

# GRÃOS DE SOJA INOCULADOS ARTIFICIALMENTE COM O FUNGO CAUSADOR DA FERRUGEM DA SOJA (*PHAKOPSORA PACHYRHIZI*) PROCESSADOS POR FEIXE ELÉTRONS

I. T. Sabundjian\*, S. Aquino, R. L. Guedes, G. B. Fanaro, R. G. Crede e  
A.L.C.H. Villavicencio

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN / CNEN - SP)  
Centro de Tecnologia das Radiações – Lab. de Detecção de Alimentos Irradiados  
Av. Professor Lineu Prestes 2242  
05508-000 São Paulo, SP  
\*itdjian@ipen.br

## RESUMO

O processamento por radiação de alimentos desenvolveu-se durante a II Guerra Mundial e atualmente é muito utilizado na desinfestação e desinfecção de produtos e também no prolongamento da vida útil de alimentos. A ferrugem da soja é uma doença que causa queda de folhas prematuramente, o que acaba por impedir a boa formação dos grãos e altera, conseqüentemente, a qualidade da soja produzida. No Brasil, durante a última safra, essa doença causou um prejuízo total de mais de US\$ 2,8 bilhões e uma perda estimada em 4,6 milhões de toneladas de soja. Esse estudo avaliou se houve inibição do desenvolvimento dos esporos do fungo causador da ferrugem da soja por processamento em aceleradores de elétrons. Inicialmente os grãos foram esterilizados a uma dose de 20 kGy em uma Fonte de <sup>60</sup>Co (*GammaCell*) no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN – CNEN/ SP). Posteriormente contaminamos os grãos artificialmente com caldo concentrado de *Phakopsora pachyrhizi* e submetemos este material a feixes de elétrons provenientes de um Acelerador *Dynamitron* (IPEN – CNEN/ SP) com as seguintes doses: 0; 1; 2 e 3 kGy. Por fim realizamos a técnica de Semeadura direta de grãos e as placas de Petri foram incubadas em uma estufa a 25 °C (± 1) durante 5 dias, sendo observado a presença ou ausência de colônias fúngicas.

## 1. INTRODUÇÃO

A tecnologia de processamento por radiação para fins alimentícios é um procedimento efetivo e seguro que intensificou seu desenvolvimento durante a II Guerra Mundial [1,2]. Esse processo pode ser utilizado para os mais diversos fins, tais como: desinfestação e desinfecção de alimentos, através do decréscimo da carga microbiana e da redução de infestação por insetos principalmente em frutos, para o prolongamento da vida útil de produtos, retardar a maturação e inibir o brotamento em alimentos [3,4].

O Brasil é o segundo maior produtor de soja do mundo ficando atrás somente dos Estados Unidos. O cultivo de soja representa um dos elementos mais fortes da economia do Brasil. Essa cultura é responsável pela entrada de mais de US\$ 3 bilhões anuais em divisas e dela depende, seja de forma direta ou indireta, a estabilidade da economia nacional. Um dos fatores que limita a exploração de potencial de produtividade da soja são as doenças, em geral de difícil controle, causadas principalmente por fungos e bactérias já constatadas aqui no Brasil [5,6].

A ferrugem asiática da soja foi relatada pela primeira vez no mundo, no Japão entre 1902 e 1903 e no Brasil seu primeiro relato ocorreu na safra de 2000/2001 [6-8]. Essa enfermidade atinge as plantações de soja e é causada por um fungo conhecido cientificamente como

*Phakopsora pachyrhizi*. Este fungo ocasiona amarelamento e queda prematura de folhas, desenvolvimento não satisfatório dos grãos e alterações na qualidade da soja produzida [5,9,10].

Essa doença causou na safra 2003/2004 um prejuízo total de U\$ 2,8 bilhões e uma perda estimada de 4,6 milhões de toneladas de soja, o que justifica a urgência em pesquisas e investimentos neste setor [8]. Esse trabalho teve como objetivo inviabilizar os esporos do fungo *Phakopsora pachyrhizi* presentes na superfície dos grãos através do processamento destes por acelerador de elétrons a diferentes doses.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Material**

Os grãos de soja foram fornecidos por uma empresa que os utiliza como base em seus produtos.

### **2.2. Métodos**

Os procedimentos descritos abaixo foram realizados no Laboratório de Alimentos do CTR (Centro de Tecnologia das Radiações, IPEN-CNEN/SP).

