

Fungos associados à castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bompl) e ao amendoim (*Arachis hypogaea* L.) comercializados em Fortaleza (Ceará)¹

Fungi associated with Brazil nut and groundnut kernels sold in Fortaleza city (Brazil)

Ana Karoline Freire da Costa², Francisco das Chagas Oliveira Freire^{3*}, Icaro Gusmão Pinto Vieira⁴, Juliana Alves Andrade⁵ e Francisca Noélia Pereira Mendes⁶

Resumo - O isolamento e a identificação dos fungos associados a amostras de amêndoas de castanha-do-Brasil e de amendoim, com e sem casca, comercializados na cidade de Fortaleza (Ceará), foram conduzidos em laboratório. Espécies de *Aspergillus*, especialmente *A. flavus*, e de *Penicillium* foram as de ocorrência mais comum em ambos os produtos. Os fungos *Curvularia lunata*, *Emericella nidulans*, *Fusarium verticilloides*, *Gongronella butleri*, *Graphium putredinis*, *Macrophomina phaseolina*, *Paecilomyces variotii*, *Saksenae vasiformis*, *Syncephalis sphaerica* e *Syncephalastrum racemosum* são relatados, pela primeira vez, afetando amêndoas de castanha-do-Brasil no nosso país. Análises conduzidas com isolados de *A. flavus* obtidos de amêndoas de castanha-do-Brasil revelaram que cinco dos dez isolados obtidos a partir de amêndoas sem casca eram eficientes produtores das aflatoxinas B₁ e G₁. Nenhum isolado do amendoim se mostrou aflatoxigênico. A provável presença de aflatoxinas nesses dois produtos no Brasil, e sua importância para a saúde dos consumidores são também discutidas.

Palavras-chave - Castanha-do-Brasil. Amendoim. Deterioração fúngica. Aflatoxinas.

Abstract - A comprehensive study was carried out on the fungi associated with kernels of Brazil nut and peanut normally traded in Fortaleza city (State of Ceará, Brazil). Samples were obtained from local retail outlets and distributors and before surface sterilization were divided into two portions, one shelled and another unshelled. Fungi were enumerated by direct plating on water agar. Data for percentage of infection were calculated and fungi were identified to species level. *Aspergillus*, mainly *A. flavus*, and *Penicillium* were the most frequently species found on both commodities. The fungi *Curvularia lunata*, *Emericella nidulans*, *Fusarium verticilloides*, *Gongronella butleri*, *Graphium putredinis*, *Macrophomina phaseolina*, *Paecilomyces variotii*, *Saksenae vasiformis*, *Syncephalis sphaerica* e *Syncephalastrum racemosum* are reported for the first time associated with Brazil nut. Five isolates of *A. flavus* from shelled Brazil nut kernels were efficient B₁ and G₁ aflatoxin producers. None of the peanut *A. flavus* isolates was capable of producing aflatoxins. The possible occurrence of aflatoxins on these commodities and their importance to human health are discussed.

Key words - Brazil nut. Peanut. Fungal deterioration. Aflatoxins.

* Autor para correspondência

¹Recebido para publicação em 15/12/2006; aprovado em 03/08/2009

Parte da Monografia do primeiro autor apresentada ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da UFC

²Departamento de Biologia, Centro de Ciências/UFC, Campus do Pici, 60.455-970, Fortaleza-CE, Brasil

³Embrapa Agroindústria Tropical, Caixa Postal 3761, 60.511-110, Fortaleza-CE, Brasil, freire@cnpat.embrapa.br

⁴PADETEC, Campus do Pici, 60.455-970, Fortaleza-CE, Brasil

⁵Graduação em Eng. de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias/UFC, Caixa Postal 12.168, 60.455-970, Campus do Pici, Fortaleza-CE, Brasil

⁶PADETEC, Campus do Pici, 60.455-970, Fortaleza-CE, Brasil

Introdução

A castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bompl.), também conhecida como castanha-do-Pará, é uma planta nativa da Região Amazônica, sendo considerada uma de suas maiores riquezas na região dos castanhais. As vinte mil toneladas produzidas anualmente no Brasil são quase totalmente exportadas, principalmente para os Estados Unidos e para o Reino Unido, permanecendo apenas 1% da produção anual para o consumo interno (RIBEIRO et al., 1995).

