

**ARIANNE COSTA BAQUIÃO**

**FUNGOS E MICOTOXINAS EM  
CASTANHAS-DO-BRASIL, DA COLHEITA AO  
ARMAZENAMENTO**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Microbiologia do Instituto  
de Ciências Biomédicas da Universidade de  
São Paulo para obtenção do título de  
Doutor em Ciências**

**SÃO PAULO  
2012**

**ARIANNE COSTA BAQUIÃO**

**FUNGOS E MICOTOXINAS EM  
CASTANHAS-DO-BRASIL, DA COLHEITA AO  
ARMAZENAMENTO**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Microbiologia do Instituto  
de Ciências Biomédicas da Universidade de  
São Paulo para obtenção do título de  
Doutor em Ciências**

**Área de concentração: Microbiologia**

**Orientador: Prof. Dr. Benedito Corrêa**

**Versão original**

**SÃO PAULO  
2012**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do  
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Baquião, Arianne Costa.

Fungos e micotoxinas em castanhas-do-brasil, da colheita ao armazenamento / Arianne Costa Baquião. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Benedito Correa.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Micotoxinas

Versão do título para o inglês: Fungi and mycotoxins in Brazil nuts, from harvest to storage.

Descritores: 1. Micoflora 2. *Aspergillus* 3. Fungo 4. Castanha-do-brasil 5. Aflatoxina 6. Ácido ciclopiazônico I. Correa, Benedito II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB017/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a):                   Arianne Costa Baquião.

Título da Tese:                Fungos e micotoxinas em castanhas-do-brasil, da colheita  
ao armazenamento.

Orientador(a):                Benedito Correa.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão  
pública realizada a ...../...../....., considerou

**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

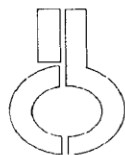
Examinador(a):   Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):   Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):   Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):   Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente:        Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil  
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438  
e-mail:

*Comissão de Ética em Pesquisa*

## CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº **233/07**, referente ao projeto intitulado: “*Microbiota fúngica e ocorrência de aflatoxinas em amostras de castanha-do-brasil da colheita ao armazenamento*” sob a responsabilidade de **Ariane Costa Baquião Porto**, foi analisado na presente data pela CEEA – COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPSh – COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 25 de setembro de 2007.

PROF. DR. WOTHIAN TAVARES DE LIMA  
Coordenador da CEEA - ICB/USP

PROF. DR. LUIZ VICENTE RIZZO  
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

*Dedico esta tese a minha filha Clarissa.*

*Você, minha pequena, transformou minha vida e é minha razão de existir. Minhas realizações são frutos do seu amor. Você, apesar de tão pequena é meu alicerce.*

*Te amo!*

*A minha querida madressita.*

*Que sempre me apoiou e se permitiu sonhar comigo. Se eu tive a oportunidade de estudar foi graças ao seu esforço e empenho!*

*Obrigada por ser minha mãe e acima de tudo minha companheira!*

## **AGRADECIMENTOS**

*Ao professor e orientador Dr. Benedito Corrêa, pela oportunidade, incentivo e dedicação. Somente com seu apoio foi possível a realização deste trabalho.*

*A minha família pelo amor, compreensão e apoio. Obrigada Ernesto, meus irmãos, cunhada e sobrinhos por compartilharem a vida comigo!*

*Ao Bando dos Calmares por estar sempre presente nos momentos bons e não tão bons, e me oferecer a esperança e força! Shalom!*

*À Tatiana Alves dos Reis pelo precioso auxílio técnico científico e paciência na execução das atividades laboratoriais. Obrigada por sua amizade.*

*Ao Dr. Sérgio Vergueiro, Eng. Agrônomo Gabriel Teixeira de Paula Neto e todos os funcionários da Agropecuária Aruanã, pela colaboração técnica, auxílio na obtenção das amostras e pelo acolhimento nas dependências da Fazenda Aruanã.*

*Ao Dr Pedro Vitorino e sua equipe, pelas análises de selênio realizadas.*

*Ao Dr. Carlos Augusto de Oliveira, professor dedicado que admiro desde a graduação, obrigada por proporcionar o conhecimento necessário à realização das análises de ACP.*

*À Patrícia Zorzete, Danielle Atayde e Maitê Oliveira pela amizade verdadeira que ultrapassa o ambiente de trabalho.*

*À Maria Jacinta de Farias, minha postiça, pelo apoio incondicional, e por incentivar na nobre “arte” da pesquisa científica.*



*Aos amigos do Laboratório de Micotoxinas do Instituto de Ciências Biomédicas, Ednei, Vinícius, Liliana, Ludmila, Mariana, Gabriela, e demais colegas pelo inestimável auxílio e convívio no laboratório.*

*Aos amigos que entendem minhas ausências e partilham de minha alegria: Janaína Luna, Nicole Pereira, Luciana Paranhos, Maria José, Juliana Amorim, Carol Amaro.*

*Ao Instituto de Ciências Biomédicas pelo suporte necessário oferecido para realização do projeto.*

*Aos professores do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas e à Universidade de São Paulo pelos conhecimentos adquiridos.*

*Aos secretários Alice, Ana, Naíde, Luciana, Celso e Bruno sempre muito prestativos.*

*Às funcionárias da Biblioteca do ICB, especialmente Eva e Teresa. Obrigada pela correção da tese e pela doçura com que executam seu ofício!*

*A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro.*

*Aos funcionários do setor de Apoio Técnico (SAT), pela colaboração sempre solícita prestada.*

*À todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.*

*A Deus, pela vida e pela força.*

*Enfim, a todos que colaboraram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.*

**OBRIGADA POR TUDO!**

*“De tudo ficaram três coisas:  
a certeza de que estamos sempre a começar,  
a certeza de que é preciso continuar,  
e a certeza de que seremos interrompidos antes  
de terminar.*

*Portanto, devemos:  
fazer da interrupção um caminho novo,  
da queda, um passo de dança,  
do medo, uma escada,  
do sonho, uma ponte,  
da procura, um encontro.”*

*Fernando Sabino*

## RESUMO

BAQUIÃO, A. C. **Fungos e micotoxinas em castanhas-do-brasil, da colheita ao armazenamento.** 2012. 141 f. Tese (Doutorado em Microbiologia)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a presença de fungos e micotoxinas (aflatoxinas e ácido ciclopiazônico [ACP]) em castanhas-do-brasil coletadas a campo e no armazenamento, bem como a microbiota do solo e ar nas coletas iniciais a fim de estabelecer possíveis vias de contaminação fúngica. Objetivou também correlacionar os achados com fatores abióticos, determinar o potencial aflatoxigênico de cepas de *Aspergillus* seção *Flavi* e avaliar os níveis de selênio (Se) nas amêndoas. As amostras procederam do município de Itacoatiara, Amazonas, Brasil. A pesquisa de fungos foi feita pela técnica de semeadura em superfície em meio Ágar batata dextrose e Ágar *Aspergillus flavus* – *parasiticus* e a determinação de micotoxinas por cromatografia líquida de alta eficiência. Os níveis de Se foram determinados por espectrometria de absorção atômica. As amostras coletadas a campo foram analisadas em quatro períodos: Dia 0; amostras na árvore, Dias 5, 10 e 15; amostras em contato natural com solo 5, 10 e 15 dias, respectivamente. As amostras armazenadas, após secagem, foram analisadas mensalmente por 11 meses. Nas amostras coletadas a campo, os fungos mais prevalentes foram: *A. flavus* em ouriços e amêndoas; *Fusarium* spp. em cascas. No solo foram isolados, principalmente, *Penicillium* spp. e *Aspergillus flavus* e no ar, *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. No armazenamento, em amêndoas, foi observado maior contaminação por *A. flavus*, *Fusarium* spp. e *A. nomius*; e em cascas, a predominância foi de *Fusarium* spp. e *A. flavus*. Aflatoxinas e ACP não foram detectados nas amostras analisadas. Dentre as cepas de *A. flavus* isoladas 57,9% (278/480) foram aflatoxigênicas, bem como todas as cepas de *A. nomius* e *A. parasiticus*. Os níveis de Se foram entre 30,64 e 139,35 µg/g. A elevada frequência de cepas aflatoxigênicas isoladas principalmente no solo e em amêndoas de castanha-do-brasil, mostrou predisposição deste substrato a contaminação por *A. flavus* e a produção de aflatoxinas. O aumento progressivo do tempo de contato das castanhas-do-brasil com o solo foi acompanhado de maior contaminação por *A. flavus* em ouriços, cascas e amêndoas; sugerindo a possibilidade de contaminação da castanha-do-brasil durante etapa a campo. Além disso, *A. nomius* e *A. parasiticus* foram isolados somente no armazenamento, sugerindo que a contaminação ocorra no estoque das amêndoas.

**Palavras chave:** Micoflora, *Aspergillus*, fungo, castanha-do-brasil, aflatoxina, ácido ciclopiazônico

## ABSTRACT

BAQUIÃO, A. C. **Fungi and mycotoxins in Brazil nuts, from harvest to storage.** 2012. 141 f. Thesis (Microbiology)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The objective of this present study was analyse, in the field and in the storage, mycobiota and the contamination by mycotoxins (aflatoxins and cyclopiazonic acid) from Brazil nuts (nuts, shells and pods), soil and air samples to determine possible route of fungi contamination. Also aimed to correlate the findings with environmental factors; determine the aflatoxigenic potential from strains of *Aspergillus* section *Flavi* and assess the levels of selenium (Se) in nuts. The samples were collected from Itacoatiara, State of Amazonas, Brazil. The Brazil nuts mycobiota was determine by dilution plating method in Potate Dextrose Agar and *Aspergillus flavus* – *parasiticus* agar and, micotoxins was done by high performance liquid chromatography. The Se levels were determined by atomic absorption spectrometry. Field samples were collected during different periods: day 0, samples still on the tree; days 5, 10 and 15, samples in contact with soil for 5, 10 and 15 days, respectively. The most prevalent fungi were *Aspergillus flavus* in fruit pods and nuts and *Fusarium* spp. in shells. *Penicillium* spp. and *A. flavus* were isolated from soil, and *Fusarium* spp. and *Penicillium* spp. from air. The storage samples, after dried, were analysed montly during 11 months; and showed predominance *A. flavus*, *Fusarium* spp. e *A. nomius* in nuts, and *Fusarium* spp. and *A. flavus* in shells. Aflatoxins and cyclopiazonic acid were not detected in any of the samples analyzed. Within species *Aspergillus flavus* isolated, 57,9% (278/480) were aflatoxigenic, as well as all strains of *A. nomius* e *A. parasiticus*. The Se levels were between 30,64 e 139,35 µg/g. The high frequency of isolation of aflatoxigenic *A. flavus* strains from soil and Brazil nuts increases the chance of aflatoxin production in these substrates. These findings suggest a possible contamination before drying and indicate soil as the main source of fungal contamination of Brazil nuts. Therefore, *A. nomius* e *A. parasiticus* were isolated only in storage, suggesting Brazil nuts contamination occurs in this period.

**Keywords:** Mycoflora, *Aspergillus*, fungi, Brazil nut, aflatoxin, cyclopiazonic acid.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1-</b>	Estrutura química das aflatoxinas B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , M <sub>1</sub> , M <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> e G <sub>2</sub> .....	30
<b>Figura 2-</b>	Mecanismos de biotransformação da AFB <sub>1</sub> .....	32
<b>Figura 3-</b>	Localização da Agropecuária Aruanã, município de Itacoatiara, Amazonas, Brasil.....	42
<b>Figura 4-</b>	Coleta dos ouriços diretamente das castanheiras. Itacoatiara, AM, no período de fevereiro de 2008.....	43
<b>Figura 5-</b>	Dependências laboratoriais na Fazenda Aruanã, Itacoatiara, AM, no período de fevereiro a março de 2008.....	44
<b>Figura 6-</b>	Ouriço isolado e identificado a data da queda. Itacoatiara, AM, no período de fevereiro de 2008.....	45
<b>Figura 7-</b>	Coleta de amostras de solo, Itacoatiara, AM, no período de fevereiro de 2008.....	45
<b>Figura 8-</b>	Coleta de amostra de ar. Itacoatiara, AM, no período de fevereiro de 2008.....	46
<b>Figura 9-</b>	Higienização dos ouriços. Itacoatiara, Amazonas, no período de março de 2008.....	47
<b>Figura 10-</b>	Forno rotatório. Itacoatiara, AM, no período de fevereiro de 2008.....	47
<b>Figura 11-</b>	Mesa de separação das castanhas por tamanho. Itacoatiara, AM, no período de fevereiro de 2008.....	48
<b>Figura 12-</b>	Sacarias contendo castanha-do-brasil em casca em galpão. Itacoatiara, AM, no período de setembro de 2008 a julho de 2009.....	49
<b>Figura 13-</b>	Representação gráfica das frequências absoluta ( $\times 10^6$ UFC/g) dos fungos mais isolados de 20 amostras de solo, provenientes de Itacoatiara, AM, no período de fevereiro a março de 2008.....	73
<b>Figura 14-</b>	Representação gráfica das frequências absoluta (UFC/m <sup>3</sup> ) dos fungos mais isolados de 20 amostras de ar, provenientes de Itacoatiara, AM, no período de fevereiro a março de 2008.....	76
<b>Figura 15-</b>	Representação gráfica das frequências absoluta ( $\times 10^6$ UFC/g) dos fungos mais isolados de 20 amostras de ouriços de castanha-do-brasil, provenientes de Itacoatiara, AM, no período de fevereiro a março de -	

	2008.....	79
<b>Figura 16-</b>	Representação gráfica das freqüências absoluta ( $X 10^6$ UFC/g) dos fungos mais isolados de 20 amostras de cascas de castanha-do-brasil, provenientes de Itacoatiara, AM, no período de fevereiro a março de 2008.....	82
<b>Figura 17-</b>	Representação gráfica das freqüências absoluta ( $X 10^6$ UFC/g) dos fungos mais isolados de 20 amostras de amêndoas de castanha-do-brasil, provenientes de Itacoatiara, AM, no período de fevereiro a março de 2008.....	85
<b>Figura 18-</b>	Representação gráfica das freqüências absoluta ( $X 10^6$ UFC/g) dos gêneros fúngicos mais isolados de 55 amostras de cascas de castanha-do-brasil, provenientes de Itacoatiara, AM, no período de setembro de 2008 a julho de 2009.....	92
<b>Figura 19-</b>	Representação gráfica do de unidades formadoras de colônias dos gêneros <i>Aspergillus</i> spp. e <i>Fusarium</i> spp. em amostras de cascas de castanha-do-brasil, Itacoatiara, AM, no período de setembro de 2008 a julho de 2009.....	92
<b>Figura 20-</b>	Representação gráfica das freqüências absoluta ( $X 10^6$ UFC/g) das espécies de <i>Aspergillus</i> mais isoladas de 55 amostras de cascas de castanha-do-brasil, provenientes de Itacoatiara, AM, no período de setembro de 2008 a julho de 2009.....	93
<b>Figura 21-</b>	Representação gráfica das freqüências absoluta ( $X 10^6$ UFC/g) dos gêneros fúngicos mais isolados de 55 amostras de amêndoas de castanha-do-brasil, provenientes de Itacoatiara, AM, no período de setembro de 2008 a julho de 2009.....	100
<b>Figura 22-</b>	Representação gráfica do de unidades formadoras de colônias dos gêneros <i>Aspergillus</i> spp. e <i>Fusarium</i> spp. em amostras de amêndoas de castanha-do-brasil, Itacoatiara, AM, no período de setembro de 2008 a julho de 2009.....	100
<b>Figura 23-</b>	Representação gráfica das freqüências absoluta ( $X 10^6$ UFC/g) das espécies de <i>Aspergillus</i> mais isoladas de 55 amostras de amêndoas de castanha-do-brasil, provenientes de Itacoatiara, AM, no período de setembro de 2008 a julho de 2009.....	101
<b>Figura 24-</b>	Representação gráfica da frequência de cepas de <i>Aspergillus</i> seção <i>Flavi</i> durante etapa de armazenamento e relação com Aa e UR, entre setembro de 2008 e julho de 2009, Itacoatiara, Amazonas.....	104

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b>	Composição química centesimal, teor de selênio e valor calórico da amêndoa da castanha-do-brasil.....	24
<b>Tabela 2-</b>	Níveis mínimos de atividade de água necessários para o crescimento e produção de micotoxinas das principais espécies toxigênicas do gênero <i>Aspergillus</i> .....	37
<b>Tabela 3-</b>	Programação térmica do forno de grafite.....	63
<b>Tabela 4-</b>	Resultado da análise química de solo das áreas experimentais, Itacoatiara, AM, no período de fevereiro de 2008.....	71
<b>Tabela 5-</b>	Unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g X 10 <sup>6</sup> ) dos fungos isolados de 20 amostras de solo, provenientes de Itacoatiara, AM, em fevereiro de 2008.....	72
<b>Tabela 6-</b>	Unidades formadoras de colônias por m <sup>3</sup> de ar (UFC/m <sup>3</sup> ) dos fungos isolados de 20 amostras de ar, provenientes de Itacoatiara, AM, no período de fevereiro de 2008.....	75
<b>Tabela 7-</b>	Unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g X 10 <sup>6</sup> ) dos fungos isolados de 20 amostras de ouriços, provenientes de Itacoatiara, AM, no período de fevereiro de 2008.....	78
<b>Tabela 8-</b>	Unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g X 10 <sup>6</sup> ) dos fungos isolados de 20 amostras de cascas de castanha-do-brasil, provenientes de Itacoatiara, AM, no período de fevereiro de 2008.....	81
<b>Tabela 9-</b>	Unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g X 10 <sup>6</sup> ) dos fungos isolados de 20 amostras de amêndoas de castanha-do-brasil, provenientes de Itacoatiara, AM, no período de fevereiro de 2008.....	84
<b>Tabela 10-</b>	Unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g X 10 <sup>4</sup> ) dos gêneros fungicos isolados de 110 amostras de cascas de castanha-do-brasil, provenientes de Itacoatiara, AM, no período de setembro de 2008 a julho de 2009.....	88
<b>Tabela 11-</b>	Unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g X 10 <sup>4</sup> ) das espécies de <i>Aspergillus</i> isoladas de 110 amostras de cascas de castanha-do-brasil, provenientes de Itacoatiara, AM, no período de setembro de 2008 a julho de 2009.....	90
<b>Tabela 12-</b>	Unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g X 10 <sup>4</sup> ) dos gêneros fungicos isolados de 55 amostras de amêndoas de castanha-	

	do-brasil, provenientes de Itacoatiara, AM, no período de setembro de 2008 a julho de 2009.....	96
<b>Tabela 13-</b>	Unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g X 10 <sup>4</sup> ) das espécies de <i>Aspergillus</i> isoladas de 55 amostras de amêndoas de castanha-do-brasil, provenientes de Itacoatiara, AM, no período de setembro de 2008 a julho de 2009.....	98
<b>Tabela 14-</b>	Unidades formadoras de colônia de <i>Aspergillus flavus</i> (X 10 <sup>4</sup> /g) em 110 amostras de castanhas-do-brasil (55 cascas e 55 amêndoas) coletadas durante período de armazenamento, valores médios de atividade de água, temperatura, umidade relativa do ar e precipitação pluvial no período entre setembro de 2008 e julho de 2009, Itacoatiara, Amazonas.....	103
<b>Tabela 15-</b>	Valores da concentração de selênio (mg/g) nas amêndoas de castanha-do-brasil coletadas a campo e no armazenamento.....	105



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>1.1</b>	<b>Características das castanha-do-brasil</b> .....	20
<b>1.2</b>	<b>Importância social da castanha-do-brasil</b> .....	21
<b>1.3</b>	<b>Importância econômica da castanha-do-brasil</b> .....	22
<b>1.4</b>	<b>Composição da castanha-do-brasil</b> .....	23
<b>1.5</b>	<b>Micobiota</b> .....	24
1.5.1	<i>Aspergillus</i> spp.....	26
<b>1.6</b>	<b>Micotoxinas</b> .....	27
1.6.1	Aflatoxinas.....	29
1.6.2	Ácido ciclopiazônico.....	35
<b>1.7</b>	<b>Fatores abióticos</b> .....	36
1.7.1	Atividade de água.....	36
1.7.2	Temperatura.....	37
<b>2</b>	<b>PROPOSIÇÕES E OBJETIVOS</b> .....	40
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	42
<b>3.1</b>	<b>Local</b> .....	42
<b>3.2</b>	<b>Amostras</b> .....	43
3.2.1	Amostras coletadas a campo.....	43
3.2.1.1	<u>Diretamente da árvore</u> .....	43
3.2.1.2	<u>Contato com solo</u> .....	44
3.2.1.3	<u>Solo</u> .....	45
3.2.1.4	<u>Ar</u> .....	46
3.2.2	Amostras coletadas durante o armazenamento.....	46
3.2.2.1	<u>Processamento prévio</u> .....	46
3.2.2.2	<u>Castanhas em casca armazenadas</u> .....	48
<b>3.3</b>	<b>Análise da composição química do solo</b> .....	49
<b>3.4</b>	<b>Determinação da atividade de água</b> .....	49
<b>3.5</b>	<b>Isolamento de micobiota</b> .....	50
3.5.1	Meios de Cultura.....	50
3.5.1.1	<u>Ágar Batata Dextrose</u> .....	50
3.5.1.2	<u>Ágar Saboraund</u> .....	50
3.5.1.3	<u>Meio Martim</u> .....	50
3.5.1.4	<u>Meio Ágar Aspergillus flavus- parasiticus (AFPA)</u> .....	51
3.5.1.5	<u>Ágar Extrato de Levedura- Sacarose (YES)</u> .....	51

3.5.1.6	<u>Ágar coco</u> .....	52
3.5.2	Micobiota das amostras de castanha-do-brasil.....	52
3.5.3	Micobiota de solo.....	53
3.5.4	Fungos do ar.....	53
3.5.5	Identificação fúngica.....	53
3.5.5.1	<u>Técnica de Microcultivo</u> .....	54
3.5.5.2	<u>Produção de ácido aspergílico</u> .....	54
3.5.5.3	<u>Identificação molecular</u> .....	54
3.5.5.3.1	Extração do DNA genômico das cepas de <i>Aspergillus</i> seção <i>Flavi</i> .....	55
3.5.5.3.2	Quantificação do DNA extraído e pureza das amostras.....	55
3.5.5.3.3	Reação em cadeia da polimerase (PCR) e eletroforese dos produtos da PCR.....	55
3.5.5.3.4	Purificação dos produtos amplificados.....	56
3.5.5.3.5	Quantificação do DNA purificado e pureza das amostras.....	56
3.5.5.3.6	Sequenciamento dos produtos amplificados.....	57
3.5.5.3.7	Precipitação da reação de sequenciamento.....	57
3.5.5.3.8	Sequenciamento de DNA e análise dos resultados.....	58
<b>3.6</b>	<b>Dados climatológicos</b> .....	<b>58</b>
<b>3.7</b>	<b>Determinação de micotoxinas</b> .....	<b>58</b>
3.7.1	Potencial aflatoxigênico das cepas de <i>Aspergillus</i> seção <i>Flavi</i> .....	58
3.7.1.1	<u>Extração de aflatoxinas para realização de potencial aflatoxigênico</u> .....	58
3.7.1.2	<u>Avaliação qualitativa do potencial aflatoxigênico</u> .....	59
3.7.1.3	<u>Avaliação quantitativa do potencial aflatoxigênico</u> .....	59
3.7.2	Determinação de aflatoxinas nas amostras de castanha-do-brasil.....	60
3.7.2.1	<u>Amêndoas</u> .....	60
3.7.2.2	<u>Cascas e Ouriços</u> .....	61
3.7.3	Determinação de ácido ciclopiazônico nas amostras de castanha-do-brasil.....	62
<b>3.8</b>	<b>Determinação de selênio</b> .....	<b>63</b>
3.8.1	Digestão das amostras de castanha-do-brasil.....	63
3.8.2	Determinação de Se por espectrometria de absorção atômica.....	63
<b>3.9</b>	<b>Análise estatística</b> .....	<b>64</b>
<b>4</b>	<b>DELINEAMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>66</b>
<b>4.1</b>	<b>Fluxograma da produção de castanha-do-brasil</b> .....	<b>66</b>
<b>4.2</b>	<b>Fluxograma analítico das amostras coletadas a campo</b> .....	<b>67</b>
<b>4.3</b>	<b>Fluxograma analítico das amostras coletadas durante armazenamento</b> .....	<b>68</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>70</b>
<b>5.1</b>	<b>Amostras coletadas a campo</b> .....	<b>70</b>

5.1.1	Análise da composição química do solo.....	70
5.1.2	Isolamento e identificação fúngica das amostras de solo.....	70
5.1.3	Isolamento e identificação dos fungos das amostras de ar.....	74
5.1.4	Isolamento e identificação fúngica das amostras de ouriços de castanha-do-brasil.....	77
5.1.5	Isolamento e identificação fúngica das amostras de cascas de castanha-do-brasil	80
5.1.6	Isolamento e identificação fúngica das amostras de amêndoas de castanha-do-brasil.....	83
<b>5.2</b>	<b>Amostras coletadas durante armazenamento.....</b>	<b>86</b>
5.2.1	Isolamento e identificação fúngica das amostras de cascas de castanha-do-brasil	86
5.2.2	Isolamento e identificação fúngica das amostras de amêndoas de castanha-do-brasil.....	94
5.2.3	Atividade de água e dados climatológicos.....	102
<b>5.3</b>	<b>Determinação dos níveis de selênio.....</b>	<b>105</b>
<b>5.4</b>	<b>Micotoxinas.....</b>	<b>106</b>
5.4.1	Otimização da técnica de CLAE para detecção de aflatoxinas.....	106
5.4.1.1	<u>Padrões de aflatoxinas.....</u>	106
5.4.1.2	<u>Derivação química.....</u>	106
5.4.1.3	<u>CLAE para aflatoxinas.....</u>	106
5.4.1.4	<u>Curva de calibração.....</u>	107
5.4.1.5	<u>Coefficientes de recuperação.....</u>	107
5.4.1.6	<u>Limites de quantificação e detecção.....</u>	108
5.4.2	Análise de aflatoxinas.....	108
5.4.2.1	<u>Amostras de castanha-do-brasil.....</u>	108
5.4.2.2	<u>Capacidade toxigênica das cepas de <i>Aspergillus</i> seção <i>Flavi</i>.....</u>	109
5.4.3	Otimização da técnica de CLAE para detecção de ACP.....	110
5.4.3.1	<u>Padrão de ACP.....</u>	110
5.4.3.2	<u>CLAE para ACP.....</u>	110
5.4.3.3	<u>Curva de calibração.....</u>	110
5.4.2.4	<u>Coefficiente de recuperação.....</u>	111
5.4.3.5	<u>Limites de quantificação e detecção.....</u>	111
5.4.4	Análise de ACP.....	111
5.4.2.1	<u>Amostras de castanha-do-brasil.....</u>	111
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>115</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>125</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>127</b>

## **1 INTRODUÇÃO**

## 1.1 Características das castanha-do-brasil:

A castanheira (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl., 1808) é originária da região amazônica, encontrada em estado nativo desde o alto Orinoco (5° latitude norte) até o alto Beni (14° latitude sul), incluindo Guiana francesa, Suriname, Guiana, Venezuela, Peru, Bolívia e Brasil, especialmente nos estados de Rondônia, Acre, Amazonas, Pará, Goiás e Mato Grosso (LORENZI, 2010; CLAY e CLEMENT, 1993).

Única representante do gênero, pertence à família Lecythidaceae (LORENZI, 2010; ALHO, 1999) e é encontrada em solos pobres, argilosos ou argilo-arenosos, de textura média a pesada. Vegeta naturalmente em clima quente e úmido, com precipitação anual de 1400 a 2800 mm, temperatura média anual de 24 a 27 °C e umidade relativa do ar de 79 a 86% (CLAY e CLEMENT, 1993).

A castanheira, árvore de grande porte, pode atingir até 50 m de altura e 2 metros de diâmetro de base, com tronco cilíndrico, reto, liso desprovido de ramos, ramificando apenas na porção superior de sua copa. As folhas simples e glabras possuem de 25 a 35 centímetros de comprimento e coloração verde-escura brilhante (LORENZI, 2010).

A árvore floresce durante o período da seca, correspondendo, no leste da Amazônia, entre os meses de novembro a fevereiro (LORENZI, 2010). Na floração, a castanheira apresenta flores brancas ou cremes, com até 4 cm de diâmetro e seis pétalas, polinizadas por abelhas silvestres robustas (Euglossinae) (ALHO, 1999).

A queda dos frutos se inicia na estação chuvosa, entre os meses de janeiro a abril no leste da Amazônia e novembro a março na região de Manaus (CLAY e CLEMENT, 1993). O peso dos ouriços associados à altura das castanheiras permite que os frutos alcancem o chão com força e velocidade, afundando no solo. Alguns roedores, como cutias (*Dasyprocta aguti*) e pacas (*Agouti paca*), são capazes de romper a cápsula do ouriço, alimentando-se das castanhas e conservando os excedentes no chão da floresta, os quais podem brotar, perpetuando novas gerações da planta (ALHO, 1999).

O fruto da castanheira, ouriço, é um pixídio imperfeito, com formato circular e capsular, espessura fibrosa e compactada, coloração castanho-escura, com 10 a 12 cm de diâmetro, peso entre 0,5 a 2,5 kg e contem de 10 a 25 sementes envoltas em uma polpa amarela (CLAY e CLEMENT, 1993; LORENZI, 2010; ALHO, 1999). As sementes variam entre 3,5 a 7 cm de comprimento e 2 cm de largura e peso de 4 a 10 g, possuem também uma casca dura e rugosa de formato triangular e encerram em seu interior a amêndoa, a castanha-do-brasil ou castanha-do-pará. A maturidade dos frutos pode ser

atingida após 15 meses da queda das flores (CLAY e CLEMENT, 1993). Plantas provenientes de sementes podem iniciar a frutificação aos oito anos, mas somente após 12 anos atingem produção de amêndoas (MÜLLER et al., 1995)

Após remoção dos ouriços, as castanhas sofrem processo de lavagem e triagem, visando a remoção daquelas visivelmente deterioradas e atrofiadas, e então são submetidas à secagem e armazenamento em depósito até a comercialização.

## **1.2 Importância social da castanha-do-brasil**

A exploração comercial da castanha-do-brasil teve início no século XIX e apresentou notoriedade meio século depois, com a abertura dos portos do rio Amazonas à navegação estrangeira. Após a decadência da borracha, a castanha-do-brasil passou a constituir o principal produto extrativo para exportação da região norte do Brasil, na categoria de produtos básicos. Dessa forma, visando normatizar o comércio deste produto, foi proposto o Decreto Federal nº 5.975/06, que regulamenta o Código Florestal e a Política Nacional do Meio Ambiente. Este decreto estabeleceu regras gerais sobre o Plano de Manejo Florestal Sustentável, supressão de vegetação, utilização de matéria-prima florestal, reposição florestal e licença para transporte de produtos florestais.

A coleta extrativista de castanha-do-brasil é considerada como um dos elementos fundamentais de preservação da floresta amazônica. Problemas na produção ou na comercialização das castanhas-do-brasil induzem os extrativistas à derrubada de florestas para implantação de sistemas agrícolas e pecuários. A desestruturação desta cadeia de produção pode trazer incrementos aos desmatamentos na Amazônia (SANTOS et al., 2010). Assim a produção extrativista deve ser estimulada, apoiada e regida por ações governamentais.

Estudo de Almeida (2004) indica que existem no país cerca de 778.150 castanheiros, distribuídos em 14 milhões de hectares, trabalhando em forma de extrativismo comunitário.

### 1.3 Importância econômica da castanha-do-brasil

A castanheira apresenta várias aplicações. Os ouriços podem ser utilizados como combustível e, também, na confecção de objetos, mas o maior valor está na amêndoa, alimento rico em proteínas, lipídios e vitaminas. Ela pode ser consumida fresca ou assada, além de participar como ingrediente de receitas doces e salgadas. O óleo pode ser usado “in natura” na culinária ou como matéria-prima manufaturada de produtos farmacêuticos, cosméticos, sabonetes, entre outros. Do resíduo da extração do óleo, obtém-se um farelo usado em farinhas ou rações (NASCIMENTO 1984). O “leite” de castanha é de grande valor na culinária regional e a madeira com boas propriedades é indicada para reflorestamento e empregada tanto na construção civil quanto na naval. Além disso, as castanhas com casca podem ser vendidas desidratadas, semidesidratadas, ou a granel (sem beneficiamento) (ALHO, 1999).

De acordo com Pennacchio (2007), até 1990, o Brasil ocupava posição de liderança no mercado mundial na produção de castanha-do-brasil, com 80% do comércio e uma produção média de 51 mil toneladas(t)/ano. Com a atual redução da produção brasileira, a Bolívia passou a ser o maior exportador mundial, com volume da ordem de 50 mil t anuais. O autor aponta possíveis explicações para a queda da produção de castanha-do-brasil nacional: redução dos castanhais produtivos; deficiências na cadeia produtiva; escassez de políticas e de programas de incentivo à produção e à comercialização; dificuldades de atendimento às exigências fitossanitárias para exportação, especialmente quanto aos limites de tolerância para presença de aflatoxinas, sendo até 20 ppb (parte por bilhão) no Brasil, e até 4 ppb nos EUA e Europa.

Desde o ano 2000, os preços de venda da castanha-do-brasil apresentaram tendência crescente, aumentando a atratividade da exploração desse produto. As razões da sua valorização são diversas e remetem a um conjunto de ações de política pública realizadas pelo governo federal (Pennacchio, 2007). Por se tratar de uma atividade extrativista, vários fatores interferem nessa relação e, indubitavelmente, o mais importante é o valor de venda. Ações cooperativistas elevaram o preço médio pago aos produtores, praticamente em 230%, passando de cerca R\$ 0,35/kg em 2000, para R\$ 1,16 em 2008 (ENRÍQUEZ, 2009).

Convém destacar que a castanha oriunda da Bolívia, apresenta qualidade inferior a brasileira, em razão da existência de menores controles de exportação e de medidas fitossanitárias deficientes. Além disso, apesar da produção boliviana superar numericamente a brasileira, seu produto final possui menor

valor agregado. A qualidade superior da castanha-do-brasil em nosso país está diretamente relacionada às exigências dos órgãos nacionais para a comercialização do produto (ENRÍQUEZ, 2009).

Foi sancionada em 18 de fevereiro de 2011 a RDC nº 7, a qual estabelece limites de aflatoxinas totais para diversos substratos produzidos no Brasil, incluindo a castanha-do-brasil. Foram considerados limites máximos de 20, 10 e 15 ppb; para castanhas-do-brasil destinadas a consumo direto com casca, consumo direto sem casca e ao processamento posterior sem casca, respectivamente (BRASIL, 2011).

Em 2009, a produção nacional de castanha-do-brasil somou 37.467 toneladas (t), equivalente a R\$ 52,261 milhões, representando um acréscimo de 21,6% em relação à produção de 30.815 toneladas, obtida em 2008. O principal estado produtor foi o Amazonas, concentrando 42,7% do total coletado. Seguem-no o Acre (27,5%) e o Pará (18,7%). Entre os 20 maiores municípios produtores, Rio Branco (AC) deteve 7,0% da produção nacional, seguido por Brasiléia (6,9%), Xapuri (6,7%) e Sena Madureira (6,3%) (IBGE, 2009).

Basicamente, a produção comercial brasileira de castanha-do-brasil, obedece a dois fluxos: o consumo interno e a exportação. Essa relação tem se alterado na proporção de 35% a 50% para a exportação e, 50% a 65% para o consumo interno. No caso das exportações podemos destacar como principal destino a Bolívia com o produto “in natura”, seguida dos Estados Unidos, Japão, Europa e Austrália (ENRÍQUEZ, 2009).

#### **1.4 Composição da castanha-do-brasil**

O valor alimentício da castanha-do-brasil é alto, a amêndoa possui cerca de 17% de proteína (SOUZA e MENEZES 2004) e 67% de gordura (NASCIMENTO, 1984), aminoácidos essenciais, como metionina e cisteína, e minerais como selênio (Se) (CLAY e CLEMENT 1993) (Tabela 1).



**Tabela 1-** Composição química centesimal, teor de selênio e valor calórico da amêndoa da castanha-do-brasil \*.

Componentes	Percentual e quantidade
Umidade	3,13 %
Cinzas	3,84 %
Lipídeos	67,3 %
Proteínas	14,29 %
Carboidratos	3,42 %
Fibra total	8,02 %
Fibra insolúvel	4,89 %
Fibra solúvel	3,12 %
Valor calórico	676,56 kcal

Fonte: Souza e Menezes, 2004.

\* Dados referentes a castanha-do-brasil com casca armazenada.

A castanha-do-brasil é considerada fonte de selênio, o qual possui um importante papel como antioxidante, estando envolvido no metabolismo da tireóide, prevenção de neoplasias e distúrbios reprodutivos. Dessa forma, o consumo de castanha-do-brasil tem sido relacionado com atividades antienvhecimento e recomendado a atletas, idosos, crianças e pessoas que buscam uma vida saudável (COUTINHO et al., 2002).