#### **2.2.1. Isolamento do fungo *Phakopsora pachyrhizi***

Grãos de soja não esterilizados foram colocados em um tubo de ensaio contendo 20 ml de caldo *Sabouraud* estéril. Em seguida o tubo foi incubado durante 7 dias em uma estufa a 25° C ( $\pm 1$ ). Comprovamos a presença deste fungo no caldo após 7 dias através da técnica de PCR.

#### **2.2.2. Esterilização de grãos**

Inicialmente 200 gramas de grãos de soja foram expostos a uma dose esterilizante de 20kGy em uma fonte de  $^{60}\text{Co}$  (*Gammacell*) no IPEN – CNEN/ SP. Após irradiados, estes grãos foram armazenados em temperatura ambiente ( $23^{\circ}\text{C} \pm 2$ ).

#### **2.2.4. Contaminação artificial dos grãos**

25 grãos estéreis foram colocados em embalagens plásticas previamente esterilizadas e a estas adicionamos 0,5 ml de caldo concentrado de uredosporos do fungo *Phakopsora pachyrhizi*. Incubamos estas embalagens a 25 °C ( $\pm 1$ ) por 24 horas.

#### **2.2.4. Irradiação em Acelerador de elétrons**

As embalagens contendo os grãos contaminados foram submetidas a feixes de elétrons provenientes de um Acelerador *Dynamitron* localizado no IPEN – CNEN/ SP, sendo as doses de radiação 0, 1, 2 e 3 kGy. Foi utilizado o sistema dosimétrico do triacetato de celulose

(CTA), calibrado e com rastreabilidade IDAS (International Dose Assurance Service) e a taxa de dose foi de 2,23 kGy/s.

### 2.2.3. Semeadura direta de grãos

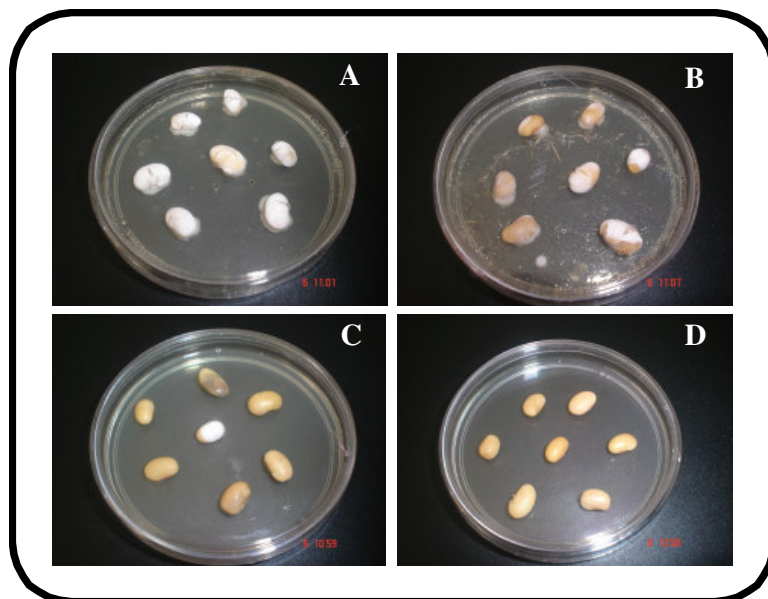
Após serem irradiados os grãos foram distribuídos em placas de Petri (cerca de 7 grãos) contendo ágar *Sabouraud* estéril [11]. Após este procedimento as placas foram incubadas em estufa durante 5 dias a 25 °C ( $\pm 1$ ). Observamos se houve o desenvolvimento de colônias fúngicas envolvendo os grãos.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