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) ocupa uma área de 25,5 milhões de hectares em ambos os hemisférios, com uma produção global de 35 milhões de toneladas por ano, além de ser uma das cinco principais culturas de oleaginosas cultivadas em todo mundo e importante fonte de proteína vegetal comestível. O Estado de São Paulo destaca-se como o principal produtor brasileiro, seguido pelos estados do Paraná, Rio Grande do Sul, Minas Gerais e Mato Grosso (AMENDOIM, 2006). Ambos os produtos possuem sabor agradável, além de serem ricas fontes de lipídios e proteínas, características que os tornam excelentes substratos para a produção de micotoxinas, substâncias naturais de baixo peso molecular, produzidas pelo metabolismo secundário de fungos filamentosos, e que podem afetar seriamente a saúde humana e animal (BENNETT; KLICH, 2003; HUSSEIN; BRASEL, 2001). As micotoxinas estão geralmente associadas a grãos armazenados e rações para alimentação animal, podendo ocorrer durante a germinação, crescimento, processo de secagem, colheita e armazenamento das sementes. Outros fatores ambientais, tais como estresse oxidativo, injúrias causadas por insetos e as condições do plantio também podem influenciar na formação de micotoxinas nos produtos agrícolas (BAYMAN et al., 2002; JAYASHREE; SCHATZKI; ONG, 2001; SUBRASMANYAM, 2000).

Dentre as micotoxinas destacam-se as aflatoxinas, produzidas pelo metabolismo secundário dos fungos *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* (KURTZMAN et al., 1987). As principais aflatoxinas são denominadas B₁; B₂; G₁ e G₂ baseadas em suas fluorescências sob a luz UV (azul ou verde) e relativa mobilidade cromatográfica durante cromatografia de camada delgada. A aflatoxina B₁ é um dos mais potentes carcinogênicos naturais conhecidos e é usualmente a principal aflatoxina produzida por cepas toxigênicas (BENNETT; KLICH, 2003).

Entre as castanhas diversas, a castanha-do-Brasil é o produto que apresenta a maior incidência de aflatoxinas no Brasil. Níveis de aflatoxinas da ordem

de 2,25 ppm já foram detectados, comprovando a susceptibilidade desta cultura (BLANK et al., 2005; CASTRILLON; PURCHIO, 1988; FREIRE et al., 2000; MELO; SCUSSEL, 2007). Com relação ao amendoim e seus derivados, a contaminação por aflatoxinas tem sido um dos principais problemas encontrado no Brasil (FREITAS; BRÍGIDO, 1998).

O trabalho em apreço teve como objetivos básicos isolar e identificar as espécies fúngicas presentes em castanha-do-Brasil e no amendoim comercializados em mercados de Fortaleza, bem como detectar isolados de *A. flavus* aflatoxigênicos.

Material e métodos

Um total de 10 amostras de amendoim, de 500 g cada, sendo metade das amostras com casca e metade já descascada, foi adquirido em diferentes mercados de Fortaleza. O mesmo procedimento foi feito com as castanhas-do-Brasil, porém com amostras de 1 kg (com casca e sem casca). As amostras foram conduzidas ao Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza (Ceará).

Para os isolamentos dos fungos obtidos a partir das amostras de amendoim as sementes foram desinfetadas superficialmente em hipoclorito de sódio a 0,4% durante 2 minutos, lavadas em água destilada esterilizada e distribuídas em placas de Petri com ágar-água, 10 sementes por placa, perfazendo um total de 10 placas por amostra. As placas foram mantidas em sala de incubação, com luminosidade de 12 horas de escuro e 12 horas de luz, a temperaturas variando de 25 °C a 32 °C.