A dose de selênio recomendada para ingestão diária pelo “National Research Council” foi estabelecida em 55 µg; entretanto o limite tolerável de consumo por dia pode alcançar até 400 µg (NAS, 2000). Estes dados demonstram que o consumo de castanha-do-brasil, pode ser eficiente na reposição dos níveis de selênio no organismo humano.

### 1.5 Micobiota

Os alimentos, independentemente de sua origem, apresentam uma microbiota natural extremamente variável, concentrada principalmente na região superficial. Os fungos e as bactérias são os microrganismos de maior destaque, tanto como agentes potenciais de deterioração do produto, ou como eventuais patógenos do homem. Porém, nas diversas etapas de processamento, os alimentos estão

sujeitos à contaminação por diferentes microrganismos que não fazem parte desta microbiota natural (LEITÃO, 1988).

Em relação ao ambiente onde vivem, os fungos foram divididos em fungos do solo e fungos do ar. Os fungos do solo habitam partes subterrâneas e aéreas inferior das plantas, fragmentos de vegetais e compostos orgânicos depositados no solo. Já os fungos do ar são encontrados nas partes superiores das plantas. Há também aqueles que colonizam ambos os ambientes (BURGESS et al., 1981).

O desenvolvimento fúngico ocorre desde fases no campo, durante o processo de formação das sementes, na colheita, nas fases de secagem, beneficiamento, até o armazenamento (ROSSETTO et al., 2005); e ainda no manuseio e transporte até o consumidor (SANTOS et al., 2001). O impacto econômico da invasão fúngica está diretamente relacionado à perda de qualidade do produto, e inclui a diminuição do poder de germinação, alterações organolépticas, perda de matéria seca, aquecimento, cozimento, mudanças químicas e nutricionais e produção de micotoxinas, tornando-os impróprios para o consumo (PASTER e BULLERMAN, 1988).

O solo é o principal reservatório primário de muitos fungos, inclusive os do gênero *Aspergillus* (SMITH e ROSS, 1991). Gonzalez et. al. (2008a) pesquisando a micobiota de amostras de solo, provenientes de Junqueirópolis (SP, Brasil) mostraram uma prevalência dos gêneros *Penicillium* e *Fusarium*, e *A. flavus* foi detectado em 8% das amostras.

Gonzalez et. al. (2008b) também pesquisaram micobiota de amostras de cascas de amendoim provenientes de Junqueirópolis (SP, Brasil). Os principais fungos isolados foram *Fusarium* spp. (78,75%), *Rhizopus* spp. (14,1%) e *A. flavus* (11,75%).

Em amêndoas de castanha-do-brasil, os gêneros mais frequentemente isolados foram *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Fusarium*, além de *Acremonium*, *Paecilomyces*, *Absidia*, *Trichoderma*, entre outros (CASTRILLÓN e PURCHIO, 1988b; FREIRE et al., 2000; BAYMAN et al., 2002; PACHECO et al., 2010).

No Brasil, Castrillón e Purchio (1988b) analisando amêndoas de castanha-do-brasil procedentes dos estados do Amazonas e São Paulo, isolaram principalmente fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, sendo as espécies *A. flavus* e *A. parasiticus* as mais frequentes.

Pacheco et al. (2010), analisando micobiota em amêndoas de castanha-do-brasil oriunda do município de Manaus (AM, Brasil), obtiveram predominância de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, considerando-os gêneros nativos na micoflora de castanha-do-brasil. Dentre as espécies de *Aspergillus*, *A. flavus* e *A. niger* foram as mais isoladas.

Em ouriços de castanha-do-brasil, coletados na Amazônia Peruana, foram isolados *Penicillium*, *Aspergillus*, *Acremonium*, *Coelomycetes* e *Pestalotiopsis*, incluindo espécies *A. flavus* (ARRUS, et al., 2005b).

#### 1.5.1 *Aspergillus* spp.

O gênero *Aspergillus* foi descrito inicialmente pelo botânico italiano Pier Antonio Micheli em 1729 (MACKENZIE, 1988) e suas espécies são, frequentemente, cosmopolitas e colonizam uma grande variedade de substratos (LAFORET, 2008).

O gênero *Aspergillus* é agrupado à divisão *Deuteromycotina*, à classe dos *Hyphomycetes*, à ordem *Moniliales*, e à família *Moniliaceae*. São caracterizados pelo desenvolvimento de colônias coloridas e brilhantes e por produzir conídios em cabeças típicas, do tipo “mop-like” (escovão) (PITT e HOCKING, 2009).

Espécies micotoxigênicas ocorrem em três seções do gênero *Aspergillus*, mas a seção *Flavi* contem o maior número de produtores potenciais (PILDAIN et al., 2004), que inclui as seguintes espécies: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. oryzae* e *A. sojae*. Dentre essas, *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* receberam as principais considerações pela capacidade de produção de potentes micotoxinas: as aflatoxinas. Já as espécies *A. oryzae* e *A. sojae* são consideradas seguras pela “U.S. Food and Drugs Administration”, por não apresentarem histórico de produção de toxinas, sendo utilizadas industrialmente na produção de “sakê”, missô e molho de soja (PITT e HOCKING, 2009).

*Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* são mundialmente distribuídos em solo, ar, materiais orgânicos e partes de plantas, invadindo pré ou pós-colheita; o que pode resultar na infecção fúngica e produção de micotoxinas (COTTY et al., 1994). Apresentam aspecto macro-morfológico característico por colônias verdes a amarelas-oliva, podendo apresentar-se amarelas puras e acizentadas com o decorrer do tempo (PITT e HOCKING, 2009). Microscopicamente, os conidióforos de *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* surgem a partir de hifas vegetativas septadas. As fiálides podem surgir diretamente de uma vesícula globosa (condição unisseriada) ou a partir da métula que envolve a superfície da vesícula (condição bisseriada). A vesícula, a métula quando presente, as fiálides, e as cadeias de conídios compreendem a cabeça conidial, que no *A. parasiticus*, é predominantemente unisseriada, enquanto no *A. flavus*, a seriação é mais variável (KOKALIS-BURELLE et al., 1997). Os conídeos de *A. flavus* e *A. nomius* tem paredes delgadas, lisas ou levemente rugosas, são esféricos a

elipsoidais com vesículas maiores que 50 µm, com métulas presentes. Já os conídeos de *A. parasiticus* são rugosos, com paredes espessas, esféricos, e suas vesículas não ultrapassam 30 µm, e métulas são incomuns (PITT e HOCKING, 2009).

A contaminação de castanha-do-brasil por *Aspergillus* seção *Flavi* apesar de freqüente, ainda não está elucidada, mas ocorre, principalmente, nas regiões tropicais e subtropicais, comumente implicados na deterioração de alimentos (TANIWAKI e SILVA, 2001).

## 1.6 Micotoxinas

O termo micotoxina é originário do grego e do latim, sendo a palavra grega “mykes”, que significa fungo; e a latina “toxicum”, que significa veneno ou toxina (BULLERMAN, 1979; GOLDBLATT, 1972).

Os metabólitos primários dos fungos, e de outros organismos, são compostos indispensáveis ao seu crescimento, como carbono, açúcares e lipídios (BU'LOCK, 1980). Já os metabólitos secundários, que caracterizam as quinomas, os pigmentos, os antibióticos e as micotoxinas, são produzidos por várias espécies de fungos ao final da fase de crescimento exponencial, dependendo do acúmulo dos precursores originados do metabolismo primário, como acetatos, piruvatos e aminoácidos (STEYN, 1977).

As micotoxinas, por definição, são metabólitos secundários tóxicos, de baixo peso molecular, produzidos por espécies fúngicas filamentosas, que contaminam alimentos no campo, no armazenamento ou após o processamento (MOSS, 1989), afetando a saúde pública e a agroeconomia. São responsáveis por perdas de milhões de dólares anuais (HUSSEIN e BRASEL, 2001).

Índícios das micotoxinas remetem a tempos antigos, e provavelmente, vários surtos de micotoxicoses já foram confundidos com pragas, envenenamentos e epilepsia. No Antigo Testamento, as 10 pragas do Egito, quando Moisés tentava libertar os hebreus do domínio faraônico, evidenciaram o problema destes metabólitos. Também há indícios na peste que dizimou os rebanhos e induziu tumores e úlceras em animais e nos egípcios (SABINO, 2004). Em 1850, ocorreu o episódio chamado de “Fogo de Santo Antônio”, no qual a ingestão de centeio infectado por *Claviceps purpurea* foi relacionada com características do ergotismo, aventando a possibilidade do perigo de metabólitos tóxicos produzidos por fungos (SANTURIO, 2000). No Japão, muitas mortes foram associadas à ingestão de arroz

contaminado por *Penicillium* spp. (SAITO et al., 1971); e na Rússia, úlceras e estomatites foram associadas a toxinas produzidas por *Fusarium sporotrichioides* (CAMPBELL e STOLOFF, 1974).

A micotoxicologia moderna inicia-se com a descoberta da aflatoxina, após perdas de grande número de animais, principalmente perus, na Inglaterra em 1961, atribuída ao consumo de amendoim a dieta. A partir daí, novas importantes descobertas foram realizadas envolvendo o efeito imunossupressor e carcinogênico das aflatoxinas e a revelação que as aflatoxinas contaminam grãos não somente no armazenamento, mas também na pré-colheita.

A produção de micotoxinas pelos fungos depende de uma série de fatores, incluindo a susceptibilidade do substrato à colonização do fungo produtor, presença de macro e micronutrientes; fatores físicos como temperatura ambiental, umidade do substrato, pH do substrato, umidade relativa do ar durante o armazenamento, aeração, danos mecânicos e tempo de armazenamento e fatores biológicos como capacidade genética do fungo em produzir micotoxinas, quantidade de esporos viáveis, interação de diferentes fungos existentes no mesmo substrato, interação de micotoxinas e presença de parasitas (insetos, roedores e ácaros) (CIEGLER, 1978; MILLER, 1994). Além do mais, as micotoxinas podem manter sua atividade biológica por longos períodos, podendo culminar em micotoxicoses (JAY, 1994).

Já a suscetibilidade humana a intoxicações por micotoxinas também é variável e depende da dose da toxina ingerida; e idade, frequência de exposição e condição nutricional do hospedeiro (MILLER, 1994).

A contaminação dos gêneros alimentícios por micotoxinas pode ser indireta através da ingestão de resíduos em carne, ovos e leite, como consequência do consumo de alimentos contaminados pelos animais ou contaminação direta através do consumo de cereais, produtos de cereais, frutas secas, frutas e outros pela contaminação com fungos toxigênicos. O resultado da ingestão de micotoxinas é a intoxicação alimentar, que pode acarretar efeitos tóxicos agudos ou crônicos, dependendo do sistema teste, dosagem e frequência da exposição (JAY, 1994). Segundo Miller (1994), a exposição crônica às micotoxinas através da dieta, ou seja, a ingestão de pequenas doses por um longo período pode ter efeitos mais expressivos do que a exposição aguda.

De acordo com Taniwaki e Silva (2001), as micotoxinas muitas vezes ocorrem em baixas concentrações, o que dificulta sua detecção e propicia ingestão contínua. Além disso, uma mesma toxina pode ser produzida por uma variedade de fungos, porém, nem todos os fungos são produtores de micotoxinas. Em uma mesma espécie, há cepas produtoras e não produtoras de micotoxinas

(ROSSETTO et al., 2005). A ausência de sinais visíveis do crescimento fúngico não pode ser totalmente interpretada como ausência de toxinas, já que estas são capazes de permanecer no alimento, mesmo na ausência do fungo produtor (TANIWAKI e SILVA, 2001).

Existem centenas de micotoxinas detectadas produzidas por cerca de 350 espécies de fungos (SABINO, 2004), porém as mais estudadas e comumente encontradas em alimentos são: aflatoxinas e ácido ciclopiazônico, produzidas principalmente, por espécies de *Aspergillus*; fusariotoxinas, representadas pela zearalenona, fumonisinas, moniliforminas e tricotecenos, produzidas por *Fusarium* spp.; e ocratoxinas, produzidas por *Aspergillus alutaceus* (*A. ochraceus*) e várias espécies do gênero *Penicillium* (CLEVSTROM, 1986).

### 1.6.1 Aflatoxinas

O primeiro relato sobre a aflatoxina foi o de Stevens et al. em 1960, quando morreram aproximadamente 100.000 perus na Inglaterra, após a ingestão de torta de amendoim de origem brasileira, apresentando sintomas típicos de ingurgitamento e congestão renal com hemorragia ou necrose do fígado. O episódio foi atribuído a uma nova doença, denominada por Blount (1961) de “Turkey X Disease”. Outros farelos de amendoim provenientes do Quênia, Nigéria, Gâmbia na África Ocidental, Uganda e Índia também provocaram sintomas similares (CARNAGHAN e SARGEANT, 1961).

Em 1961, foi atribuído ao *Aspergillus flavus* a origem da “Turkey X Disease”, isolando-o das amostras analisadas e confirmando-o como fungo produtor da toxina, denominada agora aflatoxina, responsável pelas mortes dos perus (SARGEANT et al., 1961). Posteriormente verificou-se que o ácido ciclopiazônico, outra micotoxina produzida também por algumas cepas de *A. flavus*, também poderia estar envolvido com os sintomas já reportados sobre os perus (KOKALIS-BURELLE et al., 1997).

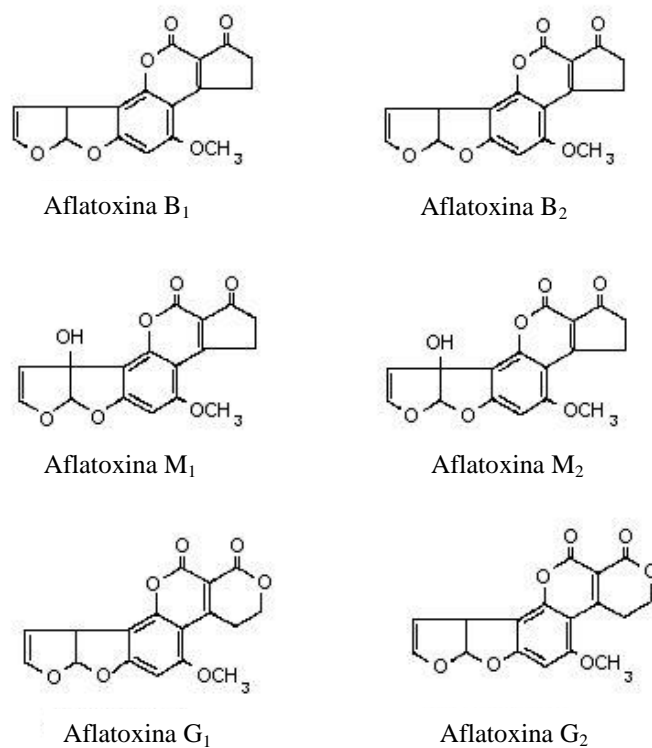
A primeira evidência do efeito carcinogênico da aflatoxinas foi reportada por Lancaster et al. (1961), que observaram o desenvolvimento de tumores malignos em ratos que ingeriram ração contaminada com a toxina em doses baixas, inferiores daquelas capazes de causar intoxicação aguda.

No Brasil, a primeira referência sobre a ocorrência de aflatoxinas parece ser a de Amaral (1961)<sup>1</sup> apud Moraes (1964), que atribuiu à administração de farelo de torta de amendoim a mortalidade observada em criações de suínos no Estado de São Paulo. A partir deste, diversos estudos envolvendo etiologia e pesquisa de micotoxinas vem sendo registrados no país.

De acordo com a FAO (2004) a contaminação de micotoxinas em alimentos é um problema mundial. Estima-se que cerca de 25% dos alimentos consumidos mundialmente apresentam significativa contaminação por micotoxinas. Além disso, o prejuízo econômico anual é de aproximadamente 1 bilhão de dólares, incluindo gastos com saúde humana, animal e produtos agrícolas condenados (CAST, 2003).

Quimicamente, as aflatoxinas apresentam um grupo de compostos heterocíclicos altamente oxigenados; sua estrutura consiste de um núcleo cumarínico fundido a um anel bifurano e mais um anel pentanona ou 6-lactona. As aflatoxinas B e M apresentam o anel pentanona, enquanto as aflatoxinas G possuem o anel 6-lactona (Figura 1) (APPLEBAUM et al., 1982). As aflatoxinas são compostos policetônicos resultantes da reação de condensação, por redução dos grupos cetônicos na biossíntese do ácido graxo realizado por *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*. Estes ácidos graxos são metabólitos primários de fonte de energia. As micotoxinas se formam no final da fase exponencial ou no início da fase estacionária de crescimento fúngico (CREPPY, 2002).

**Figura 1-** Estrutura química das aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>..



Fonte: <<http://www.food-info.net/uk/tox/afla.htm>>, disponível em 10 dez. 2011.

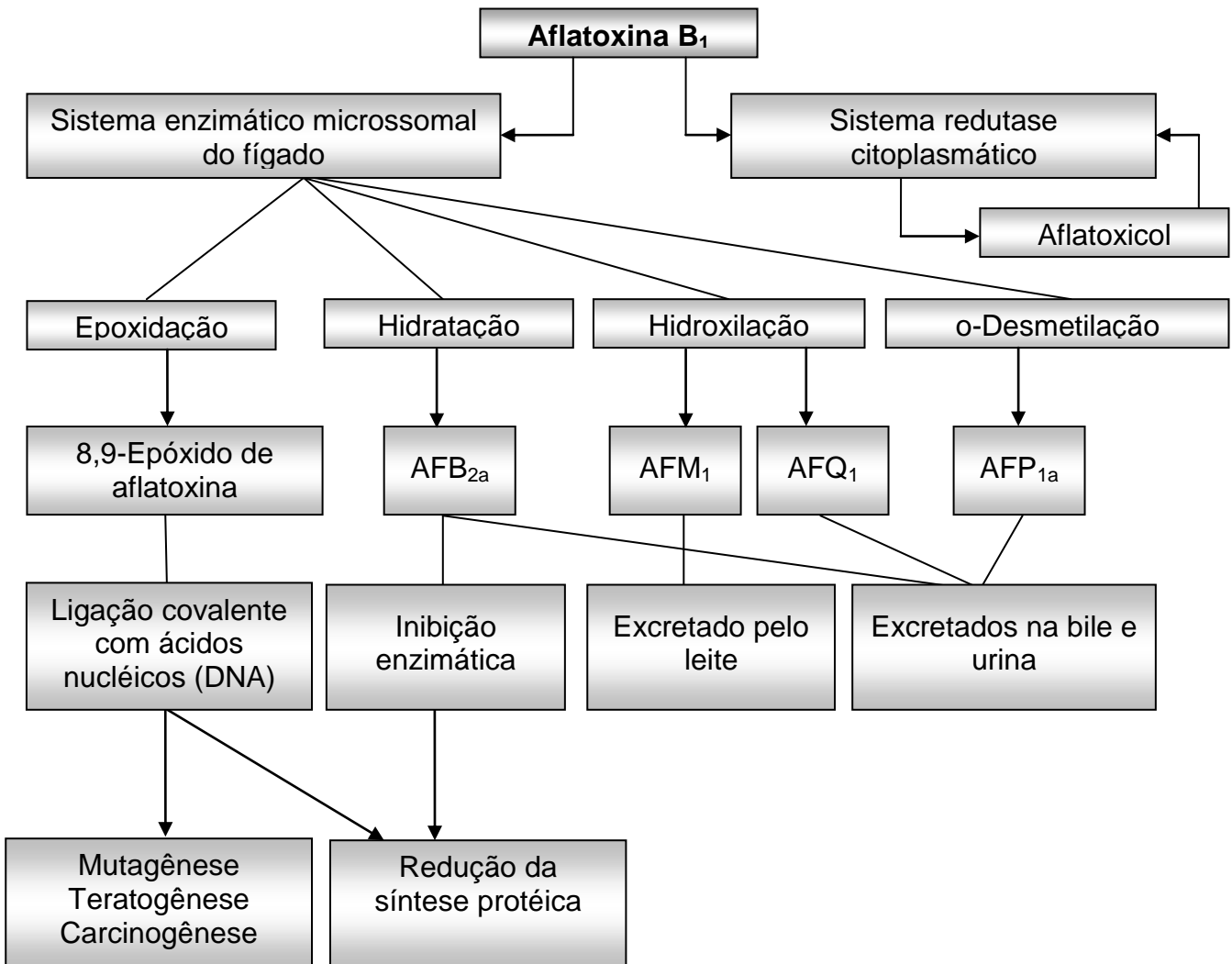
As aflatoxinas receberam essas denominações, B e G, devido suas características fluorescentes, “Blue” (azul) e “Green” (verde), quando expostas à radiação ultravioleta. A designação “M” origina-se de “milk toxin” por ser uma toxina excretada no leite (HARTLEY e O’KELLEY, 1963). As aflatoxinas são primariamente hepatotóxicas e podem causar injúrias no fígado, sendo AFB<sub>1</sub> considerada a mais tóxica, seguida da AFG<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub> e AFG<sub>2</sub> (BENNET e FERNHOLZ, 1978), além disso AFB<sub>1</sub> foi descrita como o mais potente agente hepatocarcinógeno em mamíferos (IARC, 1993).

Os efeitos toxicológicos das aflatoxinas ocorrem após a ativação metabólica de suas moléculas por enzimas hepáticas localizadas, sobretudo, no retículo endoplasmático liso (microsomas) e no citoplasma (HUSSEIN e BRASEL, 2001) e culminam em propriedades hepatotóxicas, teratogênicas e mutagênicas (SANTOS et al., 2001), podendo causar danos como hemorragias, edemas, imunossupressão e carcinoma hepático (SMITH e ROSS, 1991).

A biotransformação das aflatoxinas é promovida por enzimas e podem ser divididas em duas fases. Na primeira fase ocorrem reações de oxidação, redução e hidrólise, com o objetivo de tornar as moléculas mais hidrofílicas. Na segunda fase, os compostos produzidos são conjugados a substâncias endógenas (sulfato, glutathione, aminoácidos e grupos metil e acil), visando facilitar a excreção (Figura 2). O processo consiste em alterações moleculares reversíveis e irreversíveis. A detoxificação ocorre mediante reações irreversíveis, produzindo metabólitos hidroxilados, hidrossolúveis e menos tóxicos que os precursores como as aflatoxinas M<sub>1</sub>, Q<sub>1</sub>, P<sub>1</sub>, B<sub>2a</sub>. Já a detoxificação reversível é baseada na formação de aflatoxicol, que posteriormente retorna a forma de aflatoxina B<sub>1</sub> por intermédio de reações de oxidação. A principal reação de ativação da aflatoxina B<sub>1</sub> caracteriza-se pela epoxidação da molécula, formando 8,9-epóxido de aflatoxina, o qual possui propriedades de ligação covalente com ácidos nucleicos, refletindo em atividades mutagênicas, teratogênicas, carcinogênicas e diminuição de produção de proteínas. Essas reações ocorrem no sistema enzimático citocromo P-450, composto por enzimas responsáveis pelas reações de oxidação, especialmente epoxidação de ligações covalentes, importantes na ativação de xenobióticos (SMITH e ROSS, 1991).



**Figura 2-** Mecanismos de biotransformação da AFB<sub>1</sub>



Fonte: Dilkin e Mallman, 2004.

A exposição humana em relação à aflatoxina pode ocorrer através da ingestão de alimentos diretamente contaminados, principalmente por AFB<sub>1</sub>; ou também de outros produtos como leite e carne, originários de animais que consumiram ração contaminada (MOSS, 1989). Os sinais clínicos da aflatoxicose aguda poderão iniciar seis horas após a ingestão, refletindo em depressão, presença de sangue nas fezes, tremores musculares, incoordenação motora e hipertermia (até 41 °C), podendo culminar em morte entre as 12 e 24 horas seguintes (DILKIN e MALLMANN, 2004).

As aflatoxinas possuem baixo peso molecular, são lipossolúveis e bastantes solúveis em solventes moderadamente polares, como clorofórmio, metanol e dimetilsulfóxido; neste caso, são relativamente sensíveis à luz, particularmente à radiação ultravioleta. Quando secas, são estáveis em

temperaturas elevadas e o ponto de fusão da AFB<sub>1</sub> é de 269 °C, sendo destruídas por autoclavagem na presença de amônia e em tratamento com hipoclorito. Estas toxinas podem ser absorvidas pela pele, pulmão e trato gastrintestinal, e distribuídas para músculos, rins e tecido adiposo, concentrando-se no fígado (OMS, 1983).

Em geral, as aflatoxinas podem ser detectadas por diversos métodos analíticos, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a cromatografia em camada delgada (CCD), a cromatografia gasosa (CG) e ELISA (SCOTT, 1990).

As aflatoxinas são produzidas principalmente por cepas de *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* (PITT e HOCKING, 2009). A espécie *A. flavus* destaca-se como mais importante produtora de AF's, capaz de sintetizar as AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub>, já *A. parasiticus* e *A. nomius* são capazes de produzir AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> (SMITH e ROSS, 1991; PITT e HOCKING, 1999).

A temperatura e a atividade de água (Aa) mínimas necessárias para o crescimento destes fungos compreendem 6 a 45°C e 0,78 a 0,80, respectivamente. Para a produção de micotoxinas, a Aa mínima varia de 0,83 a 0,87 (LACEY et al., 1991) e as temperaturas mínima, ótima e máxima para a produção de aflatoxinas são 12, 27 e 40-42°C, respectivamente (OMS, 1983). Em cereais estocados, os fatores que facilitam o crescimento do gênero *Aspergillus* e a produção de aflatoxinas são umidade relativa do ar (80 a 85%) e do substrato (17%) e temperatura de armazenamento (24 a 35°C) (LEESON et al., 1995).

As aflatoxinas possuem afinidade por substratos oleaginosos, como amendoim, milho, sementes de algodão, centeio, sorgo, trigo, cevada, nozes, semente de girassol, aveia, arroz, castanha-do-brasil, pistache, avelãs, entre outros (PITT e HOCKING, 2009).

A ocorrência de aflatoxinas em castanhas-do-brasil tem sido confirmada por vários estudos (STEINER et al., 1992; MARKLINDER, 2005) e constitui um problema para a exportação da castanha-do-brasil, desde 1998, quando a União Européia restringiu os limites de tolerância de AF total e AFB<sub>1</sub> para 4 e 2 ng/g, respectivamente. Aliado a isto, a devolução de lotes de castanha-do-brasil por países importadores devido ao alto nível de contaminação (FAO, 1998) levou o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento a elaborar um programa de monitoramento da cadeia produtiva da castanha-do-brasil, visando prevenção e controle da contaminação, regulamentando os níveis de aflatoxinas permitidos na castanha-do-brasil.

O trabalho realizado por Castrillón e Purchio (1988a) avaliou a ocorrência de aflatoxina em amêndoas de castanha-do-brasil coletadas de usinas de beneficiamento, mercados e feiras-livres em

Manaus e de supermercados em São Paulo. Foram detectadas aflatoxinas em 3/115 amostras analisadas, com níveis de AFB<sub>1</sub> entre 0,1 a 2,25 mg/kg; e de AFG<sub>1</sub> entre 0,075 a 1,5 mg/kg.

Em 1992, Freire et al. pesquisaram diversos metabólitos de cepas de *Aspergillus flavus* isolados de amêndoas de castanha-do-brasil, e detectaram aflatoxinas em 3/15 amostras analisadas; com níveis de AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub> máximos de 27,1 e 2,1 µg/kg, respectivamente.

Estudo de Caldas et al. (2002) pesquisou a ocorrência de aflatoxinas em diversos alimentos, inclusive castanha-do-brasil. Os resultados demonstraram que 33,3% (3/9) das amostras de castanha-do-brasil analisadas estavam contaminadas por aflatoxinas.

Mello e Scussel (2007) apresentaram trabalho relacionando características visuais (tamanho, peso e cor) de amêndoas de castanha-do-brasil com possível deterioração e produção de aflatoxinas. Os autores observaram que somente as amêndoas classificadas como pequenas apresentaram contaminação por aflatoxina B<sub>1</sub> ao nível de 5,62 µg/kg. Já em 2009, Pacheco e Scussel, detectaram aflatoxinas em 68,75% (55/80) das amostras analisadas de castanha-do-brasil, com níveis de AFB<sub>1</sub> entre 1,2 e 11,5 µg/kg.

Johnsson et al. (2008) e Olsen et al. (2008) alertaram sobre a importância de *A. nomius* em amêndoas de castanha-do-brasil, definindo esta espécie fúngica como um importante produtor de aflatoxinas neste substrato.

Pacheco et al. (2010) detectaram aflatoxinas em 7,5% (9/120) das amostras de amêndoas de castanha-do-brasil coletadas da cidade de Manaus (AM, Brasil) entre 2003 e 2006. As aflatoxinas foram detectadas nas amostras oriundas da etapa de recepção e de comercialização, em concentrações que variaram de 8 a 686 µg/kg para aflatoxina total.

Gonzalez et. al. (2008b) pesquisaram a ocorrência de aflatoxinas também em amostras de cascas de amendoim em diferentes estágios de maturação, provenientes de Junqueirópolis (SP, Brasil). Das 25 amostras analisadas, 6 (24%) apresentaram contaminação por aflatoxinas, em concentrações que variaram de 5,42 a 218,52 µg/kg. A aflatoxina B<sub>1</sub> foi detectada em 100% das amostras contaminadas e as aflatoxinas B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> foram detectadas em 83,3%, 50% e 50%, respectivamente.

Recentemente, Vargas et al. (2011) determinaram a presença de aflatoxinas em cascas de castanhas-do-brasil, principalmente em frações visivelmente deterioradas.

### 1.6.2 Ácido ciclopiazônico

O ácido ciclopiazônico (ACP) foi isolado inicialmente a partir de *Penicillium cyclopium* (HOLZAPFEL, 1968) e somente posteriormente foi relacionado como um metabólito de *A. flavus* LINK (LUK, et al., 1977). Assim, os gêneros relacionados com a produção de ACP incluem: *Penicillium* e *Aspergillus*, especialmente *A. flavus*, *A. versicolor* e o *A. tamarii* (DORNER et al., 1984, TRUCKSESS et al., 1987; CAST, 2003).

O CPA é um inibidor específico da enzima  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase, e possui papel importante na indução de alterações no transporte de íons em membranas celulares. Quando consumido com alimentos, pode levar a quadro de degeneração e necrose hepática, lesões miocárdicas e efeitos neurotóxicos (RAO e HUSAIN, 1985) além de afetar os ductos e órgãos originados em ductos (FRISVAD et al., 2006).

Sinais clínicos da intoxicação por ACP incluem anorexia, diarreia, degeneração e necrose dos músculos e vísceras, desidratação, perda de peso e convulsões. Estes sintomas foram observados artificialmente em ratos, cães, suínos, ovelhas e aves (CULLEN et al., 1988; CAST, 2003). Efeitos neurotóxicos causados pelo ACP, como catalapsia e sedação, também foram descritos em suínos desmamados (LOMAX et al., 1984).

Estudos com espécies aflatoxigênicas e não aflatoxigênicas de *Aspergillus flavus* têm mostrado que existem cepas que podem produzir apenas AF's, apenas ACP, ambas ou nenhuma delas (GALLAGHER et al., 1978). Efeito sinérgico entre aflatoxinas e ácido ciclopiazônico em ratos e macacos também já foram descritos (SMITH et al., 1992; COLE, 1986; MORRISSEY et al., 1985; PÍER et al., 1989), entretanto seu papel na saúde humana ainda permanece obscuro (COLE, 1986).

Já foi constatada a presença de ACP em alguns alimentos, tais como milho, amendoim, queijo, carnes, semente de girassol, feno, tomate (LEBARS, 1979; GALLAGHER et al., 1978; LANSDEN e DAVIDSON, 1983; DUTTON e WESTLAKE, 1985; NORRED et al., 1987; TRUCKSESS et al., 1987; CHANG-YEN e BIDASEE, 1990; URANO et al., 1992b). Além disso, o ACP pode ser transferido para o leite e ovos após a administração oral em ovelhas lactantes e galinhas poedeiras (DORNER et al., 1994), tornando a ingestão desses subprodutos contaminados uma potencial fonte de exposição humana (OLIVEIRA et al., 2006).

Apesar da destacada importância desta micotoxina, estudos envolvendo ACP e castanhas-do-brasil são ausentes na literatura científica atual.

## 1.7 Fatores abióticos

O crescimento fúngico e a produção de micotoxinas são influenciados por vários fatores. A compreensão de cada fator envolvido é fundamental para o entendimento total do processo de contaminação, assim como para prever e prevenir a produção de micotoxinas (CHAMBERLAIN et al., 1993). As condições ambientais exercem importante impacto no crescimento fúngico e na produção de micotoxinas, que são geneticamente reguladas em função dessas condições (HOLLINGER e EKPERIGIN, 1999).

Os principais fatores que podem afetar o desenvolvimento fúngico em cereais são: conteúdo de umidade e atividade de água (Aa) dos grãos, umidade relativa do ar, temperatura, tempo de armazenamento, condições dos grãos na pré-colheita, quantidade de inóculo presente nos grãos no pré-armazenamento e oxigenação (WILSON et al., 1981).

### 1.7.1 Atividade de água

A água é, provavelmente, o fator mais determinante para o crescimento fúngico em produtos estocados. Embora outros fatores também sejam relevantes, a ausência de água impossibilita o crescimento fúngico (LACEY, 1988). A disponibilidade de água no substrato é importante para o desenvolvimento e seleção de microrganismos (LACEY, 1988; TROLLER et al., 1984).

Nem toda a água presente no substrato está disponível para a utilização pelo microrganismo, pois parte dela pode estar fortemente presa ao substrato por ligações químicas (LACEY, 1988). A determinação da Aa de um alimento possibilita a avaliação da água disponível aos microrganismos, e seus valores oscilam entre 0 e 1, sendo 1 o valor encontrado na água pura e 0 total ausência de água (TROLLER et al., 1984; JAY, 1994).

A atividade de água é um conceito físico-químico, introduzido por Scott (1957) ao demonstrar a relação da Aa nos alimentos e a habilidade dos microrganismos se desenvolverem neles. Assim, a Aa é um fator intrínseco de grande importância na conservação e no processo de deterioração de alimentos (PITT e HOCKING, 2009).

A Aa pode ser definida como a relação entre a pressão de vapor de água de um substrato e a pressão de vapor de água pura, nas mesmas condições, sendo expresso por:  $Aa = p / p_0$ , onde  $p$  é a pressão de vapor da solução, e  $p_0$  é a pressão de vapor do soluto (TROLLER et al., 1984).

Todos os fungos toxigênicos apresentam valores mínimo, ótimo e máximo para seu crescimento (JAY, 1994); e a maioria cresce em uma atividade de água de aproximadamente 0,85 (TANIWAKI e SILVA, 2001).

De acordo com Leitão (1988) e Lacey et al., (1991), a faixa de Aa ideal para o crescimento de *A. flavus* e *A. parasiticus* está entre 0,78 a 0,80 e 0,78 a 0,82, respectivamente. Para a produção de aflatoxinas, os níveis necessários de Aa estão entre 0,83 e 0,87 para o *A. flavus* e 0,87 para o *A. parasiticus*.

**Tabela 2-** Níveis mínimos de atividade de água necessários para o crescimento e produção de micotoxinas das principais espécies toxigênicas do gênero *Aspergillus*.

Fungos	Aa mínima		Micotoxinas produzidas
	Crescimento	Produção de micotoxinas	
<i>A. flavus</i>	0,78 – 0,80	0,83 – 0,87	Aflatoxinas
<i>A. parasiticus</i>	0,78 – 0,82	0,87	Aflatoxinas

Fonte: Lacey et al., 1991; Leitão, 1988.

A água livre que permite o desenvolvimento fúngico em grãos pode ser resultado de secagem inadequada no pré-armazenamento, deterioração dos grãos que pode aumentar a temperatura e consequente transporte de água durante sua atividade metabólica, absorção da umidade ambiental, dentre outros fatores (CHRISTENSEN e KAUFMANN, 1974).

### 1.7.2 Temperatura

A temperatura também é um fator importante para o crescimento fúngico em sementes. A maioria dos fungos capazes de infectar plantas podem se desenvolver a temperatura de 0 a 30 °C. Tanto o *A. flavus* como o *A. parasiticus* e *A. nomius* podem crescer entre 6 e 45 °C, com faixa ótima de crescimento a 35 °C para o *A. flavus* e 35 e 37 °C para o *A. parasiticus* (LACEY, 1988).

A contaminação e consequente produção de aflatoxinas em castanha-do-brasil por *Aspergillus* seção *Flavi* ainda permece oculta, mas especula-se que pode ocorrer em vários estágios da produção, no campo e no armazenamento, assim como observado em amendoim (DIENER et al., 1987). No

campo, a contaminação por aflatoxinas pode estar associada o estresse hídrico da planta sob condições de elevada temperatura (COLE et al., 1989). Após a colheita, prévio ao armazenamento, a contaminação pode ser evitada com uma pré-secagem do substrato, o que promoveria a diminuição da Aa (DIENER e DAVIS, 1970).

