

Metodologia para obtenção de microrganismos endofíticos da polpa de tucumã

Robson Ribeiro MARINHO¹; Marcus Antonio da Silva SANTOS²; Alisson dos Reis CANTO³; Jerusa de Souza ANDRADE⁴; Noemia Kazue ISHIKAWA⁵

¹Bolsista PIBIC/CNPq; ²Colaborador (Graduando do Curso de Farmácia-UNIP); ³Colaborador (Graduando do Curso de Ciências Biológicas-CEFET); ⁴Colaborador INPA/CPTA; ⁵Orientador INPA/CPTA

O tucumã é um fruto típico da região Amazônica constituído de polpa amarelada rica em carotenóides e de caroço que contém no seu interior uma amêndoa, de onde se pode extrair óleo. O consumo de 30 g da polpa desse fruto é suficiente para suprir as necessidades de vitamina A de uma criança (Portela *et al.*, 1996). Com o surgimento do sanduíche de tucumã em Manaus, a procura por esse fruto cresceu de forma significativa, o que intensificou sua comercialização e disseminação pela região. A polpa de tucumã passou a ser um ingrediente típico na culinária amazônica, sendo utilizada no preparo de diversos produtos, tais como, tapiocas, sorvetes, pizzas, cremes, purês. Porém, estudos sobre sua conservação são raros, o que dificulta a difusão desse produto para outras regiões. Essa limitação se dá principalmente devido ao curto tempo de validade da polpa. Em trabalhos realizados por Santos *et al.* (2005) foi constatada alta carga microbiana na polpa de tucumã comercializada na cidade de Manaus, sendo este um dos fatores responsáveis pela rápida deterioração da polpa. Em pesquisa realizada na Coordenação de Pesquisas em Tecnologia de Alimentos (CPTA) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), foram estudados os pontos críticos de contaminação da polpa, uso de sanitizantes para desinfestação do fruto e aplicação de baixas temperaturas para conservar a polpa. Tais pesquisas têm trabalhado com a quantificação total dos microrganismos, ou seja, epifíticos e endofíticos. Contudo faz-se necessário investigar o papel dos endofíticos separadamente, para melhor compreender a rápida deterioração da polpa de tucumã. Para o estudo de microrganismos endofíticos a completa eliminação dos epifíticos é fundamental, embora os principais passos da desinfestação dos epifíticos sejam descritos em literatura, são necessárias adaptações para cada tipo de material a ser analisado. Com isso, o objetivo deste trabalho foi definir uma metodologia para avaliar a incidência dos microrganismos endofíticos na polpa de tucumã pelo cálculo da frequência e pela quantificação, em unidade formadora de colônia por grama de polpa de tucumã (UFC/g). Para determinar a frequência de infecção de fungos e bactérias endofíticas, foi testada a desinfestação dos frutos e da polpa. Para tanto, frutos de tucumã adquiridos em pontos de vendas distribuídos pela cidade de Manaus, foram transportados para a CPTA, onde foram lavados em água corrente com detergente e divididos em três lotes. O primeiro serviu como controle do experimento. No segundo lote, os frutos foram desinfestados segundo metodologia descrita por Araújo *et al.* (2002), onde os frutos inteiros foram imersos em álcool 70 % por um minuto, hipoclorito de sódio 2 % por três minutos, novamente em álcool 70 % por 30 segundos e lavados duas vezes em água destilada esterilizada. No terceiro lote, os frutos foram descascados e despulpados seguidos pela desinfestação da polpa utilizando o mesmo processo do segundo lote. A presença de microrganismos na última água de enxágüe foi analisada como prova da eficiência da desinfestação. Para calcular a frequência de infecção de fungos e bactérias, parte do mesocarpo foi cortado em fragmentos de aproximadamente 0,5 cm² e estes transferidos, respectivamente, para placas de Petri contendo meios de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) acrescido de cloranfenicol e Tripton de Soja Ágar (TSA) acrescido de benomil (Araújo *et al.*, 2002). Para a quantificação dos microrganismos endofíticos, a imersão da polpa por três minutos em hipoclorito de sódio eliminou tanto os microrganismos epifíticos quanto os endofíticos, deste modo foi testada a imersão por um, um minuto e 30 segundos e dois minutos. Para contagem tanto de fungos quanto de bactérias endofíticas, 1 g da polpa já desinfestada foi macerada em 3 mL de solução salina peptonada (SSP), utilizando grau e pistilo e diluída em 6 mL da mesma solução. A diluição contendo a polpa de tucumã macerada foi colocada em mesa agitadora a 150 rpm durante uma hora e 30 minutos, para auxiliar a liberação dos endofíticos, em seguida, foram feitas duas diluições, 10⁻² e 10⁻³, destas, foi transferido 1 mL de cada diluição para placas de Petri esterilizadas. Em seguida, foi vertido aproximadamente 20 mL do meio de cultura BDA (método de pour plate) para o isolamento de bolores e leveduras e as placas foram mantidas a 28 °C, por quatro dias, e TSA, para bactérias, e essas placas foram mantidas a 28 °C durante dez dias. Para quantificação dos microrganismos endofíticos multiplicou-se por 100 a média de colônias de três placas, para a diluição 10⁻², por 1000 a média de colônias para a diluição 10⁻³ e tirou-se a média para a quantidade total de colônias em ambas as diluições. Em seguida multiplicou-se a média total de colônias por dez para se obter a quantidade de colônias por mL da amostra. Por fim, multiplicou-se o valor obtido pelo volume em mL de SSP utilizado para a diluição da amostra e dividiu-se o resultado pelo peso (em gramas) utilizado para a mesma. O resultado foi expresso em UFC/g de polpa de tucumã. A média da frequência de fungos e bactérias nos frutos que não receberam tratamento foi 56% e 76% respectivamente. Os fragmentos de polpa de frutos desinfestados apresentaram maior frequência de