Para as amêndoas de castanhas-do-Brasil o isolamento foi realizado a partir de fragmentos de 5 mm x 5 mm de cada amêndoa. Dez fragmentos foram distribuídos diretamente por placa de Petri, também num total de 10 placas por amostra examinada. As condições e o período de incubação, bem como a identificação dos fungos, foram semelhantes aos descritos para o amendoim. Após uma semana de incubação, os fungos foram então identificados de acordo com suas características morfológicas, utilizando-se chaves taxonômicas (SINGH et al., 1991).

A percentagem de infecção foi calculada baseada na quantidade de colônias fúngicas desenvolvidas em relação ao número total de sementes de amendoim ou de fragmentos de castanha-do-Brasil plaqueados.

Para confirmar se as espécies de *A. flavus* isoladas eram produtoras de algum tipo de aflatoxina, foi empregada a metodologia desenvolvida por Frisvad e

Filtenborg (1990), a qual consistiu na análise qualitativa por cromatografia em camada delgada. As placas com sílica-gel foram ativadas em estufa, a 110 °C por 5 minutos, e em seguida, as amostras foram aplicadas através de discos de 0,4 cm de diâmetro feitos a partir de culturas fúngicas em meio de Czapek. Os discos foram umedecidos com uma mistura de clorofórmio/metanol (2:1) e pressionados durante poucos segundos contra a superfície de uma placa de sílica gel 20 cm x 20 cm (Merck, Darmstadt, Alemanha), tendo-se o cuidado para obter spots com diâmetro nunca superior a 0,6cm. Na mesma placa foram adicionados 5 µl de uma suspensão padrão das aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂ (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e de griseofulvina (0,5 µg/mL). As placas permaneceram em cuba de vidro contendo uma mistura de tolueno/acetato de etila/ácido fórmico (5:4:1, v/v/v) 30 minutos. Após a eluição a placa foi seca e visualizada utilizando lâmpada ultravioleta, com comprimento de onda de 365 nm. Pelo cromatograma obtido foram calculados os R_fs das amostras e dos padrões em relação à griseofulvina [R_fg; fluorescência azul: B₁(0,56), B₂ (0,39) e azul esverdeado: G₁ (0,32), G₂ (0,24)]. A determinação qualitativa foi feita pela comparação da fluorescência e dos R_fs das amostras em relação aos padrões.

Resultados e discussão

Os resultados obtidos a partir dos isolamentos de amêndoas de castanhas-do-Brasil, com e sem casca, encontram-se sumariados na Tabela 1. Nas amêndoas com cascas destacou-se a elevada contaminação por *Aspergillus flavus*. Nas amêndoas sem casca, além da elevada incidência de *A. flavus*, foi notório o elevado percentual de infecção por *Penicillium* spp, o que já havia sido relatado em estudos anteriores (CASTRILLON; PURCHIO, 1988; FREIRE et al., 2000). Isto talvez possa ser explicado em virtude da exposição e do manuseio, já que as amêndoas descascadas estão muito mais expostas à contaminação ambiental. Com relação às espécies fúngicas identificadas, a maioria já havia sido relatada em amêndoas produzidas no Brasil (FREIRE et al., 2000).

Entretanto, as espécies *C. lunata*, *E. nidulans*, *F. verticilloides*, *G. butleri*, *G. putredinis*, *M. phaseolina*, *P. variotii*, *S. vasiformis*, *S. sphaerica* e *S. racemosum* são relatados, pela primeira vez, afetando amêndoas desta planta no Brasil. O elevado percentual de infecção de *A. flavus*, espécie potencialmente aflatoxigênica, pode explicar a frequência com que aflatoxinas têm sido detectadas em amêndoas de castanha-do-Brasil (FREIRE et al., 2000; STEINER et al., 1992).

