

Anais da V Reunião Técnica de Pesquisa e Desenvolvimento da Embrapa Amazônia Ocidental



ISSN 1517-3135

Junho, 2011

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Amazônia Ocidental
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 87

**Anais da V Reunião Técnica de
Pesquisa e Desenvolvimento da
Embrapa Amazônia Ocidental**

*José Roberto Antoniol Fontes
Léa Cristina Heinzen Trindade*
Editores Técnicos

Embrapa Amazônia Ocidental
Manaus, AM
2011

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Amazônia Ocidental

Rodovia AM 010, Km 29, Estrada Manaus/Itacoatiara
Caixa Postal 319
Fone: (92) 3303-7800
Fax: (92) 3303-7820
www.cpa.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *Celso Paulo de Azevedo*
Secretária: *Gleise Maria Teles de Oliveira*
Membros: *Edsandra Campos Chagas*
Jeferson Luis Vasconcelos de Macêdo
José Clério Resende Pereira
Kátia Emídio da Silva
Lucinda Carneiro Garcia
Maria Augusta Abtibol Brito
Maria Perpétua Beleza Pereira
Paulo César Teixeira
Rogério Perin
Ronaldo Ribeiro de Moraes
Sara de Almeida Rios

Revisor de texto: *Maria Perpétua Beleza Pereira*
Normalização bibliográfica: *Maria Augusta Abtibol Brito*
Diagramação: *Gleise Maria Teles de Oliveira*
Capa: *Gleise Maria Teles de Oliveira*
Fotos da Capa: *Neuza Campelo, Raimundo Nonato C. da Rocha, José Roberto Antoniol
Fontes, Luadir Gasparotto, Francisco Célio M. Chaves*
1ª edição
1ª impressão (2011): 300

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.
Embrapa Amazônia Ocidental.**

Reunião Técnica de Pesquisa e Desenvolvimento da Embrapa Amazônia Ocidental
(5. : 2011 : Manaus).
Anais... / editores José Roberto Antoniol Fontes e Léa Cristina Heinzen Trindade.
Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2011.
42 p. - (Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos; 87).

ISSN 1517-3135

1. Pesquisa. 2. Desenvolvimento. I. Fontes, José Roberto Antoniol. II. Trindade,
Léa Cristina Heinzen. III. Título. IV. Série

CDD 630.7

© Embrapa 2011

Isolamento e Identificação de Fungos Associados à Castanha-do-Brasil para o Desenvolvimento de Um Método Molecular para a Detecção de *Aspergillus* spp. Aflatoxigênicos

*Daniela Bittencourt
Enyleide Lima Nogueira
Rosalee Albuquerque Coelho Netto
Rogério Eiji Hanada*

PALAVRAS-CHAVE:

A exploração extrativista de castanha-do-brasil tem uma função socioeconômica e ambiental na região amazônica. Parte significativa da população local, cuja maioria é pobre, depende direta ou indiretamente da extração e comercialização de castanha para os mercados locais ou estrangeiros, o que gera emprego e renda. O extrativismo de castanha-do-brasil também contribui com a organização socioeconômica das grandes áreas extrativistas, evita migração rural e destruição da floresta amazônica. A castanha-do-brasil tem um valor nutricional alto (rico em proteínas, gorduras, vitaminas e selênio) e é uma fonte importante de alimento para famílias locais. Por essas razões, é considerada uma prioridade para o desenvolvimento sustentável da região amazônica.

Entretanto, a castanha-do-brasil é frequentemente contaminada por altos níveis de aflatoxinas (AF - B1, B2, G1, G2), que, em condições favoráveis, são metabólitos produzidos pelos fungos *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. No Brasil, as aflatoxinas são as únicas micotoxinas cujos níveis máximos em alimentos estão previstos na legislação. O Ministério da Saúde estabelece o limite máximo de 30 µg/Kg de AF B1 + AF G1 em alimentos de consumo humano, e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) estabelece o de 50 µg/Kg de AF totais (tipos B1 + B2 + G1 + G2) para alimentos destinados ao consumo animal. Esse limite é comparável aos estabelecidos por outros países e recomendado pela Organização Mundial da Saúde e pela Organização para Alimentação e Agricultura (OMS/FAO).

