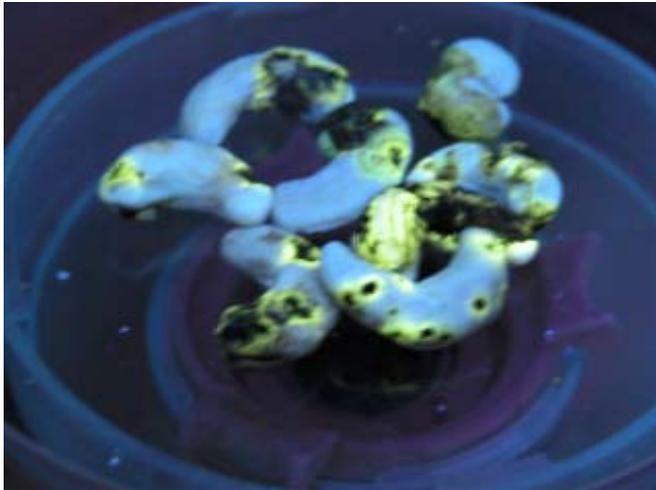


Foto: Francisco Marto Pinto Viana



## Fluorescência em Amêndoas de Castanhas de Cajueiro

Francisco das Chagas Oliveira Freire<sup>1</sup>

Ícaro Gusmão Pinto Vieira<sup>2</sup>

Olmar Baller Weber<sup>3</sup>

Juliana Alves Andrade<sup>4</sup>

Francisca Noélia Pereira Mendes<sup>5</sup>

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de castanha de cajueiro. A totalidade da produção brasileira localiza-se na Região Nordeste, onde essa cultura exerce uma importante função socioeconômica, empregando direta e indiretamente cerca de 300 mil pessoas e gerando uma renda aproximada de 200 milhões de dólares, anualmente. O principal produto de exportação é a amêndoa processada, a qual é exportada para os Estados Unidos da América e Europa (Paula Pessoa et al., 1995). A despeito da ocorrência comprovada de fungos, bactérias e leveduras, a amêndoa do cajueiro é reconhecida como a mais limpa, em relação à presença de micotoxinas (Freire & Kozakiewicz, 2005).

Durante recentes estudos, conduzidos pela Embrapa Agroindústria Tropical e pelo Núcleo de Tecnologia do Ceará (Nutec), foi detectada uma intensa fluorescência em amêndoas brocadas (amêndoas danificadas pelo ataque de insetos), industrialmente classificadas como W4, provenientes de diversas regiões produtoras dos Estados do Ceará e do Rio Grande do Norte. A

fluorescência, a qual aparece na forma de um halo circundando as lesões, é visível apenas quando as amêndoas são observadas sob luz ultravioleta com comprimento de onda de 260 nm (Fig. 1).

Com o objetivo de identificar as causas dessa ocorrência, amêndoas afetadas foram esterilizadas superficialmente em solução alcoólica a 70%, e as partes afetadas foram colocadas em solução com cloramina T a 1%, durante 10 minutos. Em seguida, os fragmentos foram lavados duas vezes em solução salina esterilizada, triturados em graal, e a suspensão inoculada em tubos contendo 9 mL de meio Dygs. Os tubos foram incubados a 30 °C, durante 24 horas, sob agitação de 125 rpm. Posteriormente, a suspensão foi riscada em placas de Petri contendo o meio Dygs. As colônias uniformes foram transferidas para meio de BDA (Batata-Dextrose-Ágar) e B de King. Duas diferentes bactérias foram obtidas, as quais foram depois inoculadas em 20 castanhas jovens de cajueiro anão precoce CP-76, com o auxílio de seringas hipodérmicas descartáveis, injetando-se 1 mL em

<sup>1</sup> Engenheiro Agrônomo, Ph. D. em Fitopatologia, Pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, R. Dra. Sara Mesquita 2270 – Pici, CEP 60511-110, freire@cnpat.embrapa.br

<sup>2</sup> Engenheiro Químico, PADETEC, Campus do Pici, Fortaleza, CE

<sup>3</sup> Engenheiro Agrônomo, D.Sc. em Ciência do Solo, Pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical

<sup>4</sup> Estagiária do PADETEC

<sup>5</sup> Farmacêutica do PADETEC

cada castanha. Castanhas inoculadas com igual volume somente com o meio de cultura serviram como testemunhas. Três dias após a inoculação, as castanhas foram colhidas, abertas e examinadas sob

lâmpada ultravioleta. Todas as amêndoas inoculadas com as bactérias exibiram fluorescência (Fig. 2). As amêndoas das testemunhas permaneceram sem fluorescência.

Foto: Ícaro Gusmão Pinto Vieira



Foto: Ícaro Gusmão Pinto Vieira

**Fig. 1.** Amêndoas brocadas sob luz natural (à esquerda) e sob luz ultravioleta (à direita), exibindo halo fluorescente em torno das lesões.