Na análise qualitativa dos isolados, vinte culturas de *A. flavus* obtidas das castanhas-do-Brasil foram testadas, sendo dez culturas das amostras com casca e dez culturas das amostras sem casca. Foi possível observar a presença de aflatoxinas em cinco culturas das amostras sem casca. As aflatoxinas encontradas foram do tipo B₁ e G₁, que se mostraram presentes em todas as cinco culturas. Esse tipo de metodologia mostrou ser uma técnica rápida para detecção de aflatoxinas a partir de culturas de *A. flavus* isolados de castanha-do Brasil. Além disso, mostrou ser um método sensível, já que a toxicidade destes metabólitos pode ocorrer em baixas doses (FREIRE et al., 2007).

É provável que a invasão das amêndoas de castanha-do-Brasil pelos fungos ocorra ainda no campo. Em amêndoas de cajueiro pelo menos três rotas de invasão já foram identificadas. A principal delas é a invasão das flores, quando os esporos fúngicos atingem o estigma, juntamente com os grãos de pólen. Após atravessar o estilete os propágulos se localizam nos ovários (FREIRE; KOZAKIEWICZ, 2005). Outras amêndoas podem ser também excelentes substratos para a formação de micotoxinas (SIMSEK et al., 2002).

As espécies fúngicas isoladas a partir do amendoim com casca e sem casca encontram-se listadas na Tabela 2. A elevada incidência de *A. flavus* nas amostras mais uma vez foi observada, confirmando relatos anteriores, tanto no Brasil quanto em outros países (NÓBREGA; SUASSUNA, 2004; ROSSETO et al., 2001). A própria fenologia do amendoim facilita a invasão das espécies fúngicas mais comuns, especialmente as do gênero *Aspergillus*. É por demais reconhecida a invasão do amendoim mesmo antes da colheita, quer pelo dano mecânico provocado nas vagens pela ação de insetos ou instrumentos agrícolas, quer diretamente através do ginóforo (HORN et al., 1985).

Dos isolados de *A. flavus* obtidos do amendoim nenhum se mostrou aflatoxigênico. Este aspecto, entretanto, não significa que não existam isolados aflatoxigênicos nas amostras examinadas. Pode ser que tenham sido obtidas apenas cepas não produtoras de aflatoxinas. Por outro lado, sabe-se que nem todos isolados de *A. flavus* obtidos de produtos agrícolas têm a capacidade de sintetizar aflatoxinas (FREIRE et al., 2007).

Tanto para a castanha-do-Brasil quanto para o amendoim, as maiores taxas de infecção foram observadas para os produtos sem casca. A própria manipulação que ambos os produtos sofrem, quase sempre sem os devidos cuidados na pós-colheita, especialmente no caso da castanha-do-Brasil, pode explicar a maior facilidade de infecção dos produtos descascados. Estes elevados percentuais de infecção sugerem que os consumidores de Fortaleza podem

Tabela 1 - Fungos associados à castanha-do-Brasil, comercializada em mercados de Fortaleza