Entretanto, a castanha-do-brasil tem origem em região quente úmida e as safras coincidem com a época das chuvas, quando o grau de umidade se eleva a mais de 90% e a temperatura média anual pode alcançar 27 °C. Estes fatores associados poderiam favorecer a contaminação deste substrato por cepas de *Aspergillus* spp. (HUECK, 1972).

## **2 PROPOSIÇÕES E OBJETIVOS**



O Brasil é considerado o segundo exportador mundial de castanha-do-brasil, com produção concentrada na região Norte, especialmente no Estado do Amazonas. A amêndoa é um dos principais produtos extrativista do Estado, devido a sua importância econômica e social.

Além disso, existe relação direta entre os fungos encontrados no solo e nas plantas nele cultivadas. Assim, a presença de cepas de *Aspergillus* no solo aponta para contaminação do mesmo nas plantas. Na produção de castanha-do-brasil a análise do solo é crítica, pois a coleta dos ouriços advém somente após a sua queda. Este pressuposto incita questionamentos, como o grau de transferência da microbiota do solo para as castanhas-do-brasil, o tempo de exposição dos ouriços no solo necessário para a efetivação da contaminação da castanha-do-brasil por fungos, condições de armazenamento necessárias ao desenvolvimento fúngico e vias de contaminação da castanha-do-brasil a campo e armazenadas.

Apesar da importância econômica que representa a contaminação fúngica e por micotoxinas em castanha-do-brasil, poucos estudos científicos relacionados ao controle de qualidade neste substrato foram realizados. É imprescindível o conhecimento da contaminação fúngica e por micotoxinas em castanha-do-brasil, a fim de apontar possíveis vias de contaminação e medidas de controle micológico e micotoxicológico.

Baseado nestas informações pretendeu na presente investigação, como objetivo geral, monitorar, no campo e armazenamento, a produção de castanha-do-brasil, quanto à contaminação fúngica e produção de micotoxinas (aflatoxinas e ácido ciclopiazônico).

Os objetivos específicos incluem:

- Determinar a microbiota e a ocorrência de aflatoxinas e ácido ciclopiazônico em amostras de castanha-do-brasil, colhidas a campo, processadas e armazenadas;
- Correlacionar a microbiota das amostras de castanha-do-brasil com as do ar e do solo;
- Estabelecer a possível via de contaminação fúngica;
- Correlacionar os resultados obtidos com a atividade de água das amostras e os elementos climáticos na região de estudo, no período de desenvolvimento da pesquisa;
- Avaliar o potencial aflatoxigênico de cepas de *Aspergillus* seção *Flavi* isoladas;
- Determinar a concentração de selênio em castanhas-do-brasil.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

### 3.1 Local

As amostras foram provenientes da Agropecuária Aruanã, município de Itacoatiara, Estado do Amazonas, com 3°08' latitude sul, 58°26' longitude oeste e 26 m de altitude (Figura 3). A Agropecuária Aruanã possui uma área total de 12.000 hectares, com plantio de *Bertholletia excelsa* correspondente a 4.000 hec; estas destinadas à produção de mudas e árvores de castanhas-do-brasil.

**Figura 3-** Localização da Agropecuária Aruanã, município de Itacoatiara, Amazonas, Brasil.



Fonte: Disponível em: <<http://www.viagemdeferias.com/mapa/amazonas/>>, Acesso em: 10 dez. 2011.

### 3.1 Amostras

#### 3.1.1 Amostras coletadas a campo

Foi predeterminada uma área de plantio de *Bertholletia excelsa* que variou de 0,4 a 1,01 hectare, eleitas pelo critério de produção e queda dos ouriços, e altura dos castançais.

### 3.1.1.1 Diretamente da árvore

Foram coletados manualmente, com auxílio de funcionário treinado, e utilizando os equipamentos de proteção e segurança, 5 amostras antes da queda ao solo, isto é, diretamente das castanheiras, conforme Figura 4.

**Figura 4-** Coleta dos ouriços diretamente das castanheiras. Itacoatiara, AM, no período de fevereiro de 2008.



Fonte: Baquião (2012).

Desta forma, foram analisadas 5 amostras de castanha, 5 amostras da casca da castanha e 5 amostras de casca de ouriço por coleta.

Imediatamente após a coleta, as amostras foram processadas em ambiente laboratorial nas dependências da Fazenda Aruanã (Figura 5), objetivando a pesquisa de microbiota fúngica e isolamento.

**Figura 5-** Dependências laboratoriais na Fazenda Aruanã, Itacoatiara, AM, no período de fevereiro a março de 2008.



Fonte: Baquião (2012).

#### 3.2.1.2 Contato com solo

A área foi mantida sob avaliação durante 15 dias. Inicialmente, foram removidos todos os ouriços caídos na área selecionada. A partir daí, diariamente foi realizada vistoria nas áreas e os ouriços caídos foram isolados e identificados (Figura 6) para estabelecer o tempo de contato com o solo. Foi permitido que os ouriços entrassem em contato com o solo ao caírem naturalmente das árvores. De cada parcela amostral foram coletados ouriços, com tempo de contato com solo de 5, 10 e 15 dias, totalizando 15 amostras. Desta forma, foram analisadas 15 amostras de castanha, 15 amostras da casca da castanha e 15 amostras da casca do ouriço.

**Figura 6-** Ouriço isolado e identificado conforme a data da queda. Itacoatiara, AM, no período de fevereiro de 2008



Fonte: Baquião, 2012.

Imediatamente após a coleta, as amostras foram analisadas em ambiente laboratorial nas dependências da Fazenda Aruanã, objetivando a pesquisa de micobiota e isolamento fúngico.

#### 3.1.1.2 Solo

As amostras de solo foram processadas de acordo com DELP et al. (1986). Cinco amostras foram coletadas no dia 0, 5, 10 e 15, sendo analisadas um total de 20 amostras. As amostras foram obtidas superficialmente do solo (0-2 cm de profundidade) ao redor de cada castanheira (figura 7), e foram homogêneas e submetidas à pesquisa de micobiota fúngica. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

**Figura 7-** Coleta de amostras de solo, Itacoatiara, AM, no período de fevereiro de 2008.



Fonte: Baquião, 2012.

### 3.1.1.3 Ar

Foram realizados 5 coletas de amostras de ar em meio Ágar Sabouraud-dextrose em aparelho Miilipore (Figura 8), com intuito de isolamento de fungos do ar. As amostras foram coletadas na região da plantação das castanheiras, nos mesmos momentos de coleta dos ouriços (Dia 0, 5, 10 e 15), perfazendo um total 20 de análises.

**Figura 8-** Coleta de amostra de ar. Itacoatiara, AM, no período de fevereiro de 2008.



Fonte: Baquião, 2012.

### 3.1.2 Amostras coletadas durante o armazenamento

#### 3.2.2.1 Processamento prévio

Os ouriços, depois de coletados, foram encaminhados à indústria da Fazenda Aruanã, onde foram submetidos à lavagem externa a jato com solução de hipoclorito de sódio 0,4% (Figura 9), visando diminuição da carga microbiana.

**Figura 9-** Higienização dos ouriços. Itacoatiara, Amazonas, no período de março de 2008.



Fonte: Baquião, 2012.

As castanhas foram removidas dos ouriços e submetidas à secagem em forno rotatório a lenha (Figura 10), com temperatura constante de 45 °C por 30 horas, visando reduzir o teor de umidade das amostras de 28% até alcançar 9%.

**Figura 10-** Forno rotatório. Itacoatiara, AM, no período de fevereiro de 2008.



Fonte: Baquião, 2012.

Após secagem as amostras foram triadas e classificadas de acordo com o tamanho em mesa de sedimentação e separação (Figura 11).



**Figura 11-** Mesa de separação das castanhas por tamanho. Itacoatiara, AM, no período de fevereiro de 2008.



Fonte: Baquião, 2012.

#### 3.2.2.2 Castanhas em casca armazenadas

As castanhas foram acondicionadas em sacas de nylon de 27 kg, empilhadas sobre estrados de madeira e armazenadas em galpão com condições de aeração, por período de 11 meses (Figura 12). Mensalmente foram retiradas amostras de múltiplos pontos de cada saca, até completar total de 1.000 g. As amostras foram enviadas ao Laboratório de Micotoxinas da Universidade de São Paulo via correio, imediatamente após a coleta das mesmas, do mês de setembro de 2008 a julho de 2009. Foram coletadas 5 amostras a cada mês, sendo utilizadas 55 amostras de castanha-do-brasil e 55 de casca de castanha, totalizando 110 amostras.

**Figura 12-** Sacarias contendo castanha-do-brasil em casca em galpão. Itacoatiara, AM, no período de setembro de 2008 a julho de 2009.



Fonte: Baquião, 2012.

### **3.3 Análise da composição química do solo**

As análises químicas do solo, para a determinação de fósforo, nitrogênio, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, boro, cobre, ferro, manganês e zinco, foram realizadas para caracterização físico-química do solo, sendo coletadas alíquotas em 3 profundidades (0-10 cm, 11-20 cm e 21-30 cm), que após homogeneização, foram analisadas pelo Laboratório de Análise de Solos e Plantas- LASP, da EMBRAPA Amazônia Ocidental, Manaus, Amazonas.

### **3.4 Determinação da atividade de água**

A atividade de água das amostras de solo e de castanha-do-brasil foi determinada por aparelho AQUALAB CX-2 (Decagon Devices Inc).

### 3.5 Isolamento de micobiota

#### 3.5.1 Meios de Cultura

##### 3.5.1.1 Ágar Batata Dextrose

O meio de cultura foi dissolvido em água fervente conforme orientação prévia do fabricante, adicionado cloranfenicol (100µg/mL) e corrigido para pH 5,6. Em seguida o meio foi autoclavado a 121 °C por 15 minutos, e distribuídos em placas de Petri e tubos de ensaio. Este meio se destinou ao isolamento, identificação e manutenção das cepas fúngicas isoladas.

##### 3.5.1.2 Ágar Saboraand

O meio de cultura foi dissolvido em água fervente, conforme orientação prévia do fabricante, adicionado cloranfenicol (100µg/mL) e então autoclavado a 121 °C por 15 minutos, corrigido para pH 5,6 e distribuído em placas de Petri destinadas ao Aparelho Monitor de ar (T-air, Millipore). Este meio foi utilizado para pesquisa de fungos do ar.

##### 3.5.1.3 Meio Martim

Meio utilizado para isolamento e contagem de fungos do solo (MARTIM, 1950).

#### **Composição:**

Dextrose.....	10 g
Peptona (OXOID).....	5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1 g
MgSO <sub>4</sub> .....	0,5 g
Rosa Bengala.....	0,0034 g
Ágar ágar (OXOID).....	20 g
Estreptomicina.....	0,044 g
Água Destilada q.s.p. ....	1000 mL

Foram dissolvidos todos os componentes em água fervente, autoclavados e distribuídos em placas de Petri.

#### 3.5.1.4 Meio Ágar *Aspergillus flavus*- *parasiticus* (AFPA)

Meio de cultura seletivo utilizado para isolamento de cepas de *Aspergillus* seção *Flavi* nas amostras de ouriço, casca e amêndoa de castanhas-do-brasil (PITT et al., 1979).

##### **Composição:**

Dextrose.....	10 g
Peptona.....	5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1 g
MgSO <sub>4</sub> .....	0,5 g
Rosa Bengala.....	0,0034 g
Ágar ágar (OXOID).....	20 g
Estreptomicina.....	0,044 g
Água Destilada q.s.p.....	1000 mL

Com a finalidade de isolamento e contagem da microbiota das amostras de castanha-do-brasil foram utilizados os meios Ágar *Aspergillus flavus*- *A. parasiticus* (AFPA-OXOID) e Ágar Batata Dextrose (PDA-OXOID). Na etapa de manutenção e identificação de cepas fúngicas isoladas foi utilizado o meio Ágar Batata Dextrose (PDA- OXOID).

#### 3.5.1.5 Ágar Extrato de Levedura- Sacarose (YES)

Meio utilizado para cultivo de cepas de *Aspergillus* seção *Flavi* com a finalidade de extração de DNA genômico.

### Composição

Extrato de levedura (OXOID).....	10g
Sacarose.....	75g
Ágar ágar (OXOID).....	10g
Água destilada q.s.p.....	500 mL

Os componentes foram dissolvidos em água fervente e em seguida o meio foi submetido à autoclavação a 121 °C por 15 minutos, e então distribuídos em placas de Petri estéreis.

#### 3.5.1.6 Ágar coco

Foi utilizado ágar coco para avaliação do potencial aflatoxigênico de cepas de *Aspergillus* seção *Flavi* (LIN e DIANESE, 1976).

### Composição

Leite de côco.....	200 mL
Ágar ágar (OXOID).....	18g
Água destilada q.s.p.....	600 mL

Todos os componentes foram homogeneizados em água fervente e em seguida o meio foi autoclavado a 121 °C por 15 minutos e distribuído em placas de Petri estéreis.

#### 3.5.2 Micobiota das amostras de castanha-do-brasil

A técnica eleita para isolamento fúngico das amostras de castanha-do-brasil foi a da semeadura em superfície (PITT E HOCKING, 2009)

Dez gramas de cada amostra de castanha-do-brasil (amêndoa, casca e ouriço) foram triturados mecanicamente e diluídos em 90 mL de água destilada estéril (diluição  $10^{-1}$ ). A partir desta, foram realizadas diluições decimais sucessivas até  $10^{-4}$ , e foram inoculados 0,1 mL de cada amostra diluída em meios de cultura ágar AFPA e PDA acrescidos de cloranfenicol. As culturas foram incubadas a temperatura de 25 °C durante até 15 dias, para então, ser procedida a contagem de colônias. Convém

ressaltar que foi realizada a correção do valor fúngico final pelo fator de diluição, a fim de obtenção do número de unidades formadoras de colônia por grama de substrato (UFC/g) (BUSTA et al., 1984). Todas as análises foram realizadas em duplicata.

### 3.5.3 Micobiota de solo

Dez gramas de cada amostra de solo foram diluídas em 90 mL de solução salina 0,85 % estéril, obtendo-se a diluição  $10^{-1}$ . A partir desta, foram realizadas diluições decimais sucessivas até  $10^{-5}$ , empregando-se o mesmo diluente. Após homogeneização, foi depositado 0,1 mL de cada diluição em meio Martin solidificado (SWANSON et al., 1982). As placas foram incubadas a 25 °C por até 10 dias. Todas as análises foram processadas em duplicata.

Após o período de incubação foi realizada a verificação das colônias e posterior correção pelo fator de diluição, obtendo-se assim o número de unidades formadoras de colônias por grama do substrato (BUSTA et al., 1984).

### 3.5.4 Fungos do ar

Foram realizadas amostragens de fungos do ar, por intermédio do Aparelho Monitor de ar (Millipore). Este método está baseado na quantificação da sedimentação, por filtro de ar, dos esporos fúngicos anemófilos em placas de Petri contendo Ágar Sabouraud Dextrose, no interior do aparelho. Após exposição por 10 minutos, as placas foram fechadas e incubadas a temperatura 25 °C por até cinco dias (GAMBALE et al., 1983).

Após o período de incubação foi realizada a verificação das colônias, obtendo-se assim o número de unidades formadoras de colônias por  $m^3$  de ar.

### 3.5.5 Identificação fúngica

Todas as colônias de fungos filamentosos isoladas em todos os substratos analisados foram identificadas de acordo com abordagem polifásica.

### 3.5.5.1 Técnica de Microcultivo

No interior de placa de Petri forrada com papel filtro, foi disposta uma lâmina de vidro sobre bastão de vidro em “U”. Este conjunto foi esterelizado em autoclave a 121 °C por 15 minutos. Uma parte de 1 cm X 1 cm de meio PDA foi assepticamente depositada sobre a lâmina. Com auxílio de alça de platina em “L”, os fungos foram semeados pelos lados do ágar e o papel filtro molhado com água esterelizada, a fim de permitir o crescimento fúngico e fixação dos órgãos vegetativos e de frutificação. Este material, protegido pela placa de Petri, foi incubado em estufa a 25 °C, até que o crescimento fúngico fosse considerado satisfatório. Após este, lâmina e lamínula foram coradas por solução de lactofenol-azul-algodão, para posterior observação microscópica (RIDELL, 1950).

Os fungos foram classificados em nível de gênero. Entretanto, aqueles pertencentes aos gêneros *Aspergillus* foram classificados até espécie, de acordo com os compêndios de Raper e Fennel (1965), Barron (1972), Arx (1974), Kozakiewicz (1989) e Pitt e Hocking (2009).

### 3.5.5.2 Produção de ácido aspergílico

Para auxiliar no processo discriminatório entre cepas de *A. parasiticus* e *A. nomius* (produtoras das toxinas B's e G's), no confirmatório de *A. flavus* não-aflatoxigênicos, foram realizados cultivos em meio AFPA, e observado reação colorimétrica alaranjada no verso da placa. Esta reação ocorre somente em cepas de *A. flavus* e *A. parasiticus*, os quais produzem moléculas de ácido aspergílico que reagem com íons férricos do citrato férrico presente na composição do meio (PITT et al., 1983).

### 3.5.5.3 Identificação molecular

A confirmação da identidade fúngica de cepas de *Aspergillus* seção *Flavi* foi realizada por sequenciamento genômico, sendo esta técnica indicada na pesquisa genotípica de cepas fúngicas (ABDOLLAHI e BUCHANAN, 1981; DEGOLA et al., 2007).

### 3.5.5.3.1 Extração do DNA genômico das cepas de *Aspergillus* seção *Flavi*

O DNA foi extraído diretamente da colônia fúngica, utilizando “kit” PrepMan Ultra® Sample Preparation Reagent (Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA). Os isolados foram inoculados em meio sólido YES e incubados a 30 °C por até 3 dias em ambiente escuro. O DNA foi extraído a partir de culturas jovens, para minimizar possíveis inibidores da PCR, como os pigmentos fúngicos. O micélio foi obtido cortando aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup> do meio de cultura inoculado e removendo todo ágar contido na amostra. Em seguida, o micélio foi transferido para tubo de polipropileno de capacidade de 2,5 mL, contendo 300 µL de solução PrepMan Ultra®. A extração do DNA seguiu o protocolo recomendado pelo fabricante, que consiste em homogeneização em vórtex, incubação a 100 °C durante 15 minutos, centrifugação a 1400 rpm (rotação por minuto) por 7 minutos, e transferência de 200 µL para microtubos de 2,5 mL.

### 3.5.5.3.2 Quantificação do DNA extraído e pureza das amostras

A quantificação do DNA extraído foi realizada em aparelho GeneQuant<sup>pro</sup> calculator (Amersham Pharmacia Biotech AB, Cambridge, Inglaterra). Um microlitro da solução de DNA diluída (98:2, água:DNA) foi inserida no leitor do aparelho e mensurado os valores de comprimento de onda a 260 nm e 280 nm, para cálculos de pureza e concentração de DNA. A razão entre as leituras da densidade óptica a 260/280 nm permitiu estimativa da pureza de DNA. Foi estabelecido que somente as amostras com valores de pureza igual ou superiores a 1,6 fossem consideradas aceitáveis; razão abaixo deste valor indicou presença de contaminantes e proteínas, devendo as amostras ser novamente extraídas. Além disso, foi realizada a correção da concentração de DNA, sendo definida em 40 ng/mL.

### 3.5.5.3.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR) e eletroforese dos produtos da PCR

Um fragmento da região ITS do rDNA foi amplificado com os iniciadores ITS1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG 3') e ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT3') (WHITE et al., 1990). O “mix” da PCR (25 µL) continha 12.5 µL 2X PCR Master Mix (Promega, San Luis Obispo, CA, USA), 6.5 µL de água ultra pura, 2 µL de DNA (40 ng) e 2 µL (20 pmol) de cada iniciador (Prodimol Biotecnologia, Minas Gerais, Brasil). As condições de amplificação consistiram na denaturação inicial



a 94 °C por 3 minutos (min.), seguida de 40 ciclos de denaturação a 94 °C por 1 min., pareamento dos iniciadores com DNA alvo a 57 °C por 1 min., e extensão final a 72 °C por 1 min.. Um passo de extensão final a 72 °C por 5 min. foi incluído ao final da amplificação. Foi utilizado termociclador (GeneAmp PCR system 9700, Applied Biosystem, Califórnia, EUA).

Os produtos amplificados pela reação de PCR (3 µL) foram separados em gel de agarose 1,2 %, acrescido de Sybr Safe (0,01%) em tampão TAE (Tris-ácido acético glacial-EDTA, pH=8) a 100 mV. Para visualização e fotodocumentação, o gel foi exposto à luz ultravioleta. O marcador de peso molecular foi de 100 pb (pares de base) DNA Ladder (Invitrogen®).

#### 3.5.5.3.4 Purificação dos produtos amplificados

A purificação da solução visa eliminação de resíduos e aumenta a qualidade das sequências produzidas.

Os produtos amplificados foram purificados baseados em instruções do “kit” QIAQuick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha). Resumidamente, os amplificados foram homogenizados com 100 µL do tampão PB (Tampão de ligação) e transferidos para coluna de purificação acoplada a um tubo coletor. Após centrifugação a 1300 rpm por 1 minuto, a solução contida no tubo coletor foi descartada e 700 µL de tampão PE (tampão de ligação) foi acrescido a coluna de filtração e esta, centrifugada a 1300 rpm por 3 minutos. O tubo coletor e a solução nele contida foram descartados, e o filtro foi acoplado em tubo de polipropileno de capacidade de 2,5 mL e então, 20 µL do tampão de eluição foi adicionado. A amostra foi incubada em temperatura ambiente durante 1 minuto, sendo centrifugada a 1300 rpm por 1 minuto. O filtro foi descartado, e o DNA purificado foi recuperado no tubo, sendo armazenado -20 °C até a realização do sequenciamento (GILGADO et al., 2005)

#### 3.5.5.3.5 Quantificação do DNA purificado e pureza das amostras

A quantificação dos purificados seguiu conforme descrito item 3.5.5.4.2, sendo considerada a concentração de DNA satisfatória entre 40 e 60 ng/mL.

### 3.5.5.3.6 Sequenciamento dos produtos amplificados

Os produtos amplificados purificados foram seqüenciados bidimensionalmente de acordo com o proposto pelo “kit” do protocolo Big-Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Gouda, Holanda). Os iniciadores utilizados na reação de sequenciamento foram os mesmos utilizados na reação de amplificação. A reação de sequenciamento foi realizada em placa de 96 poços, cada um contendo um produto de PCR purificado e diluído e “mix” preparado especificamente para cada iniciador. Foram preparadas 2 soluções de “mix” contendo para cada amostra 3 µL do tampão, 1 µL do Big Dye, 5 µL de DNA/água (entre 40 e 60 ng/mL) e 1 µL do iniciador ITS1 (3,2 pmol) para um mix e 1 µL do iniciador ITS4 (3,2 pmol) para o outro mix; totalizando 10 µL de volume final. A reação de sequenciamento obedeceu ao seguinte programa: 35 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 55 °C por 20 segundos e 60 °C por 1 minuto e meio, em termociclador (GeneAmp PCR system 9700, Applied Biosystem, Califórnia, EUA) .

### 3.5.5.3.7 Precipitação da reação de sequenciamento

Após o sequenciamento, os produtos da reação foram precipitados com a finalidade de eliminação de sais, iniciadores e dNTPs e ddNTPs (didesoxiribonucleotídeos) não incorporados. O método de precipitação estabelecido foi o protocolo isopropanol e etanol. Resumidamente, foram adicionados em cada poço da placa contendo as amostras sequenciadas 40 µL de isopropanol 65 %. A placa então foi incubada a temperatura ambiente no escuro por 15 minutos, e então centrifugada a 3000 rpm por 30 minutos. A precipitação das moléculas de DNA ocorreu nesta etapa. Após a centrifugação, a solução foi então descartada e acrescida de 150 µL de etanol 70 %; sendo centrifugada a 3800 rpm por 10 minutos. Após esta etapa a solução foi novamente descartada por inversão da placa e o excesso removido por evaporação a 95 °C.

Após a precipitação, os fragmentos foram submetidos à etapa de denaturação. Foi adicionado em cada poço da placa 15 µL de formamida *HiDi* (Applied Biosystem, Gouda, Holanda). A placa foi vedada com tampa específica para separação eletroforética em capilar, homogeneizada por 20 segundos e incubada a 94 °C por 3 minutos, seguida de choque térmico a temperatura de 0 °C por 1 minuto.

### 3.5.5.3.8 Sequenciamento de DNA e análise dos resultados

Para a análise dos resultados, as amostras foram submetidas a sequenciador modelo *ABI Prism 310 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems), que utiliza poliacrilamida *POP6* (Applied Biosystems, Gouda, Holanda) e tampão TBE 1X (Tris-Borato-EDTA) durante 30 minutos a 54 °C e 1300 volts, com laser na potência de 25%.

Sequências consenso foram obtidas usando o programa AutoAssembler (PerkinElmer-Applied Biosystems) e software SeqMan (Lasergene, Madison, Wisconsin). As sequências utilizadas foram pesquisadas no BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) (ALTSCHUL et al., 1990) de forma a confirmar identificações das espécies entre as sequências geradas e as sequências do banco de dados.

## 3.6 Dados climatológicos

Durante o período de armazenamento (11 meses), os dados climatológicos referentes à temperatura (°C), umidade relativa do ambiente (%) e precipitação fluvial (mm) foram obtidos de fontes de Estação Climática Principal de Itacoatiara/AM e decidadas pelo CPTe/INPE. Os resultados foram analisados objetivando avaliar a correlação entre variações dos elementos climáticos, a quantidade de fungos isolados e a produção de micotoxinas.

## 3.7 Determinação de micotoxinas

### 3.7.1 Potencial aflatoxigênico das cepas de *Aspergillus* seção *Flavi*

#### 3.7.1.1 Extração de aflatoxinas para realização de potencial aflatoxigênico

Um fragmento de cada colônia de *Aspergillus* seção *Flavi*, previamente isolado foi inoculado em meio ágar coco e incubado a temperatura de 25 °C por 15 dias (LIN e DIANESE, 1976). Após este período, o conjunto cultura e ágar foram pesados e o ágar foi transferido para Erlenmeyer de capacidade de 500 mL e foi adicionado clorofórmio na proporção de 10 g do cultivo para 30 mL de clorofórmio e submetido a agitador mecânico horizontal durante 30 minutos. O homogeneizado foi filtrado em papel

de filtro contendo sulfato de sódio anidro e terra diatomácea e o filtrado foi evaporado até resíduo e armazenado a -4°C até a realização de cromatografia.

#### 3.7.1.2 Avaliação qualitativa do potencial aflatoxigênico

A avaliação qualitativa do potencial aflatoxigênico por cepas de *Aspergillus* spp. isoladas foi realizada por CCD.

Cada extrato extraído foi ressuspendido em 500 µL de clorofórmio, e imediatamente aplicada 10 µL na cromatofolha (“TLC sílica gel 60”, Merck), com auxílio de micro-seringa. As cromatofolhas de sílica foram demarcadas com pontos de aplicação localizados 2 cm da base inferior, onde foram aplicadas as amostras com intervalos de 1 cm entre elas, bem como solução padrão das aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>. O diâmetro da aplicação das amostras foi sempre o menor possível a fim de evitar dispersão da toxina. Foi delimitada uma linha superior de 12 cm da base da placa, por meio de traço forte, para delimitar a fase móvel. A placa foi eluída unidimensionalmente com a utilização de 100 mL de fase-móvel composta de solução saturada de clorofórmio:acetona (9:1), no interior de cuba cromatográfica com tampa de vidro. Após a separação, as cromatofolhas foram submetidas à luz ultravioleta com comprimento de onda de 366 nm (TARIN et al., 2004), comparando as revelações das amostras com as do padrão de referência (Rf) (SOARES e RODRIGUES-AMAYA, 1989). As amostras que revelaram fluorescência de coloração verde indicaram a produção de aflatoxinas G’s, e as que revelaram fluorescência azul, produção de aflatoxinas B’s.

#### 3.7.1.3 Avaliação quantitativa do potencial aflatoxigênico

A avaliação quantitativa do potencial aflatoxigênico das cepas de *Aspergillus* spp. isoladas foi realizada por CLAE de acordo com Lebret et al. (2004) e Tanaka et al. (2000) com modificações.

Cada amostra extraída foi ressuspendida em 2 mL de clorofórmio, e 100 µL desta solução foi transferida para frasco âmbar e seca até resíduo. A partir daí, a amostra foi ressuspedida em 3 mL de solução de acetonitrila:água (85:15), agitada em vórtex durante 1 minuto e então diluída em 27 mL de água acidificada (0,5 % ácido acético glacial) e novamente agitada. A partir desta solução foi realizada a extração em fase sólida, utilizando cartucho de sílica Strata C18-E 500 mg/3 mL, previamente condicionado por 3 mL de metanol grau HPLC e 6 mL de água acidificada 0,5 %. Esta solução foi

submetida completamente a fluxo de 1 gota/segundo, com auxílio de bomba a vácuo. Após esta etapa, os cartuchos sofreram etapa de “clean up” (limpeza) com a adição de 12 mL de água acidificada e a extração das aflatoxinas com eluição final em 1 mL de metanol grau CLAE. As amostras foram submetidas à secagem a resíduo, derivatizadas com 200 µL de hexano e 100 µL de TFA (ácido trifluoracético), e mantidas a 40 °C por 15 minutos, após este as amostras foram secas a resíduo e ressuspendidas em 2000 µL de solução metanol:água (1:1, v/v). Volume entre 1 e 50 µL da solução (dependendo da concentração da toxina) foi injetada no cromatógrafo líquido e as aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> presentes no extrato foram quantificadas, tendo como fase móvel água:acetonitrila:metanol (8:1,5:1,5 v/v/v) 0,1% TFA, fluxo de 1mL/min, e detector de fluorescência (365 nm de excitação e 450 nm de emissão).

### 3.7.2 Determinação de aflatoxinas nas amostras de castanha-do-brasil

A determinação de aflatoxinas nas amostras de castanha-do-brasil foi realizada por CLAE de acordo com Lebret et al. (2004) e Tanaka et al. (2000) com modificações. Para este fim, foi utilizado o cromatógrafo líquido modelo Prominence da marca Shimadzu, modelo LC 20, módulo CBM 20A, detector de fluorescência RF 10 AXL marca Shimadzu e loop fixo com capacidade de 20 µl, e injetor automático de 1 a 100 µl acoplado a coluna analítica (Shimadzu, Shin-Pak VP ODS 150 x 4,6 mm). Para análise dos resultados foi utilizado o programa LC Solution, Shimadzu.

#### 3.7.2.1 Amêndoas

Total de 25 gramas de cada amostra de amêndoa foi homogeneizada e triturada. Alíquota de 2,5 g de cada amostra foi separada, então, adicionada 12,5 mL de solução acetonitrila:água (85:15 v/v) e submetida a vórtex e, posteriormente, a agitador mecânico horizontal durante 60 minutos. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 rpm durante 3 minutos. Cinco mililitros do sobrenadante foram, então, transferidos para tubo de polipropileno de capacidade de 50 mL e adicionado de 45 ml de água acidificada e agitado vigorosamente. A partir desta solução foi realizada a extração em fase sólida, utilizando cartucho de sílica Strata C18-E 500 mg/3 mL, previamente condicionado por 3 mL de metanol grau CLAE e 6 mL de água acidificada. Esta solução foi submetida completamente a fluxo de 1 gota/segundo, com auxílio de bomba a vácuo. Após esta etapa, os cartuchos sofreram etapa de “clean

up” (limpeza) com a adição de 12 mL de água acidificada 0,5 % e, extração das aflatoxinas com eluição final em 1 mL de metanol grau CLAE. As amostras foram secas, derivatizadas, submetidas à nova secagem a resíduo e ressuspendidas em 400 µL de solução metanol:água (1:1, v/v).

Quarenta microlitos da solução foram injetados em cromatógrafo líquido Shimadzu Prominence (Kyoto, Japan) equipado com detector de fluorescência RF 10 AXL com comprimentos de onda de excitação, 365 nm; e de emissão: 450 nm e sistema de injeção automática. A coluna analítica (Shimadzu, Shim-Pack VP ODS, 150 x 4.6 mm) estava acoplada em cartucho de pré-coluna (Shim-Pack GVP-ODS, 10 mm x 4.6 mm) mantida a 40 °C em forno. A fase móvel isocrática consistia de solução de água:acetonitrila:methanol (8:1,5:1,5 v/v/v) 0,1 % TFA, fluxo de 1 mL/min.

### 3.7.2.2 Cascas e Ouriços

Total de 25 gramas de cada amostra foi homogeneizada e triturada. Alíquota de 5 g de cada foi separada, então, adicionada 12,5 mL de solução acetonitrila:água (85:15 v/v), submetida a vórtex e posteriormente a agitador mecânico horizontal durante 60 minutos. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 rpm durante 3 minutos. Dois e meio mililitros do sobrenadante foi, então, transferido para tubo de polipropileno de capacidade de 50 mL e adicionado de 47,5 ml de água acidificada e agitado vigorosamente. A partir desta solução foi realizada a extração em fase sólida, utilizando cartucho de sílica Strata C18-E 500 mg/3 mL, previamente condicionado por 3 mL de metanol grau CLAE e 6 mL de água acidificada. Esta solução foi submetida completamente a fluxo de 1 gota/segundo, com auxílio de bomba a vácuo. Após esta etapa, os cartuchos sofreram etapa de “clean up” com a adição de 12 mL de água acidificada e extração das aflatoxinas com eluição final em 1 mL de metanol grau CLAE. As amostras foram submetidas à secagem a resíduo, derivatizadas, secadas novamente e ressuspendidas em 400 µL de solução metanol:água (1:1, v/v).

Vinte microlitos da solução foram injetadas no cromatógrafo líquido Shimadzu Prominence (Kyoto, Japan) equipado com detector de fluorescência RF 10 AXL com comprimentos de onda de excitação, 365 nm; e de emissão: 450 nm e sistema de injeção automática. A coluna analítica (Shimadzu, Shim-Pack VP ODS, 150 x 4.6 mm) estava acoplada em cartucho de pré-coluna (Shim-Pack GVP-ODS, 10 mm x 4.6 mm) mantida a 40 °C em forno. A fase móvel isocrática consistia de solução de água:acetonitrila:methanol (8:1,5:1,5 v/v/v) 0,1 % TFA, fluxo de 1 mL/min.

### 3.7.3 Determinação de ácido ciclopiazônico nas amostras de castanha-do-brasil

A determinação de ACP nas amostras de castanha-do-brasil (ouriço, casca e amêndoa) foi baseada em Urano et al. (1992a).

Vinte e cinco gramas de cada amostra, previamente homogeneizada e triturada, foram aliqüotadas em 2,5 g e transferidas tubo de polipropileno com capacidade para 25 mL e acrescidos de 20 mL de solução de metanol:bicarbonato de sódio 2 % em água (7:3). Após agitação por 45 minutos em agitador mecânico horizontal, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 3 minutos. Oito mililitros do sobrenadante foram transferidos para funil de separação e adicionados de 10 mL de hexano. Em seguida, foi recolhida a fase inferior e acrescida de 8 mL de KCl 10%. A solução foi acidificada com HCl 6N até obtenção de pH=3. Foram então, realizadas duas partições com 10 mL de clorofórmio, visando concentração da amostra. Os extratos foram submetidos à secagem e ressuspensos em 1.000 µL de metanol grau CLAE e injetados em cromatógrafo líquido Shimadzu Prominence HPLC system equipado com detector UV-Vis (ultravioleta visível) Shimadzu SPD-10A com comprimento de onda a 282 nm, em sistema de injeção automática e coluna Luna C-8 (4.6 x 250 mm, 5-µm de tamanho de partícula; Phenomenex, Torrance, CA, USA) mantido a 40 °C em forno. A fase móvel isocrática consistiu de 4 mM de ZnSO<sub>4</sub> em solução de metanol:água (6:4, v/v) e foi eluída a um fluxo constante de 1 mL/min.

### 3.8 Determinação de selênio

#### 3.8.1 Digestão das amostras de castanha-do-brasil

Cinco gramas de cada amostra de amêndoa de castanha-do-brasil foram previamente moídas e adicionadas de 10 mL de solução de metanol:clorofórmio (1:2, v/v), e submetida a homogenizador orbital, operado a 350 rpm durante 30 minutos. Este procedimento foi repetido por duas vezes, com a finalidade de remoção dos lipídeos. O extrato amostral então foi submetido a extrações sequenciais com água deionizada, NaCl, etanol, e NaOH. A separação de todos sobrenadantes foi realizada utilizando sistema de filtração a vácuo com membrana filtrante de 0,45 µm.

O sólido final foi digerido em forno microondas em recipiente fechado, utilizando mistura oxidante diluída (2,0 mL HNO<sub>3</sub>; 1,0 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 3 mL de água). O programa de temperatura do microondas apresentou 4 etapas descritas a seguir: (Temperatura/°C; rampa/minuto; manutenção/minuto): 1 (140; 5; 1), 2 (180; 4; 5), 3 (200; 4; 10) e 4 (0; 0; 20). O extrato digerido foi ressuspenso em 10 mL de água deionizada (NAOZUKA e OLIVEIRA, 2007).

