



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-135-6

Efeito da radiação ultravioleta C no desenvolvimento vegetativo e na germinação de esporos de *Aspergillus flavus* Link da castanha-do-Brasil

Sandra Rodrigues dos **Santos**¹; Monica Pirola **Viecelli**²; Mayara Silva **Ponte**³; Rosely dos Santos **Nascimento**⁴; Daniel **Terao**⁵

Nº 16421

RESUMO - A castanha-do-Brasil, proveniente da região Norte do Brasil, tem apresentado elevado nível de contaminação por fungos toxigênicos, devido ao modelo de exploração extrativista do produto em que os frutos permanecem muito tempo amontoados aos pés da castanheira, em condições ideais para desenvolvimento de *Aspergillus flavus*. Este fungo tem elevada capacidade de produzir a aflatoxina AFB1, potente agente hepatocarcinogênico. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da radiação UV-C na germinação de esporos e no desenvolvimento vegetativo de *A. flavus* da castanha-do-Brasil, e sua eficiência no controle do fungo na castanha. Avaliaram-se, no controle de esporos: 0,12; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 kJ m⁻²; no crescimento micelial: 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 10 kJ m⁻² e na irradiação de castanhas: 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 kJ m⁻². O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com quatro repetições. Os resultados demonstraram que o esporo de **A. flavus** apresenta elevada sensibilidade à luz UV-C, sendo que a dose de 0,5 kJ m⁻² possibilitou um controle superior a 98% de unidades formadoras de colônia (UFC), não diferindo estatisticamente de 2,0 kJ m⁻², que controlou completamente. Por outro lado, a radiação UV-C apresentou baixa eficiência de controle do desenvolvimento vegetativo, sendo que mesmo a dose de 10 kJ m⁻² não conseguiu inibir o crescimento micelial de *A. flavus*. Provavelmente, devido ao longo período de armazenamento prévio das amostras de castanha, o fungo já havia germinado, estando presente na forma micelial, de maneira que mesmo a dose de 5,0 kJ m⁻² não foi suficiente para controlá-lo.

Palavras-chaves: Controle físico, *Aspergillus flavus*, aflatoxinas, radiação UV-C.

¹ Autor, Bolsista Embrapa: Graduação em Engenharia Ambiental, FAJ, Jaguariúna-SP; san_draro@hotmail.com

² Colaborador, Bolsista EMBRAPA: Graduação em Engenharia de Alimentos, FAJ, Jaguariúna-SP.

³ Colaborador Bolsista Embrapa: Graduação em Ciência dos Alimentos, ESALQ/USP, Piracicaba-SP.

⁴ Colaborador: Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; rosely.nascimento@embrapa.br.

⁵ Orientador: Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; daniel.terao@embrapa.br.



ABSTRACT – *The Brazil nut, from Northern region of Brazil, has presented high level of contamination by toxigenic fungi due to extractive exploitation model of the product, in which the fruit remains piled up on forest ground for long periods, in ideal conditions for the development of Aspergillus flavus. This fungus is highly efficient in producing aflatoxin AFB1, described as a powerful hepatocarcinogenic agent. The objective of this study was to evaluate the effect of UV-C radiation on the germination of spores and vegetative growth of A. flavus and its efficiency to control this fungus on Brazil nut. The following doses of UV-C light were evaluated, for spore inhibition: 0.12, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 kJ m⁻²; for mycelial growth: 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 10 kJ m⁻² and for irradiation of nuts: 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 and 5.0 kJ m⁻². The experiment was laid out in a completely randomized design with four replications. The results showed that the dose of 0.5 kJ m⁻² enabled more than 98% of control of colony-forming unit (CFU) which were not statistically different from the dose of 2.0 kJ m⁻², which completely inhibited the spore germination, demonstrating the high sensibility of the spores of A. flavus to UV-C light. By the other hand UV-C radiation showed a low efficiency to control vegetative development. The irradiation of 10 kJ m⁻² was not enough to inhibit the mycelial growth. Probably due to the long period of prior storage of the nut samples, the fungus colonization had already begun on the nut surface, so even the dose of 5.0 kJ m⁻² of UV-C radiation was not efficient to the control the contamination, not differing from the Control.*

Keywords: Physical control, *Aspergillus flavus*, aflatoxin, UV-C radiation.