Foto: Francisco Mário Pinto Viana



**Fig. 2.** Amêndoas de castanhas jovens exibindo fluorescência três dias após a inoculação com as bactérias.

Inicialmente, julgava-se que as bactérias pertenceriam ao gênero *Pseudomonas*, pelo fato de exibirem fluorescência. Entretanto, testes conduzidos em meio de King B foram negativos. Por meio de exames conduzidos na Embrapa Meio Ambiente, em Jaguariúna, São Paulo, as bactérias foram identificadas como sendo *Bacillus megaterium* e *Staphylococcus aureus*. A identificação foi realizada com base na composição dos ácidos graxos da parede celular bacteriana. Para tanto, foram injetados 2 µL da suspensão de cada isolado em um cromatógrafo gasoso Agilent, modelo 6850, com injetor automático e detector FID, com coluna ultra 2,5% fenil metil

siloxano, acoplado a uma base de dados TSBA50. Ambas as espécies já haviam sido detectadas em amêndoas de castanhas de cajueiro oriundas do Brasil (Freire & Offord, 2002). Não se conhece, ainda, como as amêndoas se tornam infectadas pelas bactérias. Provavelmente, elas são inoculadas através de insetos sugadores (ordem Hemiptera, família Coreidae), pertencentes às espécies *Crinocerus sanctus*, *Sphictyrtus chryseis* ou *Teogonis* (= *Leptoglossus*) *stigma*, os quais são encontrados comumente sobre castanhas jovens, em condições de campo. Aliás, esses sugadores estão também envolvidos na inoculação de fungos no interior de amêndoas jovens, sendo uma das rotas de infecção já identificadas (Freire & Kozakiewicz, 2005).

Estudos para tentar determinar a composição da substância fluorescente formada nas amêndoas brocadas encontram-se, atualmente, em desenvolvimento no Laboratório de Química do Parque de Desenvolvimento Tecnológico (Padetec), em Fortaleza, CE. As áreas lesionadas foram selecionadas, trituradas, e a substância fluorescente foi extraída com hexano, concentrando-se o extrato (Sokol, 1986; Mossialos et al., 2000). O resíduo obtido foi extraído com solução aquosa de NH<sub>4</sub>OH (pH 9,5). O extrato aquoso foi filtrado e o pH foi ajustado para 2,0 e extraído com acetato de etila. O produto obtido foi concentrado em evaporador rotativo, produzindo um material fluores-

cente oleoso, o qual foi submetido à análise por ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$ , sendo, posteriormente, submetido à cromatografia em camada delgada (sílica gel, clorofórmio : ácido acético : etanol : 90:5:15) (Fig. 3).

A suspeita inicial de que a substância fluorescente seria um sideróforo (substância excretada no ambiente pela célula bacteriana para a captura de íons de ferro), semelhante à pioverdina ou à piochelina, não se confirmou. Na realidade, as informações obtidas, até o momento, apontam para uma molécula com um núcleo aromático e com 18 átomos de carbono.



Foto: Ícaro Gusmão Pinto Vieira

**Fig. 3.** Substância de consistência oleosa, fluorescente, isolada a partir de amêndoas brocadas.

Até que a natureza da substância fluorescente seja reconhecida, e a sua toxicidade a animais de laboratório seja avaliada, torna-se prematuro sugerir medidas para contornar o problema. Esse fenômeno deve estar ocorrendo há dezenas de anos, tendo somente agora

sido descoberto. Por outro lado, o mecanismo de inoculação das bactérias dentro das amêndoas necessita ser elucidado. É provável que elas sejam inoculadas por insetos sugadores das castanhas jovens. Nesse caso, apenas o controle químico dos insetos poderia reduzir o percentual de amêndoas brocadas, o qual atinge, em média, 5% do total das amêndoas processadas.

## Referências

FREIRE, F. das C.O.; KOZAKIEWICZ, Z. Filamentous fungi, bacteria and yeasts associated with cashew kernels in Brazil. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 36, n. 2, 249-254, 2005.

FREIRE, F. das C.O.; OFFORD, L. Bacterial and yeast counts in Brazilian commodities and spices. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 145-148, 2002.

MOSSIALOS, D.; MEYER, J.M.; BUDZIKIEWICZ, H.; WOLFF, U.; KOEDAM, N.; BAYSSE, C.; ANJALIAH, V.; CORNELIS, P. Quinolobactin, a new siderophore of *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400, the production of which is repressed by the cognate pyoverdine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 487-492, 2000.

PAULA PESSOA, P.F.A.; LEITE, L.A.S.; PIMENTEL, C.R.M. Situação atual e perspectivas da agroindústria do caju. In: ARAÚJO, J.P.P., SILVA, V.V. (Ed.). **Cajucultura: modernas técnicas de produção**. Fortaleza: EMBRAPA-CNPAT, 1995. p. 23-42.

SOKOL, P.A. Production and utilization of pyochelin by clinical isolates of *Pseudomonas cepacia*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 23, n. 3, p. 560-562, 1986.

### Comunicado Técnico, 119

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:  
**Embrapa Agroindústria Tropical**  
 Endereço: Rua Dra. Sara Mesquita 2270, Pici,  
 CEP 60511-110 Fortaleza, CE  
 Fone: (0xx85) 3299-1800  
 Fax: (0xx85) 3299-1803 / 3299-1833  
 E-mail: negocios@cnpat.embrapa.br

1ª edição *on line*: dezembro de 2006

### Comitê de Publicações

**Presidente:** Francisco Marto Pinto Viana  
**Secretário-Executivo:** Marco Aurélio da Rocha Melo  
**Membros:** Janice Ribeiro Lima, Andréa Hansen Oster, Antonio Teixeira Cavalcanti Júnior, José Jaime Vasconcelos Cavalcanti, Afrânio Arley Teles Montenegro, Ebenézer de Oliveira Silva.

### Expediente

**Supervisor editorial:** Marco Aurélio da Rocha Melo  
**Revisão de texto:** José Ubiraci Alves  
**Editoração eletrônica:** Arilo Nobre de Oliveira  
**Normalização bibliográfica:** Ana Fátima Costa Pinto.