#### 3.8.2 Determinação de Se por espectrometria de absorção atômica

Dez microlitros do extrato amostral digerido foram depositadas no interior de tubo de grafite (Perkin Elmer) com injetor automático AS-72. As condições instrumentais para o programa de espectrometria e de temperatura para o tubo de grafite atomizador na detecção de selênio apresentou as condições descritas pela Tabela 3 (NAOZUKA et al., 2010):

**Tabela 3-** Programação térmica do forno de grafite.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (segundos)	Manutenção (segundos)	Fluxo de ar (ml/minuto)
Secagem I	100	10	10	250
Secagem II	130	2	15	250
Pirólise	1200	10	20	250
Atomização	2300	0	5	0
Limpeza	2500	1	2	250



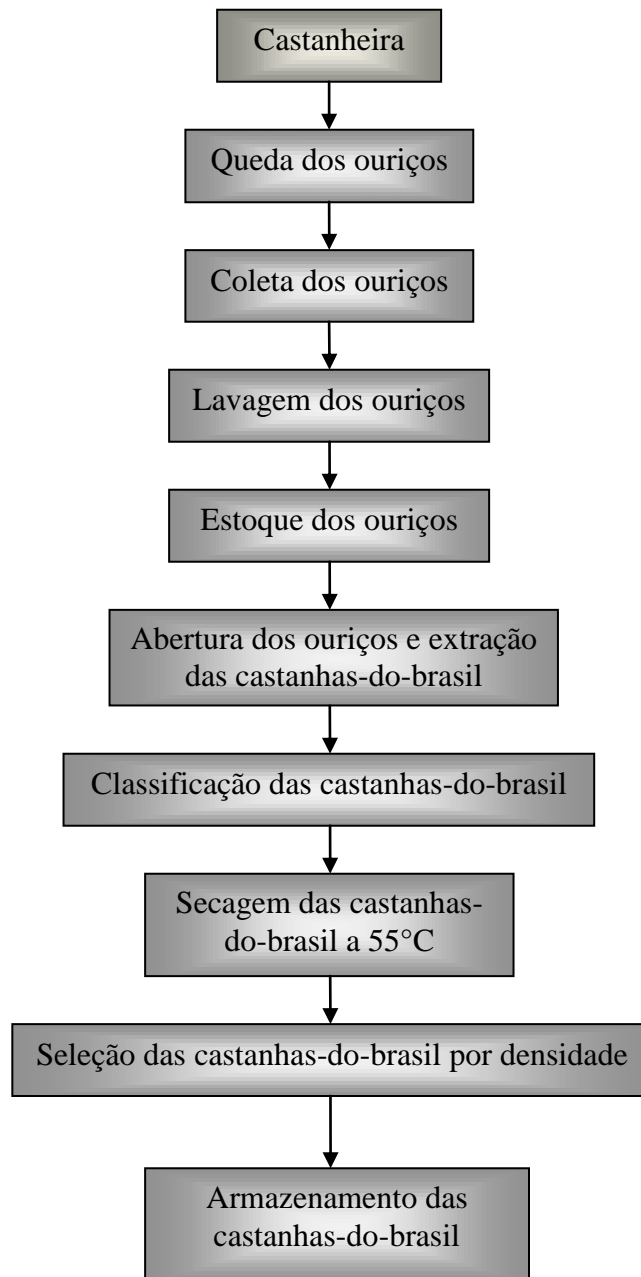
O perfil elemental cromatográfico foi construído usando Microcal™ Origin™ (Versão 5.0, Microcal Software, Inc., USA).

### **3.9 Análise estatística**

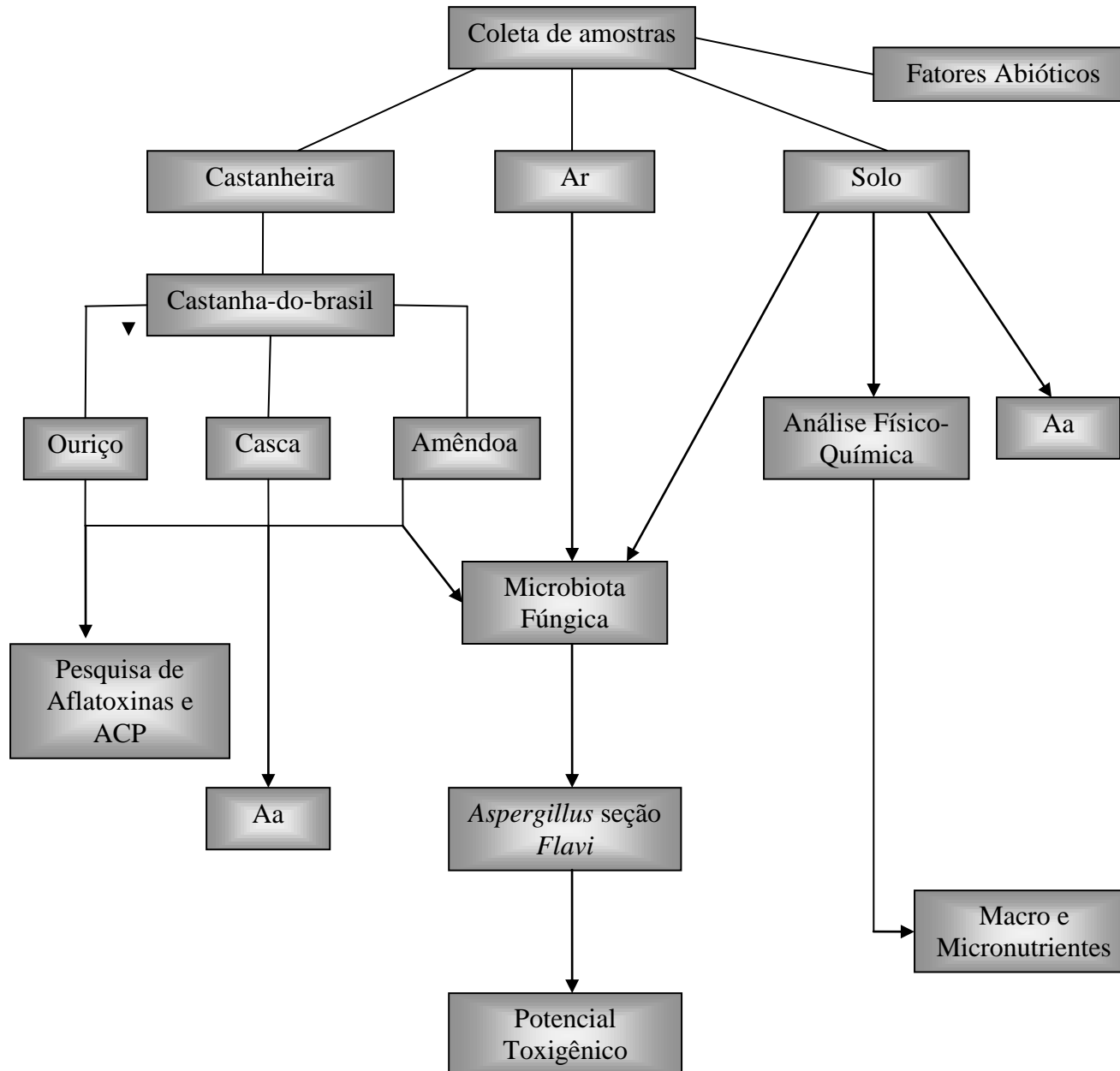
Coeficiente de Spearman e modelo de regressão logística foram utilizados para estabelecimento da correlação entre contaminação fúngica por *Aspergillus flavus* no ouriço, casca e amêndoa de castanha-do-brasil, considerando o tempo de contato com solo e contaminação das amostras. A análise estatística utilizou o procedimento REG do software SAS 9.0 (Statistical Analysis Software).

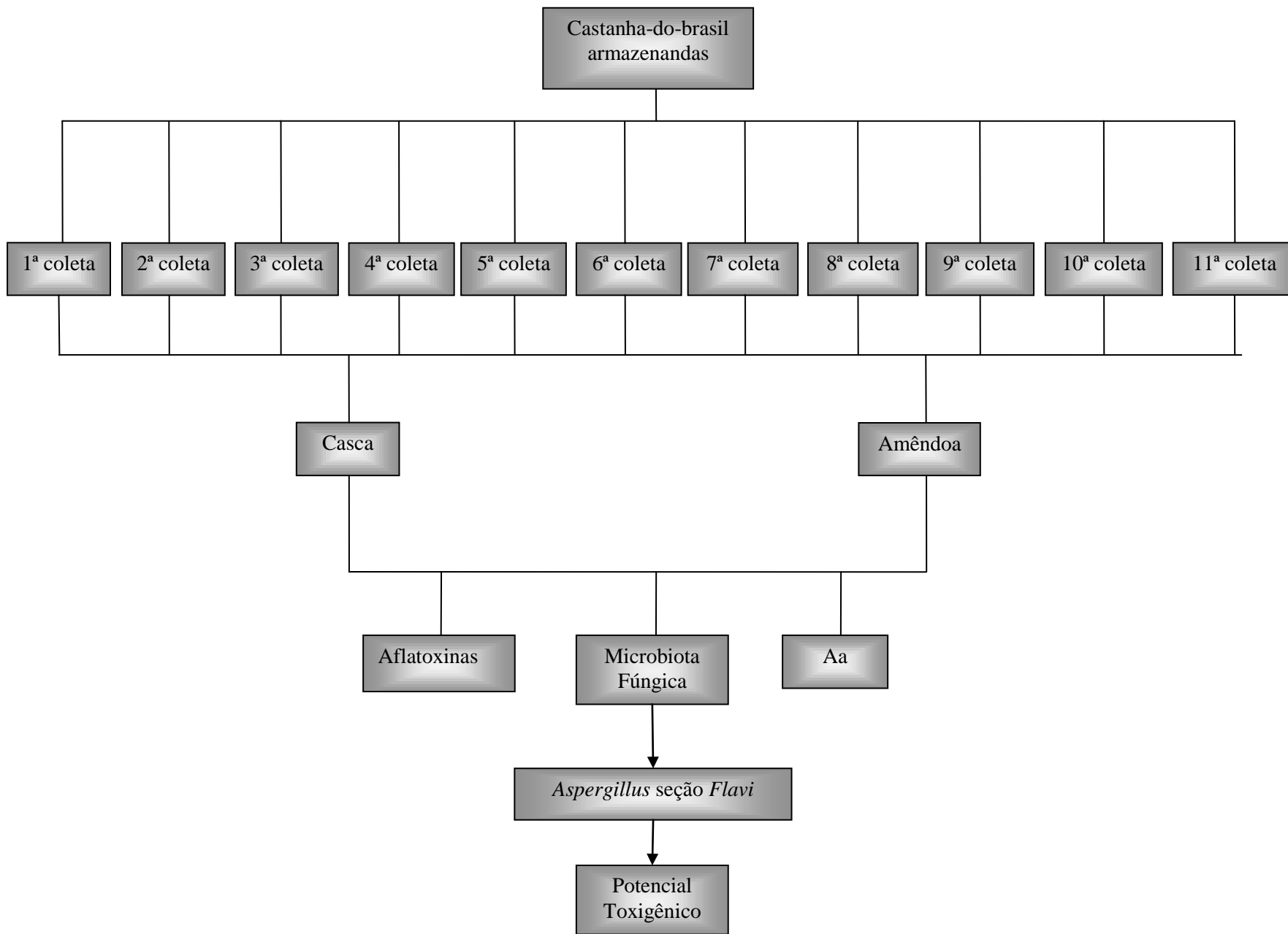


#### 4.1 Fluxograma da produção de castanha-do-brasil



#### 4.2 Fluxograma analítico das amostras coletadas a campo





## **5 RESULTADOS**

## 5.1 Amostras coletadas a campo

### 5.1.1 Análise da composição química do solo

A Tabela 4 mostra os resultados da análise da composição química do solo, analisado durante a fase de coleta.

### 5.1.2 Isolamento e identificação fúngica das amostras de solo

Nas amostras de solo foram encontrados os seguintes fungos: *Penicillium* spp. ( $378,5 \times 10^6$  UFC/g), *Aspergillus flavus* ( $186,5 \times 10^6$  UFC/g), *Cladosporium* spp. ( $66 \times 10^6$  UFC/g), FNE (Fungos não esporulados) ( $25 \times 10^6$  UFC/g), *Fusarium* spp. ( $6 \times 10^6$  UFC/g), *Aspergillus ochraceus* ( $5,0 \times 10^6$  UFC/g) *Paecilomyces* spp. ( $1 \times 10^6$  UFC/g), *Neurospora* spp. ( $0,5 \times 10^6$  UFC/g) e *Altenaria* spp. ( $0,5 \times 10^6$  UFC/g).

No solo, *A. flavus* apresentou número de unidades formadoras de colônia (UFC/g) variando entre  $2,5 \times 10^6$  e  $80 \times 10^6$ . Neste substrato a Aa variou entre 0,97 e 0,99 (Tabela 5, Figura 13). Do total das cepas de *A. flavus* isoladas em solo, 64% (16/25) apresentaram capacidade aflatoxigênica.

**Tabela 4-** Resultado da análise química de solo das áreas experimentais, Itacoatiara, AM, no período de fevereiro de 2008.

Amostra	pH	C	M.O.	N	P	K	Na	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	t	T	V	m	Fe	Zn	Mn	Cu
	H <sub>2</sub> O	g/kg	%	mg/dm <sup>3</sup>	Cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>							%	mg/dm <sup>3</sup>							
1	4,58	40,09	68,96	2,98	3	68	2	0,98	0,6	0,7	8,15	1,76	2,46	9,92	17,77	28,43	358	1,89	11,55	0,29
2	4,20	34,68	59,64	2,44	4	30	3	0,31	0,3	1,73	9,14	0,70	2,43	9,84	7,11	71,20	149	0,84	4,10	0,19
3	4,32	39,88	68,6	2,87	4	34	5	0,74	0,38	1,22	9,58	1,23	2,45	10,81	11,36	49,86	284	1,42	8,29	0,23
4	4,47	34,48	59,31	2,43	3	34	3	0,78	0,65	0,66	6,60	1,53	2,19	8,13	18,83	30,26	215	1,38	12,45	0,17
5	4,08	32,60	56,08	2,37	3	34	2	0,3	0,22	1,49	8,35	0,62	2,10	8,96	6,87	70,7	168	1,16	7,29	0,15

C= carbono; M.O.= Matéria orgânica; N= nitrogênio; P= fósforo; K= potássio; Na= sódio; Ca= cálcio; Mg= magnésio; Al= alumínio; H= hidrogênio; SB= soma das bases trocáveis; t= capacidade de troca catiônica efetiva; T= capacidade de troca catiônica a pH 7,0; V= Índice de saturação por bases; m= índice de saturação por alumínio; Fe= ferro; Zn= zinco; Mn= manganês; Cu= cobre.

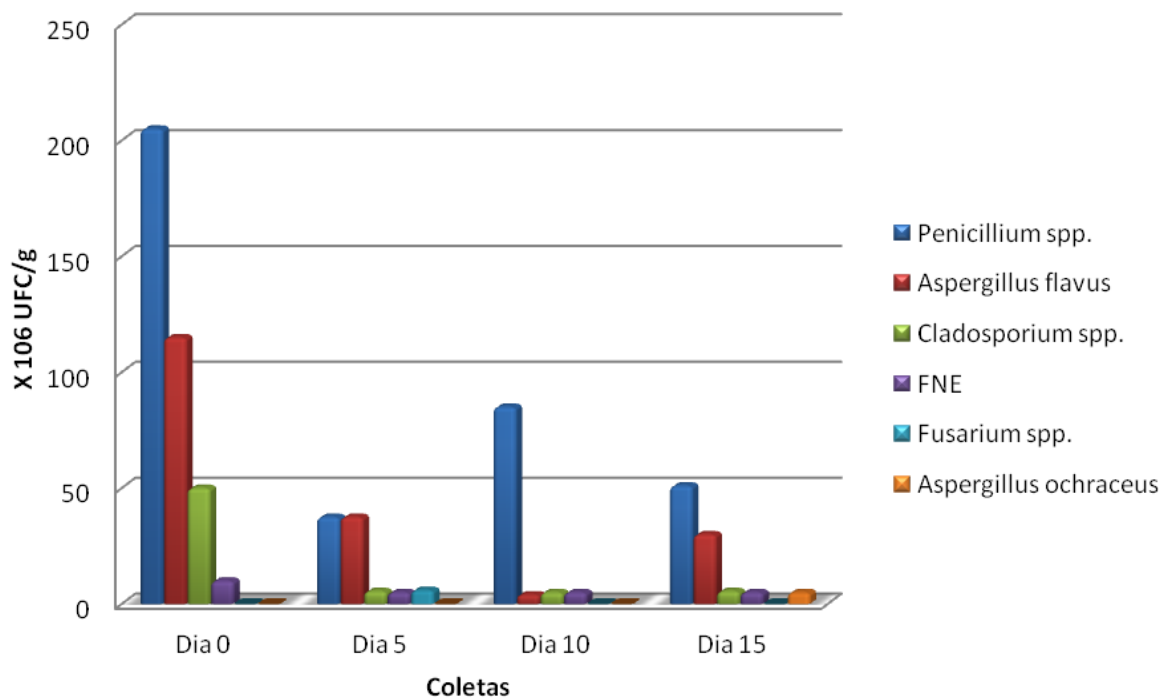


**Tabela 5-** Unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g X 10<sup>6</sup>) dos fungos isolados de 20 amostras de solo, provenientes de Itacoatiara, AM, no período de fevereiro a março de 2008.

		Contagem X 10 <sup>6</sup> UFC/g									
Coleta	Amostra	Aa	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Aspergillus</i> <i>flavus</i>	<i>Cladosporium</i> spp.	FNE *	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Aspergillus</i> <i>ochraceus</i>	<i>Paecilomyces</i> spp.	<i>Alternaria</i> spp.	<i>Neurospora</i> spp.
1 <sup>a</sup> Dia 0	1	0,99	100	-	50	-	-	-	-	-	-
	2	0,99	15	10	-	-	-	-	-	-	-
	3	0,99	5	20	-	10	-	-	-	-	-
	4	0,99	15	80	-	-	-	-	-	-	-
	5	0,98	70	5	-	-	-	-	-	-	-
<b>X Aa<sup>1</sup> e Σ fungos<sup>2</sup></b>		0,99	205	115	50	10	0	0	0	0	0
2 <sup>a</sup> Dia 5	1	0,99	21,5	5	-	-	1	-	0,5	-	-
	2	0,99	4,5	-	0,5	-	-	-	0,5	-	-
	3	0,99	-	5	5	-	-	-	-	-	-
	4	0,99	1,5	2,5	-	-	-	-	-	-	-
	5	0,99	10	25	-	5	5	-	-	-	-
<b>X Aa e Σ fungos</b>		0,99	37,5	37,5	5,5	5	6	0	1	0	0
3 <sup>a</sup> Dia 10	1	0,99	10	-	5	-	-	-	-	-	-
	2	0,99	5	-	-	5	-	-	-	-	-
	3	0,96	20	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	0,98	50	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	0,99	-	4	-	-	-	-	-	0,5	0,5
<b>X Aa e Σ fungos</b>		0,98	85	4	5	5	0	0	0	0,5	0,5
4 <sup>a</sup> Dia 15	1	0,98	15	10	5	-	-	-	-	-	-
	2	0,99	5	5	-	-	-	5	-	-	-
	3	0,99	5	15	-	-	-	-	-	-	-
	4	0,98	1	-	0,5	-	-	-	-	-	-
	5	0,98	25	-	-	5	-	-	-	-	-
<b>X Aa e Σ fungos</b>		0,98	51	30	5,5	5	0	5	0	0	0
<b>Contagem Total X 10<sup>6</sup> UFC/g</b>											
<b>Σ Total<sup>3</sup></b>			<b>378,5</b>	<b>186,5</b>	<b>66</b>	<b>25</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,5</b>

<sup>1</sup> Média de Aa das amostras, <sup>2</sup> Somatório dos fungos, <sup>3</sup> Somatório dos fungos totais, \* Fungos não esporulados.

**Figura 13-** Representação gráfica das freqüências absoluta ( $\times 10^6$  UFC/g) dos fungos mais isolados de 20 amostras de solo, provenientes de Itacoatiara, AM, no período de fevereiro a março de 2008.



Fonte: Baquião, 2012.

### 5.1.3 Isolamento e identificação dos fungos do ar

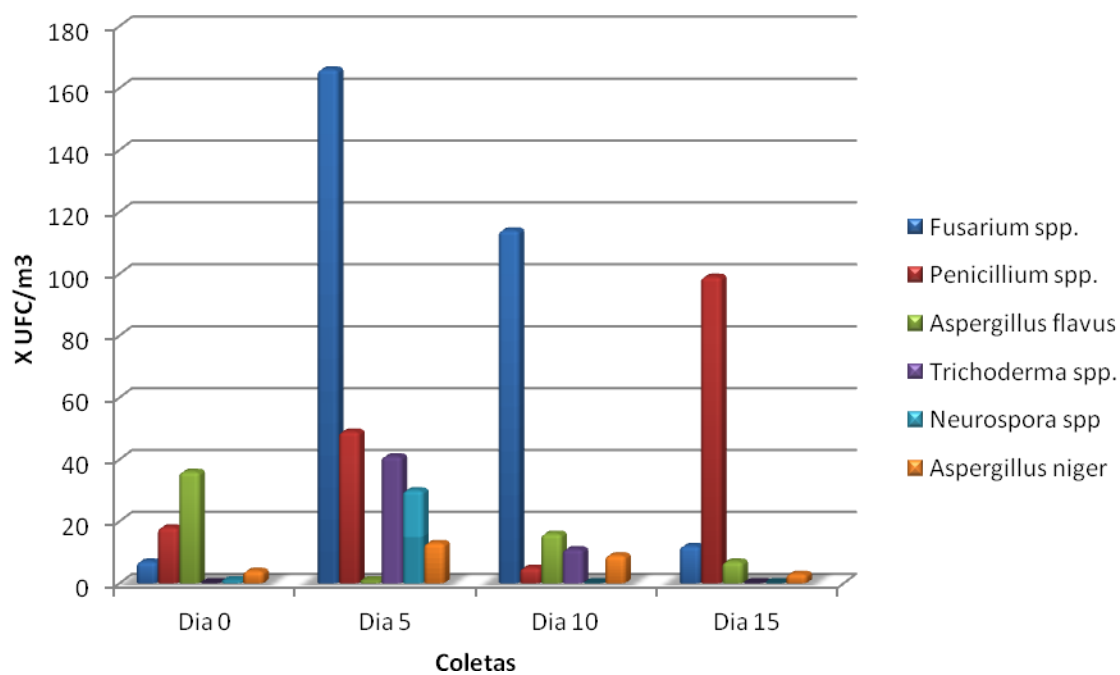
Nas amostras de ar foram encontrados os seguintes fungos: *Fusarium* spp. (299 UFC/m<sup>3</sup>), *Penicillium* spp. (171 UFC/m<sup>3</sup>), *Aspergillus flavus* (60 UFC/m<sup>3</sup>), *Trichoderma* spp. (52 UFC/m<sup>3</sup>), *Neurospora* spp. (31 UFC/m<sup>3</sup>), *Aspergillus niger* (29 UFC/m<sup>3</sup>), *Alternaria* spp. (25 UFC/m<sup>3</sup>), FNE (16 UFC/m<sup>3</sup>), *Curvularia* spp. (4 UFC/m<sup>3</sup>) e *Mucor* spp. (4 UFC/m<sup>3</sup>). No ar, *A. flavus* apresentou número de unidades formadoras de colônia (UFC/m<sup>3</sup>) variando entre  $1 \times 10^4$  e  $16 \times 10^4$ , porém, espécies do gênero *Fusarium* foram as mais isoladas, com valores oscilando entre 1 e  $109 \times 10^4$  UFC/m<sup>3</sup> de ar (Tabela 6; Figura 14). Do total das cepas de *A. flavus* isoladas no ar, 30% (18/60) apresentaram capacidade aflatoxigênica.

**Tabela 6-** Unidades formadoras de colônias por m<sup>3</sup> de ar (UFC/m<sup>3</sup>) dos fungos isolados de 20 amostras de ar, provenientes de Itacoatiara, AM, no período de fevereiro a março de 2008.

		Contagem X UFC/m <sup>3</sup>									
Coleta	Amostra	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Aspergillus</i> <i>flavus</i>	<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Neurospora</i> spp.	<i>A. niger</i>	<i>Alternaria</i> spp.	FNE *	<i>Curvularia</i> spp.	<i>Mucor</i> spp.
1 <sup>a</sup> Dia 0	1	-	-	14	-	-	-	-	-	-	-
	2	1	9	6	-	-	4	-	-	-	1
	3	5	4	11	-	-	-	-	-	-	-
	4	1	1	5	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	4	-	-	1	-	-	-	-	-
<b>Σ fungos<sup>1</sup></b>		<b>7</b>	<b>18</b>	<b>36</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
2 <sup>a</sup> Dia 5	1	1	31	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	40	2	1	-	30	1	-	-	-	-
	3	40	-	-	-	-	2	-	-	-	-
	4	40	4	-	1	-	3	-	3	1	-
	5	45	12	-	40	-	7	-	-	-	1
<b>Σ fungos</b>		<b>166</b>	<b>49</b>	<b>1</b>	<b>41</b>	<b>30</b>	<b>13</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
3 <sup>a</sup> Dia 10	1	1	-	-	7	-	-	-	3	-	-
	2	109	-	16	-	-	-	-	-	-	1
	3	-	3	-	1	-	1	21	-	-	-
	4	1	1	-	-	-	8	-	4	1	-
	5	3	1	-	3	-	-	-	2	-	-
<b>Σ fungos</b>		<b>114</b>	<b>5</b>	<b>16</b>	<b>11</b>	<b>0</b>	<b>9</b>	<b>21</b>	<b>9</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
4 <sup>a</sup> Dia 15	1	4	-	-	-	-	2	-	-	-	-
	2	4	76	1	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	11	-	-	-	1	-	3	2	1
	4	3	3	-	-	-	-	4	1	-	-
	5	1	9	6	-	-	-	-	-	-	-
<b>Σ fungos</b>		<b>12</b>	<b>99</b>	<b>7</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>
<b>Contagem total X UFC/m<sup>3</sup></b>											
<b>Σ Total<sup>2</sup></b>		<b>299</b>	<b>171</b>	<b>60</b>	<b>52</b>	<b>31</b>	<b>29</b>	<b>25</b>	<b>16</b>	<b>4</b>	<b>4</b>

<sup>1</sup>Somatório dos fungos, <sup>2</sup>Somatório dos fungos totais, \* Fungos não esporulados.

**Figura 14-** Representação gráfica das frequências absoluta (UFC/m<sup>3</sup>) dos fungos mais isolados de 20 amostras de ar, provenientes de Itacoatiara, AM, no período de fevereiro a março de 2008.



Fonte: Baquião, 2012.

#### 5.1.4 Isolamento e identificação fúngica das amostras de ouriços de castanha-do-brasil

Nas amostras dos ouriços foram encontrados os seguintes fungos totais: *Aspergillus flavus* ( $2.206,3 \times 10^6$  UFC/g), *Penicillium* spp. ( $1127 \times 10^6$  UFC/g), *Trichoderma* spp. ( $927 \times 10^6$  UFC/g), *A. niger* ( $611,8 \times 10^6$  UFC/g), *Fusarium* spp. ( $610,1 \times 10^6$  UFC/g), *A. tamarii* ( $585,3 \times 10^6$  UFC/g), *Humicola* spp. ( $200 \times 10^6$  UFC/g), *Neurospora* spp. ( $128,1 \times 10^6$  UFC/g), , FNE ( $113 \times 10^6$  UFC/g), , *A. restrictus* ( $110,3 \times 10^6$  UFC/g), *Eurotium amstelodami* ( $53,5 \times 10^6$  UFC/g), *A. glaucus* ( $2,5 \times 10^6$  UFC/g) e *A. ornatus* ( $2,5 \times 10^4$  UFC/g).

Nos ouriços, *A. flavus* apresentou número de unidades formadoras de colônia (UFC/g) variando entre  $0,3 \times 10^6$  e  $863,5 \times 10^6$ . Neste substrato os níveis de Aa variaram entre 0,88 e 0,99 (Tabela 7).

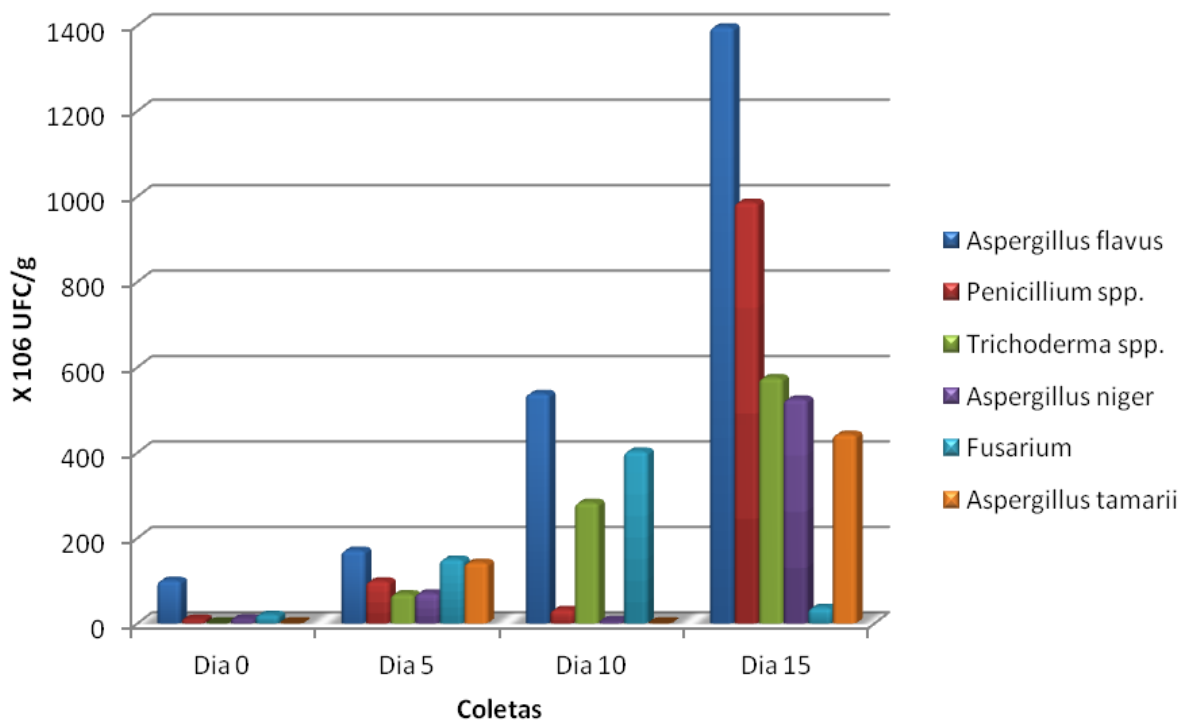
A espécie *A. flavus* foi a mais frequentemente isolada em todas as quatro etapas de coleta (Dia 0, 5, 10 e 15) (Figura 15). Destas, o potencial aflatoxigênico foi predominante em 40,8% (31/76) das cepas de *A. flavus*.

**Tabela 7-** Unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g X 10<sup>6</sup>) dos fungos isolados de 20 amostras de ouriços, provenientes de Itacoatiara, AM, no período de fevereiro a março de 2008.

		Contagem X 10 <sup>6</sup> UFC/g													
Coleta	Amostra	Aa	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Trichoderma</i> spp.	<i>A. niger</i>	<i>Fusarium</i> spp.	<i>A. tamarii</i>	<i>Humicula</i> spp.	<i>Neurospora</i> spp.	FNE *	<i>A. restrictus</i>	<i>Eurotium amstelodami</i>	<i>A. glaucus</i>	<i>A. ornatus</i>
1 <sup>a</sup> Dia 0	1	0,98	2,7	6,8	-	2,8	5,0	-	-	15,0	-	42,3	-	-	-
	2	0,98	55,4	-	-	7,5	12,5	-	-	12,5	-	12,5	2,5	-	-
	3	0,98	5,0	0,3	-	-	-	-	-	1,0	-	1,8	0,5	-	-
	4	0,94	35,0	-	-	0,3	-	-	-	10,3	-	-	-	-	2,5
	5	0,98	2,5	2,5	-	-	2,5	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>X Aa<sup>1</sup> e Σ fungos<sup>2</sup></b>		0,97	100,5	9,5	0,0	10,5	20,0	0,0	0,0	38,8	0,0	56,5	3,0	0,0	2,5
2 <sup>a</sup> Dia 5	1	0,99	57,5	45,0	-	45,0	10,0	-	-	2,5	3,0	-	-	-	-
	2	0,97	55,0	-	69,0	20,3	75,0	-	-	10,0	2,0	-	-	-	-
	3	0,98	-	5,0	-	-	62,5	142,5	-	-	-	-	-	-	-
	4	0,98	58,4	-	-	-	2,8	-	-	72,8	-	-	-	-	-
	5	1,00	0,3	49,0	-	5,5	-	-	-	-	-	28,8	-	-	-
<b>X Aa e Σ fungos</b>		0,98	171,2	99,0	69,0	70,8	150,3	142,5	0,0	85,3	5,0	28,8	0,0	0,0	0,0
3 <sup>a</sup> Dia 1 0	1	0,91	20,0	-	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	0,89	323,0	-	-	5,5	2,5	-	-	1,5	-	-	-	2,5	-
	3	0,92	37,5	-	-	-	383,0	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	0,95	157,5	-	183,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	0,89	-	32,5	-	-	17,5	0,3	-	N	8,0	-	-	-	-
<b>X Aa e Σ fungos</b>		0,91	538,0	32,5	283,0	5,5	403,0	0,3	0,0	1,5	8,0	0,0	0,0	2,5	0,0
4 <sup>a</sup> Dia 15	1	0,99	36,6	353,0	50,0	-	31,8	-	-	2,5	-	-	0,5	-	-
	2	0,98	-	-	-	325,0	5,0	442,5	200,0	-	-	-	-	-	-
	3	0,95	390,0	203,0	-	25,0	-	-	-	-	100,0	25,0	-	-	-
	4	0,99	106,5	180,0	350,0	-	-	-	-	-	-	-	50,0	-	-
	5	0,99	863,5	250,0	175,0	175,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>X Aa e Σ fungos</b>		1,0	1396,6	986,0	575,0	525,0	36,8	442,5	200,0	2,5	100,0	25,0	50,5	0,0	0,0
<b>Contagem Total X 10<sup>6</sup> UFC/g</b>															
<b>Σ Total<sup>3</sup></b>			<b>2206,3</b>	<b>1127,0</b>	<b>927,0</b>	<b>611,8</b>	<b>610,1</b>	<b>585,3</b>	<b>200,0</b>	<b>128,1</b>	<b>113,0</b>	<b>110,3</b>	<b>53,5</b>	<b>2,5</b>	<b>2,5</b>

<sup>1</sup>Média de Aa das amostras, <sup>2</sup>Somatório dos fungos, <sup>3</sup>Somatório dos fungos totais, \*Fungos não esporulados.

**Figura 15-** Representação gráfica das freqüências absoluta ( $\times 10^6$  UFC/g) dos fungos mais isolados de 20 amostras de ouriços de castanha-do-brasil, provenientes de Itacoatiara, AM, no período de fevereiro a março de 2008.



Fonte: Baquião, 2012.



### 5.1.5 Isolamento e identificação fúngica das amostras de casca de castanha-do-brasil

Nas amostras de casca de castanha foram encontrados os seguintes fungos totais: *Fusarium* spp. ( $5.376,5 \times 10^6$  UFC/g), *Aspergillus flavus* ( $1524,3 \times 10^6$  UFC/g), *Penicillium* spp. ( $660,3 \times 10^6$  UFC/g), *Neurospora* spp. ( $327,5 \times 10^6$  UFC/g), FNE ( $322 \times 10^6$  UFC/g), *Trichoderma* spp. ( $284 \times 10^6$  UFC/g), *A. restrictus* ( $87,5 \times 10^6$  UFC/g), *A. versicolor* ( $62,5 \times 10^6$  UFC/g), *Mucor* spp. ( $22 \times 10^6$  UFC/g), *A. niger* ( $20,5 \times 10^6$  UFC/g), *Rhizomucor* spp. ( $10 \times 10^6$  UFC/g), *Alternaria* spp ( $3 \times 10^6$  UFC/g), *A. glaucus* ( $2,5 \times 10^6$  UFC/g), *A. tamaritii* ( $0,5 \times 10^6$  UFC/g) e *Cladosporium* spp. ( $0,3 \times 10^6$  UFC/g).

Nas cascas de castanha-do-brasil, *A. flavus* apresentou número de unidades formadoras de colônia (UFC/g) variando entre  $0,3 \times 10^6$  e  $793 \times 10^6$ . Neste substrato a Aa variou entre 0,89 e ,99 (Tabela 8).