1 INTRODUÇÃO

A castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*) é a rainha da floresta, uma árvore amazônica que pode atingir cinquenta metros de altura e dois metros de diâmetro na base, considerada uma das mais altas da Amazônia, apresenta tronco retilíneo, cilíndrico, desprovido de galhos até a copa e casca marrom-escuro (ALHO,1999; LORENZI, 2010). Os frutos, em forma de “ouriço”, podem pesar dois quilos, que amadurecem e caem no chão da floresta, partindo-se e liberando suas sementes. Essa queda ocorre nas estações chuvosas, entre os meses de novembro e abril.

A exploração da castanha-do-Brasil é basicamente extrativista e constitui uma importante fonte de renda para comunidades rurais do interior de toda a região Norte.

O armazenamento e a conservação da castanha-do-Brasil constituem os problemas mais importantes para o produtor. Normalmente, os frutos ficam muito tempo amontoados aos pés da castanheira, aguardando o transporte, em condições de elevada umidade relativa do ar e de



temperatura ambiente, situação ideal para o desenvolvimento de fungos, dentre eles o *Aspergillus flavus* Link, que se prolifera no local e infecta a castanha. O *A. flavus* se desenvolve bem em substratos oleaginosos como a castanha-do-Brasil, onde apresenta maior capacidade de produzir aflatoxina (COELHO, 2012).

Aflatoxinas são metabólitos lipossolúveis, de baixo peso molecular, solúveis em solventes como clorofórmio e metanol e são relativamente sensíveis à luz. Podem ser absorvidas pela pele, pulmão e trato intestinal, sendo distribuídas para os rins, tecido adiposo e músculos, tendo maior concentração no fígado (OMS, 1983). As aflatoxinas são hepatotóxicas, sendo a AFB1 descrita como o mais potente agente hepatocarcinogênico em mamíferos, podendo causar hemorragias, edemas, imunossupressão e carcinoma hepático (HUSSEIN; BRASEL, 2001; SMITH; ROSS, 1991).

O *A. flavus* encontrado em castanha-do-Brasil destaca-se como importante produtor de aflatoxinas AFB1 e AFB2 (PITT; HOCKING, 1997).

A produção brasileira de castanha tem sido afetada por crescente contaminação de aflatoxinas o que tem prejudicado as exportações do produto, pois os limites máximos estabelecidos pela comunidade Européia pelo regulamento 2001/466/CE é de 4 ng/g (ARRUS et al., 2005), o que diminui nossa possibilidade de exportar o produto. No Brasil, a Resolução – RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, estabeleceu o limite máximo tolerado de AFB1 e AFB2 para consumo direto de castanha-do-Brasil sem casca de 10 ug/kg (COELHO, 2012).

A radiação de luz ultravioleta C (UV-C) tem sido usado na indústria alimentar, com ação eficaz na descontaminação microbiana de superfícies, embalagens, podendo ser aplicado na descontaminação de vegetais. O efeito germicida da luz UV-C ocorre pela destruição de estruturas do patógeno, inibição de germinação de estruturas reprodutivas e do desenvolvimento vegetativo e desorganização da membrana plasmática (DERMICI; PANICO, 2008).

O presente trabalho teve como objetivos, avaliar o efeito da radiação UV-C na germinação de esporos e no desenvolvimento vegetativo de *A. flavus* de castanha-do-Brasil, e a eficiência de seu controle de castanhas contaminadas pelo fungo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados na Embrapa Meio Ambiente. Nos ensaios in vitro avaliou-se o efeito da radiação ultravioleta C (UVC) no desenvolvimento e na inibição da germinação de esporos do *A. flavus*, isolado de castanha-do-Brasil infectada.