A melhoria da qualidade da castanha-do-brasil, seja para exportação seja para consumo interno, passa inevitavelmente por certificação quanto à ausência de micotoxinas. O primeiro passo no desenvolvimento de uma estratégia eficiente de certificação consiste no levantamento, na identificação e no estudo da variabilidade e micotoxicidade dos organismos produtores de micotoxinas nesses frutos no Brasil. Atualmente, a técnica oficial de detecção da aflatoxina e de outras micotoxinas é a cromatografia, que detecta a toxina, mas não o fungo, não sendo recomendada no monitoramento da cadeia produtiva. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma poderosa ferramenta no combate à aflatoxina, podendo ser utilizada no monitoramento de toda a cadeia produtiva. É uma técnica rápida e versátil; para detecção, o organismo não necessita ser cultivado a priori; é sensível, sendo capaz de detectar moléculas de DNA alvo em uma mistura complexa sem uso de sondas radioativas. Se comparada às análises por cromatografia, é uma técnica relativamente barata.

No intuito de desenvolver um método molecular para a detecção de *Aspergillus* spp. aflatoxigênicos em amostras de castanhas-do-brasil por meio de uma estratégia de PCR, em forma de kit-diagnóstico rápido, foram isolados fungos de amostras de castanha-do-brasil provenientes de Manicoré e Fonte Boa, no Amazonas; e de Caroebe, em Roraima.

Coletaram-se 70 amostras em cada um dos três municípios. O isolamento dos fungos foi realizado de forma direta, as castanhas foram abertas e desinfestadas com etanol 70% e hipoclorito 1%, seguida de lavagem com água estéril. Após a desinfestação, as castanhas foram dispostas em câmaras úmidas (Gerbox com papel toalha umedecido), em cada uma foram organizadas 5 amêndoas, observadas por 7 dias. À medida que as estruturas dos fungos foram surgindo, estas foram transferidas de maneira asséptica para placa de petri contendo meio de cultura BDA. A identificação dos fungos baseou-se na observação das colônias e nas estruturas morfológicas em microscópio de luz. O desenvolvimento de fungos nas amêndoas atingiu um percentual de 100% das amostras, e, dentre os isolados, foi possível identificar os gêneros *Aspergillus* (79,1%), *Penicillium* (4,2%), *Fusarium* (9,6%), *Trichoderma* (3,2%), entre outros (3,9%). O gênero *Aspergillus* foi predominante, sendo que alguns isolados de *Aspergillus* spp. desenvolveram estruturas de resistência, esclerócios, com formatos globosos, coloração escura e composta por uma massa compacta de hifas. A presença desses fungos na castanha-do-brasil alerta para uma possível presença de não apenas micotoxinas como aflatoxinas B₁ e B₂, mas também ocratoxina A, B e C, ácidos ciclopiazônicos, esterigmatocistina e outras.

A identificação precisa desses microrganismos, associada à sua caracterização molecular, possibilitará o desenvolvimento de um método diagnóstico molecular rápido, eficiente e sensível, que não onere demasiadamente o custo final do produto, ao mesmo tempo em que garanta a sua qualidade. Além disso, espera-se que esse novo método diagnóstico, por ser mais rápido e barato, possibilite uma análise mais frequente desses produtos e a identificação das possíveis fontes de contaminação (no campo, no transporte e no armazenamento), contribuindo para o aumento da qualidade das amêndoas brasileiras, a diminuição da frequência de contaminação dos lotes por aflatoxinas, a redução dos riscos a saúde humana e animal e o aumento do valor de exportação do produto.