NATHÁLIA BEATRIZ SPAGNUOLO YUNES

Resposta ecofisiológica de cepas de *Aspergillus nomius*: crescimento micelial, expressão gênica e produção de aflatoxinas em diferentes temperaturas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Benedito Corrêa

Versão Corrigida

São Paulo
2018

RESUMO

YUNES, N. B. S. **Resposta ecofisiológica de cepas de *Aspergillus nomius***: crescimento micelial, expressão gênica e produção de aflatoxinas em diferentes temperaturas. 2018. 91 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A castanheira (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.) é uma árvore nativa da região Amazônica muito valorizada por suas sementes, as castanhas-do-Brasil, que apresentam alto valor nutritivo e são uma rica fonte de selênio, um agente antioxidante. O Brasil está entre os países que mais produzem e exportam estas castanhas. As condições climáticas da região Amazônica, assim como as demais etapas da cadeia produtiva, podem favorecer a infecção fúngica neste substrato, principalmente por *Aspergillus nomius*, espécie extremamente relacionadas à produção de aflatoxinas. Esta micotoxina está associada ao desenvolvimento de tumores, imunossupressão e alterações hepáticas tornando-a um risco para a saúde pública. Sendo assim, a realização de estudos que forneçam informações adequadas sobre o comportamento de *A. nomius* é de extrema relevância, pois contribuem no conhecimento das condições propícias para a produção de aflatoxinas. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a resposta ecofisiológica de cepas de *A. nomius* isoladas de castanhas-do-Brasil (crescimento micelial, expressão gênica e produção de aflatoxinas) em diferentes temperaturas (25, 30 e 35 °C). O crescimento micelial foi mensurado diariamente a partir da inoculação de 8 cepas em ágar coco, mantidas no escuro até 7 dias. A partir destas colônias foi feita análise da expressão dos genes *aflR*, *aflD* e *aflQ*, envolvidos na biossíntese das aflatoxinas, com utilização de PCR em Tempo Real. Com as mesmas colônias também foi feita análise do potencial aflatoxigênico (B₁, B₂, G₁ e G₂) qualitativo (Cromatografia em Camada Delgada) e quantitativo (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência). A temperatura ideal para crescimento micelial das cepas de *A. nomius* foi 30 °C. Esta condição foi a melhor para a expressão dos genes *aflR*, *aflD* e *aflQ*. Contudo, o gene *aflQ* também apresentou alta expressão a 25 °C e foi o gene mais expresso em todas as temperaturas avaliadas. Em relação ao potencial toxigênico das cepas, a maior produção ocorreu a 25 °C. Em todas as temperaturas avaliadas houve maior produção de aflatoxinas do grupo B do que do grupo G. Pôde-se observar que a temperatura que propiciou a maior produção destas toxinas coincide com as da região Amazônica, território nativo das castanheiras. Com base nos resultados reportados, este estudo poderá servir como ferramenta na elaboração de eficientes estratégias para o controle de *A. nomius* e aflatoxinas em castanhas-do-Brasil.

Palavras-chave: Castanha-do-Brasil. Ecofisiologia. Fungo. Micotoxinas.

ABSTRACT

YUNES, N. B. S. **Ecophysiological response of *Aspergillus nomius* strains**: mycelial growth, gene expression and aflatoxin production at different temperatures. 2018. 91 f. Dissertation (Masters thesis in Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

The Brazil nut tree (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.) is an Amazonian native species that produce seeds with high nutritional value and rich source of selenium, an antioxidant agent. Brazil is one of the major producers and exporters of these nuts. The Amazon weather conditions in the production area and also on the productive chain play a critical role in the fungal infection, specially by *Aspergillus nomius*, important species associated to the aflatoxin contamination. This mycotoxin is related to the development of tumors, immunosuppression and liver alterations that becomes a risk to public health. Therefore, studies that provides adequate informations about the behavior of *A. nomius* are extremely relevant, contributing to better understand the favorable conditions to the aflatoxins production. The main goal of the present study was to evaluate the ecophysiological response of *A. nomius* strains isolated from Brazil nuts (mycelial growth, gene expression and aflatoxin production) at different temperatures (25 °C, 30 °C, and 35 °C). The mycelial growth of 8 strains was measured daily for 7 days in coconut agar. From these colonies, the expression of *afIR*, *afID*, and *afIQ* genes, that are involved in aflatoxin biosynthesis was analyzed by using Real Time PCR. From the same colonies, the aflatoxigenic potential (B₁, B₂, G₁ and G₂) were analyzed qualitative and quantitative by Thin Layer Chromatography and High Performance Liquid Chromatography, respectively. Mycelial growth assessment revealed that the optimal temperature for the radial growth rate and the average of final growth was at 30 °C. This was also the best condition for the expression of *afIR*, *afID*, and *afIQ* genes. However, the *afIQ* also showed high expression at 25 °C and was the most expressed gene at all evaluated temperatures. The highest aflatoxin production occurred at 25 °C, with higher toxins production on group B than group G. It was possible to notice that the optimum temperature to aflatoxin production coincides with those in Amazon region, the most important producing area. These results also may contribute to enhance the management strategies of aflatoxin control in Brazil nuts.

Keywords: Brazil nuts. Ecophysiology. Fungus. Mycotoxins.

1 INTRODUÇÃO

O extrativismo é a atividade humana mais antiga que existe, antecedendo até mesmo a agricultura. No Brasil este foi o primeiro ciclo econômico, tendo início a partir da exploração do pau-Brasil. Esta atividade garante, ainda, a subsistência de famílias e movimentação dos mercados locais na região Amazônica (EMBRAPA, 2014).

A maior produção de itens não madeireiros, com participação extrativista, corresponde aos alimentos (71,9%). A castanha-do-Brasil é, nessas condições, a segunda especiaria mais rentável, perdendo apenas para o açaí, com valor de produção beirando a R\$ 110,1 milhões (IBGE, 2016).

A cadeia produtiva dessas castanhas é composta por: deslocamento dos extrativistas aos castanhais, coleta e amontoa dos ouriços (Figura 1), retirada das castanhas, secagem e armazenamento (Figura 2), beneficiamento (se houver descascamento), transporte e comercialização (BAQUIÃO, 2012).

Figura 1 – Cadeia produtiva das castanhas-do-Brasil: coleta e amontoa de ouriços.

Fonte: Baquião, 2012.

Figura 2 – Cadeia produtiva das castanhas-do-Brasil: secagem e armazenamento.

Fonte: Baquião, 2012.

Um dos maiores problemas recorrentes que afeta toda esta cadeia é a contaminação por fungos toxigênicos do gênero *Aspergillus*, frequentemente encontrados em diversas sementes comestíveis, tais como: amendoim, sorgo, milho, noz, (PASSONE, et al., 2012), avelã, pistache, amêndoa e outros vegetais oleosos ao redor do mundo (BENNETT e KLISCH, 2003; GALLO et al., 2016). A contaminação pela toxina produzida por estes fungos, as aflatoxinas, pode causar vários distúrbios na saúde humana e animal (BENNETT e KLISCH, 2003; CAST, 2003). Conhecendo estes malefícios, há restrições no comércio de produtos contaminados com estas substâncias (EC, 2010, CAC, 2010, ANVISA, 2011), gerando consideráveis perdas econômicas (CAST, 2003; PASSONE, et al., 2010), já que ainda é um desafio controlar a produção destas toxinas em alimentos (OLSEN, et al., 2008).