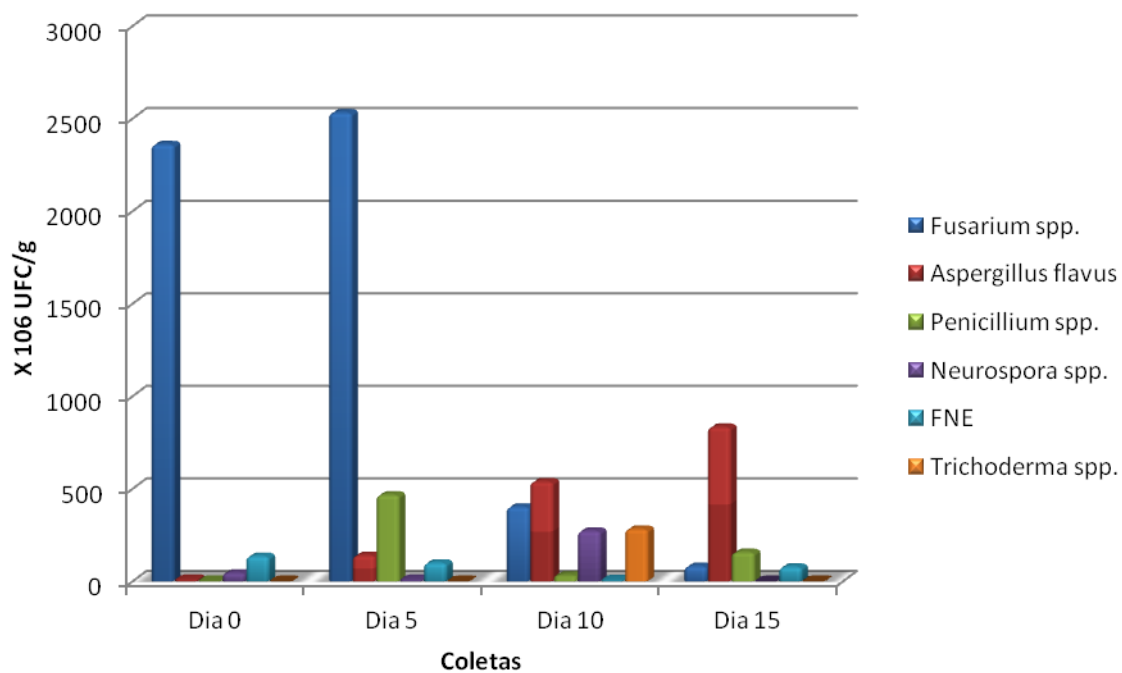
O gênero *Fusarium* foi o mais frequentemente isolado nas duas coletas iniciais (dia 0 e 5), variando neste período entre  $10 \times 10^6$  e  $1202,5 \times 10^6$  UFC/g. Na terceira coleta (dia 10) houve predominância de *Neurospora* spp., com valores entre  $270 \times 10^6$  e  $2,5 \times 10^6$  UFC/g. Na quarta coleta (dia 15), houve aumento de isolamento de cepas de *A. flavus*, variando entre  $12,75 \times 10^6$  e  $792,5 \times 10^6$  (Figura 16). Destas, foi detectado potencial aflatoxigênico em 63,8% (23/36) das cepas de *A. flavus* isoladas.

**Tabela 8-** Unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g X 10<sup>6</sup>) dos fungos isolados de 20 amostras de cascas de castanhas-do-brasil, provenientes de Itacoatiara, AM, no período de fevereiro a março de 2008.

		Contagem X 10 <sup>6</sup> UFC/g															
Coleta	Amostra	Aa	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Aspergillus</i> <i>flavus</i>	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Neurospora</i> spp.	FNE *	<i>Trichoderma</i> spp.	<i>A.</i> <i>restricus</i>	<i>A.</i> <i>versicolor</i>	<i>Mucor</i> spp.	<i>A.</i> <i>niger</i>	<i>Rhizomucor</i> spp.	<i>Alternaria</i> spp.	<i>A.</i> <i>glauca</i>	<i>A.</i> <i>tamaritii</i>	<i>Cladosporium</i> spp.
1 <sup>a</sup> Dia 0	1	0,99	10,0	-	2,5	2,5	68,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	0,99	20,0	5,0	-	35,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	0,99	57,5	5,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	0,99	1070,0	-	-	7,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	0,99	1203,0	0,5	-	-	68,0	-	-	-	20,0	-	10,0	-	-	-	-
<b>X Aa<sup>1</sup> e Σ fungos:</b>		0,99	2360,5	10,5	2,5	45,0	136,0	0,0	0,0	0,0	20,0	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2 <sup>a</sup> Dia 5	1	0,99	2205,0	-	27,5	-	-	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	0,98	54,5	0,3	352,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	0,97	30,0	15,0	-	10,0	-	-	67,5	-	2,0	-	-	-	-	-	-
	4	0,98	115,0	125,0	85,0	-	100,0	-	20,0	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	0,98	127,5	0,5	2,5	-	-	-	-	-	-	-	-	3,0	-	-	-
<b>X Aa e Σ fungos</b>		0,98	2532,0	140,8	467,5	10,0	100,0	0,0	87,5	0,0	2,0	0,0	0,0	3,0	0,0	0,0	0,0
3 <sup>a</sup> Dia 10	1	0,91	-	20,0	-	-	-	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	0,89	2,5	323,0	-	270,0	-	-	-	-	-	5,5	-	-	2,5	-	-
	3	0,92	382,5	38,0	-	2,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	0,95	-	158,0	-	-	8,0	183,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	0,89	17,5	-	32,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-
<b>X Aa e Σ fungos</b>		0,91	402,5	539,0	32,5	272,5	8,0	283,0	0,0	0,0	0,0	5,5	0,0	0,0	2,5	0,3	0,0
4 <sup>a</sup> Dia 15	1	0,97	20,0	-	145,0	-	15,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	0,98	4,3	13,0	-	-	-	-	-	62,5	-	15,0	-	-	-	-	-
	3	0,94	-	-	-	-	63,0	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	0,94	32,3	28,0	12,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3
	5	0,98	25,0	793,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-
<b>X Aa e Σ fungos</b>		0,96	81,5	834,0	157,8	0,0	78,0	1,0	0,0	62,5	0,0	15,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,3
<b>Contagem Total X 10<sup>6</sup>UFC/g</b>																	
<b>Σ Total<sup>3</sup></b>			<b>5376,5</b>	<b>1524,3</b>	<b>660,3</b>	<b>327,5</b>	<b>322,0</b>	<b>284,0</b>	<b>87,5</b>	<b>62,5</b>	<b>22,0</b>	<b>20,5</b>	<b>10,0</b>	<b>3,0</b>	<b>2,5</b>	<b>0,5</b>	<b>0,3</b>

<sup>1</sup>Média de Aa das amostras, <sup>2</sup>Somatório dos fungos, <sup>3</sup>Somatório dos fungos totais, \*Fungos não esporulados.

**Figura 16-** Representação gráfica das freqüências absoluta ( $\times 10^6$  UFC/g) dos fungos mais isolados de 20 amostras de cascas de castanha-do-brasil, provenientes de Itacoatiara, AM, no período de fevereiro a março de 2008.



Fonte: Baquião, 2012.

### 5.1.6 Isolamento e identificação fúngica das amostras de amêndoas de castanha-do-brasil

Nas amostras de amêndoas de castanha-do-brasil foram encontrados os seguintes fungos totais: *Aspergillus flavus* ( $2.548 \times 10^6$  UFC/g), *Penicillium* spp. ( $1.072,3 \times 10^6$  UFC/g), *Fusarium* spp. ( $306 \times 10^6$  UFC/g), *A. ornatus* ( $302,5 \times 10^6$  UFC/g), FNE ( $274,1 \times 10^6$  UFC/g), *Neurospora* spp. ( $149 \times 10^6$  UFC/g), *Trichoderma* spp. ( $44 \times 10^6$  UFC/g), *A. restrictus* ( $32,5 \times 10^6$  UFC/g), *Paecilomyces* spp. ( $30 \times 10^6$  UFC/g), *Mucor* spp. ( $15 \times 10^6$  UFC/g), *Tricothecium* spp ( $8 \times 10^6$  UFC/g), *A. wentii* ( $7,8 \times 10^6$  UFC/g), *A. terreus* ( $5,8 \times 10^6$  UFC/g), *A. tamaritii* ( $5 \times 10^6$  UFC/g), *A. glaucus* ( $5 \times 10^6$  UFC/g) e *A. niger* ( $3 \times 10^6$  UFC/g) e *Geotrichum* spp. ( $3 \times 10^6$  UFC/g).

Nas amêndoas, *A. flavus* apresentou número de unidades formadoras de colônia (UFC/g) variando entre  $0,3 \times 10^6$  e  $1.090 \times 10^6$ . Neste substrato a Aa variou entre 0,93 e 0,99 (Tabela 9). Esta mesma espécie apresentou predominância nas quatro etapas de coletas (Dia 0, 5, 10 e 15) (Figura 17).

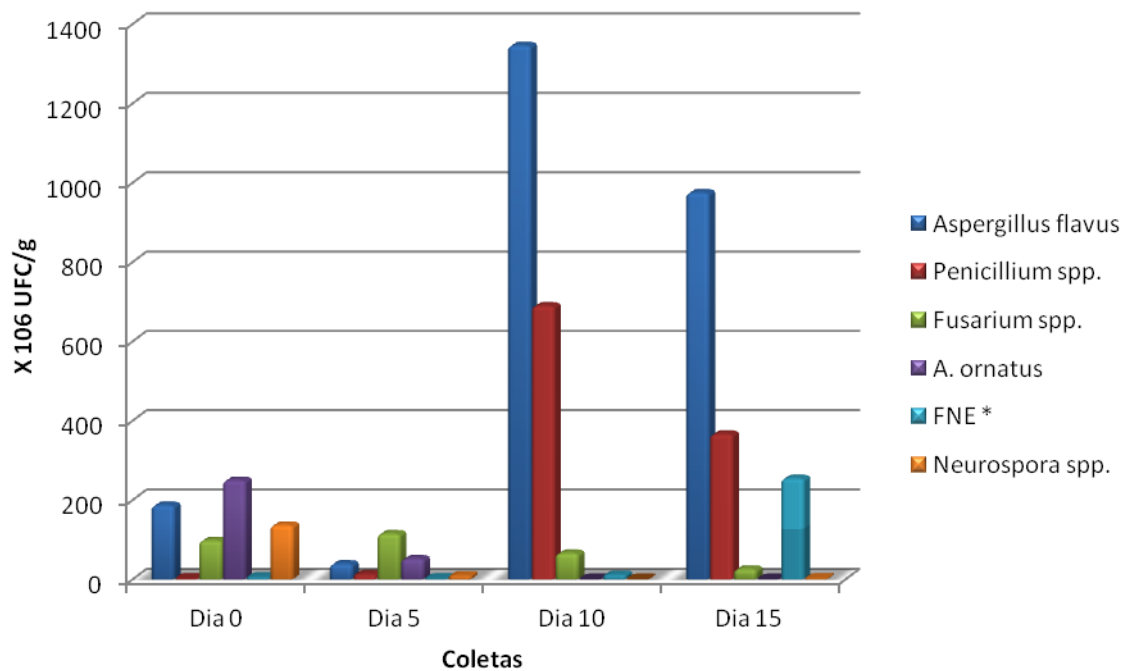
Foram também isoladas cepas de 67,8% (47/59) de cepas de *Aspergillus flavus* aflatoxigênicas.

**Tabela 9-** Unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g X 10<sup>6</sup>) dos fungos isolados de 20 amostras de amêndoas de castanha-do-brasil, provenientes de Itacoatiara, AM, no período de fevereiro a março de 2008.

Contagem X 10 <sup>6</sup> UFC/g																			
Coleta	Amostra	Aa	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>A. ornatus</i>	FNE *	<i>Neurospora</i> spp.	<i>Trichoderma</i> spp.	<i>A. restrictus</i>	<i>Paecilomyces</i> spp.	<i>Mucor</i> spp.	<i>Tricotecium</i> spp.	<i>A. wentii</i>	<i>A. terreus</i>	<i>A. tamaritii</i>	<i>A. glaucus</i>	<i>Geotrichum</i> spp.	<i>A. niger</i>
Dia 0	1	0,99	110,0	-	-	250,0	-	25,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	0,98	44,0	2,5	-	-	3,3	98,0	-	-	30,0	-	-	7,5	-	-	-	-	-
	3	0,99	0,3	-	85,0	-	2,5	1,0	-	-	-	-	-	-	5,8	-	-	-	-
	4	0,95	3,0	-	13,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	0,98	30,0	-	-	-	-	13,0	-	-	-	15,0	-	-	-	-	-	-	-
<b>X Aa<sup>1</sup> Σ fungos<sup>2</sup></b>		0,98	187,3	2,5	98,0	250,0	5,8	137,0	0,0	0,0	30,0	15,0	0,0	7,5	5,8	0,0	0,0	0,0	0,0
Dia 5	1	0,98	25,5	6,8	0,3	-	0,3	2,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	0,98	2,5	2,5	108,0	-	-	-	38,0	32,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	0,98	2,7	0,0	2,5	52,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3
	4	0,98	2,5	-	-	-	-	7,5	5,0	-	-	-	8,0	0,3	-	-	-	-	-
	5	0,98	6,3	4,0	4,5	-	1,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>X Aa e Σ fungos</b>		0,98	39,5	13,3	115,3	52,5	1,8	9,5	43,0	32,5	0,0	0,0	8,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3
Dia 10	1	0,93	25,3	-	35,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,0	2,5
	2	0,95	-	7,5	6,3	-	9,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	0,95	1090,0	-	-	-	2,5	-	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3
	4	0,94	18,0	2,5	20,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,5	-	-
	5	0,98	213,0	680,0	5,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>X Aa e Σ fungos</b>		0,95	1346,3	690,0	66,3	0,0	11,5	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,5	3,0	2,8
Dia 15	1	0,95	340,0	339,0	15,0	-	255,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,5	-	-
	2	0,93	565,0	27,5	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,0	-	-	-
	3	0,95	-	-	-	-	-	2,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	0,95	2,5	-	6,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	0,98	67,5	-	5,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>X Aa e Σ fungos</b>		0,95	975,0	366,5	26,4	0,0	255,0	2,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	2,5	0,0	0,0
Contagem Total X 10 <sup>6</sup> UFC/g																			
<b>Σ Total<sup>3</sup></b>			<b>2548,0</b>	<b>1072,3</b>	<b>306,0</b>	<b>302,5</b>	<b>274,1</b>	<b>149,0</b>	<b>44,0</b>	<b>32,5</b>	<b>30,0</b>	<b>15,0</b>	<b>8,0</b>	<b>7,8</b>	<b>5,8</b>	<b>5,0</b>	<b>5,0</b>	<b>3,0</b>	<b>3,0</b>

<sup>1</sup>Média de Aa das amostras, <sup>2</sup>Somatório dos fungos, <sup>3</sup>Somatório dos fungos totais, \*Fungos não esporulados.

**Figura 17-** Representação gráfica das freqüências absoluta ( $\times 10^6$  UFC/g) dos fungos mais isolados de 20 amostras de amêndoas de castanha-do-brasil, provenientes de Itacoatiara, AM, no período de fevereiro a março de 2008.



Fonte: Baquião, 2012.

## 5.2 Amostras coletadas durante armazenamento

### 5.2.1 Isolamento e identificação fúngica das amostras de cascas de castanha-do-brasil

Nas amostras de casca de castanha foram encontrados os seguintes fungos totais: *Aspergillus* spp. ( $1595,5 \times 10^4$  UFC/g), *Fusarium* spp. ( $1507,98 \times 10^4$  UFC/g), *Penicillium* spp. ( $1066,88 \times 10^4$  UFC/g), FNE ( $358,48 \times 10^4$  UFC/g), *Acremonium* spp. ( $61,20 \times 10^4$  UFC/g), *Cladosporium* spp. ( $39,73 \times 10^4$  UFC/g), *Geotrichum* spp. ( $24,55 \times 10^4$  UFC/g), *Paecilomyces* spp. ( $18,6 \times 10^4$  UFC/g), *Alternaria* spp. ( $13,5 \times 10^4$  UFC/g), *Verticillium* spp. ( $12,5 \times 10^4$  UFC/g), *Eurotium* spp. ( $10,5 \times 10^4$  UFC/g), *Rhizopus* spp. ( $7,65 \times 10^4$  UFC/g), *Mucor* spp. ( $3,75 \times 10^4$  UFC/g) e *Trichoderma* spp. ( $0,65 \times 10^4$  UFC/g).

Nas cascas de castanha, o gênero *Aspergillus* spp. apresentou número de unidades formadoras de colônia (UFC/g) variando entre  $0,3 \times 10^4$  UFC/g e  $295,5 \times 10^4$  UFC/g. Neste substrato a Aa variou entre 0,48 a 0,80 (Tabela 10).

O gênero *Fusarium* foi o mais prevalente nas coletas iniciais, substituído pelos *Geotrichum* e *Penicillium* até a nona coleta. Já na quinta coleta e nas finais, foi observado maior grau de contaminação por *Aspergillus* em cascas (Figuras 18 e Figura 19).

As espécies de *Aspergillus* isolados nas amostras de casca de castanha-do-brasil foram: *A. flavus* ( $448,88 \times 10^4$  UFC/g), *A. nomius* ( $187,6 \times 10^4$  UFC/g), *A. parasiticus* ( $58,53 \times 10^4$  UFC/g), *A. penicillioides* ( $744,23 \times 10^4$  UFC/g), *A. restrictus* ( $33,8 \times 10^4$  UFC/g), *A. ochraceus* ( $26,63 \times 10^4$  UFC/g), *A. wentii* ( $17,88 \times 10^4$  UFC/g), *A. tamaritii* ( $14,05 \times 10^4$  UFC/g), *A. sydowii* ( $10,53 \times 10^4$  UFC/g), *A. niger* ( $6,0 \times 10^4$  UFC/g), *A. terreus* ( $5,38 \times 10^4$  UFC/g), *A. ornatus* ( $1,65 \times 10^4$  UFC/g), e *A. versicolor* ( $0,38 \times 10^4$  UFC/g).

Dentre as espécies mais frequentemente isoladas de *Aspergillus* nas primeiras 4 coletas houve predominância de *A. flavus*, variando neste período de  $40,0 \times 10^4$  UFC/g e  $7,7 \times 10^4$  UFC/g; na quinta coleta houve predominância de *A. nomius*, com valor de  $89,38 \times 10^4$  UFC/g; na sexta, sétima, oitava e nona coletas houve predominância de *A. terreus*, *A. restrictus*, *A. penicillioides* e *A. tamaritii*, respectivamente. Na décima coleta houve maior isolamento de *A. flavus* ( $233,4 \times 10^4$  UFC/g) e na décima primeira, de *A. penicillioides*.

As espécies potencialmente aflatoxigênicas *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* apresentaram quantidades variando entre 0,75 e 187,5; 0,75 e 25,5; e 0,03 e 89,38 X 10<sup>4</sup> UFC/g, respectivamente. Dentre *A. flavus* aflatoxigênicos isolados neste substrato, obteve-se frequência relativa de 62,7% (96/153).





Contagem X 10 <sup>4</sup> UFC/g																
Coleta	Amostra	Aa	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	FNE*	<i>Acremonium</i> spp.	<i>Cladosporium</i> spp.	<i>Geothricum</i> spp.	<i>Paecilomyces</i> spp.	<i>Alternaria</i> spp.	<i>Verticillium</i> spp.	<i>Eurotium</i> spp.	<i>Rhizopus</i> spp.	<i>Mucor</i> spp.	<i>Trichoderma</i> spp.
6 <sup>a</sup> Fevereiro 2009	1	0,68	0,43	-	3,85	-	-	0,03	22,80	-	-	-	-	-	-	-
	2	0,69	3,00	11,25	10,75	-	-	2,00	1,75	-	-	-	-	0,75	-	-
	3	0,69	0,88	5,25	13,30	-	-	-	-	-	-	-	-	0,15	-	-
	4	0,71	0,83	1,00	2,03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	0,72	3,38	0,25	1,88	0,25	-	-	-	-	-	-	-	0,18	-	-
<b>X Aa e Σ fungos</b>		<b>0,69</b>	<b>8,50</b>	<b>17,75</b>	<b>21,05</b>	<b>0,25</b>	<b>0,00</b>	<b>2,03</b>	<b>24,55</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>1,08</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
7 <sup>a</sup> Março 2009	1	0,68	12,58	-	44,78	5,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,15
	2	0,58	20,70	-	111,73	0,45	-	-	-	-	-	-	-	5,00	-	-
	3	0,64	10,50	0,38	0,05	0,53	12,50	-	-	-	-	-	-	0,08	-	-
	4	0,60	6,00	0,13	2,50	32,50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	0,58	4,30	0,40	6,28	-	0,25	0,20	-	-	-	-	-	0,25	-	-
<b>X Aa e Σ fungos</b>		<b>0,62</b>	<b>54,07</b>	<b>0,90</b>	<b>165,33</b>	<b>38,48</b>	<b>12,75</b>	<b>0,20</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>5,33</b>	<b>0,00</b>	<b>0,15</b>
8 <sup>a</sup> Abril 2009	1	0,68	2,00	6,00	22,50	0,25	-	-	-	-	-	-	-	0,75	-	-
	2	0,69	17,75	-	22,75	18,25	-	-	-	-	-	-	-	0,25	-	-
	3	0,69	8,50	-	6,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	0,71	2,00	3,75	13,50	13,75	-	-	-	-	-	-	-	0,25	3,75	-
	5	0,72	12,50	0,25	5,50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,25
<b>X Aa e Σ fungos</b>		<b>0,69</b>	<b>42,75</b>	<b>10,00</b>	<b>70,25</b>	<b>32,25</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>1,25</b>	<b>3,75</b>	<b>0,25</b>
9 <sup>a</sup> Maio 2009	1	0,70	2,30	0,25	6,50	4,50	9,50	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	0,79	0,10	-	6,50	8,50	-	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	0,78	8,80	-	7,00	0,50	-	-	-	-	-	-	0,50	-	-	-
	4	0,78	0,53	9,25	7,25	10,25	16,75	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	0,80	2,80	-	4,25	19,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>X Aa e Σ fungos</b>		<b>0,77</b>	<b>14,53</b>	<b>9,50</b>	<b>31,50</b>	<b>43,00</b>	<b>26,25</b>	<b>1,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,50</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
10 <sup>a</sup> Junho 2009	1	0,64	31,00	1,00	1,00	-	-	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	0,65	18,75	-	0,25	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	0,64	8,50	-	1,75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,25
	4	0,62	225,00	-	1,00	-	2,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	0,61	4,25	-	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>X Aa e Σ fungos</b>		<b>0,63</b>	<b>287,50</b>	<b>1,00</b>	<b>5,00</b>	<b>0,25</b>	<b>2,00</b>	<b>0,25</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,25</b>
11 <sup>a</sup> Julho 2009	1	0,74	250,00	37,50	52,50	2,50	-	2,50	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	0,72	295,50	1,00	9,50	-	-	-	-	3,50	-	-	-	-	-	-
	3	0,75	20,25	-	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	0,72	227,50	-	52,50	-	-	-	-	-	-	-	10,00	-	-	-
	5	0,78	95,00	-	37,50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>X Aa e Σ fungos</b>		<b>0,74</b>	<b>888,25</b>	<b>38,50</b>	<b>152,25</b>	<b>2,50</b>	<b>0,00</b>	<b>2,50</b>	<b>0,00</b>	<b>3,50</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>10,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
<b>Contagem Total X 10<sup>4</sup> UFC/g</b>																
<b>Σ Total<sup>3</sup></b>			<b>1595,50</b>	<b>1507,98</b>	<b>1066,88</b>	<b>358,48</b>	<b>61,20</b>	<b>39,73</b>	<b>24,55</b>	<b>18,60</b>	<b>13,50</b>	<b>12,50</b>	<b>10,50</b>	<b>7,65</b>	<b>3,75</b>	<b>0,65</b>

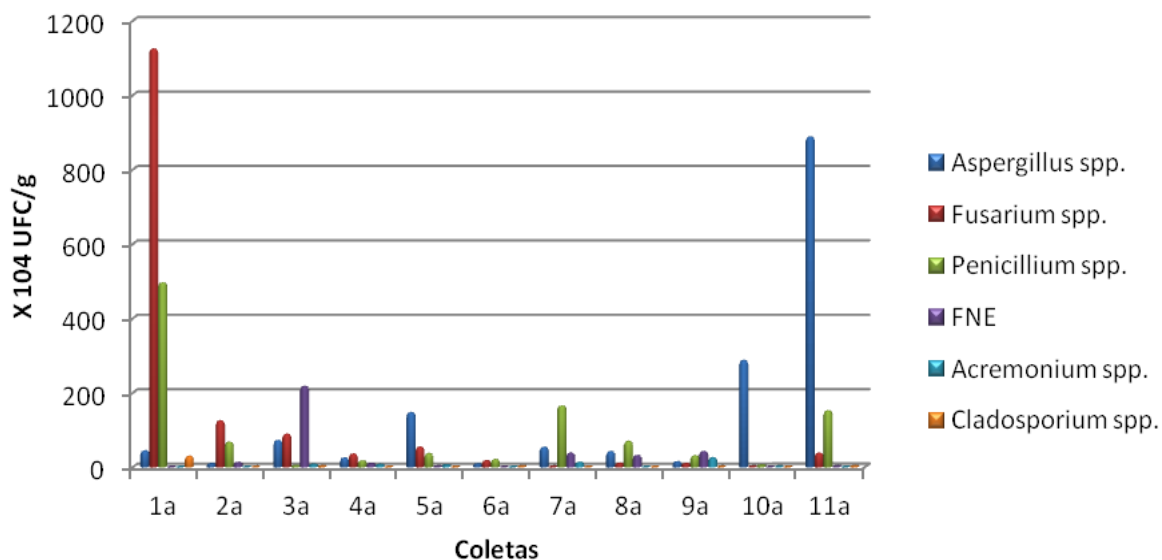
<sup>1</sup>Média de Aa das amostras, <sup>2</sup>Somatório dos fungos, <sup>3</sup>Somatório dos fungos totais, \*Fungos não esporulados.



Contagem X 10 <sup>4</sup> UFC/g															
Coleta	Amostra	Aa	A. <i>penicillioides</i>	A. <i>flavus</i>	A. <i>nomius</i>	A. <i>parasiticus</i>	A. <i>restrictus</i>	A. <i>ochraceus</i>	A. <i>wentii</i>	A. <i>tamaritii</i>	A. <i>sydowii</i>	A. <i>niger</i>	A. <i>terreus</i>	A. <i>ornatus</i>	A. <i>versicolor</i>
6 <sup>a</sup> Fevereiro 2009	1	0,68	-	0,10	-	-	-	-	0,05	-	-	-	0,13	0,15	-
	2	0,69	3,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	0,69	-	-	0,55	-	-	-	-	-	-	-	0,25	-	0,08
	4	0,71	-	0,13	0,53	-	0,05	-	-	-	-	-	0,05	0,08	-
	5	0,72	-	0,1	-	-	-	0,025	-	-	-	-	3,2	-	0,05
<b>X Aa e Σ fungos</b>		<b>0,69</b>	<b>3,00</b>	<b>0,33</b>	<b>1,08</b>	<b>0,00</b>	<b>0,05</b>	<b>0,03</b>	<b>0,05</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>3,63</b>	<b>0,23</b>	<b>0,13</b>
7 <sup>a</sup> Março 2009	1	0,68	5	5,05	-	-	2,525	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	0,58	2,5	2,5	0,02	-	15,225	0,45	-	-	-	-	-	-	-
	3	0,64	0,175	0,05	-	-	2,5	0,025	-	5	-	2,5	-	-	0,25
	4	0,6	-	2,925	-	-	-	-	3,075	-	-	-	-	-	-
	5	0,58	0,1	2,525	-	-	0,75	-	-	-	-	-	0,5	0,425	-
<b>X Aa e Σ fungos</b>		<b>0,62</b>	<b>7,78</b>	<b>13,05</b>	<b>0,02</b>	<b>0,00</b>	<b>21,00</b>	<b>0,48</b>	<b>3,08</b>	<b>5,00</b>	<b>0,00</b>	<b>2,50</b>	<b>0,50</b>	<b>0,43</b>	<b>0,25</b>
8 <sup>a</sup> Abril 2009	1	0,68	1,5	0,25	-	-	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	0,69	3,25	1,5	-	-	-	13	-	-	-	-	-	-	-
	3	0,69	0,25	6,75	-	0,25	-	1,25	-	-	-	-	-	-	-
	4	0,71	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	0,72	9,5	2	0,25	-	-	0,5	-	-	-	-	0,25	-	-
<b>X Aa e Σ fungos</b>		<b>0,69</b>	<b>15,50</b>	<b>10,50</b>	<b>1,25</b>	<b>0,25</b>	<b>0,25</b>	<b>14,75</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,25</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
9 <sup>a</sup> Maio 2009	1	0,7	0,025	-	-	-	-	1	-	0,025	-	0,25	-	1	-
	2	0,79	0,05	-	-	-	-	0,05	-	-	-	-	-	-	-
	3	0,78	-	0,025	-	-	-	-	-	8,775	-	-	-	-	-
	4	0,78	0,25	0,025	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	0,8	2,5	-	0,025	-	-	0,275	-	-	-	-	-	-	-
<b>X Aa e Σ fungos</b>		<b>0,77</b>	<b>2,83</b>	<b>0,05</b>	<b>0,28</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>1,33</b>	<b>0,00</b>	<b>8,80</b>	<b>0,00</b>	<b>0,25</b>	<b>0,00</b>	<b>1,00</b>	<b>0,00</b>
10 <sup>a</sup> Junho 2009	1	0,64	-	30,25	-	-	-	-	-	-	-	-	0,75	-	-
	2	0,65	5	8	5	-	-	-	0,75	-	-	-	-	-	-
	3	0,64	0,25	5,25	3	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	0,62	12,5	187,5	5	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	0,61	1,75	2,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>X Aa e Σ fungos</b>		<b>0,63</b>	<b>19,50</b>	<b>233,50</b>	<b>13,00</b>	<b>20,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,75</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,75</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
11 <sup>a</sup> Julho 2009	1	0,74	75	100	70	0	5	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	0,72	295	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	0,75	17,5	2,75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	0,72	227,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	0,78	77,5	-	5	7,5	-	5	-	-	-	-	-	-	-
<b>X Aa e Σ fungos</b>		<b>0,74</b>	<b>692,50</b>	<b>103,25</b>	<b>75,00</b>	<b>7,50</b>	<b>5,00</b>	<b>5,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
<b>Contagem Total X 10<sup>4</sup> UFC/g</b>															
<b>Σ Total<sup>3</sup></b>			<b>744,23</b>	<b>488,88</b>	<b>187,60</b>	<b>58,53</b>	<b>33,80</b>	<b>26,63</b>	<b>17,88</b>	<b>14,05</b>	<b>10,53</b>	<b>6,00</b>	<b>5,38</b>	<b>1,65</b>	<b>0,38</b>

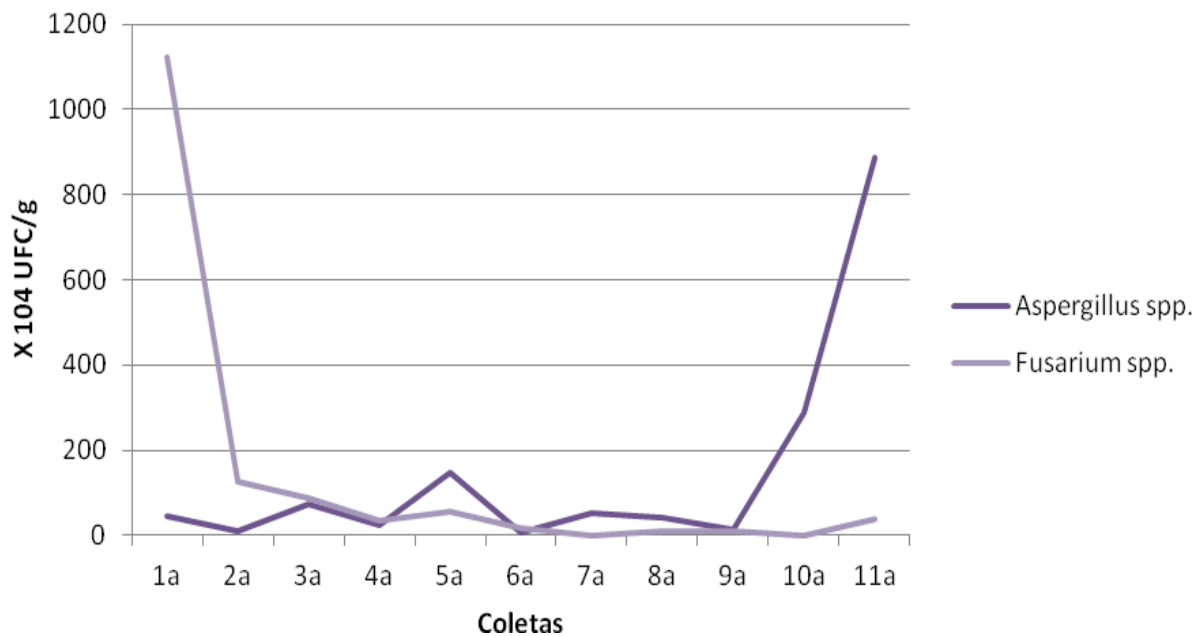
<sup>1</sup>Média de Aa das amostras, <sup>2</sup>Somatório dos fungos, <sup>3</sup>Somatório dos fungos totais, \*Fungos não esporulados.

**Figura 18-** Representação gráfica das frequências absoluta ( $\times 10^4$  UFC/g) dos gêneros fúngicos mais isolados de 55 amostras de cascas de castanha-do-brasil, provenientes de Itacoatiara, AM, no período de setembro de 2008 a julho de 2009.



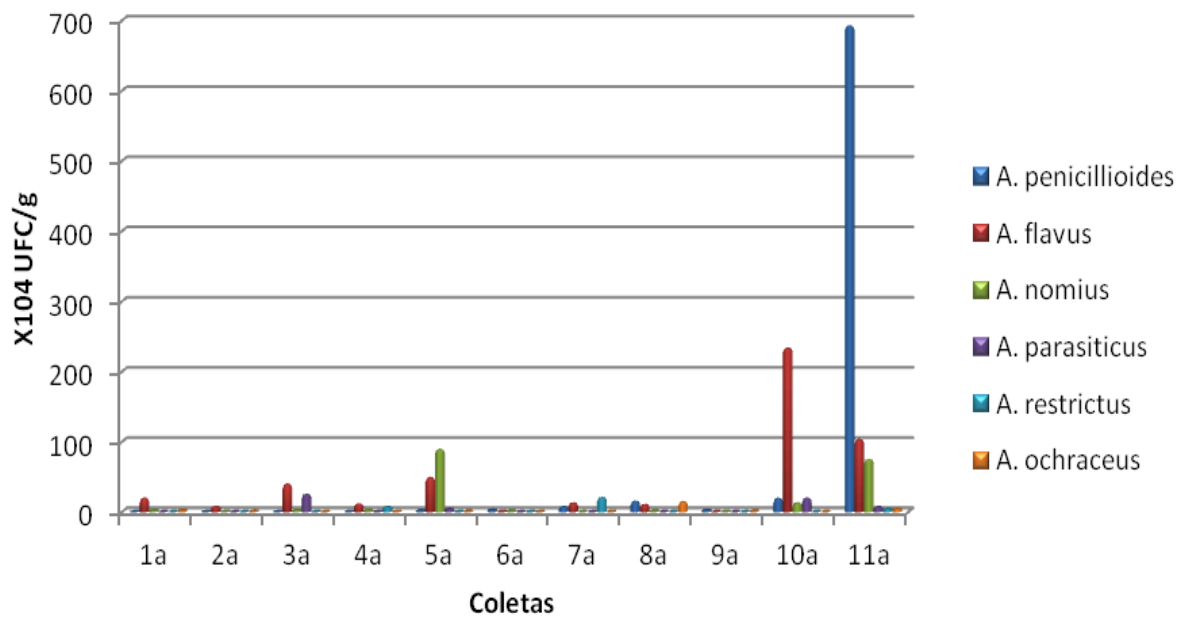
Fonte: Baquião, 2012.

**Figura 19-** Representação gráfica do de unidades formadoras de colônias dos gêneros *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp. em amostras de cascas de castanha-do-brasil, Itacoatiara, AM, no período de setembro de 2008 a julho de 2009.



Fonte: Baquião, 2012.

**Figura 20-** Representação gráfica das frequências absoluta ( $\times 10^4$  UFC/g) das espécies de *Aspergillus* mais isoladas de 55 amostras de cascas de castanha-do-brasil, provenientes de Itacoatiara, AM, no período de setembro de 2008 a julho de 2009.



Fonte: Baquião, 2012.