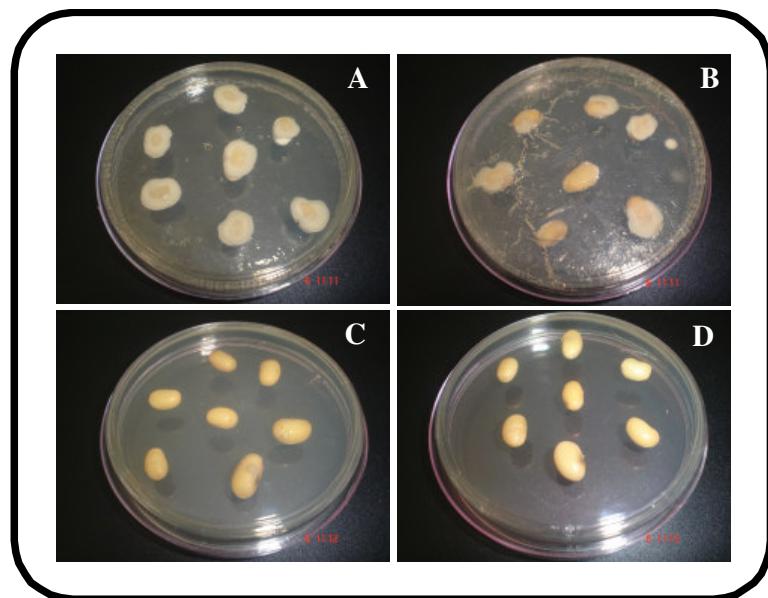
Após 5 dias, observamos que nas placas controle (0 kGy) os grãos de soja encontravam – se envolvidos por colônias de *Phakopsora pachyrhizi* quando observados frontalmente conforme mostra a figura 1A e quando observados pela face oposta conforme a figura 2A. Já nas placas irradiadas a 1 kGy notamos que não eram todos os grãos que apresentavam em sua superfície colônias fúngicas (Figura 1B e 2B). Nas amostras processadas a 2 kGy (Figura 1C e 2C) o número de grãos de soja que apresentavam-se cobertos pelo fungo era ainda menor do que os irradiados a 1 kGy. Quando os grãos foram processados a uma dose de 3 kGy o fungo não se desenvolveu sobre nenhum dos grãos dispostos nas placas (Figura 1D e 2D).

A partir dos resultados apresentados notamos que o desenvolvimento do fungo dá-se de forma inversamente proporcional à dose de radiação (Figura 3). Observamos que todos os grãos controle (0 kGy) apresentavam em sua superfície fungos. Nos grãos irradiados a 1 kGy, 5 dos 7 grãos apresentaram contaminação, sendo assim houve uma redução de contaminação de 28,6% (Figura 4). A 2 kGy essa contaminação diminuiu ainda mais, visto que apenas 1 dos 7 grãos apresentou contaminação por colônias fúngicas. Neste caso houve uma redução de contaminação de 85,7% (Figura 4) e nas placas contendo grãos irradiados a 3 kGy não observamos nenhum grão contaminado, chegando então a uma redução de contaminação aparente de 100% (Figura 4).

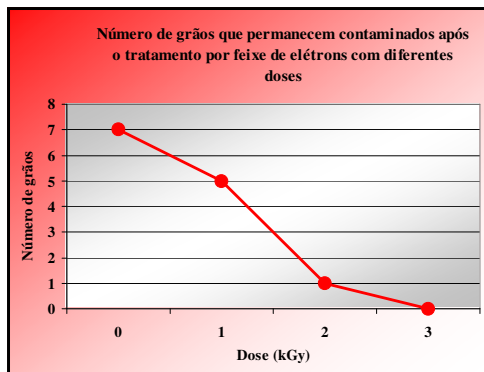
Nos grãos tratados com 3 kGy o não desenvolvimento do fungo pode ter ocorrido devido ao efeito direto da radiação, ou seja, pela excitação ou ionização do material genético do organismo causando assim mudanças biológicas e conseqüente morte celular. Este é o processo dominante quando esporos secos de microorganismos são irradiados. Outro fenômeno que pode ter nos levado a tais resultados é o chamado efeito indireto da radiação, onde esta pode interagir com outros átomos e moléculas na célula, particularmente a água, para produzir radicais livres, os quais podem difundir – se o bastante para danificar o DNA do organismo [12,13]. Com doses de radiação mais baixas (1 e 2 kGy) o desenvolvimento do fungo na superfície do grão diminui quando comparamos este aos grãos controle, porém ainda ocorre. Nossos resultados estão de acordo com outras pesquisas citadas na literatura.