1.1 CASTANHAS-DO-BRASIL

A castanheira (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.) (Figura 3) é uma árvore nativa da região Amazônica muito valorizada em relação ao consumo de suas sementes, as castanhas-do-Brasil (FERREIRA et al., 2006; ANDRADE, 2010; CAMARGO, 2011).

Figura 3 – Castanheira (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.) em seu habitat natural.

Fonte: EMBRAPA, 2008.

Essas sementes, também conhecidas como castanhas-do-Pará (MAPA, 2014), castanhas-do-Maranhão e castanhas-da-Amazônia (SILVA, 2014), possuem alto valor nutritivo além de possuir selênio, um importante agente antioxidante (PACHECO, 2007), assim como possui finalidade na elaboração de cosméticos (CONAB, 2017b). Estas castanhas estão distribuídas dentro dos

frutos das castanheiras, conhecidos como ouriços, sendo envoltas por uma casca cada uma (BAQUIÃO, 2012) (Figura 4).

Figura 4 – Castanhas-do-Brasil e sua disposição em cascas e ouriços.

Fonte: Borello, 2012.

O Brasil é atualmente o segundo maior produtor mundial (34,8%), atrás apenas da Bolívia (42,9%) (AVRAMENKO, 2017). Em relação à produção brasileira, o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) registrou um total de 34.664 t de castanhas-do-Brasil em 2016 destacando o estado do Amazonas como o principal produtor, seguido pelo Acre e Pará. No que diz respeito a dados de 2014 sobre a exportação deste substrato, o Brasil ocupa o primeiro lugar com 7.100 t (31,2%), se tratando de castanhas com casca não processadas, não ocorrendo o mesmo quanto às castanhas descascadas processadas com 800 t (2,1%), mantendo a Bolívia na liderança com 23.600 t (60,8%) (KOSIKOVA, 2016).

A produção de castanhas-do-Brasil em território nacional é baseada no extrativismo (MAPA, 2010; PENNACCHIO, 2013; MAPA 2014), e, portanto, isento de defensivos agrícolas. O Brasil consome apenas 10% desta iguaria (FREITAS-SILVA e VENÂNCIO et al. 2011) e, em relação ao mercado externo, os principais países importadores são Estados Unidos (25%), membros do Reino Unido (17%), Alemanha (17%) e Holanda (5%) (KOSIKOVA, 2016).

O produto vem sendo valorizado devido às políticas públicas implementadas como o Decreto Federal nº 1282/94, que proíbe a extração da madeira da castanheira, o Decreto Federal nº 5.975/06, que determina que a exploração deva ser feita de maneira sustentável e a Resolução da Diretoria Colegiada nº 07/11 na qual a ANVISA determina limites de tolerância para aflatoxinas. Estes limites referentes às aflatoxinas totais ($B_1 + B_2 + G_1 + G_2$) foram estabelecidos para o produto com casca para consumo direto (20 µg/kg), sem casca para consumo direto (10 µg/kg), e sem casca para processamento posterior (15 µg/kg). De acordo com a CONAB (2017a), o valor de venda das castanhas-do-Brasil aumentou de R\$ 0,35/kg em 2000 para R\$ 1,27/kg em 2017, tornando o produto atrativo para os extrativistas e auxiliando na preservação da floresta Amazônica.

1.2 FUNGOS EM CASTANHAS-DO-BRASIL

As condições climáticas da região Amazônica podem propiciar a infecção e proliferação por microrganismos no fruto da castanheira (MARTINS JUNIOR et al., 2011). A temperatura média anual da Amazônia varia de 24 a 27 °C, a precipitação pluvial média corresponde entre 1.400 a 2.800 mm/ano e a umidade relativa do ar atinge mais de 80% (EMBRAPA, 2008).

O modo de acondicionamento deste alimento também pode levar a colonização por esses invasores, já que a temperatura em armazenamento normalmente varia de 26,2 a 28 °C, a atividade de água (Aa) oscila entre 0,50 e 0,83 e a umidade relativa da castanha vai de 2,4% a 18,9% (BAQUIÃO, 2012). Outros autores relatam ainda que as condições de armazenamento, assim como áreas de processamento, chegam a 30 °C com umidade relativa do ar entre 80 e 97%, permanecendo por longos períodos (ARRUS, et al., 2005). Em vista deste problema, o Codex Alimentarius Commission (CAC) recomenda desde 2006 que estes grãos ao serem armazenados devem ser mantidos a temperatura entre 0 e 10 °C, a Aa deve ser menor que 0,70 ou possuir umidade relativa abaixo de 15%, quanto as instalações, é esperado que a umidade relativa do ar seja menor que 70% e, que o local seja limpo e seco, possuir proteção contra chuva, assim como entrada de roedores e aves, e uma adequada drenagem de água.

Há diversos relatos de contaminação fúngica em amêndoas de castanhas-do-Brasil, sendo a constatação da espécie *Aspergillus nomius* recorrente e é observada em diversos trabalhos conduzidos no país (COSTA et al. 2009; BAQUIÃO, 2012; REIS et al. 2012; GONÇALVES et al. 2012; CALDERARI et al. 2013; LUO et al. 2014, MASSI et al. 2014; MIDORIKAWA, 2014; REIS et al. 2014; TANIWAKI et al. 2017).

Olsen et al. (2008), detectaram em castanhas-do-Brasil importadas pela Europa, frequência de isolamento de 13,6% de *A. nomius* entre as 22 cepas isoladas de *Aspergillus* seção *Flavi*. Estudos conduzidos por Reis et al. (2012) nos estados do Acre, Amazonas, Amapá e Pará, apontaram *A. nomius* como uma das espécies mais isoladas em castanhas-do-Brasil, com frequência, em 200 amostras de amêndoas, de 56% e, em 200 amostras de cascas, 63,8%. No estudo de Calderari et al. (2013), foi evidenciado que em 288 castanhas-do-Brasil coletadas, foram isoladas 4.172 cepas de *Aspergillus* seção *Flavi*, sendo que a espécie mais frequente, 30%, foi de *A. nomius*. Estes mesmos autores revelaram a presença deste fungo em toda a cadeia produtiva destas sementes. Novos trabalhos evidenciaram ainda a presença deste fungo em abelhas que visitam as flores das castanheiras (MASSI et al., 2015).

A. nomius é uma espécie considerada anamórfica, cosmopolita, e pertencente à seção *Flavi*, gênero *Aspergillus*, à família Trichocomaceae, ordem Eurotiales, agrupada na classe Eurotiomycetes, subclasse Eurotiomycetidae, próprio do filo Ascomycota, subfilo Pezizomycotina, reino Fungi (KURTZMAN et al., 1987; KLICH, 2002).

Esta espécie foi primeiramente descrita por Kurtzman et al. (1987), utilizando ágar Czapek (CZ) e ágar extrato de malte (MEA), após sete dias de cultivo a 25 °C. Os autores constataram colônias de 4 a 7 cm e crescimento perceptível até 42 °C. Também relataram colônias com micélio vegetativo branco ou com tonalidade laranja acastanhada, aspecto aveludado, pouca ou moderada abundância de estruturas conidiais, normalmente em zonas marginais. O reverso mostrou-se amarelo claro e laranja acastanhado com exsudato vermelho acastanhado nos esclerócitos. Com o envelhecimento, as colônias adquiriram coloração amarelo esverdeada a verde. Os conidióforos observados eram incolores com 8 a 22 µm de diâmetro e 300 a 1100 µm comprimento, podendo apresentar cabeça bisseriada ou unisseriada, radial, característica globosa ou

subglobosa, rugosa e 3,7-8,1 a 4,5-6,5 μm de diâmetro. As vesículas eram globosas a subglobosas medindo aproximadamente 25 a 65 μm de diâmetro. As métulas e as fiálides apresentaram diâmetro em torno de 4,0-8,6 x 8,1-17,3 e 3,8-6,5 x 7,6-11,3 μm , respectivamente (Figura 5).