microrganismos do que os fragmentos onde a desinfestação foi realizada na própria polpa (Tabela 1). No entanto, apenas a análise microbiológica da última água de enxágüe do tratamento onde a polpa foi desinfestada mostrou a eficiente eliminação dos microrganismos epifíticos, o que indica que as colônias observadas são endofíticas. Para a quantificação dos microrganismos em UFC/g de polpa, o tempo de um minuto e 30 segundos para imersão em hipoclorito de sódio 2 % foi o mais indicado, obtendo-se a quantificação de $4,3 \times 10^5$ e 1×10^6 UFC/g de fungos e bactérias endofíticas por grama de polpa de tucumã, respectivamente. Sendo assim, pode-se sugerir para a análise de microrganismos endofíticos de tucumã que a desinfestação seja realizada na polpa e que o tempo de imersão em hipoclorito de sódio 2 % seja de um minuto e meio.

Tabela 1 - Média da frequência de infecção da polpa de tucumã a partir de fragmentos e quantidade de unidade formadora de colônia por mL (UFC/mL) da água do último enxágüe da desinfestação

	Frequência de infecção (%)		UFC/mL da água do último enxágüe	
	Fungos	Bactérias	Fungos	Bactérias
Controle	56	76	nr	nr
Desinfestação do fruto	45	61	69	108
Desinfestação da polpa	10	31	0	0

nr = não realizado

Controle = ausência de desinfestação

Palavras-chave: *Astrocaryum aculeatum*, desinfestação, deterioração

Apoio financeiro: FAPEAM/CNPq

Bibliografias citadas

Araújo, W. L.; Lima, A. O. S.; Azevedo, J. L.; Marcon, J.; Kuklinsky-Sobral, J.; Lacava, P. T. 2002. *Manual: Isolamento de Microrganismos Endofíticos*. Editora CALQ, Piracicaba, SP, Brasil. 86pp

Portela, F. A.; Amoedo, M. S. B. C.; Ayrton, A. 1996. *Plantas medicinais e suas aplicações na indústria*. DAMPI - Manaus, AM, Brasil. 160pp.

Santos, L. B.; Ioppi, P. C. S.; Santos, M. A. S.; Andrade, J. S.; Ishikawa, N. K. 2005. *Avaliação Microbiológica de Polpa de Tucumã (*Astrocaryum vulgare*) Comercializado em Manaus*. In: XIV Jornada de Iniciação Científica do PIBIC/CNPq/FAPEAM/INPA. *Resumo*. Manaus, (CD-Room).