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-135-6

No estudo de inibição de esporos, o isolado de *A. flavus* foi cultivado em placas de Petri com meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA). Após o período de sete dias de incubação, as placas com as colônias foram inundadas com 10 mL de água destilada esterilizada (ADE) e raspadas com uma alça esterilizada e a suspensão de esporos ajustada na concentração de 1×10^3 conídios mL⁻¹.

Para o tratamento com radiação UV-C foram preparadas placas de Petri de 5 cm de diâmetro contendo 3 mL da suspensão de esporos, as quais, abertas, foram expostas à radiação UV-C pelo período de 34 s; 1 min e 7 s; 2 min e 14 s; 4 min e 27 s; 8 min e 54 s, que corresponderam às doses de: 0,12; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 kJ m⁻², respectivamente. Após a irradiação das placas, alíquotas de 0,1 mL foram transferidas e espalhadas em placas de Petri contendo o meio BDA, onde ficaram incubadas a 23 ± 1 °C, em regime de fotoperíodo 12/12 h. Após 72 h, foi feita a avaliação pela contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC).

Para a avaliação do efeito da radiação UV-C no crescimento micelial do fungo, discos de micélio de BDA, obtido da borda de crescimento ativo do fungo, foram depositados no centro de placas de Petri, contendo meio BDA. Estas placas foram abertas no irradiador e receberam as doses estudadas de luz UV-C: 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 10 kJm⁻²; correspondendo respectivamente aos seguintes tempos de irradiação: 4 min e 27 s; 8 min e 54 s; 17 min e 48 s; 35 min e 36 s e 44 min e 30 s. Após a irradiação as placas foram fechadas e incubadas a 23 ± 1 °C, em regime de fotoperíodo 12/12 h. Avaliou-se diariamente o desenvolvimento do fungo pela medição do crescimento micelial em dois sentidos ortogonais, com o auxílio de um paquímetro digital.

No teste in vivo, utilizaram-se duas amostras de castanhas, provenientes do Estado do Acre e de Roraima, armazenadas em casca durante um ano, dentro de saco de estopa, em temperatura ambiente. Após descascadas, as castanhas foram expostas à radiação UV-C durante os seguintes tempos, em cada face: 2 min e 14 s; 4 min e 27 s; 6 min e 41 s; 8 min e 54 s e 11 min e 8 s que correspondiam às doses de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 kJ m⁻². Utilizou-se o conjunto de 20 castanhas como unidade experimental. Após a irradiação as castanhas foram acomodadas em placas de Petri, sobre papel de filtro previamente esterilizado e umedecido com água destilada estéril. As placas foram fechadas com tampas e foram incubadas a 23 ± 1 °C, em regime de fotoperíodo 12/12 h, avaliando-se diariamente sintomas de queimadura na epiderme da castanha e o aparecimento de crescimento fúngico.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com quatro repetições e os dados obtidos foram expressos em porcentagem de controle e submetidos à análise de variância e as médias obtidas foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 mostra que o esporo *A. flavus* apresentou elevada sensibilidade à luz UV-C, sendo que a dose de 0,5 kJ m⁻² possibilitou um controle superior a 98% de UFC, não diferindo estatisticamente da dose de 2,0 kJ m⁻², que controlou completamente a germinação de esporos.

Tabela 1. Controle de germinação de esporo de *Aspergillus flavus* submetido a doses de luz ultravioleta C (UV-C).

Dose (kJ m ⁻²)	Controle (%)	
0,12	27,12	c
0,25	78,45	b
0,5	98,4	a
1,0	99,47	a
2,0	100	a

No entanto, com relação ao desenvolvimento vegetativo, a radiação UV-C apresentou baixa eficiência de controle, sendo que, mesmo na dose elevada de 10 kJ m⁻², não houve inibição do crescimento micelial de *A. flavus*, e nenhuma das doses avaliadas diferiu da Testemunha.