### 5.2.2 Isolamento e identificação fúngica das amostras de amêndoas de castanha-do-brasil

Nas amostras de amêndoas foram encontrados os seguintes fungos totais: *Aspergillus* spp. ( $1528,13 \times 10^4$  UFC/g), *Penicillium* spp. ( $661,00 \times 10^4$  UFC/g), *Fusarium* spp. ( $328,20 \times 10^4$  UFC/g), *Acremonium* spp. ( $66,9 \times 10^4$  UFC/g), FNE ( $55,23 \times 10^4$  UFC/g), *Cladosporium* spp. ( $76,1 \times 10^4$  UFC/g), *Mucor* spp. ( $50,25 \times 10^4$  UFC/g), *Eurotium* spp. ( $44 \times 10^4$  UFC/g), *Rhizopus* spp. ( $15,5 \times 10^4$  UFC/g), *Trichoderma* spp. ( $12,5 \times 10^4$  UFC/g), *Verticillium* spp. ( $9,2 \times 10^4$  UFC/g), *Paecilomyces* spp. ( $1,7 \times 10^4$  UFC/g), *Neurospora* spp. ( $0,5 \times 10^4$  UFC/g), *Geotrichum* spp. ( $0,43 \times 10^4$  UFC/g) e *Neurotium* spp. ( $0,25 \times 10^4$  UFC/g).

Nas amêndoas, o gênero *Aspergillus* spp. apresentou número de unidades formadoras de colônia (UFC/g) variando entre  $0,08 \times 10^4$  UFC/g e  $225,0 \times 10^4$  UFC/g. Neste substrato a Aa variou entre 0,50 a 0,83 (Tabela 12).

O gênero *Fusarium* foi isolado predominantemente nas coletas iniciais (primeira e terceira), apresentando valores  $227,5$  e  $0,28 \times 10^4$  UFC/g, respectivamente. Na quarta coleta o fungo predominante foi *Penicillium* ( $14,55 \times 10^4$  UFC/g). A partir da quinta coleta, houve predominância de isolados do gênero *Aspergillus* spp., variando entre  $0,08$  e  $217,5 \times 10^4$  UFC/g. (Figuras 21 e Figura 22).

Dentro do gênero *Aspergillus* foram isoladas as seguintes espécies: *A. flavus* ( $439,5 \times 10^4$  UFC/g), *A. nomius* ( $261,05 \times 10^4$  UFC/g), *A. parasiticus* ( $30,75 \times 10^4$  UFC/g), *A. penicillioides* ( $565,83 \times 10^4$  UFC/g), *A. niger* ( $98,55 \times 10^4$  UFC/g), *A. wentii* ( $78,53 \times 10^4$  UFC/g), *A. restrictus* ( $18,15 \times 10^4$  UFC/g), *A. terreus* ( $16,28 \times 10^4$  UFC/g), *A. ochraceus* ( $11,75 \times 10^4$  UFC/g), *A. ornatus* ( $4,75 \times 10^4$  UFC/g), *A. glaucus* ( $2,5 \times 10^4$  UFC/g) e *A. versicolor* ( $0,5 \times 10^4$  UFC/g).

*A. flavus* foi uma das espécies mais isoladas em todas as coletas, notadamente nas etapas (sétima a décima coleta). As espécies aflatoxigênicas foram isoladas somente a partir da quarta coleta, com aumento significativo do número de unidade formadora de colônias nas últimas fases (Tabela 13 e Figura 23). Nas castanhas, as espécies potencialmente aflatoxigênicas apresentaram grau de contaminação variando de  $1,27$  a  $148,5 \times 10^4$  UFC/g

(*A. flavus*); 0,25 a  $165 \times 10^4$  (*A. parasiticus*); e 0,25 a  $68,5 \times 10^4$  UFC/g, (*A. nomius*).  
Dentre os isolados de *A. flavus* 54,9% (72/131) foram produtores de aflatoxinas.



**Tabela 12-** Unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g X 10<sup>4</sup>) dos gêneros fungicos isolados de 55 amostras de amêndoas de castanha-do-brasil, provenientes de Itacoatiara, AM, no período de setembro de 2008 a julho de 2009.

		Contagem X 10 <sup>4</sup> UFC/g															
Coleta	Amostra	Aa	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Acremonium</i> spp.	FNE*	<i>Mucor</i> spp.	<i>Eurotium</i> spp.	<i>Cladosporium</i> spp.	<i>Rhizopus</i> spp.	<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Verticillium</i> spp.	<i>Paecilomyces</i> spp.	<i>Neurospora</i> spp.	<i>Geotrichum</i> spp.	
1 <sup>a</sup> Setembro 2008	1	0,50	2,5	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2	0,56		117,5	227,5	-	-	-	-	2,5	-	-	-	-	-	-	
	3	0,57		2,5	7,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	4	0,54		95	10,75	37,5	-	-	-	2	-	-	-	1	-	-	
	5	0,50	10	0,5	7,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>X Aa<sup>1</sup> e Σ fungos<sup>2</sup></b>		<b>0,53</b>	<b>12,5</b>	<b>215,5</b>	<b>253,25</b>	<b>37,5</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>4,5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	
2 <sup>a</sup> Outubro 2008	1	0,59	1,5	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2	0,59	6,75	3	2,75	-	-	-	0,25	3,75	-	-	-	-	-	-	
	3	0,54	2,3	0,05	1,63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	4	0,51	11,5	0,25	0,25	-	-	-	-	8,25	-	-	-	-	-	-	
	5	0,55	1,25	-	0,15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>X Aa e Σ fungos</b>		<b>0,55</b>	<b>23,3</b>	<b>3,3</b>	<b>6,78</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,25</b>	<b>12</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	
3 <sup>a</sup> Novembro 2008	1	0,62	0,3	4,25	2,25	0,25	2,125	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2	0,65	1,55	-	10,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	3	0,63	2,75	3,25	6,75	-	3	-	-	1,25	0,5	-	-	-	-	-	
	4	0,64	0,78	-	0,28	-	0,65	-	-	0,25	-	-	-	-	-	-	
	5	0,61	1	0,03	2,8	-	5,55	-	-	2,5	-	-	-	-	-	-	
<b>X Aa e Σ fungos</b>		<b>0,63</b>	<b>6,38</b>	<b>7,53</b>	<b>22,98</b>	<b>0,25</b>	<b>11,33</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>0,5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	
4 <sup>a</sup> Dezembro 2008	1	0,57	5,05	0,05	0,075	-	0,55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2	0,68	0,28	4,75	1,5	-	2	-	-	0,5	-	-	-	-	-	-	
	3	0,56	3	5,75	-	-	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	4	0,63	0,5	1,5	0,25	-	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	5	0,59	1,25	2,5	0,325	-	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>X Aa e Σ fungos</b>		<b>0,61</b>	<b>10,08</b>	<b>14,55</b>	<b>2,15</b>	<b>0</b>	<b>3,8</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	
5 <sup>a</sup> Janeiro 2009	1	0,70	15,5	2,5	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2	0,66	1,75	2	1,675	0,5	-	-	-	0,05	-	-	-	-	-	-	
	3	0,63	32,75	11,75	8,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	4	0,58	15,25	5	-	-	-	-	-	0,25	-	-	-	-	-	-	
	5	0,55	1,1	0,7	0,025	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7	-	-	
<b>X Aa e Σ fungos</b>		<b>0,62</b>	<b>66,35</b>	<b>21,95</b>	<b>17,95</b>	<b>0,5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,7</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	

Contagem X 10 <sup>4</sup> UFC/g																
Coleta	Amostra	Aa	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Acremonium</i> spp.	FNE	<i>Mucor</i> spp.	<i>Eurotium</i> spp.	<i>Cladosporium</i> spp.	<i>Rhizopus</i> spp.	<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Verticillium</i> spp.	<i>Paecilomyces</i> spp.	<i>Neurospora</i> spp.	<i>Geotrichum</i> spp.
6 <sup>a</sup> Fevereiro 2009	1	0,75	0,75	0,25	0,725	-	1,6	-	-	0,75	-	-	-	-	-	-
	2	0,77	0,08	0,35	3,225	-	0,25	-	-	-	-	-	-	-	0,25	-
	3	0,75	5,05	0,73	0,4	-	-	-	-	0,03	-	-	-	-	-	-
	4	0,67	0,28	-	-	-	1,4	-	-	0,28	-	-	-	-	-	-
	5	0,70	10	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,425
<b>X Aa e Σ fungos</b>		<b>0,73</b>	<b>16,275</b>	<b>1,425</b>	<b>4,35</b>	<b>1,4</b>	<b>1,85</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1,05</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,25</b>	<b>0,43</b>
7 <sup>a</sup> Março 2009	1	0,76	35,75	1,25	11,25	27,25	-	-	-	-	-	0,25	-	-	-	-
	2	0,72	20,75	24,75	-	-	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	0,68	3	32,5	-	-	-	47,5	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	0,65	12,75	52,5	-	-	-	-	-	1,75	-	-	9,2	-	0,25	-
	5	0,62	155	1	0,25	-	-	2,75	-	2,5	-	-	-	-	-	-
<b>X Aa e Σ fungos</b>		<b>0,69</b>	<b>227,25</b>	<b>112</b>	<b>11,5</b>	<b>27,25</b>	<b>0,25</b>	<b>50,25</b>	<b>0</b>	<b>4,25</b>	<b>0</b>	<b>0,25</b>	<b>9,2</b>	<b>0</b>	<b>0,25</b>	<b>0</b>
8 <sup>a</sup> Abril 2009	1	0,75	12,5	22,25	0,5	-	20,75	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	0,77	3,5	6,25	0,5	-	-	-	0,25	-	-	-	-	-	-	-
	3	0,75	12	8,25	0,25	-	2,5	-	-	3,25	-	-	-	-	-	-
	4	0,67	20	3,75	7	-	6,25	-	-	0,5	-	-	-	-	-	-
	5	0,70	8,75	3,5	-	-	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>X Aa e Σ fungos</b>		<b>0,73</b>	<b>56,75</b>	<b>44</b>	<b>8,25</b>	<b>0</b>	<b>30</b>	<b>0</b>	<b>0,25</b>	<b>3,75</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
9 <sup>a</sup> Maio 2009	1	0,83	42	19,5	-	-	-	-	11	-	-	12,25	-	-	-	-
	2	0,80	17,75	13,75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	0,77	217,5	137,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	0,78	23,5	10	-	-	1,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	0,80	47,5	-	1	-	0,75	-	-	10,25	-	-	-	-	-	-
<b>X Aa e Σ fungos</b>		<b>0,80</b>	<b>348,25</b>	<b>180,75</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>2,25</b>	<b>0</b>	<b>11</b>	<b>10,25</b>	<b>0</b>	<b>12,25</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
10 <sup>a</sup> Junho 2009	1	0,67	9,75	2,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	0,68	10,75	6,75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	0,66	24,5	5	-	-	-	-	-	2,5	-	-	-	-	-	-
	4	0,65	30,25	2,5	-	-	-	-	27,5	-	15	-	-	-	-	-
	5	0,66	17,5	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>X Aa e Σ fungos</b>		<b>0,66</b>	<b>92,75</b>	<b>17,5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>27,5</b>	<b>2,5</b>	<b>15</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
11 <sup>a</sup> Julho 2009	1	0,78	23,25	7,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	0,77	225	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	0,76	225	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	0,77	65	5	-	-	0,75	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	0,76	130	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-
<b>X Aa e Σ fungos</b>		<b>0,77</b>	<b>668,25</b>	<b>42,5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,75</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Contagem Total X 10<sup>4</sup> UFC/g</b>																
<b>Σ Total<sup>3</sup></b>			<b>1528,13</b>	<b>661,00</b>	<b>328,20</b>	<b>66,90</b>	<b>55,23</b>	<b>50,25</b>	<b>44,00</b>	<b>43,10</b>	<b>15,50</b>	<b>12,50</b>	<b>9,20</b>	<b>1,70</b>	<b>0,50</b>	<b>0,43</b>

<sup>1</sup>Média de Aa das amostras, <sup>2</sup>Somatório dos fungos, <sup>3</sup>Somatório dos fungos totais, \*Fungos não esporulados.

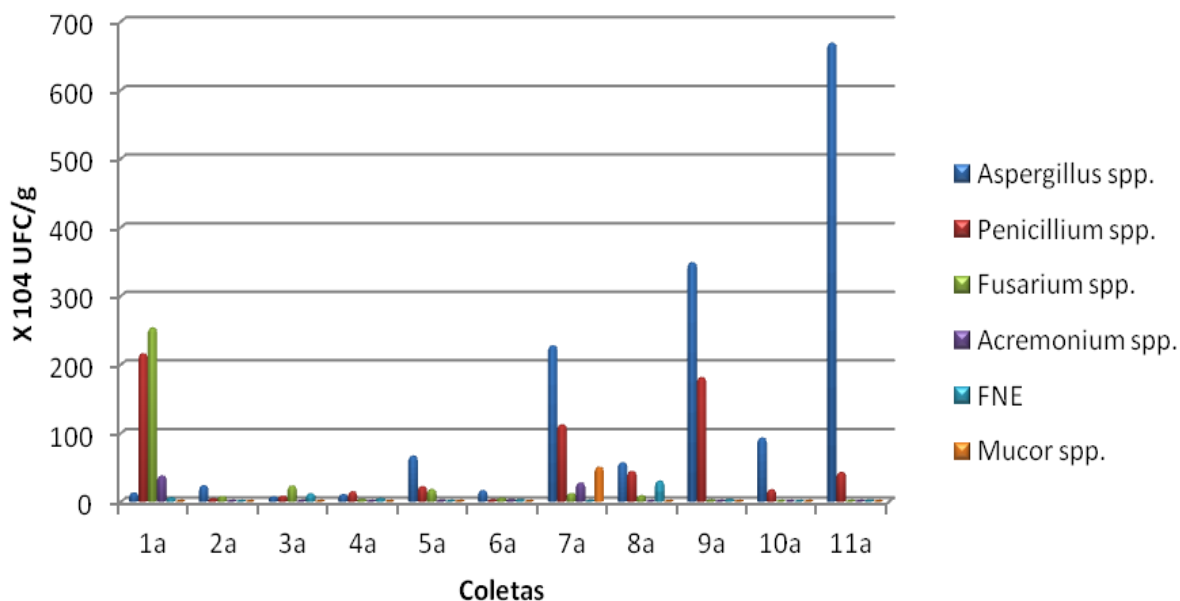
**Tabela 13-** Unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g X 10<sup>4</sup>) das espécies de *Aspergillus* isoladas de 55 amostras de amêndoas de castanha-do-brasil, provenientes de Itacoatiara, AM, no período de setembro de 2008 a julho de 2009.

		Contagem X 10 <sup>4</sup> UFC/g													
Coleta	Amostra	Aa	A. <i>penicillioides</i>	A. <i>flavus</i>	A. <i>nomius</i>	A. <i>niger</i>	A. <i>wentii</i>	A. <i>parasiticus</i>	A. <i>restrictus</i>	A. <i>ochraceus</i>	A. <i>ornatus</i>	A. <i>glaucus</i>	A. <i>terreus</i>	A. <i>versicolor</i>	
1 <sup>a</sup> Setembro 2008	1	0,50	-	2,50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2	0,56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	3	0,57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	4	0,54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	5	0,50	-	10,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>X Aa<sup>1</sup> e Σ fungos<sup>2</sup></b>		<b>0,53</b>	<b>0,00</b>	<b>12,50</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	
2 <sup>a</sup> Outubro 2008	1	0,59	-	1,50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2	0,59	3,75	0,50	-	-	2,50	-	-	-	-	-	-	-	
	3	0,54	2,05	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	4	0,51	-	-	-	-	-	-	-	11,50	-	-	-	-	
	5	0,55	-	1,00	-	-	-	-	0,25	-	-	-	-	-	
<b>X Aa e Σ fungos</b>		<b>0,55</b>	<b>5,80</b>	<b>3,25</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>2,50</b>	<b>0,00</b>	<b>0,25</b>	<b>11,50</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	
3 <sup>a</sup> Novembro 2008	1	0,62	-	0,05	-	-	-	-	0,25	-	-	-	-	-	
	2	0,65	0,80	0,25	-	-	-	-	0,50	-	-	-	-	-	
	3	0,63	0,75	2,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	4	0,64	-	0,13	-	-	-	-	0,65	-	-	-	-	-	
	5	0,61	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>X Aa e Σ fungos</b>		<b>0,63</b>	<b>2,55</b>	<b>2,43</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>1,40</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	
4 <sup>a</sup> Dezembro 2008	1	0,57	3,00	1,00	1,05	-	-	0,00	-	-	-	-	-	-	
	2	0,68	-	0,28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	3	0,56	-	-	-	-	-	0,50	2,50	-	-	-	-	-	
	4	0,63	-	-	0,25	-	-	-	-	0,25	-	-	-	-	
	5	0,59	-	-	-	-	-	-	1,25	-	-	-	-	-	
<b>X Aa e Σ fungos</b>		<b>0,61</b>	<b>3,00</b>	<b>1,28</b>	<b>1,30</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,50</b>	<b>3,75</b>	<b>0,25</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	
5 <sup>a</sup> Janeiro 2009	1	0,70	-	-	-	-	-	0,25	-	-	-	-	15,25	-	
	2	0,66	0,50	1,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	3	0,63	30,00	2,75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	4	0,58	-	-	-	15,25	-	-	-	-	-	-	-	-	
	5	0,55	-	0,53	-	0,55	-	-	-	-	-	-	0,03	-	
<b>X Aa e Σ fungos</b>		<b>0,6</b>	<b>30,5</b>	<b>4,525</b>	<b>0</b>	<b>15,8</b>	<b>0</b>	<b>0,25</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>15,275</b>	<b>0</b>	

Contagem X 10 <sup>4</sup> UFC/g														
Coleta	Amostra	Aa	A. <i>penicillioides</i>	A. <i>flavus</i>	A. <i>nomius</i>	A. <i>niger</i>	A. <i>wentii</i>	A. <i>parasiticus</i>	A. <i>restrictus</i>	A. <i>ochraceus</i>	A. <i>ornatus</i>	A. <i>glaucus</i>	A. <i>terreus</i>	A. <i>versicolor</i>
6 <sup>a</sup> Fevereiro 2009	1	0,75	0,75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	0,77	0,075	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	0,75	0,05	2,5	-	-	-	-	-	-	-	2,5	-	-
	4	0,67	-	0,25	-	-	0,025	-	-	-	-	-	-	-
	5	0,70	0,1	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>X Aa e Σ fungos</b>		<b>0,73</b>	<b>0,975</b>	<b>12,775</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,025</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2,5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
7 <sup>a</sup> Março 2009	1	0,76	3,25	32,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	0,72	10	7,5	2,5	0,25	-	0	-	-	-	-	-	0,5
	3	0,68	2,75	-	-	-	-	-	0,25	-	-	-	-	-
	4	0,65	12,5	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	0,62	29,25	58,25	-	-	67,5	-	-	-	-	-	-	-
<b>X Aa e Σ fungos</b>		<b>0,69</b>	<b>57,75</b>	<b>98,5</b>	<b>2,5</b>	<b>0,25</b>	<b>67,5</b>	<b>0</b>	<b>0,25</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,5</b>
8 <sup>a</sup> Abril 2009	1	0,75	0,25	12,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	0,77	-	0,5	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	0,75	-	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	0,67	5	10	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	0,70	-	4	-	-	-	-	-	-	4,75	-	-	-
<b>X Aa e Σ fungos</b>		<b>0,73</b>	<b>5,25</b>	<b>38,75</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>4,75</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
9 <sup>a</sup> Maio 2009	1	0,83	-	42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	0,80	12,75	4	0,25	-	-	0,75	-	-	-	-	-	-
	3	0,77	-	80	60	77,5	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	0,78	-	22,5	1	-	-	0	-	-	-	-	-	-
	5	0,80	7,5	-	40	-	-	0	-	-	-	-	-	-
<b>X Aa e Σ fungos</b>		<b>0,80</b>	<b>20,25</b>	<b>148,5</b>	<b>101,25</b>	<b>77,50</b>	<b>0,00</b>	<b>0,75</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
10 <sup>a</sup> Junho 2009	1	0,67	4	-	3,25	-	-	2,5	-	-	-	-	-	-
	2	0,68	-	10,75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	0,66	15	3,75	0,5	-	2,5	1,75	-	-	-	-	1	-
	4	0,65	7,5	10,25	-	-	-	-	12,5	-	-	-	-	-
	5	0,66	-	7,25	9,25	-	1	0	-	-	-	-	-	-
<b>X Aa e Σ fungos</b>		<b>0,66</b>	<b>26,50</b>	<b>32</b>	<b>13,00</b>	<b>0,00</b>	<b>3,50</b>	<b>4,25</b>	<b>12,50</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>1,00</b>	<b>0,00</b>
11 <sup>a</sup> Julho 2009	1	0,78	20,75	-	-	-	-	2,5	-	-	-	-	-	-
	2	0,77	137,5	62,5	17,5	-	-	7,5	-	-	-	-	-	-
	3	0,76	115	-	105	-	5	0	-	-	-	-	-	-
	4	0,77	27,5	22,5	-	-	-	15	-	-	-	-	-	-
	5	0,76	112,5	-	17,5	-	-	0	-	-	-	-	-	-
<b>X Aa e Σ fungos</b>		<b>0,77</b>	<b>413,25</b>	<b>85,00</b>	<b>140,00</b>	<b>0,00</b>	<b>5,00</b>	<b>25,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
<b>Contagem Total X 10<sup>4</sup> UFC/g</b>														
<b>Σ Total<sup>3</sup></b>			<b>565,83</b>	<b>434,98</b>	<b>261,05</b>	<b>82,75</b>	<b>78,53</b>	<b>30,50</b>	<b>18,15</b>	<b>11,75</b>	<b>4,75</b>	<b>2,50</b>	<b>16,28</b>	<b>0,50</b>

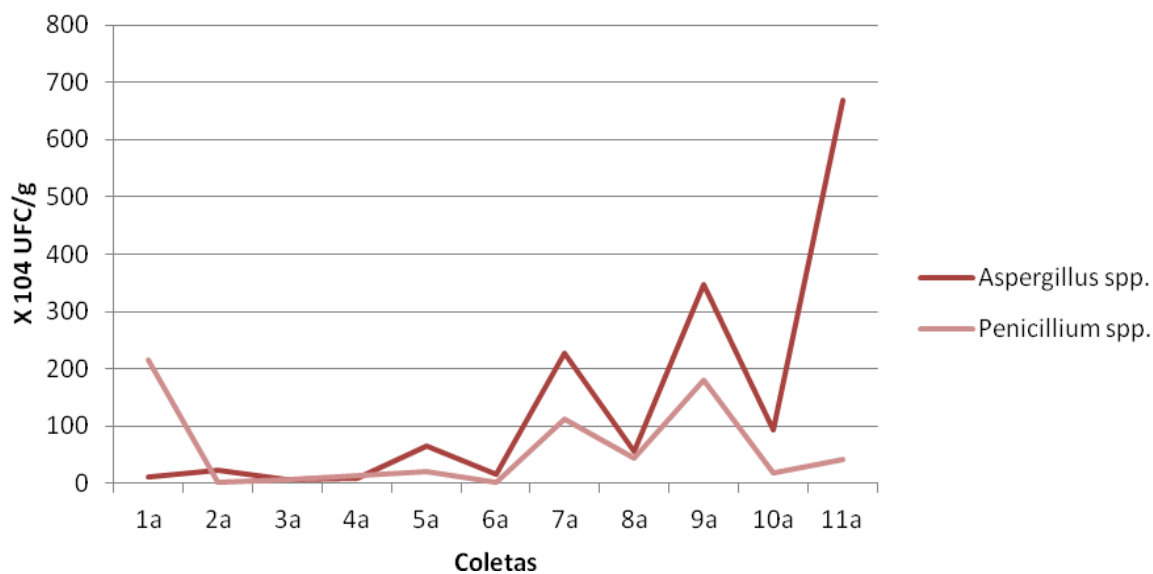
<sup>1</sup>Aa das amostras, <sup>2</sup>Somatório dos fungos, <sup>3</sup>Somatório dos fungos totais, \*Fungos não esporulados.

**Figura 21-** Representação gráfica das frequências absoluta ( $\times 10^4$  UFC/g) dos gêneros fúngicos mais isolados de 55 amostras de amêndoas de castanha-do-brasil, provenientes de Itacoatiara, AM, no período de setembro de 2008 a julho de 2009.



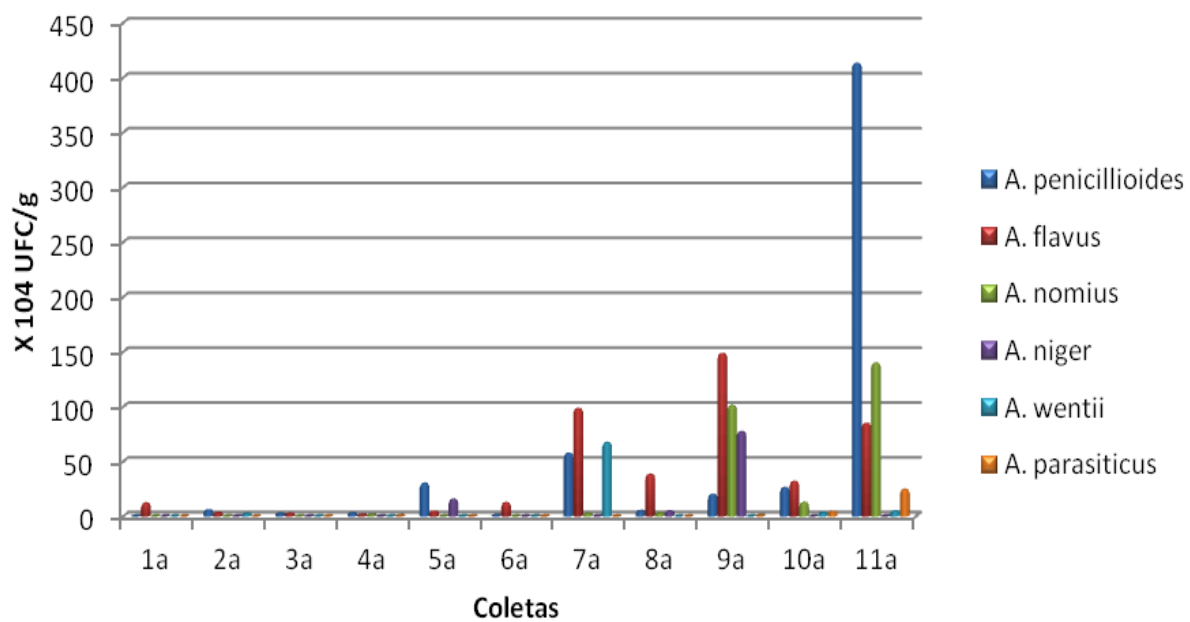
Fonte: Baquião, 2012.

**Figura 22-** Representação gráfica do de unidades formadoras de colônias dos gêneros *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp. em amostras de amêndoas de castanha-do-brasil, Itacoatiara, AM, no período de setembro de 2008 a julho de 2009.



Fonte: Baquião, 2012.

**Figura 23-** Representação gráfica das frequências absoluta ( $\times 10^4$  UFC/g) das espécies de *Aspergillus* mais isoladas de 55 amostras de amêndoas de castanha-do-brasil, provenientes de Itacoatiara, AM, no período de setembro de 2008 a julho de 2009.



Fonte: Baquião, 2012.

### 5.2.3 Atividade de água e dados climatológicos

Durante período experimental de armazenamento, os valores de atividade de água (Aa) das amostras variaram de 0,8 a 0,48 nas cascas e 0,83 e 0,5 nas amêndoas de castanha-do-brasil.

Neste mesmo período, os dados climatológicos registrados revelaram dias quentes, com temperaturas entre 28 e 26,2 °C, a precipitação pluvial entre 87,4 e 79 mm e umidade relativa do ar entre 18,9 e 2,4% (Tabela 14).

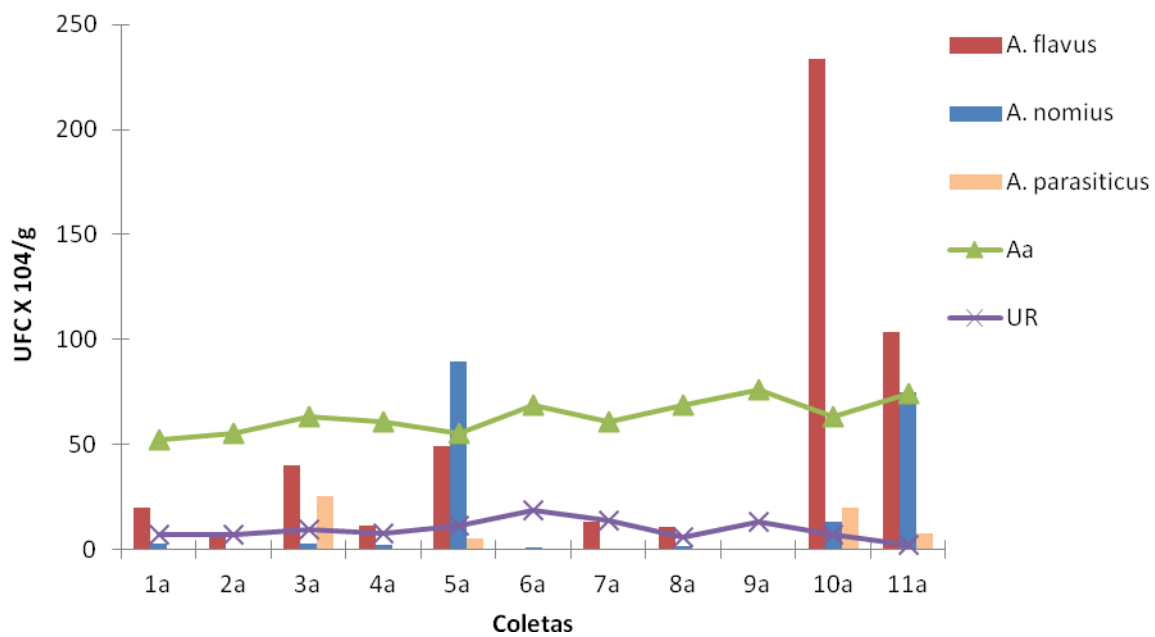
Os valores de elevada umidade relativa do ar constatados, refletiram em aumento da Aa gradativa das amostras, bem como na frequência absoluta de isolados de *Aspergillus* seção *Flavi* no mesmo período de estudo (Figura 24).

**Tabela 14-** Unidades formadoras de colônia de *Aspergillus flavus* ( $\times 10^4$  UFC/g) em 110 amostras de castanhas-do-brasil (55 cascas e 55 amêndoas) coletadas durante período de armazenamento, valores médios de atividade de água (Aa), temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), umidade relativa do ar (URA) e precipitação pluvial(mm) no período entre setembro de 2008 e julho de 2009, Itacoatiara, Amazonas.

ARMAZENAMENTO												
Data	Coleta	Aa		Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	URA (%)	Precipitação Pluvial (mm)	<i>A. flavus</i> (UFC $\times 10^4$ /g)		<i>A. nomius</i> (UFC $\times 10^4$ /g)		<i>A. parasiticus</i> (UFC $\times 10^4$ /g)	
		amêndoa	casca				amêndoa	casca	amêndoa	casca	amêndoa	casca
Set/08	1 <sup>a</sup>	0,53	0,52	27,8	7,2	79	12,5	20	0	2,5	0	0
Out/08	2 <sup>a</sup>	0,55	0,55	27,7	7,3	80	3,25	7,7	0	0,1	0	0
Nov/08	3 <sup>a</sup>	0,63	0,63	27,5	9,4	82,7	2,43	40	0	2,75	0	25,5
Dez/08	4 <sup>a</sup>	0,6	0,61	27,1	7,4	83,9	1,28	11,25	1,3	2,25	0,5	0,28
Jan/09	5 <sup>a</sup>	0,62	0,55	26,6	11,1	87	4,53	49,25	0	89,35	0,25	5
Fev/09	6 <sup>a</sup>	0,72	0,69	26,2	18,9	87,4	12,78	0,33	0	1,08	0	0
Mar/09	7 <sup>a</sup>	0,68	0,61	26,7	13,5	85,2	98,5	13,05	2,5	0,02	0	0
Abr/09	8 <sup>a</sup>	0,72	0,69	27	6	85	38,75	10,5	3	1,25	0	0,25
Mai/09	9 <sup>a</sup>	0,79	0,76	26,7	12,9	85	148,5	0,05	101,25	0,28	0,75	0
Jun/09	10 <sup>a</sup>	0,66	0,63	26,9	6,8	84	32	233,5	13	13	4,25	20
Jul/09	11 <sup>a</sup>	0,76	0,74	28	2,4	79	85	103,25	140	75	25	7,5



**Figura 24-** Representação gráfica da frequência de cepas de *Aspergillus* seção *Flavi* durante etapa de armazenamento e relação com Aa e UR, entre setembro de 2008 e julho de 2009, Itacoatiara, Amazonas.



Fonte: Baquião, 2012.

### 5.3 Determinação dos níveis de selênio

Nossos estudos revelaram a presença de selênio em todas as amostras de amêndoas de castanha-do-brasil com valores entre 30,64 e 139,35  $\mu\text{g/g}$  (Tabela 15).

**Tabela15-** Valores da concentração de selênio (mg/g) nas amêndoas de castanha-do-brasil coletadas a campo e no armazenamento.

CAMPO			ARMAZENAMENTO								
Coletas	Amostras	Selênio (mg/g)	Coletas	Amostras	Selênio (mg/g)	Coletas	Amostras	Selênio (mg/g)	Coletas	Amostras	Selênio (mg/g)
Dia 0	1	62,54	1 <sup>a</sup>	1	49,88	5 <sup>a</sup>	1	76,91	9 <sup>a</sup>	1	54,43
	2	111,84		2	52,05		2	67,31		2	73,89
	3	39,85		3	48,19		3	75,52		3	80,82
	4	125,42		4	51,00		4	93,56		4	48,19
	5	91,47		5	20,73		5	52,43		5	84,25
		<b>Média</b>	<b>86,22</b>		<b>Média</b>	<b>44,37</b>		<b>Média</b>	<b>73,15</b>		<b>Média</b>
Dia 5	1	30,64	2 <sup>a</sup>	1	57,41	6 <sup>a</sup>	1	48,63	10 <sup>a</sup>	1	69,27
	2	53,86		2	59,12		2	66,32		2	72,95
	3	73,39		3	59,30		3	65,18		3	80,59
	4	93,75		4	68,33		4	72,89		4	93,97
	5	122,31		5	59,68		5	49,56		5	80,89
		<b>Média</b>	<b>74,79</b>		<b>Média</b>	<b>60,77</b>		<b>Média</b>	<b>60,51</b>		<b>Média</b>
Dia 10	1	55,09	3 <sup>a</sup>	1	60,83	7 <sup>a</sup>	1	139,35	11 <sup>a</sup>	1	59,64
	2	65,68		2	95,69		2	38,14		2	53,23
	3	39,53		3	73,27		3	82,29		3	61,15
	4	60,84		4	136,34		4	48,42		4	74,54
	5	62,57		5	49,10		5	65,55		5	44,57
		<b>Média</b>	<b>56,74</b>		<b>Média</b>	<b>83,05</b>		<b>Média</b>	<b>74,75</b>		<b>Média</b>
Dia 15	1	39,74	4 <sup>a</sup>	1	76,81	8 <sup>a</sup>	1	56,09			
	2	43,49		2	54,53		2	67,17			
	3	51,78		3	110,26		3	39,05			
	4	81,71		4	57,81		4	40,30			
	5	93,16		5	84,92		5	45,26			
		<b>Média</b>	<b>61,98</b>		<b>Média</b>	<b>76,87</b>		<b>Média</b>	<b>49,57</b>		

## 5.4 Micotoxinas

### 5.4.1 Otimização da técnica de CLAE para detecção de aflatoxinas

#### 5.4.1.1 Padrões de aflatoxinas

Os padrões de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>, adquiridos junto à Sigma, foram ressuspendidos em solução de benzeno:acetonitrila (98:2, v:v), aferidos e quantificados em espectrofotômetro DU 640 (Beckman, EUA). A solução com concentração de 1 µg/ml foi utilizada nas atividades propostas.

#### 5.4.1.2 Derivação química

O processo de derivação química com ácido trifluoracético e hexano tem por finalidade a conversão das aflatoxinas B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub>, em B<sub>2a</sub> e G<sub>2a</sub>, respectivamente, o que potencializa a capacidade de fluorescência e também a confirma a presença das toxinas.

Foram testados diferentes protocolos de derivação, bem como modificações dos mesmos (CASTRO et al., 2009; KHAYOON et al., 2009; TARIN et al., 2004; e SCOTT et al., 1990), e o protocolo de derivação eleito, por apresentar os melhores resultados em nossas condições laboratoriais, foi baseado em Scott et al. (1990) e segue descrito abaixo.

Foram acrescentados 200 µL de hexano (Mallinckrodt) e 100 µL de ácido trifluoracético (TFA), marca Sigma, na amostra extraída e na solução padrão de aflatoxinas previamente seca, contidas em frasco âmbar. Esta solução foi homogeneizada manualmente e aquecida em termobloco (Marconi), à temperatura de 40 °C durante 15 minutos. Após este procedimento, a solução foi evaporada a resíduo em nitrogênio líquido e mantida à temperatura de -20 °C até processamento cromatográfico.

