

## 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 B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, 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.