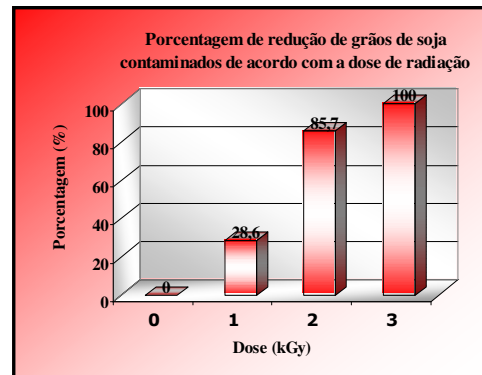
**Figura 1. Placas contendo grãos de soja processados por diferentes doses de radiação, após 5 dias de estocagem a 25 °C(± 1). A: Placa controle (0 kGy); B: 1 kGy; C: 2 kGy e D: 3 kGy.**



**Figura 2. Face oposta das placas contendo grãos de soja processados por diferentes doses de radiação, após 5 dias de estocagem a 25 °C(± 1). A: Placa controle (0 kGy); B: 1 kGy; C: 2 kGy e D: 3 kGy.**



**Figura 3.** Número de grãos de soja que permanecem contaminados com o fungo *Phakopsora pachyrhizi* após o processamento por feixe de elétrons deste produto em com doses de 0, 1, 2 e 3 kGy.



**Figura 4.** Porcentagem de redução de contaminação dos grãos de soja de acordo com a dose de radiação que estes receberam .

#### 4. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos podemos concluir que as doses de 1 e 2 kGy não são suficientes para inibir o desenvolvimento dos uredosporos do fungo causador da ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*), porém a dose de 3 KGy inviabiliza os uredosporos, impedindo que estes se desenvolvam sobre a superfície dos grãos de soja e causem danos a este produto.

#### AGRADECIMENTOS

Agradecemos a FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro.

#### REFERÊNCIAS

1. J. F. Diehl, “Food Irradiation – past, present and future”, *Radiation Physics and Chemistry*, Vol. 63, pp. 211 – 215 (2002).
2. P. Loaharanu, “Food irradiation in developing countries: A practical alternative”, *IAEA Bulletin*, n. 1, pp. 30 - 35 (1994).
3. N. S. Marín-Huachaca, J. Mancini –Filho, H. Delincée and A. L. C. H. Villavicencio, “Identification of gamma-irradiated papaya, melon and watermelon”, *Radiation Physics and Chemistry*, Vol. 71, pp. 191 – 194 (2004).
4. E. R. Kitazuru, A.V. B. Moreira, J. Mancini –Filho, H. Delincée and A. L. C. H. Villavicencio, “Effects of irradiation on natural antioxidants of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* N.)”, *Radiation Physics and Chemistry*, Vol. 71, pp. 37-39 (2004).

5. R. M. Soares, S. A. L. Rubin, A. P. Wielewicki e J. G. Ozelame, “Fungicidas no controle da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) e produtividade da soja”, *Ciência Rural*, Vol. 34, n. 4, pp. 1245 – 1247 (2004).
6. A. A. Carvalho Jr e M.B. Figueiredo, “A verdadeira identidade da ferrugem da soja no Brasil”, *Summa Phytopathologica*, Vol. 26, n. 02, pp.197 – 200 (2000).
7. C. V. Godoy e M. G. Canteri, “Efeitos Protetor, Curativo e Erradicante de Fungicidas no Controle da Ferrugem da Soja Causada por *Phakopsora pachyrhizi*, em Casa de Vegetação”, *Fitopatologia Brasileira*, Vol. 29, pp. 97 – 101 (2004).
8. J. T.Yorinori e J. J. Lazzarotto, “Situação da Ferrugem Asiática da Soja No Brasil e na América do Sul”, *Londrina: Embrapa* , Documento 235 (2004).
9. R. S. Kawuki; E. Adipala and P. Tukamuhabwa, “Yield loss associated with Soya Bean Rust (*Phakopsora pachyrhizi* Syd) in Uganda”, *J. Phytopathology*, Vol. 151, pp. 7 – 12 (2003).
10. J. T.Yorinori; W. M. Paiva; L. M. Constamilan and P. F. Bertagnolli. “Ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*): Identificação e controle”. *Informações Agronômicas*, n. 104, p. 05 – 08 (2003).
11. J. I. Pitt and A. D. Hocking. *Fungi and Food Spoilage*, Second edition, Blackie Academic & Professional, London (1997).
12. J. F. Diehl, *Safety of Irradiated Foods – 2.ed. revised and expanded*. Marcel Dekker Inc., New York, N. Y. (1995).
13. S. Aquino, *Efeitos da radiação gama no crescimento de Aspergillus flavus produtor de aflatoxinas e no emprego da técnica da reação em cadeia de polimerase (PCR) em amostras de grãos de milho inoculadas artificialmente* (2003). Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) da Universidade de São Paulo.