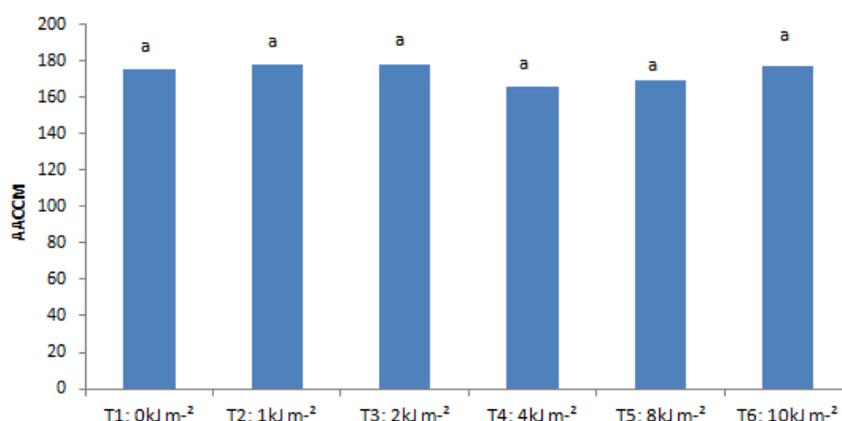


Figura 1. Área abaixo da curva do crescimento micelial (AACCM) de *Aspergillus flavus* submetidos a doses de luz ultravioleta C (UVC).

Os resultados obtidos estão de acordo com Terao et al. (2015), que observaram a baixa eficiência da radiação UV-C no controle do crescimento micelial de fungos causadores de doença



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-135-6

pós-colheita de manga: *Botyosphaeria dothidea*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Alternaria alternata* e *Colletotrichum gloeosporioides*. Verificaram que, mesmo a dose elevada de 20 kJ m⁻² não foi suficiente para inibir o crescimento micelial dos fungos avaliados, sendo que para *A. alternata*, doses elevadas de luz UV-C estimularam o desenvolvimento vegetativo. Esses autores atribuíram o controle eficiente de doença pós-colheita em manga usando baixas doses de luz UV-C (ao redor de 3 kJ m⁻²), quando aplicada diretamente no fruto, ao fenômeno da hormese e não à ação direta da luz UV-C sobre o fungo.

De maneira similar, Nascimento et al. (2014) verificaram em estudo sobre o efeito da radiação UV-C no controle de patógenos de manga, *C. gloeosporioides* e *L. theobromae*, e de melão, *A. alternata*, *Fusarium pallidroseum* e *Myrothecium roridum*, que a dose de 1,32 kJ m⁻² já foi suficiente para controlar acima de 96% das UFCs, no entanto, de maneira geral, apresentou baixa eficiência no controle do crescimento micelial dos fungos avaliados.

Nas avaliações in vivo, a radiação UV-C, apesar de não provocar queimadura na epiderme da castanha, mesmo na dose de 10 kJ m⁻², não foi capaz de inibir o crescimento de *A. flavus*. Provavelmente, o longo armazenamento das amostras de castanha, prévio à instalação do experimento (superior a um ano), em condições ambientais inadequadas, possibilitou a germinação de esporos de *A. flavus* presentes na casca, iniciando a colonização da castanha. Assim, o fungo já estava presente na epiderme da castanha, na forma micelial, apesar de não estar apresentando sinais visíveis.

De acordo com os resultados obtidos nos testes in vitro, a radiação UV-C, apesar de ser altamente eficiente no controle de esporos, não foi capaz de controlar o desenvolvimento micelial, mesmo aplicando-se doses elevadas.

Após os tratamentos, o ambiente úmido em que as castanhas foram mantidas durante o experimento, incubadas em placas de Petri fechadas, sobre papel de filtro estéril úmido, favoreceu o rápido crescimento do fungo sobre a superfície da castanha, no tratamento Controle, cobrindo totalmente a epiderme, revelando o elevado nível de contaminação do produto.

Observou-se que, nenhuma das doses avaliadas foi capaz de controlar o fungo, que se desenvolveu gradativamente em todos os demais tratamentos, não diferindo significativamente da testemunha.

Provavelmente, o tratamento com radiação UV-C poderá apresentar melhor eficiência de controle de *A. flavus* em castanhas recém coletadas, descascadas imediatamente e mantidas em armazenamento adequado, antes do tratamento. Nestas condições, o fungo, mesmo que presente na castanha, estará, ainda, na fase conidial, devido às condições ambientais desfavoráveis à germinação de esporos, portanto, na forma sensível e vulnerável à radiação UV-C.