Figura 5 – Características micromorfológicas de *A. nomius*. (A) vesícula e conidióforo; (B) conídios em microscopia de campo claro.

Fonte: Manikandan et al., 2009.

A associação entre a disponibilidade de água e a temperatura determina os microrganismos que podem colonizar certo tipo de substrato e os que predominam nele, influenciando diretamente a produção de micotoxinas (LACEY, 1988). Neste contexto, Pitt e Mischamble (1995) constataram que a melhor condição para o crescimento de *A. nomius* foi a 25°C em níveis de Aa entre 0,96 e 0,98.

De acordo com Pitt e Hocking (2009), *A. nomius* está morfológicamente relacionado com *Aspergillus flavus* e toxicologicamente relacionado com *Aspergillus parasiticus*, ambos também pertencentes à seção *Flavi*. Os autores

destacam ainda que *A. flavus* e *A. parasiticus* apresentam bom crescimento quando incubados na faixa de temperatura de 25 a 37 °C. A temperatura também é um fator importante para o crescimento fúngico em sementes. A maioria dos fungos capazes de infectar plantas podem se desenvolver na faixa de temperatura de 0 a 30 °C. Tanto *A. flavus* como *A. parasiticus* podem crescer entre 6 e 45 °C, com temperatura ótima de crescimento de 35 °C para *A. flavus* e 35 a 37 °C para o *A. parasiticus* (LACEY, 1988).

Em relação à produção de aflatoxinas, Gqaleni et al. (1997) constataram, analisando temperaturas de 20, 25, 30 e 37 °C, maiores concentrações de aflatoxinas produzidas por *A. flavus* na temperatura de 30 °C e Aa de 0,99, após 15 dias de incubação. Resultados semelhantes foram observados por Schmidt-Heydt et al. (2009). Estes autores reportaram maiores níveis de produção de aflatoxinas por *A. flavus* entre 25 e 30 °C, e melhor crescimento micelial a 37 °C.

De maneira geral, espécies do gênero *Aspergillus*, principalmente *A. flavus* e *A. parasiticus*, apresentam bom crescimento entre 15 e 40 °C sendo, portanto, frequentes em regiões de clima tropical (DANTIGNY et al., 2005). Por sua vez, em relação à espécie *A. nomius*, estudos que estabeleçam as condições ótimas de temperaturas para o crescimento e a produção de micotoxinas ainda são escassos.

1.3 AFLATOXINAS

Micotoxinas, de origem grega “mykes” (fungo) e latina “toxicum” (tóxico), são metabólitos secundários tóxicos de baixo peso molecular produzidos por certos fungos filamentosos expostos a determinadas condições ambientais e nutricionais (BHATNAGAR et al., 2002; BENNETT e KLISCH, 2003). Estes metabólitos, assim como os antibióticos, pigmentos e quinonas são produzidos no final do crescimento exponencial do fungo e não são imprescindíveis ao seu desenvolvimento (BHATNAGAR et al., 2002; FIB, 2009).

Dentre os fatores que influenciam a produção de micotoxinas destacam-se umidade, temperatura e composição do substrato (CIEGLER, 1978; ARRUS et al., 2005; FIB, 2009). Outros elementos que também podem estar envolvidos nesta etapa são a cepa, atividade de água, aeração, população microbiana, fatores de estresse, insetos e suscetibilidade à colonização do fungo pelo

substrato (CIEGLER, 1978; BHATNAGAR et al., 2002). A temperatura e umidade ótima de crescimento fúngico e produção de micotoxinas podem variar para cada espécie (BHATNAGAR et al., 2002). Arrus et al. (2005) relataram maior produção de aflatoxinas por *A. flavus* em castanhas-do-Brasil submetidas a temperaturas entre 25 e 30 °C e umidade relativa de 97%.

Sabe-se que *A. nomius* produz aflatoxinas do grupo B e G (Kurtzman et al., 1987). Os trabalhos de Reis et al. (2012) e Baquião et al. (2012) evidenciaram que esta espécie foi a maior produtora de aflatoxinas, de ambos os grupos, entre as diversas espécies de *Aspergillus* isoladas nas amostras de castanhas-do-Brasil. O estudo de Calderari et al. (2013) evidenciou a presença dessas toxinas em toda a cadeia produtiva dessas castanhas.

As aflatoxinas são um grupo de micotoxinas produzidas, principalmente, por *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* (KURTZMAN et al., 1987). Elas são formadas na via enzimática dos ácidos graxos, que são metabólitos primários, pela redução de compostos cetônicos no fim da fase exponencial ou começo da fase estacionária do desenvolvimento fúngico (CREPPY, 2002). Estas toxinas são bisfuranocumarinas constituídas de dihidrofuranos ou tetrahidrofuranos associados a um anel cumarínico sendo que o grupo B possui anel ciclopentanona e o grupo G apresenta anel lactona (GOURAMA e BULLERMAN, 1995; BHATNAGAR et al., 2002; BENNETT e KLISCH, 2003; KLICH, 2007; HUSSEIN e BRASEL, 2011) (Figura 6). As aflatoxinas de ocorrência natural são classificadas como B₁, B₂, G₁ e G₂, denominação do inglês por conta das suas fluorescências “blue” (425 nm) e “green” (540 nm) (azul e verde, respectivamente) emitidas sob a luz UV (BHATNAGAR et al., 2002; BENNETT e KLISCH, 2003; DO e CHOI, 2007; KLICH, 2007; KUMAR et al., 2017).

Figura 6 – Estrutura química de aflatoxinas do grupo B e G.

Fonte: Zain, 2011.

Na tentativa de detoxificação os microrganismos ou animais podem metabolizar as aflatoxinas em compostos menos tóxicos como M₁, M₂, P₁, Q₁ e aflatoxicol (SMITH e ROSS, 1991). As toxinas M₁ e M₂, conhecidas como “milk toxins”, são metabólitos hidroxilados de B₁ e B₂, respectivamente, e podem ser encontradas em produtos lácteos provenientes de gados que ingeriram alimentos contaminados por aflatoxinas B₁ e B₂ (CREPPY, 2002).

O Brasil é um dos países com maior índice de contaminação de produtos vegetais por fungos aflatoxigênicos, principalmente a castanha-do-Brasil. Esses fungos degradam grãos causando perda do valor nutricional e problemas a saúde humana e animal (MIDORIKAWA, 2014). De acordo com Costa et al. (2009), a castanha-do-Brasil é, entre as castanhas, a especiaria com maior nível de contaminação por aflatoxinas. Olsen et al. (2008) e Massi et al. (2014), analisando a ocorrência de micotoxinas em castanhas-do-Brasil, detectaram a presença das aflatoxinas dos grupos B e G.

A micotoxicose é a ação tóxica causada pela ingestão destas micotoxinas as quais podem causar efeitos mutagênico, teratogênico, hepatotóxico, nefrotóxico, neurotóxico, estrogênico e até carcinogênico em humanos e em animais, dependendo da micotoxina e espécie animal envolvida (BHATNAGAR et al., 2002; BENNETT e KLISCH, 2003).