#### 5.4.1.3 CLAE para aflatoxinas

Na etapa de extração de aflatoxinas foram testados diferentes protocolos, dentre eles método descrito por Trucksess et al. (1991), algumas modificações sugeridas pela VICAM

(USA) e o método preconizado por Stroka e Anklam (2000). Entretanto, o método eleito por apresentar melhores resultados foi baseado em Tanaka et al. (2002) com modificações de Lebret et al. (2004).

Foram testadas diferentes formulações de fase móvel (CASTRO et al., 2009; KHAYOON et al., 2009; TARIN et al., 2004; AKIYAMA et al., 2001 e SCOTT et al., 1990) e foi eleita, dentro das condições laboratoriais presentes, a fase móvel baseada em trabalho de Scott et al. (1990), que consiste na seguinte solução: acetonitrila: metanol: água (1,5:1,5:8, v/v/v), 1% TFA. Antes de ser acoplada ao CLAE, a solução da fase móvel foi submetida a ultrassom (Thornton) durante 1 hora, a fim de eliminar possíveis bolhas de ar, que pudessem comprometer o bom desempenho do cromatógrafo.

#### 5.4.1.4 Curva de calibração

A partir da solução de 1µg/ml de padrão das quatro aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> em cada matriz analisada (amêndoa, casca e ouriço de castanha-do-brasil), foram realizadas diluições seriadas com as concentrações de cada aflatoxina de 10; 5; 2,5; 1,25; e 0,625 ng/mL, que correspondem a 2; 1; 0,5; 0,25; e 0,125 ppb; respectivamente. O cálculo das concentrações foi realizado considerando o valor em partes por bilhão (ppb) e considerando valor da toxina em 1 grama de substrato final após o processo de extração de aflatoxinas.

Os padrões foram derivados e ressuspendidos conforme descrito anteriormente; e cada ponto foi injetado em quintuplicata.

Os coeficientes de correlação ( $r^2$ ) obtidos para aflatoxina G<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> e B<sub>2</sub> foram 0,999 para cada aflatoxina.

#### 5.4.1.5 Coeficientes de recuperação

Visando verificar o método de extração de aflatoxinas, bem como a cromatografia, foi proposta a determinação do coeficiente de recuperação.

A recuperação de aflatoxinas foi realizada fortificando amostras de castanha-do-brasil, que apresentaram níveis de aflatoxinas não detectados, com solução padrão de aflatoxinas. Os testes foram realizados em quintuplicata, inoculando solução correspondente

a concentração de 5 ng/g de cada aflatoxina na matriz. A partir daí, executou-se a etapa de extração e quantificação por CLAE, previamente descritas, e foram realizados os cálculos do percentual de recuperação para cada aflatoxina.

Os coeficientes de recuperação alcançados foram para aflatoxinas B<sub>1</sub>, 80,44%; B<sub>2</sub>, 81,06%; G<sub>1</sub>, 83,28% e G<sub>2</sub>, 84,26%.

#### 5.4.1.6 Limites de quantificação e detecção

Os testes de limite de detecção e quantificação foram realizados fortificando matriz biológica com concentrações decrescentes da solução padrão contendo as aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>. As amostras fortificadas foram então submetidas à extração de aflatoxinas e, posterior análise por CLAE, até a menor concentração quantificável e detectável. Para amêndoas e cascas de castanha-do-brasil, os limites de quantificação para as 4 aflatoxinas ficou estabelecido em 1,5 ng/g; e o limite de detecção, em 0,75 ng/g. Para ouriços, os limites de quantificação foram 2,5 ng/g e os de detecção para as 4 aflatoxinas foram de 1,25 ng/g.

### 5.4.2 Análise de aflatoxinas

#### 5.4.2.1 Amostras de castanha-do-brasil

Foram realizados para cada lote de amostras analisadas por CLAE, por meio de curva de calibração, controles positivos com três concentrações: 20, 10 e 2,5 ng/g, e também controle negativo, com matriz que apresentasse níveis de aflatoxinas não detectáveis.

Todas as amostras de amêndoas, casca e ouriço de castanha-do-brasil, coletadas a campo e armazenamento não revelaram valores detectáveis que confirmassem a presença de aflatoxinas.

#### 5.4.2.2 Capacidade toxigênica das cepas de *Aspergillus* seção *Flavi*

Análise do potencial toxigênico das cepas de *Aspergillus* seção *Flavi* isoladas a campo (solo, ar, ouriço, casca e amêndoa) revelaram 56,1 % (110/196) de cepas aflatoxigênicas, com produção somente de aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> com níveis variando de 3 a 700.874 ng/g (AFB<sub>1</sub>) e de 11,4 a 4.002 ng/g (AFB<sub>2</sub>), sendo: 1) Ar: 30% (20/60), 2) Solo: 64% (16/25), 3) Ouriços: 40,8% (31/76); 4) Cascas: 63,8% (23/36); e 5) Amêndoas: 67,8% (40/59).

Foram isolados durante etapa de armazenamento de cascas e amêndoas de castanha-do-brasil 336 cepas de *Aspergillus* seção *Flavi*, sendo 84,5% (278/336) de *A. flavus*; 12,5% (42/336) de *A. nomius* e 3% (10/336) de *A. parasiticus*. O potencial toxigênico das cepas de *Aspergillus* seção *Flavi* revelou produção de AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> com níveis variando de 0,75 a 85.519,14 ng/g; 2,01 a 5.968,89 ng/g, 5,74 a 224.265,89 ng/g e 2,40 a 1.510,02 ng/g; respectivamente.

O percentual de cepas de *A. flavus* aflatoxigênicas constatados no armazenamento foi 59,1% (168/284), sendo: 1) Cascas: 62,7% (96/153) e 2) Amêndoas: 54,9% (72/131).

Na etapa de armazenamento, as cepas de *A. flavus* isoladas a partir das amêndoas, apresentaram valores máximos para aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> de 32.079,9 e 1897,0 ng/g respectivamente. As cepas de *A. parasiticus* isoladas do mesmo substrato mostraram níveis máximos de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> de 23.566,9; 267,8; 224.265,9 e 1.214,0 ng/g, respectivamente. Cepas de *A. nomius* obtiveram valores máximos de aflatoxina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> de 6.767,6; 178,3; 34.488,8 e 17.789,0, respectivamente.

As cepas de *A. flavus* isoladas de casca de castanha-do-brasil, no mesmo período, apresentaram níveis máximos de aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> de 32.079,9 e 1.897,0 respectivamente. Os isolados de *A. parasiticus* apresentaram valores máximos de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>, respectivamente, de 23.566,9; 267,8; 224.265,9 e 1.214,0 ng/g. Cepas de *A. nomius* nas mesmas condições apresentaram limite superior de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> de 6.767,6; 178,3; 34.488,8 e 17.789,0 ng/g, respectivamente.

### 5.4.3 Otimização da técnica de CLAE para detecção de ACP

#### 5.4.3.1 Padrão de ACP

O padrão de ácido ciclopiazônico utilizado nas análises foi adquirido pela empresa Sigma, ressuspendido em solução de metanol grau CLAE. Foi realizada diluição à concentração de 500 µg/ml, aferido e quantificado em espectrofotômetro DU 640 (Beckman, EUA).

#### 5.4.3.2 CLAE para ACP

Na etapa de extração de ácido ciclopiazônico foram testados diferentes protocolos (URANO et al., 1992a; HAYASHI e YOSHIKAWA, 2005; MOTA e SOARES, 2000 e MOLDES-ANAYA et al., 2009), bem como suas fases-móveis.

O método eleito que apresentou melhores resultados na etapa de otimização foi baseado no trabalho descrito por Urano et al. (1992a) com modificações.

Antes de ser acoplada ao CLAE, a solução da fase móvel e de lavagem foram submetidas à ultrassom (Thornton) durante 1 hora, a fim de eliminar possíveis bolhas de ar, que pudessem comprometer o bom desempenho do cromatógrafo. Além disso, visando evitar danos a coluna cromatográfica, antes e após a utilização da fase móvel, foi aplicada solução de lavagem composta por metanol:água (6:4).

#### 5.4.3.3 Curva de calibração

A partir da solução de 500 µg/ml de padrão de ácido ciclopiazônico nas matrizes analisadas foram realizadas diluições seriadas com as seguintes concentrações: 166; 333; 500; 666; 833 ng/g. O cálculo das concentrações foi expresso em ppb e considerou o valor da toxina em 1 grama de substrato final após o processo de extração de ácido ciclopiazônico.

Cada ponto foi injetado em sextuplicata e o coeficiente de correlação ( $r^2$ ) obtidos para ácido ciclopiazônico foi 0,997. Estes resultados demonstram que o método proposto apresenta linearidade para os analitos testados.

#### 5.4.2.4 Coeficiente de recuperação

A recuperação de ácido ciclopiazônico foi realizada fortificando amostras de castanha-do-brasil, que apresentaram níveis de ácido ciclopiazônico não detectados, com solução padrão do mesmo. Os testes foram conduzidos em quintuplicata, inoculando solução correspondente a concentração de 500 ng/g de ACP em cada matriz. A partir daí, foi procedida a extração, análise por CLAE e calculado o percentual de recuperação de ACP.

Os coeficientes de recuperação atingidos para ACP foi 93,45 % nas amêndoas, 97,71% nas cascas e 89,65% nos ouriços.

#### 5.4.3.5 Limites de quantificação e detecção

Os testes de limite de detecção e quantificação foram realizados fortificando cada matriz com concentrações decrescentes da solução padrão contendo ACP. As amostras fortificadas foram então submetidas a extração da toxina e análise em CLAE, até a menor concentração quantificável e detectável. Para amêndoas os limites de quantificação e detecção foram, respectivamente, 250 e 80 ng/g e para cascas e ouriços de castanha-do-brasil, os limites de quantificação foi 600 ng/g e o limite de detecção, 200 ng/g.

### 5.4.4 Análise de ACP

#### 5.4.4.1 Amostras de castanha-do-brasil

Foram realizados para cada lote de amostras, por meio de curva de calibração, controles positivos com três concentrações: 500, 270 e 140 ng/g, e também controle negativo, com matriz que apresentasse níveis de ACP não detectáveis.



Todas as amostras de amêndoas, casca e ouriço de castanha-do-brasil, coletadas a campo e armazenamento não revelaram a presença de ácido ciclopiazônico.

## **6 DISCUSSÃO**

Estudos nacionais e internacionais abordando a pesquisa de fungos e de micotoxinas em castanha-do-brasil, são escassos e utilizam, principalmente, amostras adquiridas no varejo proveniente, na maioria das vezes de mercados locais (FREIRE et al., 2000; BAYMAN et al., 2002; BLESÁ et al., 2004). Dados científicos que descrevem e acompanham as etapas de produção da castanha-do-brasil a campo são incipientes ou não-atuais, permanecendo ainda obscura a origem da contaminação fúngica da castanha-do-brasil. Pacheco e Scussel (2006) e Mello e Scussel (2007) sugerem que a contaminação possa acontecer a campo, ainda na floresta, ou durante o armazenamento e transporte dos frutos até seu processamento. Apesar da contaminação da castanhas-do-brasil por aflatoxinas ser um fenômeno conhecido, os pontos críticos da infecção por *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, e conseqüente produção de micotoxinas ainda não foi elucidado (MARKLINDER et al., 2005).

Os fungos anemófilos podem participar da contaminação de grãos na etapa do campo, contaminando partes aéreas da planta durante seu desenvolvimento (LINDSEY e TURNER, 1975).

No ar atmosférico, a predominância, no presente estudo, de *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e *Aspergillus flavus*, vem ao encontro dos resultados obtidos por Pozzi et al. (2005) e Almeida et al. (2002), que também constataram elevada frequência dos citados fungos em áreas de cultivo de girassol e de milho, respectivamente. Pozzi et al. (2005), detectaram no ar atmosférico frequência de isolamento do gênero *Fusarium* (68%), *Cladosporium* (66%), *Neurospora* (38%), *Penicillium* (12%), *Aspergillus* (8%), entre outros; enquanto Almeida et al. (2002) isolaram preferencialmente *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. Tais fungos, considerados como dominantes universais, também foram apontados por Gambale (1998) como os mais freqüentes no ar atmosférico de várias cidades brasileiras.

O solo agrícola pode servir de reservatório para diferentes fungos, inclusive espécies micotoxigênicas (BAYMAN e COTTY, 1991 e COTTY, 1997), que podem colonizar a planta e infectar a semente durante a emergência no solo (JACKSON e BELL, 1969). A predominância de *Penicillium* spp. e *Aspergillus flavus* já foi descrita anteriormente, no Brasil, por Almeida et al. (2002), em solos de campos de milho; Pozzi et al. (2005), em solos de plantação de girassol; e Zorzete et al. (2008), em solos de plantação

de amendoim. Estudos realizados em solo de cultivos de amendoim no estado de São Paulo, Brasil, demonstraram a presença de *Penicillium* spp. em 100 % das amostras e *A. flavus* em 8 % das amostras (GONÇALEZ et al., 2008a), e prevalência de cepas de *Penicillium* spp., *Trichoderma* spp., *Fusarium* spp. e *A. flavus* (ZORZETE, et al., 2011).

A presença de cepas de *Aspergillus* seção *Flavi*, especialmente *A. flavus*, no solo, pode resultar em perdas econômicas, como resultados da deterioração e produção de micotoxinas nas amêndoas (HILL et al., 1983).

A avaliação química do solo é considerada importante, pois a composição mineral balanceada, com níveis adequados de macro e micronutrientes, pode evitar possíveis contaminações na cultura. Uma nutrição inadequada do solo pode propiciar doenças, reduzir a produtividade e favorecer a contaminação fúngica e produção de micotoxinas (CUERO, et al., 1991, AMÉZQUITA et al., 1993).

Em castanhas-do-brasil, o tempo para maturidade fisiológica da planta, que refelete no início da produção castanheira, é acima de 12 anos, (MÜLLER et al., 1995). Isto dificulta o estabelecimento de correlação direta entre a produtividade e a composição química do solo. Além disso, por ser uma cultura basicamente extrativista, cuidados com a nutrição da terra de plantio são, quase sempre, negligenciados.

Na Agropecuária Aruanã, local onde o presente experimento foi conduzido, não é realizada a correção de minerais no solo da região dos castanhais. O pH ideal para crescimento de *Aspergillus* seção *Flavi* e produção de aflatoxinas situa-se entre 5 e 11, e 4 e 6, respectivamente. Vale ressaltar que espécies de *Aspergillus* podem crescer em ampla faixa de pH, variando de 2 a 11 e a produção de aflatoxinas pode ocorrer entre pH 2 e 8 (BUCHANAN e AYRES, 1975; ICMSF, 1996). Assim, em nosso estudo, o pH do solo apresentou valores entre 4,08 e 4,58; e se mostrou favorável ao crescimento fúngico e produção de toxinas.

Em ouriços de castanha-do-brasil, o grau de contaminação fúngica (acima  $10^6$  UFC/g), e a maior frequência de *A. flavus* e *Penicillium* spp. também foram confirmados por Arrus et. al. (2005b), analisando amostras de ouriços coletadas assepticamente da Amazônia peruana. Os autores obtiveram níveis de isolamento fúngico superiores a  $10^7$  UFC/g e predominância de isolamento de *Penicillium* spp. (93%) e, também, de *A. flavus*

(21%); e ausência de isolamento de cepas de *A. parasiticus* e *A. nomius* também foi constatada.

Nos isolados a campo, a predominância de *Fusarium* spp, em amostras de cascas de castanha-do-brasil, nas coletas iniciais, seguido pelo aumento de isolamento de *A. flavus* nas finais, também foi constatada por Gonzalez et al. (2008b). Estes pesquisadores, analisando a micobiota de cascas de amendoim em fase de granação, demonstraram a predominância de *Fusarium* spp. (78,75%), *Rhizopus* spp. (14,1%) e *A. flavus*.

Nas amêndoas coletadas a campo, o predomínio de *Aspergillus flavus*, *Penicillium* spp. e *Fusarium* spp, confirmam os resultados obtidos por Castrillon and Purchio (1988b), que constataram maior frequência de *Aspergillus* e *Penicillium*, no mesmo substrato. O não isolamento de *A. flavus* por Arrus et al. (2005b), analisando amostras de castanha-do-brasil oriundas de ouriços coletados diretamente da árvore, pode ser atribuído ao não contato entre substrato e solo. Em nossa investigação, além das amostras coletadas diretamente da castanheira, também foram analisados 3 diferentes coletas de amostras em contato com o solo (5, 10 e 15 dias). Estudo conduzido por Beuchat (1975) também indicaram presença de isolados de *A. flavus*, embora em baixa contagem (2 a 146 UFC/g) em nozes coletadas manualmente das árvores. Assim, a casca e o ouriço que envolvem a amêndoa de castanha-do-brasil, podem atuar como invólucro e apresentar função protetora parcial contra microrganismos, insetos e predadores, mas não impedem a contaminação fúngica (CASTRILLÓN e PURCHIO, 1988b).

A via de contaminação de *A. flavus* em castanha-do-brasil, até o presente momento, não foi definida. Em milho, Mills (1989), descreve duas possíveis rotas de contaminação: 1) Esporos provenientes de gramíneas e solo poderiam participar da contaminação; 2) Insetos e aves poderiam causar danos estruturais nas sementes, e esporos fúngicos trazidos pela dispersão do ar atmosférico poderiam colonizá-las. Em nossa investigação, provavelmente, o solo foi a rota de infecção mais importante para castanha-do-brasil; visto ser *A. flavus* o segundo fungo mais isolado neste substrato. Além disso, o longo tempo do ouriço em contato com o solo associado às condições climáticas da região também contribuem para a dispersão e desenvolvimento do fungo.

As análises estatísticas indicaram que a maior permanência dos ouriços com o solo aumenta a predominância de *A. flavus* ( $p=0,011$ ), alcançando até 43% de possibilidade de

contaminação por dia. Também demonstrou correlação positiva entre a presença de *A. flavus* no ouriço e na casca. ( $p= 0,008$ ).

Nossos resultados alertam para a possibilidade de transferência de cepas de *A. flavus* aflatoxigênicas do solo para as amêndoas de castanha-do-brasil, o que poderia resultar em contaminação por aflatoxinas. De acordo com Horn et al. (2005), a presença de *A. flavus* em amostras de solo, durante a coleta de frutos, sinaliza esse como reservatório primário do fungo e a presença de cepas aflatoxigênicas indicaria possibilidade de contaminação pela toxina (HILL, et al., 1983; TIRADO et al., 2010).

Após a queda dos ouriços no solo, estes podem tornar-se rapidamente contaminados por espécies de *Aspergillus* (ARRUS et al., 2005b), principalmente se o solo contiver estas cepas e houver danos estruturais nos ouriços (CASTRILÓN e PURCHIO, 1988a). Em condições naturais, o ouriço é coletado somente após sua queda, permanecendo no chão por tempo indeterminado, sendo este período crucial na contaminação por espécies de *Aspergillus* spp. (ARRUS et al., 2005b). Tais dados vêm ao encontro de nossos achados, os quais demonstraram um aumento gradativo do número de UFC/g de *A. flavus*, conforme o tempo de permanência no solo (Tabela 3), sugerindo que o solo possa atuar como a principal fonte de contaminação.

Considerando as amostras coletadas no armazenamento, foi observada diminuição logarítmica do grau de contaminação fúngica (de  $10^6$  a  $10^4$  UFC/g), devido ao processo de secagem das amostras e diminuição de Aa das mesmas. Johnsson et al. (2008) concluíram que a partir de 2 a 3 log de UFC de contaminação por *Aspergillus* seção *Flavi*, aumenta o risco de produção de aflatoxinas (superior a 4 ng/g). Entretanto, os autores sugerem que é necessário tempo de 40 a 90 dias de adaptação do fungo nas castanhas-do-brasil, mantidas as condições ótimas, para que ocorra tal produção. Além disso, após eficiente secagem das castanhas-do-brasil, espera-se que o crescimento fúngico cesse, mas conídeos e aflatoxinas já formados puderam permanecer.

A prevalência de *A. flavus* e *Penicillium* spp. em castanhas-do-brasil armazenadas, também foi confirmada por Castrillón e Purchio (1988b), em amostras provenientes de usinas de beneficiamento, mercados e feiras-livres da região do Amazonas e São Paulo; por Freire et al. (2000) pesquisando micoflora de castanha-do-brasil oriunda de mercados do município de Belém, Pará; Bayman et al. (2002), analisando amêndoas adquiridas em

varejo nos Estados Unidos; e por Pacheco et al. (2010), estudando amostras coletadas do município de Manaus, Amazônia. Pesquisas sugerem invasão prematura e colonização por *A. flavus* em amêndoas jovens, provavelmente na fase de pré-coleta (a campo) (FREIRE et al, 2000; BAYMAN et al. 2002). O embasamento desta afirmação consiste na contatação de distribuição uniforme e homogênea do fungo nas castanhas-do-brasil e pela observação de amêndoas deterioradas no interior de cascas íntegras.

Além disso, durante o armazenamento, a partir da 1ª coleta em cascas e da 4ª coleta em amêndoas foram isolados *A. parasiticus* e *A. nomius*, que se mantiveram nas coletas posteriores e se apresentavam ausentes nos isolados coletados a campo. O grau de contaminação de amêndoas de castanha-do-brasil por *A. nomius* foi descrito mais recentemente por Olsen et al. (2008), os quais isolaram 22 cepas de *A. flavus* e 3, de *A. nomius* provenientes da companhia italiana V. Besana S.p.a. e por Johnsson et al. (2008), que realizando trabalho de contaminação experimental de castanha-do-brasil por *A. nomius*, concluíram que estas espécies são os maiores produtores de aflatoxinas neste substrato.

No estudo proposto foram constatadas cepas de *A. flavus* aflatoxigênicas isoladas a partir de todos os substratos analisados, tanto a campo quanto no armazenamento. Estes resultados coincidem com os de outros autores, analisando cepas de *A. flavus* isoladas do solo, de ouriços e de amêndoas (COTY e CARDWELL, 1999; RAZZAGHI-ABYANEH et al., 2006; ARRUS et al., 2005b; CASTRILLÓN e PURCHIO, 1988b).

No solo em estudo foram isolados 64% (16/25) de cepas de *A. flavus* aflatoxigênicas, enquanto Razzaghi-Abyaneh et al. (2006) isolaram apenas 27% em solos de campo de milho. Em ouriços, isolamos 76 cepas de *A. flavus*, destas, 31 (40,8%) foram produtoras; sendo que pesquisando o mesmo substrato Arrus et al. (2005b) isolaram somente 5 cepas de *A. flavus* e 3 (60%), toxigênicas. Já Castrillón e Purchio (1988a) isolaram 18 estirpes de *A. flavus* e 16 destas (88,8%) com capacidade aflatoxigênica; enquanto nosso percentual foi de 67,8% (40/59) e 54,9% (72/131), para as amêndoas coletadas a campo e no armazenamento, respectivamente. Estes dados alertam para a quantidade de cepas aflatoxigênicas presentes no solo e a possível transferência desta para amêndoa de castanha-do-brasil, substrato notadamente favorável ao desenvolvimento de aflatoxinas.

Em relação à presença de micotoxinas nas amostras analisadas, a não detecção de aflatoxinas coincide com os achados de alguns autores (ARRUS et al., 2005b; LEONG et al., 2011; SOUZA e MENEZES, 2004; MARTINS et al., 2012). Arrus et al. (2005a), isolaram cepas *A. flavus* toxigênicas em ouriços e não encontraram aflatoxinas em ouriços e amêndoas de castanha-do-brasil; bem como Leong et al. (2010), que também detectaram aflatoxinas em 16% de amostras de amêndoas variadas, mas não constataram micotoxinas nas castanhas-do-brasil analisadas. Souza e Menezes (2004), analisando amêndoas e tortas de castanha-do-brasil provenientes de cooperativa agro-extrativista do município de Xapuri, Acre; também não detectaram aflatoxinas. Mais recentemente, Martins et al. (2012) não encontraram aflatoxinas em lotes de castanha-do-brasil, oriundos do município de Manaus, Amazonas, destinados à exportação (safra de 2009).

Outras pesquisas revelaram detecção de aflatoxinas em castanha-do-brasil por diferentes métodos, tais como fluorescência direta das amêndoas (STEINER et al., 1992), por CCD (CASTRILLÓN e PURCHIO, 1988a; FREIRE et al., 2000; CALDAS et al., 2002 e PACHECO et al., 2010), por CLAE (BLESA et al., 2004; MARKLINDER et al., 2005), e por cromatografia gasosa (MELLO e SCUSSEL, 2007).

Pacheco e Scussel (2007) ao analisarem castanha-do-brasil provenientes do município de Itacoatiara, Amazônia detectaram nível de aflatoxina total entre 2,0 e 11,5 ng/g, utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa com APCI modo íon positivo. Já em 2009, Pacheco e Scussel, analisando os mesmos substratos em casca e descascados, comprovaram aflatoxinas com níveis superiores a 4 µg/kg, em apenas 8,7% dos analisados (14/171).

Pacheco et al. (2010) detectaram aflatoxinas em 9/120 amostras de castanhas-do-brasil (lotes de 2006 e 2007), provenientes de Manaus, Amazonas, com valores acima de 4 µg/kg e 5 destas amostras com limites superiores a 30 µg/kg.

Em 2011, Vargas et al., pesquisando aflatoxinas em castanhas-do-brasil prontas para comercialização e suas frações, obtidas do Acre e Pará, detectaram valores entre 4,55 e 102,63 µg/g de aflatoxinas em 54/130 amostras testadas; e determinaram que as frações em fase de deterioração analisadas de castanha, contribuíram significativamente para os altos valores de aflatoxinas registrados. Além disso, os autores concluíram que as toxinas estavam distribuídas de forma homogênea em todas as partes das castanhas-do-brasil



(cascas e amêndoas), diferenciando das demais amêndoas, cuja distribuição concentra-se na porção comestível (amêndoa). A explicação para a detecção de aflatoxinas em cascas pode ser decorrente da ausência de boas práticas e bom extrativismo ao longo do complexo sistema de transporte e armazenamento presente na região Amazônica.

Scussel et al. (2011), propuseram a aplicação de métodos com atmosfera modificada (ozônio, dióxido de carbono e absorventes), em embalagens de castanha-do-brasil armazenadas objetivando avaliar, principalmente, o grau de degradação de aflatoxinas, o controle fúngico e estabilidade de lípidos da amêndoa. Dos tratamentos testados, único que promoveu a degradação de aflatoxinas, além de estabilidade ou inibição de crescimento de microrganismos foi a aplicação de ozônio.

A ausência de aflatoxinas em nossas amostras pode ser atribuída às boas práticas aplicadas na produção das amêndoas de castanha-do-brasil, como seleção das amêndoas e secagem prévia ao armazenamento. A extração das cascas e triagem das amêndoas visivelmente deterioradas por fungos também deve ter contribuído para a não detecção de aflatoxinas (AOAC, 2005). Já o processo de secagem teve por finalidade diminuir a Aa das amostras (BITANCOURT, 1949; AYERST e BUDD, 1960), e se mostrou eficaz no controle da produção de fungos e aflatoxinas (PACHECO e SCUSSEL, 2007; VARGAS et al., 2011). Os níveis de Aa registrados em nossas amostras a campo (0,91 a 0,99) e armazenamento (0,52 a 0,79), justificam a predominância de cepas de *Aspergillus* seção *Flavi*, principalmente em amêndoas e também explicam a ausência de aflatoxinas. De acordo com Kozakiewicz e Smith (1994) Aa mínima e ótima para crescimento de *A. flavus* é 0,71 e 0,98, respectivamente, e para produção de aflatoxinas a Aa mínima é de 0,82. Em relação à castanha-do-brasil, estudos realizados por Arrus et al. (2005a) mostraram que Aa ótima para crescimento e mínima para a produção de aflatoxinas foi de 0,91 e 0,68, respectivamente. Em nossa pesquisa a campo, apesar dos níveis de umidade poderem favorecer a produção de aflatoxinas, o reduzido tempo de permanência do fungo nos substratos (apenas 15 dias), provavelmente, não permitiu a adaptação necessária para a produção de aflatoxinas pelas cepas. Segundo Bennett et al. (1979), a produção de aflatoxinas ocorre após a fase exponencial de crescimento (idiofase). Já nas amostras armazenadas, entretanto, a produção de aflatoxinas pode ter sido comprometida pela baixa atividade de água, que não alcançou 0,80.

Além disso, outros fatores podem estar envolvidos na ausência de detecção das aflatoxinas, em amostras naturais tais como: 1) antagonismo por competição por diversas cepas fúngicas e outros microrganismos, 2) diferentes doses infectantes capazes de iniciar o processo de produção toxigênica; 3) concentração irregular da toxina no lote ou 4) combinação destes fatores (JOHNSSON et al., 2008).

A temperatura e precipitação pluvial média foram praticamente constantes durante o período experimental, porém, os valores de umidade relativa do ar mostraram variação significativa (Tabela 5). De acordo com Arrus et al. (2005a) e Pacheco e Scussel (2009) as variáveis abióticas que mais podem influenciar na produção de aflatoxinas, são a umidade relativa do ar e a temperatura. A temperatura média no local do estudo de 27 °C pode ter contribuído para desenvolvimento de cepas de *Aspergillus* seção *Flavi* (LACEY et al., 1991; ARRUS et al., 2005<sup>a</sup>; PACHECO e SCUSSEL, 2009). Os valores elevados de umidade relativa do ar da região de estudo, refletiram em aumento gradativo da atividade de água das amostras armazenadas (Tabela 5); entretanto ambos os fatores foram insuficientes para garantir as condições mínimas capazes de permitir a produção de aflatoxinas neste substrato.

A não detecção de ACP em amostras de castanha-do-brasil em nossa investigação concorda com Gonzalez, et al. (2008b), que utilizando cascas de amendoim, obtidas do município de Junqueirópolis, São Paulo, não revelaram a presença de ACP em níveis detectáveis por CLAE. Também não encontraram esta toxina, Moldes-Anaya et al. (2009), pesquisando 44 amostras de ração de frango por CLAE acoplado a espectrometria de massa e Hayashi e Yoshizawa (2005), analisando amostras de arroz, provenientes da Tailândia por CLAE.

Todavia, estudos confirmam a presença de ACP em todo processo de maturação do amendoim a campo (GONÇALEZ et al., 2008b e ZORZETE et al., 2011), em milho e amendoim comercializados (URANO et al., 1992b), em tomates e seus subprodutos (MOTTA e SOARES, 2000). Além disso, a co-ocorrência de aflatoxinas e ACP tem sido relatada por alguns autores (VAAMONDE et al., 2006; GONÇALEZ et al., 2008a; ZORZETE et al., 2011), o que acarretaria em associação das micotoxinas e aumento da sua toxicidade.

De acordo com Vaamonde et al., (2006), as condições ótimas experimentais para a produção de ACP são: Aa de 0,94; temperatura de 25 °C e tempo de incubação superior a 28 dias. Considerando os resultados obtidos a campo, apesar dos valores de Aa (0,99 a 0,89) ótimo para a produção de ACP, o tempo de incubação mínimo pra permitir a produção de ACP não foi atingido (15 dias). Já em amostras armazenadas, o tempo de armazenamento (11 meses) e a temperatura média nos períodos analisados (em torno de 27 °C), poderiam favorecer a produção de ACP, mas os valores de Aa em castanha-do-brasil não alcançaram 0,80; impedindo tal produção. Assim, estes dados justificam a ausência de amostras positivas para esta toxina em nossa investigação.

É importante ressaltar que relatos envolvendo detecção de ACP em castanhas-do-brasil são ausentes na literatura científica atual, destacando o pioneirismo do presente estudo.

O Se foi quantificado em todas as amostras de castanha-do-brasil analisadas, e os níveis deste micronutriente (30,64 a 139,35 µg/g) vem ao encontro de outros trabalhos científicos em castanha-do-brasil, que estabeleceram concentrações de Se variando de 0,2 e 253 µg/g (BARCLAY et al., 1995; KANNAMKUMARATH et al., 2002; DUMONT, et al., 2006; PACHECO e SCUSSEL, 2007; YANG, 2009; MARTINS et al., 2012).

Devido a não detecção de aflatoxinas no presente estudo, não foi possível estabelecer relação entre a toxina e selênio. Parece haver correlação positiva entre níveis de selênio e produção de aflatoxinas. Altos níveis de selênio podem causar estresse oxidativo em cepas de fungos, ativando assim, o mecanismo de produção de metabólitos secundários. Dependendo dos níveis, o selênio poderia induzir cepas aflatoxigênicas de *Aspergillus* seção *Flavi* a produzir aflatoxinas, o que acarretaria em contaminação de castanhas-do-brasil, enquanto esporos e condições ótimas estiverem presentes (PACHECO e SCUSSEL, 2007).

Amêndoas de castanha-do-brasil concentram Se, principalmente na película que envolve a amêndoa (SOUZA e MENEZES, 2004), provavelmente, pela similaridade química deste elemento com enxofre, um nutriente essencial na confecção proteica de sementes (CLAY e CLEMENTE, 1993). A composição química do solo dos castanhais é de grande importância, uma vez que a quantidade de Se presentes nas amêndoas é altamente dependente da quantidade de Se presente no solo (DUMONT et al., 2006). O

enxofre é frequentemente deficiente em solos da região Amazônica, especialmente após décadas ou séculos de exploração dos castanhais. Entretanto, a região da Amazônia oriental, que inclui o município de Itacoatiara, possui destacada quantidade de Se no solo quando comparada à região da Amazônia ocidental, com concentrações em torno de 9,4 a 8,1 mg/kg (PACHECO e SCUSSEL, 2007), propiciando altos valores de Se em castanhas-do-brasil desta região.

O presente estudo evidenciou a suscetibilidade de castanha-do-brasil a colonização por *A. flavus*, especialmente em etapas precoces na fase de coleta a campo; e sua perpetuação durante armazenamento, associado a cepas toxigênicas de *A. nomius* e *A. parasiticus*. Além disso, os resultados mostraram que durante este período, a atividade de água do substrato exerceu papel determinante para o desenvolvimento fúngico e consequentemente, demonstrou um risco potencial para produção de aflatoxinas. A elevada porcentagem de cepas aflatoxigênicas indica que boas práticas de manejo podem prevenir a ocorrência de aflatoxinas em castanhas-do-brasil.

## **7 CONCLUSÕES**

Dentro dos objetivos propostos e das condições de realização do presente estudo, as conclusões obtidas foram:

- O presente estudo evidenciou a suscetibilidade de castanha-do-brasil a colonização por *A. flavus*, especialmente em etapas precoces na fase de coleta a campo;
- O solo foi apontado como possível via de contaminação fúngica de amêndoas de castanha-do-brasil;
- A atividade de água do substrato exerceu papel importante para o crescimento fúngico e conseqüentemente, demonstrou um risco potencial para produção de aflatoxinas;
- A umidade relativa do ar elevada, contribuiu para o aumento progressivo da Aa nas castanhas-do-brasil (Aa até 0,79), mas não foi suficiente para permitir a produção de toxinas;
- O aumento progressivo do tempo de contato de ouriços de castanha-do-brasil com o solo foi acompanhado da maior contaminação por *A. flavus*;
- A contaminação por *A. nomius* e *A. parasiticus* ocorreu durante período em que as amostras permaneceram armazenadas;
- A prevalência significativa de *A. flavus* nas amostras de castanha-do-brasil coletadas a campo, sinaliza este substrato como sendo de alto risco de contaminação pelo fungo;
- A não detecção de aflatoxinas e ácido ciclopiazônico nas amostras pode ser atribuída à baixa atividade de água das amostras, resultado do processo de secagem durante o armazenamento. Este fato demonstra que a secagem do produto pode contribuir para o controle de aflatoxinas;

- A elevada porcentagem de cepas aflatoxigênicas de *Aspergillus* seção *Flavi*, aliada a altos níveis de produção de aflatoxinas indicam que boas práticas de manejo podem prevenir a ocorrência de aflatoxinas em castanhas-do-brasil;
- Os métodos para detecção de aflatoxinas e ácido ciclopiazônico em castanha-do-brasil (amêndoa, casca e ouriço) encontram-se validados e viáveis para análises nestes substratos.

**REFERÊNCIAS\***

ABDOLLAHI, A.; BUCHANAN, N.L. Regulation aflatoxin biosynthesis: characterization of glucose as an apparent inducer of aflatoxin production. **J. Food Sci.**, v. 46, p. 143-146, 1981.

AKIYAMA, H.; GODA, Y.; TANAKA, T.; TOYODA, M.. Determination of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> in spices using a multifunctional column clean-up. **J. Chromatogr.**, v. 932, n. 1, p. 153-157, 2001.

ALHO, C. J. R. Proteção da floresta + benefícios sociais. **Ciência Hoje**, v.25, p. 31-37, 1999.

ALMEIDA, A. P.; FONSECA, H.; FANCELLO, A. L.; DIREITO, G. M.; ORTEGA, E. M.; CORRÊA, B. Mycoflora and fumonisin contamination in Brazilian corn from sowing to harvest. **J. Agr. Food Chem.**, v. 50, p. 3877-3882, 2002.

ALMEIDA, A. W. B. Terras tradicionalmente ocupadas: processos de territorialização, movimentos sociais e uso comum. **Rev. Bras. Est. Urb. Reg.**, v. 6, n. 1, p. 9-32, 2004.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v. 215, p. 403-410, 1990.