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-135-6

Existem estudos que demonstram a elevada eficiência da radiação UV-C na desintoxicação da aflatoxina, como tecnologia não termal usada na indústria de alimentos (DIAO et al., 2015a; DIAO et al., 2015b). Portanto, novos ensaios deverão ser instalados para melhor avaliar a eficiência da luz UV-C no controle de *A. flavus* e da aflatoxina B1, usando amostras mais novas de castanha, de melhor qualidade e com menor grau de contaminação.

4 CONCLUSÃO

O *A. flavus* da castanha-do-Brasil é sensível à radiação UV-C na fase conidial, sendo que a partir da dose de $0,5 \text{ kJ m}^{-2}$ observou-se inibição significativa na germinação de esporos, no entanto, ela não é eficiente no controle do desenvolvimento vegetativo; mesmo a dose de 10 kJ m^{-2} não foi capaz de inibir o crescimento micelial do fungo. Em castanhas, com elevado grau de infecção do fungo, presente no produto na forma micelial, a dose de 20 kJ m^{-2} , apesar de não causar queimadura na epiderme, não resultou em controle eficiente da contaminação.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Embrapa pelo apoio financeiro e logístico ao projeto.

6 REFERÊNCIAS

- ARRUS, K.; BLANK, G.; CLEAR, R.; HOLLEY, R.A.; ABRAMSON, D. Microbiological and aflatoxin evaluation of Brazil nut pods and the effects of unit processing operations. **Journal of Food Protection**, v.68, n.5, 2005.
- ALHO, C. J. R. Proteção da floresta mais benefícios sociais. **Ciências hoje**, v. 25,p. 31-37, 1999.
- COELHO, E.A.A. **Efeitos da radiação gama e feixe de elétrons sobre amostras de castanhas-do-Brasil inoculadas artificialmente com *Aspergillus flavus***. 2012. 85f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- DERMICI, A.; PANICO, L. Pulsed ultraviolet light. **Food Science and Technology International**, London, v.14, n.5, p. 443-446, 2008.
- DIAO, E.; LI, X.; ZHANG, Z.; MA, W.; JI, N.; DONG, H. Ultraviolet irradiation detoxification of aflatoxins. **Trends in Food Science & Technology**, v. 42, p. 64-69, 2015a.
- DIAO, E.; SHEN, X.; ZHANG, Z.; JI, N.; MA, W.; JI, N.; DONG, H. Safety evaluation of aflatoxin B1 in peanut oil after ultraviolet irradiation detoxification in photodegradation reactor. **Food Science and Technology**, v. 50, p.41-47, 2015b.



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-135-6

HUSSEIN, S.H.; BRASEL, J.M. Toxicity, metabolismo, and impacto f mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, p. 101-134, 2001.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. São Paulo: Instituto Plantarium Ltda, 2010, 384 p.

NASCIMENTO, F.V.; SANTOS, M.C.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; BARTINICKI, V.A. Hidrotermia e radiação UV-C no controle de patógenos de manga e melão. **Summa Phytopathologica**, v.40, n.4, p.313-317, 2014.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). Critérios de salud ambiental. **Micotoxinas**, México: OMS, 1983. v.11, 131 p.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and food spoilage**. 2nd ed. London: Beackie Academic and Professional, 1997. 593 p.

SMITH, J.E.; ROSS, I.C. The toxigenic *Aspergillus*. In: SMITH, J.E.; HENDERSON, R.S. (Ed.) **Mycotoxins and animal foods**. London: CRC Press, 1991. p. 31-61.

TERAO, D.; CAMPOS, J.S.C.; BENATO, E.A.; HASHIMOTO, J.M. Alternative strategy on controlo f postharvest diseases of mango (*Mangifera indica* L.) by use of low dose of ultraviolet-C irradiation. **Food Engineering Reviews**, v.7, p. 171-175, 2015.