Aflatoxicose é a doença causada pela inalação ou ingestão de aflatoxinas que ao longo do tempo pode levar ao desenvolvimento de tumores, imunossupressão, problemas hepáticos, entre outros (BENNETT e KLISCH, 2003). A IARC (1993) classifica a aflatoxina B₁ como pertencente à classe 1 de compostos carcinogênicos para humanos. Estudos feitos com a administração de doses únicas de aflatoxinas em animais demonstraram nenhuma espécie é resistente aos seus efeitos tóxicos e que, portanto, os humanos podem ser igualmente afetados. A DL₅₀ determinada varia para a maioria destas espécies entre 0,5 a 1,0 mg/kg corpóreo e a toxicidade está associada a fatores ambientais, idade, quantidade e duração da exposição, estado de saúde e nutricional (DDTHA, 2003).

O prejuízo econômico anual acarretado pelas micotoxinas é relevante. Em países como os Estados Unidos, as perdas relacionadas às contaminações de produtos agrícolas por estes compostos tóxicos já atingiram prejuízo de cerca de 1 bilhão de dólares (CAST, 2003). Por conta desta problemática, o mercado externo estabeleceu limites máximos de micotoxinas para a importação de grãos, a fim de garantir melhor qualidade dos produtos a serem consumidos. O CAC recomenda, desde 2010, que castanhas como castanhas-do-Brasil, pistaches, amêndoas e avelãs devam apresentar limites de até 10 µg/kg de aflatoxinas totais para consumo direto e até 15 µg/kg para estes produtos que ainda serão processados.

A União Européia restringe aflatoxinas em alimentos desde 1998 e mantém desde 2010 um limite máximo de 15 µg/kg para a somatória das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, e de 8 µg/kg para B₁, no caso de processamento posterior e, 10 µg/kg para aflatoxinas totais e 5 µg/kg para B₁ para consumo direto, sendo isso válido para os produtos que englobam além de castanhas-do-Brasil também amendoins, avelãs, frutos de casca rígida e frutos secos, desde que passem por processos de seleção e tratamento antes do consumo humano (EC, 2010). A exportação de castanhas-do-Brasil para a Europa caiu quase 90% entre os anos de 2000 e 2004, por conta destas restrições (FREITAS-SILVA e VENÂNCIO, 2011). Na safra de 2006, Pacheco e Scussel (2009) reportaram concentrações de aflatoxinas maiores que estes limite mencionados em castanhas processadas na Amazônia destinadas à exportação. Para atender esta demanda, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento criou um

programa para fiscalizar a cadeia produtiva e incentivar pesquisas, no intuito de evitar e limitar a contaminação dos alimentos com estas micotoxinas (BAQUIÃO, 2012; SILVA, 2014).

1.4 GENES RELACIONADOS À BIOSÍNTESE DAS AFLATOXINAS

Os genes relacionados à produção de aflatoxinas são chamados de “*afI*” seguidos das letras entre “A” e “Y” de acordo com o lugar que ocupa na via biossintética, que é formada por 25 genes posicionados no cluster de DNA de 80 kb próximo ao telômero do cromossomo 3 (YU et al., 2004; CARBONE et al., 2007) (Figura 7). Estes genes estão localizados na mesma ordem, da cadeia biossintética dessas toxinas, em fungos aflatoxigênicos da seção *Flavi* (*A. nomius*, *A. flavus* e *A. parasiticus*) (ERLICH et al. 2005).

Figura 7 – Conjunto de genes (A) e via biossintética das aflatoxinas (B).

Fonte: modificada de Yu et al., 2004.

No caso do *A. nomius*, essa cadeia biossintética possui tamanho de 68,4 kb (ERLICH et al., 2005). A maior parte dos genes que codificam enzimas desta via foram clonados e caracterizados. A via é controlada de forma coordenada, sendo que o ácido norsolorínico (NOR) é a primeira substância estável precursora de aflatoxinas (BENNETT, 1981; TRAIL et al., 1994). Logo no começo da via, os genes *aflA* e *aflB* codificam duas subunidades enzimáticas sintetizadoras de ácidos graxos (FAS α e FAS β , respectivamente), e então o gene *aflC* codifica uma enzima sintetizadora de policetídeos (PKS), as três enzimas estão envolvidas na transformação do acetato no policetídeo NOR (FLAHERTY e PAYNE, 1997; YU et al., 2004; YU, 2012; KUMAR et al., 2017).

O *aflD* é um gene responsável pela codificação de uma enzima redutase, que da início à reação de redução do NOR, este ácido então passa pela atuação de mais dois genes (*aflE* e *aflF*) e é convertido em averantina (AVN) ainda no início da cadeia (TRAIL et al., 1994; YU, 2012). Vale ressaltar que para que ocorra a reação NOR $\rightarrow$ AVN é necessário que ao menos dois desses genes (*aflD*, *aflE* e *aflF*) estejam atuando de forma apropriada (TRAIL et al., 1994; YU et al., 2004; DO e CHOI, 2007).

Esse policetídeo sofre então uma sequência de transformações, AVN $\rightarrow$ 5'-hidroxiaverantina (HAVN) $\rightarrow$ 5'-oxoaverantina (OAVN) e subsequentemente em averufina (AVF) $\rightarrow$ acetato hemiacetal versicolonal (VHA) $\rightarrow$ versiconal (VAL) $\rightarrow$ versicolina B (VERB) graças à codificação de diversas enzimas pelos genes *aflG*, *aflH*, *aflI*, *aflJ* e *aflK*, respectivamente. A partir de então a cadeia biossintética das aflatoxinas segue por caminhos distintos. Para dar continuação à formação de B₁ e G₁ as etapas seguem da seguinte maneira, VERB $\rightarrow$ versicolina A (VERA) $\rightarrow$ dimetilesterigmatocistina (DMST) $\rightarrow$ esterigmatocistina (ST) $\rightarrow$ O-metilesterigmatocistina (OMST), com auxílio dos genes *aflL*, *aflM* e *aflN*, *aflO*, e *aflP* respectivamente. Para seguir com a formação de B₂ e G₂ as reações prosseguem de tal forma que, VERB $\rightarrow$ dihidrodimetilesterigmatocistina (DHDMST) $\rightarrow$ dihidroesterigmatocistina (DHST) $\rightarrow$ dihidro-O-metilesterigmatocistina (DHOMST), sendo os genes envolvidos, *aflL* supostamente, *aflO* e *aflP* (YU et al., 2004; DO e CHOI, 2007; FRISVAD et al., 2007; YU, 20012; KUMAR et al., 2017).

No final da via o gene *aflQ* é encarregado de codificar uma enzima monoxigenase, que atua na conversão OMST, por oxidação, em aflatoxina B₁

(FRISVAD et al., 2007), assim como no processo de modificação de DHOMST, também por oxidação, em aflatoxina B₂ (CARBONE et al., 2007; DO e CHOI, 2007; YU, 2012). Para a formação de AFG ainda há a necessidade de codificação de mais uma monooxigenase, agora pelo gene *aflU*, assim como a adição de açúcar pela codificação de uma enzima citosólica feita pelo gene *nadA*, essas circunstâncias levam a conversão de OMST em toxina G₁ e de DHOMST em G₂ (YU et al., 2000; CARBONE et al., 2007; YU, 2012).