AMÉZQUITA, M. O.; BARRERA, A. C.; ARBELÁEZ, G.; GRANADA, E. G.; OSPIRA, J. Evaluacion dos sistemas de desinfeccion del suelo y su interaccion com algunas formulaciones de microelemento sobre La incidência de *Fusarium oxysporum* em dos variedades de clavel. **Agronomia Colombiana**, v. 10, p. 122-127, 1993.

APPLEBAUM, R. S.; BRACKETT, R. E.; WISEMAN, D. W.; MARTH, E. H.. Responses of dairy cows to dietary aflatoxin: feed intake and yield, toxin content, and quality of milk of cows treated with pure and impure aflatoxin. **J. Dairy Sci.**, v. 65, p. 1503-1508, 1982.

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. **J. Food Protect.**, v. 68, p. 1060-1065, 2005b.

ARRUS, K.; BLANK, G.; ABRAMSON, D.; CLEAR, R.; HOLLEY, R.A. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. **J. Stored Prod. Res.**, v. 41, p. 513-527, 2005a.

---

**\* De acordo com:**

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.



ARX, J. A. **The genera of fungi sporulating in pure culture**. 2<sup>nd</sup> ed. Vaduz: J. Cramer, 1974, 315 p.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official methods of analysis of the 18th international AOAC. In: HORWITZ, W., LATIMER, G. W., Jr., (Eds) **Official methods of analysis of the 18th international AOAC**. Gaithersburg: AOAC, 2005.

AYERST, G. J.; BUDD, D. Effect of moisture content on the storage of Brazil nuts. **J. Sci. Food Agric. Res.**, v. 11, p. 390-396, 1960.

BARRON, G. L. **The genera of hyphomycetes from soil**. New York: Robert E. Krieger Publishing, 1972. 364 p.

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

BAYMAN, P.; COTTY, P. J. Vegetative compatibility and genetic diversity in the *Aspergillus flavus* population of an single field. **Can. J. Bot.**, v. 69, p. 1707-1711, 1991.

BEAUCHAT, L. R.; YOUNG, C. T.; CHERRY, J. P. Eletrophoretic patterns and free amino acid composition of peanut meal fermented with fungi. **Can. Inst. Food Sci. Technol. J.**, v. 8, p. 40-44, 1975.

BENNET, J. W.; FERNHOLZ, F. A. Effect of light on aflatoxin, anthraquinones, and sclerotia in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Mycologia**, v. 70, p. 106-116, 1978.

BENNETT, J. W.; HOROWITZ, P. C.; LEE, L. S. Production of sclerotia by aflatoxigenic and nonaflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. **Mycologia**, v. 71, p. 415-432, 1979.

BITANCOURT, A. A. Podridões da castanha-do-pará. **Biológico**, v. 7, p. 303-312, 1949.

BLESA, J.; SORIANO, J.M.; MOLTÓ, J.C.; MAÑES, J. Limited survey for presence of aflatoxins in foods from local markets and supermarkets in Valencia, Spain. **Food Addit. Contam.** v. 21, p. 165-171, 2004.

BLOUNT, W. P. Turkey "X" disease. **Turkeys**, v. 9, n. 2, p. 52- 67, 1961.

BRASIL MINISTÉRIO DA SAÚDE Resolução RDC n° 7, da ANVISA, de 18 de fevereiro de 2011, publicada no Diário Oficial da União de 22/02/2011.

BU'LOCK, J. D. Mycotoxins as secondary metabolities. In: STEYN, P. S. (Ed.). **The biosynthesis of mycotoxins**. New York: Academy Press, 1980. p. 1-16.

BUCHANAN, J. R.; AYRES, J. C. Effect of initial pH on aflatoxin production. **Appl. Microbiol.**, v. 30, p. 1050-1051, 1975.

BULLERMAN, L. B. Significance of mycotoxins to food safety and human health. **J. Food Prot.**, v. 42, n. 1, p. 65-86, 1979.

BURGESS, L. W.; NELSON, P. E.; TOUSSON, T. A. **Laboratory Manual of a Fusarium studies**. Sidney: Univ. Sidney, 1981. 50 p.

BUSTA, F. F.; PETERSON, E. H.; ADAMS, D. M. Colony count methods. In: SPECK, M. L. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of methods for the microbiological examination of foods**. New York: American Public Health Association, 1984, p. 914.

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

CAMPBELL, C.; STOLOFF, L. Implication of mycotoxins for human health. **J. Agric. Food Chem.**, v. 22, p. 1006-1015, 1974.

CARNAGHAN, R. B. A.; SARGEANT, K. The toxicity of certain groundnuts meals to poultry. **Vet. Rec.**, v. 73, n. 29, p. 726, 1961.

CAST (COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY). In: RICHARD, J. L.; PAYNE, G. A. (Ed.) **Mycotoxins: Risks in plant, animal and human systems**. Iowa, USA: Task Force Report, n° 139, 2003.

CASTRILLON, A.L.; PURCHIO, A. Ocorrência de aflatoxinas em castanha do pará (*Bertholleia excelsa*, HUMB. & BONPL., 1808). **Acta Amazônica**, v. 18, n.1-2, p.49-56, 1988a.

CASTRILLON, A.L.; PURCHIO, A. Ocorrência de aflatoxinas em castanha do pará (*Bertholleia excelsa*, HUMB. & BONPL., 1808). **Acta Amazônica**, v.18, n. 3-4, p. 173-183, 1988b.

CASTRO, I. M.; ANJOS; M. R.; LABORÃO, L. S. Ensaio para validação de aflatoxinas em castanha-do-brasil por CLAE/DF com pré-derivatização por TFA. In: XVI ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE ALIMENTOS, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Abstract...** Belo Horizonte: SBAAL CD-ROM ENAAL, 2009, vol. 1, p. 1-3.

CHAMBERLAIN, W. J.; VOSS, K. A.; NORRED, W. P. Analysis of commercial laboratory rat rations for fumonisins B, a mycotoxin produced on corn by *Fusarium moniliforme*. **Contemp. Top. Lab. Anim. Sci.**, v. 32, p. 28-28, 1993.

CHANG-YEN, I.; BIDASEE, K.. Improved spectrophotometric determination of cyclopiazonic acid in poultry feed and corn. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 73, p. 257-259, 1990.

CHRISTENSEN, C. M.; KAUFMANN, H. H. Mycoflora. In: CHRISTENSEN, C. M. (Ed.). **Storage of Cereal Grains and their Products**. Minnesota: American Association of Cereal Chemists, 1974. p. 158-92.

CIEGLER, A. Fungi that produce mycotoxins: condition and occurrence. **Mycopathology**, v. 65, p. 5-11, 1978.

CLAY, J.W.; CLEMENT, C.R. **Selected species and Strategies to enhance income generation from Amazonian Forests**. Rome: FAO, Forestry Paper, 1993.

CLEVSTROM, G. **Studies of fungi flora of plants and feeds**: the influence of formic acid on growth and aflatoxin production in *Aspergillus flavus*. Sweden, Upsala, 1986. p. 11-46.

COLE, R. J. Etiology of turkey 'X' disease in retrospect: a case for the involvement of cyclopiazonic acid. **Mycotox. Res.**, v. 2, p. 3-7, 1986.

COLE, R. J.; SANDERS, T. H.; DORNER, J. W.; BLANKENSHIP, P. D.; HALL, S. D. Environmental conditions required to induce preharvest aflatoxin contamination of groundnuts: Summary on six years' research. In: AFLATOXIN CONTAMINATION OF GROUNDNUT: PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL WORKSHOP, 1987, Pantacheru. **Proceedings...** 1989, p. 279-287.

COTTY, P. J. Aflatoxin-producing potential of communities of *Aspergillus* section *Flavi* from cotton producing areas of the United States. **Mycol. Res.**, v. 101, p. 698-704, 1997.

COTTY, P. J.; BAYMAN, P.; EGEL, D. S.; ELIS, K. S. Agriculture, aflatoxins and *Aspergillus*. In: POWELL, K. A.; RENWICK, A.; PEBERDY, J. F. (Eds.) **The Genus *Aspergillus*: From Taxonomy and Genetics to Industrial Applications**, New York: Plenum Press, 1994. P. 1-27.

COTTY, P. J.; CARDWELL, K. F. Divergence of West African and North American communities of *Aspergillus section Flavi*. **Appl. Environ. Microb.**, v. 65, p. 2264-2266, 1999

COUTINHO, V. F.; BITTENCOURT, V. B.; COZZOLINO, S. M. F. Effects of supplementation with Brazil nuts (CP, *Bertholletia excelsa*, H.B.K.) in capoeira players on selenium (Se) concentration and glutathione peroxidase activity (GSH-PX, E.C. 1.11.1.9). In: ROUSSEL, A. M.; ANDERSON, R. A.; FRAVIER, A. E. (Ed.). **Trace Elements in Man and Animal**. New York: Springer, 2002, part 2, 405-406 p.

CREPPY, E. E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicol. Lett.**, v. 127, n. 1-2, p. 19-28, 2002.

CUERO, R. G.; OSUJI, G.; WASHINGTON, A. N-carboxymethylchitosan inhibition of aflatoxin production: role of zinc. **Biotechnol. Lett.**, v. 13, p. 441-444, 1991.

CULLEN, J. M., WILSON, W. J. HAGLER, JR., J. F. ORT, AND R. J. COLE. Histologic lesions in broiler chicks given cyclopiazonic acid orally. **Am. J. Vet. Res.**, v. 49, p. 728–732, 1988.

DEGOLA F.; BERNI, E.; DALL'ASTA, C.; SPOTTI, E.; MARCHELLI, R.; FERRERO, I.; RESTIVO, F. M. A multiplex RT-PCR approach to detect aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. **J. Appl. Microbiol.**, v. 203, p. 409–427, 2007.

DELP, R. B.; STEWELL, L. J.; MAROIS, J. J. Evaluation of field sampling techniques for estimation of disease incidence. **Phytopathology**, v. 76, p. 1299-1305, 1986.

DIENER, U. L.; DAVIS, N. D. Limiting temperature and relative humidity for aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in stored peanuts. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 47, p. 347-351, 1970.

DIENER, U. L., COLE, R. J.; SANDERS, T. H.; PAYNE, G. A.; LEE, L. S.; KLICH, M. A. Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 25, p. 249-270, 1987.

DILKIN, P.; MALLMANN, C. A. Sinais clínicos e lesões causadas por micotoxinas. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 11., 2004, Piracicaba. **Resumos...** Piracicaba: Laboratório de Micotoxinas – LAN/ESALQ-USP, 2004. p. 32-35.

DORNER, J. W.; COLE, R. J.; DIENER, U. L. The relationship of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* with reference to production of aflatoxins and cyclopiazonic acid. **Mycopathology**, v. 87, p. 13-15, 1984.

DORNER, J. W.; COLE, R. J.; ERLINGTON, D. J. SUSKSUPATH, S.; McDOWELL, G. H.; BRYDEN, W. L. Cyclopiazonic acid residues in milk and eggs. **J. Agric. Food Chem.**, v. 42, p. 1516, 1994.

DUMONT, E.; DE PAUW, L.; VANHAECKE, F.; CORNELIS, R. Speciation of Se in *Bertholletia excelsa* (Brazil nut): A hard nut to crack? **Food. Chem.**, v. 95, p. 684-92, 2006.

DUTTON, M.F.; WESTLAKE, K. Occurrence of mycotoxins in cereals and animal feedstuffs in Natal, South Africa. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 68, n. 5, p. 839-843, 1985.

ENRÍQUEZ, G. Amazônia – Rede de inovação de dermocosméticos. Sub-rede de dermocosméticos na Amazônia a partir do uso sustentável de sua biodiversidade com enfoques para as cadeias produtivas da castanha-do-pará e dos óleos de andiroba e copaíba. **Amazônia- Rede de Inovação da Biodiversidade**, v.14. n. 28, p. 51-118, 2009.

FAO/WHO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/WORLD HEALTH ORGANIZATION) Expert Committee on Food Additives (JECFA). **Safety evaluation of certain food additives and contaminants-Aflatoxins**. Geneva: World health Organization; 1998.

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

FRISVAD, J. C.; NIELSEN, K. F.; SAMSON, R. A. Recommendations concerning the chronic problem of misidentification of species associated with mycotoxigenic fungi in foods and feeds, In: HOCKING, A. D.; PITT, J. I.; SAMSON, R. A.; THRANE, U. (Ed). **Adv. Food Mycology**, New York: Springer, 2006, p. 33-46.

GALLAGHER, R. T.; RICHARD, J. L.; STAHR, H. M.; COLE R. J. Cyclopiazonic acid production by aflatoxigenic and nonaflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. **Mycopathologia**, v. 66, p. 1-36, 1978.

GAMBALE, W; PURCHIO, A.; PAULO, C. R. Ação de fatores abióticos na dispersão aérea de fungos. **Rev. Microbiol.**, v. 14, p. 204-214, 1983.

GAMBALE, W. Fungos contaminantes. In: ZAITZ, C.; CAMPBELL, I.; MARQUES, S. A.; RUIZ, L. R.; SOUZA V. M. (Ed.), **Compêndio de Micologia Médica**. São Paulo: Medsi Editora Medica e Cientifica Ltda., 1998. p.113-121.

GILGADO, F.; CANO, J.; GENÉ, J.; GUARRO, J.; Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 4930-4942, 2005.

GOLDBLATT, L. A. Implications of mycotoxins. **Clin. Toxicol.**, v. 5, p. 453-458, 1972.

GONÇALEZ, E.; NOGUEIRA, J. H.; FONSECA, H.; FELICIO, J. D.; PINO, F. A.; CORRÊA, B. Mycobiota and mycotoxins in Brazilian peanut kernels from sowing to harvest. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 123, n. 3, p. 184-190, 2008a.

GONÇALEZ, E.; SOUZA, T. N.; ROSSI, M. H.; FELICIO, J. D.; CORRÊA, B. Avaliação da microflora e ocorrência de micotoxinas em cascas de amendoim em diferentes estágios de maturação da vagem. **Ciênc. Agrotecnol.**, v. 32, p. 1380-1386, 2008b.

HARTLEY, R. D.; O'KELLY, J. Toxicity and fluorescence properties of aflatoxins. **Nature**, v. 196, p. 1001, 1963.

HAYASHI, Y.; YOSHIZAWA, T. Analysis of cyclopiazonic acid in corn and rice by a newly developed method. **Food Chem.**, v. 93, p.215-221, 2005.

HILL, R.A.; BLANKESHIP, P.D.; COLE, R.J.; SANDERS, T.H. Effects of soil moisture and temperature on preharvest invasion of peanuts by *Aspergillus flavus* group and subsequent aflatoxin development. **Appl. Environ. Microb.**, v. 45, p. 628-33, 1983.

HOLLINGER, K.; EKPERINGIN, H. E. Mycotoxicosis in food producing animals. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**, v. 15, p. 133-165, 1999.

HOLZAPFEL, C. W. The isolation and structure of cyclopiazonic acid, a toxic metabolite of *Penicillium cyclopium* Westling. **Tetrahedron**, v. 24, p. 2101-2119, 1968.

HORN, B.W. Colonization of wounded peanuts seeds by soil fungi: selectivity for species from *Aspergillus* section *flavi*. **Mycologia**, v. 97, p. 202-217, 2005.

HUECK, K. **As florestas da América do sul: ecologia, composição e importância econômica**. São Paulo, Editora da Universidade de Brasília e Editora Polígono, 1972. 466p.

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

IARC (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER). **Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins**. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Geneva, IARC, 1993. v. 56, p. 489-521.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Produção da extração vegetal e silvicultura**. v. 24, p. 17-18, 2009.

ICMSF (INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS OF FOODS). **Aflatoxin in Iowa**. Disponível em: <<http://vetmed.iastate.edu>>. Acesso em 20 dezembro de 2011.

JACKSON, C. R.; BELL, D. K. Diseases of peanut (groundnut) caused by fungi. **Stations Research Bulletin n. 56**. Universidade da Georgia, Athens, 1969.

JAY, J. M. **Microbiologia Moderna de Los Alimentos**. 3. ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 1994. 753 p.

JOHNSON, P.; LINDBLAD, M.; THIM, A. M.; JOHNSON, N.; VARGAS, E. A.; MEDEIROS, N. L.; BRABET, C.; QUARESMA DE ARAÚJO, M., OLSEN, M. Growth of aflatoxigenic moulds and aflatoxin formation in Brazil nuts. **World Mycotoxin Journal**, v. 1, n. 2, p. 127-137, 2008.

KANNAMKUMARATH, S.; WROBEL, K.; VONDERHEID, A.; CARUSO J. HPLC-ICP-MS determination of selenium distribution and speciation in different types of nut. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 373, p. 454-460, 2002.

KHAYOON, W. S.; SAAD, B.; YAN, C. B.; HASHIM, N. H.; ALI, A. S. M.; SALLEH, M. I.; SALLEH, B. Determination of aflatoxins in animal feeds by HPLC with multifunctional column clean-up. **Food Chem.**, v. 118, p. 882-886, 2010.

KOKALIS-BURELLE, N.; PORTER, D. M.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; SMITH, D. H.; SUBRAHMANYAM, P. **Compendium of peanut diseases**. 2. ed. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1997. 94 p.

KOZAKIEWICZ, Z. *Aspergillus* species on stored products. CAB International, Wallingford, 1989. 188 p.

KOZAKIEWICZ, Z.; SMITH, D. Physiology of *Aspergillus*. In: Smith, J. E. (Ed.), **Aspergillus, Biotechnology Handbooks 7**. New York : Plenum Press, 1994, p. 23- 40.

LACEY, J. Water availability and the occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in stored products. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS. **Anais...** 1988, Tokyo. Tokyo: IUPAC, 1988. v. 6, p.186-89.

LACEY, J.; RAMAKRISHNA, N.; HAMER, A.; MAGAN, N.; MARFLEET, C. Grain Fungi. In: DILIP, K.; ARORA, K. G.; MUKERJI, E.; MARTH, H. (Ed.). **Handbook of Applied Mycology: foods and feeds**. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 12-77.

LAFORET, E. P. El género *Aspergillus*: Métodos, claves y referencias actuales para las especies comunes em clínica y em ambientes diversos. **Boletín Micológico**, v. 23, 2008.

LANCASTER, M. C.; JENKINS, F. P.; PHILIP, J. McL. Toxicity associated with certain samples of groundnuts. **Nature**, v. 192, p. 1095, 1961.

LANSDEN, J. A.; DAVIDSON, J. I. Occurrence of cyclopiazonic acid in peanuts, **Appl. Environ. Microb.**, v. 45, p. 766–769, 1983.

LE BARS, J., Cyclopiazonic acid production by *Penicillium camemberti* Thom and natural occurrence of this mycotoxin in cheese. **Appl. Environ. Microb.**, v. 38, p. 1052–1055. 1979.

LEBRET, D. T.; MARTINS JR., H. A.; WANG, A.; BUSTILLOS, O. V. Rapid method to determinate of mycotoxins compounds in food samples using high-performance liquid chromatography with APCI ionization tandem mass spectrometry (LC-APCI-MS/MS) in simultaneous positive and negative ion mode. In: LATIN AMERICAN CONGRESS ON CHROMATOGRAPHY AND RELATED TECHNIQUES (COLACRO X), 10. 2004, Campos de Jordão. **Abstracts**, 2004...p. 130.

LEESON, S.; DIAS, G.; SUMMERS, J. D. **Poultry metabolic disorders and mycotoxins**. Guelph: University Books, 1995. 352 p.

LEITÃO, M. F. Microbiologia de alimentos. In: ROTTMAM, I. et al. **Tratado de Microbiologia**. São Paulo: Manole, 1988, p.1-81.

LEONG, Y.; ISMAIL, N.; LATIF, A. A.; AHMAD, R. Aflatoxin occurrence in nuts and commercial nutty products in Malaysia. **Food Control**, v. 21, p. 334-338, 2010.

LIN, M. T.; DIANESE, J. C. A Coconut-Agar Medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. **Phytopathology**, v. 66, p. 1466-1469, 1976.

LINDSEY, D. L.; TURNER, R.B. Inhibition of growth of *Aspergillus flavus* and *Trichoderma viride* by peanut embryos. **Mycopathologia**, v. 55, p. 149-152, 1975.

LOMAX, L. G.; COLE, R. J.; DORNER, J. W. The toxicity of cyclopiazonic acid in weaned pigs. **Vet. Pathol.**, v. 21, p. 418, 1984.

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

LUK, K. C.; KOBBE, B.; TOWNSEND, J. M. Production of cyclopiazonic acid by *Aspergillus flavus* Link. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 33, p. 211-212, 1977.

MACKENZIE, D. W. R. Keynote lecture: *Aspergillus* in man. In: VANDEN BOSSCHE, H.; MACKENZIE, D. W. R.; CAUWENBERGH, G. (Ed.). ***Aspergillus and Aspergillosis***. New York: Plenum Press, 1988. p. 332.

MARKLINDER, I.; LINDBLAD, M.; GIDLUND, A.; OLSEN, M. Consumers' ability to discriminate aflatoxin-contaminated Brazil nuts. **Food Addit. Contam.**, v. 22, p. 56-64, 2005.

MARTIN, J. P. Use of acid rose Bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. **Soil Sci.**, v. 69, p. 215-232, 1950.

MARTINS, M.; PACHECO, A. M.; LUCAS, A. C. S.; ANDRELLO, A. C.; APPOLONI, C. R.; XAVIER, J. J. M. Brazil nuts: determination of natural elements and aflatoxin. **Acta Amazonica**, v. 42, p. 157-164, 2012.

MELLO, F.R.; SCUSSEL, V.M. Characteristics of in shell brazil nuts and their relationship to aflatoxin contamination: criteria for sorting. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, p. 9305-9310, 2007.

MILLER, J. R. Epidemiology of *Fusarium* ear diseases of cereals. In: MILLER, J. D.; TRENHOLM, H. L. (Ed.). **Mycotoxins in Grain**. St. Paul: Eagan Press, 1994. p. 19-36.

MILLS, J. T. (1989). Ecology of mycotoxigenic *Fusarium* species on cereal seeds. **J. Food Protect.**, v. 52, p. 737-742, 1989.

MOLDES-ANAYA, A. S.; ASP, T. N.; ERIKSEN, G. S.; SKAAR, I.; RUNDBERGET, T. Determination of cyclopiazonic acid in food and feeds by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v. 1216, p. 3812-3818, 2009.

MORAES, G. W. G. **Estudos sobre aflatoxina. II Extração e identificação da aflatoxina no farelo de amendoim**. Belo Horizonte: Arquivos da Escola de Veterinária, 1964. p. 1. Separata do vol. XVI.



MORRISSEY, R. E.; NORRED, W. P. ; COLE, R. J.; DORNER, J. Toxicity of the mycotoxin, cyclopiazonic acid to Sprague–Dawley rats. **Toxicol. Appl. Pharm.**, v. 77, p. 94–107, 1985.

MOSS, M. O. Mycotoxins of *Aspergillus* and others filamentous fungi. **J. Appl. Bacteriol.**, p. 69-81, 1989. Suppl.

MOTTA, S.; SOARES, L. M. V. Simultaneous determination of tenuazonic and cyclopiazonic acid in tomato products. **Food Chem.**, v. 71, p. 111-116, 2000.

MÜLLER, C. H.; FIGUEIREDO, F. J. C.; KATO, A. K.; CARVALHO, J. E. U. **A cultura da castanha-do-pará**. Brasília: EMBRAPA- Coleção Plantar, 1995. 65 p.

NAOZUKA, J.; MARANA, S. R.; OLIVEIRA, P. V. Water-soluble Cu, Fe, Mn and Zn species in nuts and seeds. **J. Food Compos. Anal.**, v. 23, p. 78-85, 2010.

NAOZUKA, J.; OLIVEIRA, P. V. Cu, Fe, Mn and Zn distribution in protein fractions of Brazil nut, cupuassu seed and coconut pulp by solid-liquid extraction and electrothermal atomic absorption spectrometry. **J. Brazil. Chem. Soc.**, v. 18, p. 1547-1553, 2007.

NAS National Academy of Science. Dietary references intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids. 2000. (<[www.nap.edu/catalog/9810.html](http://www.nap.edu/catalog/9810.html)>. acessado em 10 de fevereiro de 2010).

NASCIMENTO, C. N. B. **Amazônia: meio ambiente e tecnologia agrícola**. Belém: EMBRAPA – CPATU, 1984, 282 p.

NORRED, W. P.; COLE, R. J.; DORNER, J. W.; LANSDEN, J. A. Liquid chromatographic determination of cyclopiazonic acid in poultry meat. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 70, p. 121–123, 1987.

OLIVEIRA, C. A.; ROSMANINHO, J.; ROSIM, R. Aflatoxin M<sub>1</sub> and cyclopiazonic acid in fluid milk traded in São Paulo, Brazil. **Food Addit. Contam.**, v. 23, n. 2, p. 196-201, 2006.

OLSEN, M.; JOHANSSON, P.; MÖLLER, T.; PALADINO, R.; LINDBLAD M. *Aspergillus nomius*, an important aflatoxin producer in Brazil nut? **World Micotoxin J.**, v. 1, n. 2, p. 123-126, 2008.

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

PACHECO, A. M., LUCAS, A., PARENTE, R., PACHECO, N. Association between aflatoxin and aflatoxigenic fungi in Brazil nuts (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 30, p. 330-334, 2010.

PACHECO, A.M.; SCUSSEL, V.M. **Castanha-do-brasil da floresta tropical ao consumidor**. Florianópolis: Editograf, 2006. 173 p.

PACHECO, A. M.; SCUSSEL, V. M. Selenium and aflatoxin level in raw Brazil nuts from Amazon basin. **J. Agric.Food Chem.**,v. 55, p. 11087-11092, 2007

PACHECO, A. M.; SCUSSEL, V. M. Aflatoxins evaluation on in-shell and shelled dry Brazil nuts for export analysed by LC-MS/MS- 2006 and 2007 harvests. **World Mycotoxin Journal**, v. 2, p. 295-304, 2009.

PASTER, N.; BULLERMAN, L. B. Mould spoilage and mycotoxins formation in grains as controlled by physical means. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 7, p. 257-65, 1988.

PENNACCHIO, H. L. Castanha-do-brasil proposta de preço mínimo safra 2006/2007. **Rev. Conab**, v.1, p. 124-127, 2007.

PIER, A. C.; BELDEN, E. L.; ELLIS, J. A.; NELSON, E. W.; MAKI, L. R. Effects of cyclopiazonic acid and aflatoxin singly and in combination on selected clinical, pathological and immunological responses of guinea pigs. **Mycopathologia**, v. 105, p. 135-142, 1989.

PILDAIN, M. B.; VAAMONDE, G.; CABRAL, D. Analysis of population structure of *Aspergillus flavus* from peanut based on vegetative compatibility, geographic origin, mycotoxin and sclerotia production. **Int. J. Food Microbiology**, v. 93, p. 31-40, 2004.

PITT, J.I.; KING, A.D.; HOCKING, A.D. Dichloran-rose bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 37, p. 959-64, 1979.

PITT, J. I.; GLENN, D. R.; HOCKING, A. D. An improved medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 54, p. 109–114, 1983.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. London: Blackie Academic Professional, 2009. 519 p.

POZZI, C.R.; BRAGHINI, R.; ARCARO, J.R.; ZORZETE, P.; POZAR, I.O.; DENUCCI, S.; COOREA, B. Mycoflora and occurrence of alternariol and alternariol monomethyl ether in Brazilian sunflower from sowing to harvest. **J. Agr. Food Chem.**, v. 53, n. 14, p. 5824-28, 2005.

RAO, B.L.; HUSAIN, A. Presence of cyclopiazonic acid in Kodo millet (*Paspalum scrobiculatum*) causing Kodua poisoning in man and its production by associated fungi. **Mycopathologia**, v. 89, p. 177–180, 1985.

RAPER, K. B.; FENNEL, D. I. **The genus Aspergillus**. Baltimore: Willians & Wilkins, 1965. 686 p.

RAZZAGHI-ABYANEH, M. R.; GHAFAROKHI, M. S.; ALLAMEH, A.; SHIRI, A.K.; BAHADORI, S. R.; MIRZAHOSEINI, H.; REZAEI, M. B. A survey on distribution of *Aspergillus Section Flavi* in corn field soils in Iran: population patterns based on aflatoxins, cyclopiazonic acid and sclerotia production. **Mycopathologia**, v. 161, p. 183-192, 2006.

RIDDELL, R. W. Permanent stained mycological preparations obtained by slid culture. **Mycologia**, v. 42, p. 265-270, 1950.

ROSSETTO, C. A. V.; SILVA, O. F.; ARAÚJO, A. E. S. Influência da calagem, da época de colheita e da secagem na incidência de fungos e aflatoxinas em grãos de amendoim armazenados. **Ciênc. Rural**, v. 35, n. 2, p. 309-315, 2005.

SABINO, M. Retrospectiva e situação atual das micotoxinas. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 11., 2004, Piracicaba. **Resumos...** Piracicaba: Laboratório de Micotoxinas – LAN/ESALQ-USP, 2004. p. 10-12.

SAITO, M.; ENOMOTO, M.; TATSUNO, T.; URAGUCHI, K. Yellowed rice toxins. In: CIEGLER, A.; KADIS, S.; AHL, S. J. (Ed.). **Microbial Toxins, a Comprehensive Treatise: Fungal Toxins**. London: Academic Press, 1971. v. 6, p. 299-380.

SANTOS, C. C. M.; LOPES, M. R. V.; KOSSEKI, S. Y. Ocorrência de aflatoxinas em amendoim e produtos de amendoim comercializados na região de São José de Rio Preto/SP. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 60, n. 2, p. 153-157, 2001.

SANTOS, J. C.; SENA, A. L. S.; ROCHA, C. I. L. Competitividade brasileira no comércio internacional de castanha-do-brasil. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 48. 2010. Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 2010. **Abstracts...** Campo Grande: Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural (SOBER), 2010. p. 1-14

SANTURIO, J. M. Micotoxinas e micotoxicoses na avicultura. **Rev. Bras. Ciênc.**, v. 2, n. 1, p. 1-12, 2000.

SARGEANT, K.; SHERIDAN, A.; O'KELLY, J.; CARNAGHAN, R. B. A. Toxicity associated with certain samples of groundnuts. **Nature**, v. 192, p. 1096-1097, 1961.

SCOTT, P. M. Natural poisons. In: HELRICH, K. et al. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. (Ed.). Arlington: The Association, 1990. 1193 p.

SCOTT, W. J. Water relation of food spoilage microorganisms. **Adv. Food Res.**, v. 7, p. 83-127, 1957.

SCUSSEL, V. M.; GIORDANO, B. N.; SIMAO, V.; MANFIO, D.; GALVAO, S.; NAZAR, M. N. F. RODRIGUES. Effect of oxygen-reducing atmospheres on the safety of packaged shelled Brazil nuts during storage. **Int. J. Anal. Chem.**, v. 2011, p. 1-9, 2011.

SMITH, E. E.; KUBENA, L. F.; BRAITHWAITE, C. E.; HARVEY, R. B.; PHILLIPS, T. D.; REINE, A. H. Toxicological evaluation of aflatoxin and cyclopiazonic acid in broiler chickens. **Poultry Sci.**, v. 71, n. 8, p. 1136-1144, 1992.

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

SOARES, L. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Survey of aflatoxins, ochratoxin, A, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. **Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 72, p. 22-26, 1989.

SOUZA, M. L.; MENEZES, H. C. Processamento de amêndoa e torta de castanha -do-Brasil e farinha de mandioca: parâmetros de qualidade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, p. 120-128, 2004.

STEINER, W.E.; BRUNSCHWEILER, K.; LEIMBACHER, E.; SCHENEIDER, R. Aflatoxins and fluorescence in Brazil nuts and pistachio nuts. **J. Agr. Food Chem.**, v. 40, p. 2453-2457, 1992.

STEVENS, A. J.; SAUNDERS, C. N.; SPENCE, J. B.; NEWHAM, A. C. Investigations into "diseases" of turkey poults. **Vet. Rec.**, v. 72, n. 31, p. 627-628, 1960.

STEYN, P. S. Mycotoxins, excluding aflatoxins, zearaleone and the trichothecenes. In: RODRICKS, J. V. et al. **Mycotoxins in human and animal health**. Illinois: Pathotox Publishers, 1977. p. 419-467.

STROKA, J.; ANKLAM, E. Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography using post-column bromination for determination of aflatoxins in peanut butter, pistachio paste, and paprika powder: collaborative study. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 83, n. 2, p. 320-340, 2000.

SWANSON, K. M.; BUSTA, F. F.; PETERSON, E. H.; JOHNSON, M. G. Colony count methods. In: VANDERZANT, C. & SPLITTOESSER, D. S. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. New York: American Public Health Association, v. 1, 1982, p. 662.

TANAKA, T.; YONEDA, A.; SUGIURA, Y.; INOUE, S.; TAKINO, M.; TANAKA, A.; SHINODA, A.; SUZUKI, H.; AKIYAMA, H. e TOYODA, M. An application of liquid chromatography and mass spectrometry for determination of aflatoxins **Mycotoxins**, v. 52, p. 107-113, 2002.

TANIWAKI, M. H.; SILVA, N. da. **Fungos em Alimentos: ocorrência e detecção**. Campinas: Núcleo de Microbiologia/ ITAL, 2001. 82 p.

TARIN, A.; ROSELL, M. G.; GUARDINO, X. Use of high-performance liquid chromatography to assess airborne mycotoxin: Aflatoxins and ochratoxin A. **J. Chromatogr.**, v. 1047, p. 235-240, 2004.

TIRADO, M. C.; CLARKE, R.; JAYKUS, L. A.; MCQUATTERS-GOLLOP, A.; FRANK, J. M. Climate change and food safety: A review. **Food Res. Int.**, v. 43, p. 1745-1765, 2010.

TROLLER, J. A.; BERNARD, D. T.; SCOTT, N. C. Measurement of water activity. In: SPECK, L. M. (Ed.). **Compendium of Methods for the microbiological examination of foods**. New York: American Public health Association, 1984. p. 124-34.

TRUCKSESS, M. W.; STACK, M.E.; NESHEIM, S.; PAGE, S. W.; ALBERT, R. H., HANSEN, T.J. e DONAHUE, K.F. Immunoaffinity column coupled with solution fluorometry or liquid chromatography post column derivatization for determination of aflatoxins in corn, peanuts and peanut butter: collaborative study, **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v.74, p. 81-88, 1991.

TRUCKSESS, M.W.; MISLIVEC, P.B.; YOUNG, K.; BRUCE, V.R.; PAGE, S.W. Cyclopiazonic acid production by cultures of *Aspergillus* and *Penicillium* species isolates from dried beans, corn meal, macaroni and pecans. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 70, p.123-126, 1987.

URANO, T., M.W. TRUCKSESS, R.W. MATUSIK, J. Liquid chromatographic determination of cyclopiazonic acid in corn and peanuts. **J. AOAC Intern.**, 75, n. 2, p. 319-322 1992a.

URANO, T., M.W. TRUCKSESS, R.W. BEAVER, D.M. WILSON, J.W. DORNER AND F.E. DOWELL Co-occurrence of cyclopiazonic acid and aflatoxins in corn and peanuts. **J. AOAC Intern.**, v. 75, n. 1, p. 838-841, 1992b.

VAAMONDE, G.; PATRIARCA, A.; FERNADEZ-PINTO, V. Effect of water activity and temperature on production of aflatoxin and cyclopiazonic acid by *Aspergillus flavus* in peanuts. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 571, p. 225-235, 2006.

VARGAS, E. A.; SANTOS, E. A.; WHITAKER, T. B.; SLATE, A. B. Determination of aflatoxin risk components for in-shell Brazil nuts. **Food Addit. Contam.**, v. 28, p. 1242-1260, 2011.

WHITE, T. J.; BRUNS, T., LEE, S.; TAYLOR, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A., GELFAND; D. H., SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Ed.). **PCR protocols a guide to methods and applications**, New York: Academic Press, 1990, p. 315-322.

WILSON, T. M.; NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; MARASAS, W. F. The *Fusarium* reseatch center and proposed diagnostic, reference and research center to *Fusarium* mycotoxicosis in animals. **Proc. Ann. Meet. Assoc. Vet. Lab. Diag.**, v. 24, p. 261-276, 1981.

YANG, J. Brasil nuts and associated health benefits: A review. **Food Sci. Technol.**, v. 42, p. 1573-1580, 2009.

ZORZETE,P.; CASTRO, R. S.; POZZI, C. R.; PRADO, G.; ISRAEL, A.L.M.; FONSECA, H.; YANAGUIBASHI, G.; CORREA, B. Relative populations and toxin production by *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* in artificially inoculated corn at various stages of development under field conditions. **J. Sci.Food Agric.**, v. 88, p. 48-55, 2008.

ZORZETE, P.; REIS, T. A.; FELÍCIO, J. D.; BAQUIÃO, A. C.; MAKIMOTO, P.; CORRÊA, B. Fungi, mycotoxins and phytoalexins in peanut varieties, during plant grown in the field. **Food Chem.**, v. 129, 957- 964, 2011.