Espécie	% com casca	% sem casca
<i>Acremonium curvulum</i>	01	02
<i>Aspergillus flavus</i>	48	59
<i>A. fumigatus</i>	02	04
<i>A. niger</i>	12	15
<i>A. tamarii</i>	12	15
<i>Chaetomium brasiliensis</i>	13	15
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	01	01
<i>C. sphaerospermum</i>	10	15
<i>Coemansia brasiliensis</i>	01	03
<i>Cunninghamella elegans</i>	00	01
<i>Curvularia lunata</i>	06	16
<i>Exophiala sp.</i>	01	03
<i>Emericella nidulans</i>	00	02
<i>Fusarium oxysporum</i>	05	13
<i>F. verticilloides</i>	01	01
<i>Gongronella butleri</i>	07	11
<i>Graphium putredinis</i>	00	01
<i>Macrophomina phaseolina</i>	01	01
<i>Paecilomyces variotii</i>	00	01
<i>Penicillium citrinum</i>	01	03
<i>P. glabrum</i>	03	17
<i>Phialophora sp.</i>	08	21
<i>Phoma sp.</i>	00	01
<i>Poitrasia circinans</i>	00	01
<i>Pseudallescheria boydii</i>	00	01
<i>Rhizopus oryzae</i>	00	02
<i>R. stolonifer</i>	02	05
<i>Saksenae vasiformis</i>	08	15
<i>Scopulariopsis sp.</i>	00	01
<i>Syncephalis sphaerica</i>	00	01
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	00	01
<i>Thielavia terricola</i>	02	10
<i>Trichoderma citrinoviride</i>	00	01
<i>Verticillium sp.</i>	01	01

estar expostos à presença de aflatoxinas nos dois produtos estudados. Convém salientar que o limite máximo de aflatoxinas totais ($B_1+B_2+G_1+G_2$) permitido pelo MA para qualquer alimento humano é de 20 ug/kg (20 ppb), de acordo a resolução 183 de 21/03/96. Tais limites, entretanto, são facilmente ultrapassados no Brasil, conforme estudos recentes

(CALDAS et al., 2002; FREIRE et al., 2007). Considerando-se que tanto o amendoim quanto a castanha-do-Brasil consumidas no Ceará são originárias das regiões Sudeste e Norte, respectivamente, o manuseio geralmente inadequado destes produtos, desde a colheita até o consumidor final, deve facilitar sua contaminação fúngica.

Tabela 2 - Fungos associados ao amendoim, comercializado em mercados de Fortaleza

Espécie	% com casca	% sem casca
<i>Aspergillus flavipes</i>	02	03
<i>A. flavus</i>	58	69
<i>A. niger</i>	29	37
<i>A. parasiticus</i>	01	01
<i>A. terreus</i>	02	03
<i>A. ustus</i>	01	01
<i>Chaetomium brasiliensis</i>	00	01
<i>C. funicola</i>	01	01
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	15	14
<i>C. sphaerospermum</i>	06	04
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	01	01
<i>Emericella nidulans</i>	03	05
<i>Fusarium pallidoroseum</i>	04	04
<i>F. solani</i>	05	04
<i>Macrophomina phaseolina</i>	00	01
<i>Muco racemosus</i>	09	14
<i>Paecilomyces variotii</i>	05	11
<i>Penicillium ssp.</i>	19	23
<i>Pestalotiopsis guepinii</i>	01	03
<i>Rhizopus stolonifer</i>	15	25
<i>Scopulariopsis gracilis</i>	01	01
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	11	19
<i>Trichoderma harzianum</i>	01	02

Conclusões

Os resultados obtidos permitem concluir que:

1. É elevada a contaminação fúngica em amêndoas de castanha-do-Brasil e de amendoim comercializados em Fortaleza, especialmente nos produtos descascados.
2. A presença constante de espécies de *Aspergillus*, especialmente *A. flavus*, sugere que estes produtos podem estar seriamente contaminados com aflatoxinas.
3. Torna-se necessário uma ação eficiente da vigilância sanitária com o intuito de monitorar os níveis de aflatoxinas presentes nestes produtos a fim de reduzir os riscos à saúde dos consumidores locais.

Referências

AMENDOIM. **Agrobyte: semeando informações**. - Disponível em: <<http://www.agrobyte.com.br/amendoim.htm>>. Acesso em: 17 maio 2006.

BAYMAN, P.; BAKER, J.; MAHONEY, N. *Aspergillus* on tree nuts: incidence and associations. **Mycopathologia**, v. 155, n. 03, p. 161-169, 2002.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 03, p. 497-516, 2003.

BLANK, K. A. et al. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. **Journal of Stored Products Research**, v. 41, n. 05, p. 513-517, 2005.