O conjunto de genes envolvidos na via biossintética de metabólitos secundários fúngicos é regulado por fatores de transcrição específicos e ativação de certos genes envolvidos na regulação de numerosos processos fisiológicos que respondem a fatores ambientais e nutricionais (YU, et al., 2004; GEORGIANNA e PAYNE, 2009). Ocupando o meio da cadeia, *aflR* é um gene que atua na regulação positiva da expressão dos genes envolvidos na biossíntese das aflatoxinas (FLAHERTY e PAYNE, 1997; ABDEL-HADI et al., 2012; YU, 2012) e codifica uma sequência de DNA específica que é marcadora de zinco, necessária na ativação transcricional de todos ou quase todos os genes estruturais dessas toxinas (FLAHERTY e PAYNE, 1997, YU, 2012). A função complementar é feita por *aflS*, que faz o papel de regulação negativa sobre a transcrição dos genes estruturais envolvidos (MEYERS et al., 1998).

A proteína transportadora que leva as toxinas para fora da célula é codificada pelo gene *aflT*, o qual não é indispensável para a formação das aflatoxinas. Os genes *aflV* e *aflW* codificam, cada qual, uma enzima monooxigenase, já o gene *aflX* codifica um polipeptídeo de 266 aminoácidos com possível papel de oxidoreductase, e por fim *aflY* é responsável por codificar outro polipeptídeo de 495 aminoácidos de atuação desconhecida. Todavia a verdadeira função desses quatro genes (*aflV*, *aflW*, *aflX* e *aflY*) ainda não foi totalmente elucidada (YU et al., 2004)

Técnicas utilizadas para análise molecular têm sido empregadas com sucesso na identificação de espécies fúngicas e na verificação de genes envolvidos na biossíntese de micotoxinas (MEYERS et al., 1998; CASTRO, 2011). O conhecimento da correlação entre as sequências de DNA e os níveis de produção de micotoxinas contribuiu para o desenvolvimento de técnicas de análise da expressão dos genes envolvidos na biossíntese dessas toxinas.

Dentre estas, destaca-se a PCR em tempo real (*Real Time PCR*), que garante rapidez, elevada especificidade e, principalmente, promove a quantificação da expressão dos genes analisados (MAYER et al., 2003; LÓPEZ-ERRASQUÍN et al., 2007). Passone et al. (2010) e Abdel-Hadi et al. (2010) aplicaram esta técnica com êxito na expressão do gene *aflD* em cepas de *A. flavus* isoladas de amostras de amendoim armazenados. Gallo et al. (2010) usando a mesma técnica, analisaram a relação entre a produção de aflatoxinas em nozes e a expressão de sete genes envolvidos. Os autores relataram, entre estes, a expressão dos genes *aflD*, *aflQ* e *aflR*.

Desse modo, a realização de estudos que forneçam a correlação entre o comportamento dos genes e a produção aflatoxigênica em cepas de *A. nomius* em castanhas-do-Brasil é de extrema importância, pois proporcionará melhor entendimento e manipulação dos *clusters* envolvidos. Além disso, as cascatas de sinalização associadas com os procedimentos de esporulação e síntese de metabólitos podem proporcionar dados imprescindíveis sobre os mecanismos envolvidos na sobrevivência fúngica e viabilizar inferências na produção de aflatoxinas. Até o presente momento não existem relatos de estudo sobre a expressão de genes envolvidos com a produção de aflatoxinas por cepas de *A. nomius*.

5 CONCLUSÕES

- A temperatura ideal para crescimento micelial das cepas de *A. nomius* foi 30 °C;
- Os genes avaliados (*aflR*, *aflD* e *aflQ*) foram expressos nas três temperaturas estudadas. Entretanto, os genes *aflR* e *aflD* apresentaram maior expressão a 30 °C e menor a 25 °C, excetuando-se a cepa padrão que, em relação a *aflD*, apresentou maior expressão a 35 °C e menor a 25 °C;
- Nas condições avaliadas, o gene *aflQ* teve comportamento distinto em relação aos outros genes (*aflR* e *aflD*). As temperaturas de 25 e 30 °C favoreceram a expressão do referido gene;
- Em relação ao potencial aflatoxigênico das cepas de *A. nomius*, houve maior produção de AFB (B_1+B_2) do que AFG (G_1+G_2), em todas as temperaturas avaliadas (25, 30 e 35 °C), com exceção da cepa padrão, que demonstrou maiores níveis de AFG do que de AFB a 30 °C;
- Maiores níveis de AFB e AFG foram constatados nas cepas de *A. nomius* mantidas a 25 °C;
- Apesar das cepas de *A. nomius* utilizadas no presente estudo apresentarem melhor crescimento a 30 °C, não foi possível correlacionar este dado com os resultados da expressão dos genes (*aflR*, *aflD* e *aflQ*), tampouco com os dados do potencial aflatoxigênico;
- A maior produção de aflatoxinas e elevada expressão do gene *aflQ* ocorreu a 25 °C. Por sua vez, a temperatura de 35 °C revelou baixos níveis de toxina e de expressão;
- A presente investigação é pioneira em relação à expressão de genes envolvidos na biossíntese de aflatoxinas em *A. nomius* e trabalhos relacionados a esta espécie ainda são escassos. Sendo assim, mais estudos são necessários para o entendimento da ecofisiologia de *A. nomius* e dos mecanismos envolvidos na produção de aflatoxinas, a fim de possibilitar o desenvolvimento de métodos eficazes no controle de fungos e micotoxinas em castanhas-do-Brasil.

REFERÊNCIAS*

- ABDEL-HADI, A.; CARTER, D.; MAGAN, N. Temporal monitoring of the *nor-1* (*aflD*) gene of *Aspergillus flavus* in relation to aflatoxin B₁ production during storage of peanuts under different water activity levels. 2010. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, p. 1914-1922, 2010.
- ABDEL-HADI, A.; SCHMIDT-HEYDT, M.; PARRA, R.; GEISEN, R.; MAGAN, N. A systems approach to model the relationship between aflatoxin gene cluster expression, environmental factors, growth and toxin production by *Aspergillus flavus*. 2011. **Journal of the Royal Society Interface**, p. 757-767, 2012.
- AL-HMOUD, N.; IBRAHIM, M. A.; AL-ROUSAN, H.; ALSEYAH, A. The Prevalence of Aflatoxinogenic *Aspergillus parasiticus* in Jordan. 2011. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, p.1-5, 2012.
- AMANI, S.; SHAMS-GHAHFAROKHI, M.; BANASAZ, M.; RAZZAGHI-ABYANEH, M. Mycotoxin-Producing Ability and Chemotype Diversity of *Aspergillus* Section *Flavi* from Soils of Peanut-Growing Regions in Iran. **Indian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 551–556, 2012.
- ANDRADE, R. G. **Classificação das Castanhas do Brasil por Origem e Seleção de Suas Amêndoas Utilizando Visão Computacional**. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Engenharia Elétrica, Escola de Engenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.
- 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, 2005.
- AVRAMENKO, S. **Which Country Produces the Most Brazil Nuts in the World?** IndexBox Marketing & Consulting, 2017. Disponível em: <<http://www.indexbox.co.uk/blog/which-country-produces-the-most-brazil-nuts-in-the-world>> Acesso em: 11 jan. 2018.
- BAQUIÃO, A. C.; DE OLIVEIRA, M. M.; REIS, T. A.; ZORZETE, P.; ATAYDE, D. D.; CORREA, B. Polyphasic approach to the identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts. 2012. **Food Chemistry**, v. 139, p. 1127-1132, 2013.
- 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.
- BAQUIÃO, A. C.; GUEDES, A. R.; LOPES, E. L.; TRALAMAZZA, S. M.; ZORZETE, P.; CORREA, B. Expression of Genes by Aflatoxigenic and Non aflatoxigenic Strains of *Aspergillus flavus* Isolated from Brazil Nuts. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 13, n. 8, 2016.

