R. M. F. **Processamento das sementes de cupuaçu para obtenção de cupulate**. Belém, PA: EMBRAPA-CPATU, 1990. 38 p. (EMBRAPA-CPATU. Boletim de pesquisa, 108).
- PASTER, N.; BULLERMAN, L. B. Mould spoilage and mycotoxins formation in grains as controlled by physical means. **International Journal of Food Microbiology**, v. 7, p. 257-265, 1988.

PEREIRA, J. D. da S.; ALVARES, V. de S.; SOUZA, J. M. L. de; MACIEL, V. T. Armazenamento de amêndoas fermentadas e despeliculadas de cupuaçu. *In: SEMINÁRIO DA EMBRAPA ACRE DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E PÓS-GRADUAÇÃO*, 1., 2018, Rio Branco. **Pesquisa e inovação para a agropecuária no Acre: anais**. Rio Branco, AC: Embrapa Acre, 2019. p. 45-49.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. London: blackie academic professional, 2009. 519 p.

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 amendoim armazenados. **Ciência Rural**, v. 35, n. 2, p. 309-315, 2005.

SÁNCHEZ-HERVÁS, M.; GIL, J. V.; BISBAL, F.; RAMÓN, D.; MARTÍNEZ-CULEBRAS, P. V. Mycobiota and mycotoxin producing fungi from cocoa beans. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, p. 336-340, 2008.

SOUZA, J. M. L. **Caracterização e efeitos do armazenamento de amêndoas com películas e despeliculadas sobre propriedades das frações proteica e lipídica de castanha-do-brasil**. 2013. 127 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

SOUZA, J. M. L. de; CARTAXO, C. B. da C.; ALVARES, V. de S.; RIBEIRO, S. A. L.; CRUZ, S. C. da. Microbiota fúngica de amêndoas fermentadas de cupuaçu. *In: SEMINÁRIO DA EMBRAPA ACRE DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E PÓS-GRADUAÇÃO*, 1., 2018, Rio Branco. **Pesquisa e inovação para a agropecuária no Acre: anais**. Rio Branco, AC: Embrapa Acre, 2019. p. 83-86.

TERABE, N. I.; MARTINS, C. M.; HOMECHIN, M. Microrganismos associados a frutos de diferentes cultivares de noz pecan. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 2, p. 659-662, 2008.

VILALBA, F. A. **Fragmentação mecânica de amêndoas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) por meio de um beneficiador de cilindros**. 2003. 73 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.