CALDAS, E. D.; SILVA, S. C.; OLIVEIRA, J. N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, n. 03, p. 319-323, 2002.

CASTRILLON, A. L.; PURCHIO, A. Ocorrência de aflatoxinas em castanha do Pará (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.). **Acta Amazonica**, v. 18, n. 01-02, p. 49-56, 1988.

FREIRE, F. C. O.; KOZAKIEWICZ, Z. Filamentous fungi, bacteria and yeasts associated with cashew kernels in Brazil. **Revista Ciência Agronômica**, v. 36, n. 02, p. 249-254, 2005.

FREIRE, F. C. O.; KOZAKIEWICZ, Z.; PATERSON, R. R. M. Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. **Mycopathologia**, v. 149, n. 01, p. 13-19, 2000.

- FREIRE, F. C. O. et al. Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. 48 p. (Documentos, 110).
- FREITAS, V. P. S.; BRIGIDO, B. M. Occurrence of aflatoxins B₁, B₂, G₁, and G₂ in peanuts and their products market in the region of Campinas, Brazil in 1995 and 1996. **Food Additives and Contaminants**, v. 15, n. 07, p. 807-811, 1998.
- FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. Secondary metabolites as consistent criteria in *Penicillium* taxonomy and a synoptic key to *Penicillium* subgenus *Penicillium*. In: SAMSON, R. A.; PITT, J. I. **Modern concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* classification**. New York: Plenum press, 1990. p. 373-378.
- HORN, B.W.; GREENE, R. L.; DORNER, J. W. Effect of corn and peanut cultivation on soil populations of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* in southwestern Georgia. **Applied Environmental Microbiology**, v. 61, n. 07, p. 2472-2475, 1985.
- HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, n. 02, p.101-134, 2001.
- JAYASHREE, T.; SUBRASMANYAM, C. Oxidative stress as a prerequisite for aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 29, n. 10, p. 981-985, 2000.
- KURTZMAN, C. P.; HORN, B. W.; HESSELTINE, C. W. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. **Antoine van Leeuwenhoek**, v. 53, n. 03, p. 147-158, 1987.
- MELLO, F. R.; SCUSSEL, V. M. Characteristics of in-shell Brazil nuts and their relationships of aflatoxin concentration: criteria for sorting. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 22, p. 9305-9310, 2007.
- NÓBREGA, F. V. A.; SUASSUNA, N. D. Análise sanitária de sementes de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) armazenadas em algumas áreas do estado da Paraíba. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 04, n. 02, p. 66-72, 2004.
- RIBEIRO, M. A. A. et al. Shelled Brazil nuts canned under different atmospheres. **Ciência de Tecnologia de Alimentos**, v. 15, n. 02, p. 105-107, 1995.
- ROSSETTO, C. A. V. et al. Tratamento fungicida, incidência de fungos e momento de avaliação de germinação no teste de envelhecimento acelerado em sementes de amendoim. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 02, p. 78-87, 2001.
- SIMSEK, O.; ARICI, M.; DEMIR, C. Mycoflora of hazelnut (*Corylus avellana* L.) and aflatoxin content in hazelnut kernels artificially infected with *Aspergillus parasiticus*. **Nahrung**, v. 46, n. 06, p. 194-196, 2002.
- SINGH, K. et al. **An illustrated manual on identification of some seed-borne *Aspergilli*, *Fusaria*, *Penicillia* and their mycotoxins**. Hellerup: Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries, 1991. 133 p.
- SCHATZKI, T. F.; ONG, M. S. Dependence of aflatoxin in almonds on the type and amount of insect damage. **Journal of Food Chemistry**, v. 49, n. 09, p. 4513-4519, 2001.
- STEINER, W. E. et al. Aflatoxins and fluorescence in Brazil nuts and pistachio nuts. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 40, n. 12, p. 2453-2457, 1992.