BAQUIÃO, A. C.; ZORZETE, P.; REIS, T. A.; ASSUNÇÃO, E.; VERGUEIRO, S.; CORREA, B. Mycoflora and mycotoxins in field samples of Brazil nuts. **Food Control**, v. 28, p. 224–229, 2012.

BENNETT, J. W. Loss of Norsolorinic Acid and Aflatoxin Production by a Mutant of *Aspergillus parasiticus*. 1980. **Journal of General Microbiology**, v. 124, p. 429-432, 1981.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 3, p. 497-516, 2003.

BHATNAGAR, D.; YU, J.; EHRLICH, K. C. Toxins of Filamentous Fungi. In: BREITENBACH, M.; CRAMERI, R.; LEHRER, S. B. **Fungal allergy and pathogenicity**. Basel: Chem. Immunol., 2002.v. 81, p. 167-206.

BRASIL. **Decreto nº 5.975**, de 30 de novembro de 2006. Regulamenta os arts. 12, parte final, 15, 16, 19, 20 e 21 da Lei nº 4.771, de 15 de setembro de 1965, o art. 4º, inciso III, da Lei nº 6.938, de 31 de agosto de 1981, o art. 2º da Lei nº 10.650, de 16 de abril de 2003, altera e acrescenta dispositivos aos Decretos nºs 3.179, de 21 de setembro de 1999, e 3.420, de 20 de abril de 2000, e dá outras providências. Disponível em: <<http://www2.camara.leg.br/legin/fed/decret/2006/decreto-5975-30-novembro-2006-547239-norma-Atualizada-pe.pdf>> Acesso em: 28 out. 2015.

BRASIL. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Comunicado nº 015**, da CONAB, de 19 de julho de 2017. Normas específicas de castanha-do-Brasil com casca extrativista – Safra 2017, publicada no Diário Oficial da União de 21/07/2017a.

BRASIL. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Relatório Mensal**. Superintendência Regional de Roraima, 2017b.

BRASIL. **Decreto 1282**, de 19 de outubro de 1994. Regulamenta os artigos 15, 19, 20 e 21 da Lei 4.771, de 15 de setembro de 1965, e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 20 de outubro de 1994, Seção 1, p. 1218.

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

BRASIL. Presidência da República. Casa Civil. **Lei n. 10.831**, de 23 de dezembro de 2003. Dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, 24 de dez. 2003. Seção 1, p. 8.

BORELLO. **Beneficiamento de Castanha do Brasil**. Borello Alimentos, 2012. Disponível em: <<http://www.borello.com.br>> Acesso em: 30 jan. 2018.

CAC - Codex Alimentarius Commission. 2010. Proposed Draft Maximum Level for Total Aflatoxins in Brazil Nuts. In: DISTRIBUTION OF THE REPORT OF THE

FOURTH SESSION OF THE CODEX COMMITTEE ON CONTAMINANTS IN FOODS. ALINORM 10/33/41. **Appendix V Joint FAO/WHO Food Standards Program**, FAO, Rome, p. 47, 2010.

CAC - Codex Alimentarius Commission. 2006. Code of Practice for the Prevention and Reduction of Aflatoxin contamination in Tree Nuts. **Recommended international code of hygienic practice**, v. 59, p. 1-9, 2006.

CALDERARI, T. O.; IAMANAKA, B. T.; FRISVAD, J. C.; PITT, J. I.; SARTORI, D.; PEREIRA, J. L.; FUNGARO, M. H. P.; TANIWAKI, M. H. The biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in Brazil nuts: From rainforest to consumer. **International Journal of Food Microbiology**, v. 160, p. 267-272, 2013.

CAMARGO, F. F. **Etnoconhecimento e variabilidade genética de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.) em área da Amazônia matogrossense**. 2011. 127 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais e Ambientais) – Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2011.

CARBONE, I.; RAMIREZ-PRADO, J. H.; JAKOBEK, J. L.; HORN, B. W. Gene duplication, modularity and adaptation in the evolution of the aflatoxin gene cluster. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, n. 111, 2007.

CAST – CONCIL 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.

CASTRO, F. L. F. **Interação entre fungos toxigênicos (*Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides*) e carunchos (*Sitophilus zeamais*) em amostras de grãos de milho**. 2011. 111 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

CHANG, P. K.; WILKINSON, J. R.; HORN, B. W.; YU, J.; BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T. E. Genes differentially expressed by *Aspergillus flavus* strains after loss of aflatoxin production by serial transfers. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, p. 917–925, 2007.

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

COSTA, A. K. F.; FREIRE, F. C. O.; VIEIRA, I. G. P.; ANDRADE, J. A.; MENDES, F. N. P. Fungos associados à castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl) e ao amendoim (*Arachis hypogaea* L.) comercializados em Fortaleza (Ceará). **Revista Ciência Agronômica**, v. 40, n. 3, p. 455- 460, 2009.

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.

DANTIGNY, P.; GUILMART, A.; BENSOUSSAN, M. Basis of predictive mycology. 2004. **International Journal of Food Microbiology**, v. 100, p. 187-196, 2005.

DAVARI, E.; MOHSENZADEH, M.; MOHAMMADI, G.; REZAEIAN-DOLOEI, R. Characterization of aflatoxigenic *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* strain isolates from animal feedstuffs in northeastern Iran. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 16, n. 2, p. 150-155, 2014.

DDTHA – DIVISÃO DE DOENÇAS DE TRANSMISSÃO HÍDRICA E ALIMENTAR. INFORME-NET DTA. **Manual das Doenças Transmitidas por Alimentos: Aflatoxinas e outras Micotoxinas**, 2003.

DO, J. H.; CHOI, D. K. Aflatoxins: Detection, Toxicity, and Biosynthesis. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 12, p. 585-593, 2007.

DOSTER, M. A.; COTTY, P. J.; MICHAILIDES, T. J. Description of a Distinctive Aflatoxin-Producing Strain of *Aspergillus nomius* that Produces Submerged Sclerotia. **Mycopathologia**, v. 168, p.193–201, 2009.

EC - EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation (EU) No. 165/2010 of 26 February 2010, amending Regulation (EC) No. 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. **Official Journal of the European Communities**, L 50, p. 8-12, 2010.

EHRlich, K. C.; KOBEMAN, K.; MONTALBANO, B. G.; COTTY, P. J. Aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Thailand. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, p. 153-159, 2007.

EHRlich, K. C.; YU, J.; COTTY, P. J. Aflatoxin biosynthesis gene clusters and flanking regions. 2004. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 518-527, 2005.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.). **Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental**, v. 60, 2008. 22 p.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Extrativismo Vegetal na Amazônia: história, ecologia, economia e domesticação**, 2014. Cap. 1. p. 17-43.

FERREIRA, E. S.; SILVEIRA, C. S.; LUCIEN, V. G.; AMARAL, A. S. Caracterização físico-química da amêndoa, torta e composição dos ácidos graxos majoritários do óleo bruto da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). **Alimentos e Nutrição**, v. 17, n. 2, p. 203-208, 2006.

FIB – FOOD INGREDIENTS BRASIL. **Micotoxinas**, n. 7, p. 32-40, 2009.

FAKRUDDIN, M.; CHOWDHURY, A.; HOSSAIN, M. N.; AHMED, M. M. Characterization of aflatoxin producing *Aspergillus flavus* from food and feed samples. **SpringerPlus**, v. 4, n. 159, 2015.

FLAHERTY, J. E.; PAYNE, G.A. Overexpression of *aflR* leads to upregulation of the pathway gene transcription and increased aflatoxin production in *Aspergillus flavus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3995–4000, 1997.

FREITAS-SILVA, O.; VENÂNCIO, A. Brazil nuts: Benefits and risks associated with the contamination by fungi and mycotoxins. 2010. **Food Research International**, v. 44, p. 1434–1440, 2011.

FRISVAD, J. C.; LARSEN, T. O.; VRIES, R.; MEIJER, M.; HOUBRAKEN, J.; CABAÑES, F. J.; EHRLICH, K.; SAMSON, R. A. Secondary metabolite profiling, growth profiles and other tools for species recognition and important *Aspergillus* mycotoxins. **Studies in Mycology**, v. 59, p. 31-37, 2007.

GALLO, A.; EPIFANI, F.; BONSEGNA, S.; PASCALE, M. Analysis of genes expressed during *Aspergillus flavus* colonization of hazelnut. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, p. 111-115, 2010.

GALLO, A.; SOLFRIZZO, M.; EPIFANI, F.; PANZARINI, G.; PERRONE, G. Effect of temperature and water activity on gene expression and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* on almond médium. 2015. **International Journal of Food Microbiology**, v. 217, p. 162–169, 2016.

GEORGIANNA, D. R.; PAYNE, G. A. Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: from gene to genome. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, p. 113–125, 2009.

GONÇALVES, J. S.; FERRACIN, L. M.; VIEIRA, M. L. C.; IAMANAKA, B. T.; TANIWAKE, M. H.; FUNGARO, M. H. P. Molecular analysis of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts. 2011. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1817-1825, 2012.

GOURAMA, H.; BULLERMAN, L. B. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: Aflatoxigenic Fungi of Concern in Foods and Feedst: A Review. **Journal of Food Protection**, v. 58, n. 12, p. 1395-1404, 1995.

GQALENI, N.; SMITH, J. E.; LACEY, J.; GETTINBY, G. Effects of Temperature, Water Activity, and Incubation Time on Production of Aflatoxins and Cyclopiazonic Acid by an Isolate of *Aspergillus flavus* in Surface Agar Culture. 1996. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 3, p. 1048- 1053, 1997.

HOUSHYARFARD, M.; ROUHANI, H.; FALAHATI-RASTEGAR, M.; MALEKZADEH-SHAFAROUDI, S.; MEHDIKHANI-MOGHADDAM, E.; PROBST, C. Characterization of *Aspergillus* section *Flavi* from pistachio soils in Iran. **Journal of Plant Protection Research**, v. 54, n. 4, 2014.

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**, v. 56, 1993. 571p.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura**, v. 31, p. 1-54, 2016.

INMETRO – INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. **Normalização e qualidade industrial**: orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Revisão: 01, 2003, 35 p.

IUPAC – INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. CURRIE, L. A. (Ed.) Commission on Analytical Nomenclature, Recommendations in Evaluation of Analytical Methods including Detection and Quantification Capabilities, **Pure Appl. Chem.**, v. 67, p. 1699-1723, 1999.

KLISCH, M. A. Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. 2006. **Mycoscience**, v. 48, n. 2, p.71-80, 2007.

KLICH, M. A. **Identification of Common Aspergillus species**. Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelauteurs, 2002. 116 p.

KOSIKOVA, D. **Brazil Nut Market - Globalization on the Brazil Nut Market**. IndexBox Marketing & Consulting, 2016. Disponível em: <<http://www.indexbox.co.uk/news/Globalization-on-the-Brazil-Nut-Market>> Acesso em: 11 jan. 2018.

KUMAR P.; MAHATO, D. K.; KAMLE, M.; MOHANTA, T. K.; KANG, S. G. Aflatoxins: A Global Concern for Food Safety, Human Health and Their Management. 2016. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 2170, p. 1-10, 2017.

KURTZMAN, C. P.; HORN, B. W.; HESSELTINE, C. W. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin- producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. **Antonie Van Leeuwenhoe**, v. 53, n. 3, p. 147-158, 1987.

LACEY, J. Water availability and the occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in stored products. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS. 1988, Tokyo. **Anais...** Tokyo: IUPAC, 1988. v. 6, p.186-189.

LEBRET, D.T.; MARTINS JR., H.d 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. 10th Latin American Congress on Chromatography and Related Techniques – COLACRO X, Campos de Jordão, São Paulo, Brazil, 2004.

LIN, M. T.; DIANESE, J. C. A coconut-agar medium for rapid detection of anatoxin production by *Aspergillus* spp. **Phytopathology**, v. 66, p. 1466-1469, 1976.

LIU, X.; GUAN, X.; XING, F.; LV, C.; DAI, X.; LIU, Y. Effect of water activity and temperature on the growth of *Aspergillus flavus*, the expression of aflatoxin biosynthetic genes and aflatoxin production in shelled peanuts. **Food Control**, v. 82, p. 325-332, 2017.

LÓPEZ-ERRASQUÍN, E.; VÁZQUEZ, C.; JIMÉNEZ, M.; GONZÁLEZ-JAÉN, M. T. Real-time RT-PCR assay to quantify the expression of *fum1* and *fum19* genes from the fumonisin-producing *Fusarium verticillioides*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 68, p. 312-317, 2007.

LOZANO-OJALVO, D.; RODRÍGUEZ, A.; BERNÁLDEZ, V.; CÓRDOBA, J. J.; RODRÍGUEZ, M. Influence of temperature and substrate conditions on the *omt-1* gene expression of *Aspergillus parasiticus* in relation to its aflatoxin production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 166, p. 263-269, 2013.

LUO, J.; TANIWAKE, M. H.; IAMANAKA, B. T.; VOGEL, R. F.; NIESSEN, L. Application of loop-mediated isothermal amplification assays for direct identification of pure cultures of *Aspergillus flavus*, *A. nomius*, and *A. caelatus* and for their rapid detection in shelled Brazil nuts. 2013. **International Journal of Food Microbiology**, v. 172, p. 5-12, 2014.

MANIKANDAN, P.; VARGA, J.; KOCSUBE, S.; SAMSON, R. A.; ANITA, R.; REVATHI, R.; DÓCZI, I.; NÉMETH, T. M.; NARENDHAN, V.; VÁGVÖLGYI, C.; MANOHARAN, C.; KREDICS, L. Mycotic Keratitis Due to *Aspergillus nomius*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 10, p. 3382–3385, 2009.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Cenário das exportações de castanha-do-Brasil 2000-2010**, 2010.

Disponível em:

<http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/camaras_setoriais/Fruticultura/27R/27R/App_Castanha.pdf> Acesso em: 28 set. 2015.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Castanha-do-Brasil: Boas práticas para o extrativista sustentável orgânico**, ed. 1, 2014. 41 p.

MARTINS JUNIOR, P. O.; SOUZA, V. Y. K.; CORREIA, A. F.; MATA, E. C. G.; KANZAKI, L. I. B. Fontes de contaminação microbiana da castanha-do-pará. **Amazônia: Ciência & Desenvolvimento**, v. 6, n. 12, p. 21-30, 2011.

MASSI, F. P.; VIEIRA, M. L. C.; SARTORI, D. PENHA, R. E. S.; MUNHOZ, C. F.; FERREIRA, J. M.; IAMANAKA, B. T.; TANIWAKI, M. H.; FRISVAD, J. C.; FUNGARO, M. H. P. Brazil nuts are subject to infection with B and G aflatoxin-producing fungus, *Aspergillus pseudonomius*. 2014. **International Journal of Food Microbiology**, v. 186, p. 14-21, 2014.

MASSI, F. P.; PENHA, R. E. S.; CAVALCANTE, M. C.; VIARO, H. P.; SILVA, J. J.; FERRANTI, L. S.; FUNGARO, M. H. P. Identification of *Aspergillus nomius* in Bees Visiting Brazil Nut Flowers. 2014. **Microbes and Environments**, v. 30, n. 3, p. 273-275, 2015

MAYER, Z.; FÄRBER, P.; GEISEN, R. Monitoring the production of aflatoxin B₁ in wheat by measuring the concentration of *nor-1* mRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 1154-58, 2003.

MEYERS, D. M.; OBRIAN, G.; DU, W. L.; BHATNAGAR, D.; PAYNE, G. A. Characterization of *afIJ*, a Gene Required for Conversion of Pathway Intermediates to Aflatoxin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 10, p. 3713–3717, 1998.

MIDORIKAWA, G. E. O.; SOUZA, M. L. M.; SILVA, O. F.; DIAS, J. S. A.; KANZAKI, L. I. B.; HANADA, R. E.; MESQUITA, R. M. L. C.; GONÇALVES, R. C.; Virginia S ALVARES, V. S.; BITTENCOURT, D. M. C.; MILLER, R. N. G. Characterization of *Aspergillus* species on Brazil nut from the Brazilian Amazonian region and development of a PCR assay for identification at the genus level. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 138, p. 1-9, 2014.

MIDORIKAWA, G. E. O. ***Aspergillus* seção *Flavi*: Caracterização molecular de espécies aflatoxigênicas da castanha do Brasil e análise do transcrito de *Aspergillus oryzae* em relação à degradação enzimática do bagaço de cana**. 120 p. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

MOORE, G. G.; MACK, B. M.; BELTZ, S. B. Genomic sequence of the aflatoxigenic filamentous fungus *Aspergillus nomius*. **BMC Genomics**, v. 16, n. 551, 2015.

OLSEN, M.; JOHNSON, P.; MÖLLER, T. PALADINO, R.; LINDBLAD, M. *Aspergillus nomius*, an important aflatoxin producer in Brazil nuts? 2008. **World Mycotoxin Journal**, v. 1, n. 2, p. 123-126, 2008.

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, n. 3, p. 295-304, 2009.

PACHECO, A. M. **Selênio e Aflatoxinas em castanhas-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) e qualidade de produtos derivados**. 2007. 144 p. Tese (Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

PASSONE, M. A.; ROSSO, L. C.; CIANCIO, A.; ETCHEVERRY, M. Detection and quantification of *Aspergillus* section *Flavi* spp. in stored peanuts by real-time PCR of *nor-1* gene and effects of storager conditions on aflatoxin production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 138, p. 276-281, 2010.

PASSONE, M. A.; ROSSO, L. C.; ETCHEVERRY, M. Influence of sub-lethal antioxidant doses, water potential and temperature on growth, sclerotia, aflatoxins and *afID* (= *nor-1*) expression by *Aspergillus flavus* RCP08108. 2011. **Microbiological Research**, v. 167, p. 470–477, 2012.

PATRIARCA, A.; VAAMONDE, G.; PINTO, V. F.; COMERIO, R. Influence of water activity and temperature on the growth of *Wallemia sebi*: application of a predictive model. **International Journal of Food Microbiology**, v. 68, p. 61-67, 2001.

PENNACCHIO, H. L. Proposta de preço mínimo safra 2013/2014 (Produtos da sociobiodiversidade). **Rev. Conab**, v. 3, p. 85-91, 2013.

PETERSON, S. W.; ITO, Y.; HORN, B. W.; GOTO, T. *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. **Mycologia**, v. 93, n. 4, p. 689-703, 2001

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, p. 2002-2007, 2001.

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

PITT, J.I.; MISCAMBLE, B.F. Water relations of *Aspergillus flavus* and closely related species. 1994. **Journal of Food Protection**, v. 58, n. 1, p. 86-90, 1995.

REIS, T. A.; BAQUIÃO, A. C.; ATAYDE, D. D.; GRABARZ, F.; CORRÊA, B. Characterization of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from organic Brazil nuts using a polyphasic approach. 2013. **Food Microbiology**, v. 42, p. 34-39, 2014.

REIS, T. A.; OLIVEIRA, T. D.; BAQUIÃO, A. C.; GONÇALVES, S. S.; ZORZETE, P.; CORRÊA, B. Mycobiota and micotoxins in Brazil nut samples from different states of the Brazilian Amazon region. 2012. **International Journal of Food Microbiology**, v. 159, n. 2, p. 61-68, 2012.

ROJAS-DURÁN, T. R.; FENTE, C. A.; VÁZQUEZ, B. I.; FRANCO, C. M.; SANZ-MEDEL, A.; CEPEDA, A. Study of a room temperature phosphorescence phenomenon to allow the detection of aflatoxigenic strains in culture media. 2006. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, p. 149–158, 2007.

SCHMIDT-HEYDT, M.; ABDEL-HADI, A.; MAGAN, N.; GEISEN, R. Complex regulation of the aflatoxin biosynthesis gene cluster of *Aspergillus flavus* in relation to various combinations of water activity and temperature. 2009. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, p. 231-237, 2009.

SCHMITTGEN, T.D., LIVAK, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative Ct method. **Nature Protocols**, v. 3, p. 1101-1108, 2008.

SCOTT, P. M. Natural poisons. In: HELRICH, K. (Ed.) **Official methods of analysis**. 15 ed. Arlington: Association of the Official Analytical Chemists, 1990. Cap. 49. p. 1184-1213.

SILVA, A. F. **Efeito das etapas de processamento sobre a qualidade de castanhas-do- brasil (*Bertholletia excelsa*, H.B.K.): avaliação da fração lipídica e contaminação por aflatoxinas**. 2014. 95 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2014.

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, zearalenonem and sterigmatocystin in some brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. **Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 72, p. 22-26, 1989.

SÓ GEOGRAFIA. **Amazonas**. Disponível em <<http://sogeografia.com.br/Mapas/Estados/am.gif>> Acesso em: 20 abr. 2018.

STUBBLEFIELD, R. D. Thin-layer and high performance liquid chromatographic methods for the analysis of aflatoxins in animal tissues and fluids. In: RICHARD, J. L.; THURSTON, J. R. (Ed.) **Diagnosis of Mycotoxicoses**. Boston, MA: Martinus Nijhoff, 1986.

TANAKA, F.; FUKUSE, T.; WADA, H.; FUKUSHIMA, M. The history, mechanism and clinical use of oral 5-fluorouracil derivative chemotherapeutic agents. **Curr. Pharm. Biotech.**, v. 1, n. 2, p. 137-164, 2000.

TANIWAKI, M. H.; FRISVAD, J. C.; FERRANTI, L. S.; LOPES, A. S.; LARSEN, T. O.; FUNGARO, M. H. P.; IAMANAKA, B. T. Biodiversity of mycobiota throughout the Brazil nut supply chain: From rainforest to consumer. **Food Microbiology**, v. 61, p. 14-22, 2017.

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

TRAIL, F.; CHANG, P. K.; CARY, J.; LIN, J. E. Structural and Functional Analysis of the *nor-1* Gene Involved in the Biosynthesis of Aflatoxins by *Aspergillus parasiticus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 11, p. 4078-4085, 1994.

WUNDER, T.; KREMER, S.; STERNER, O.; ANKE, H. Metabolism of the polycyclic aromatic hydrocarbon pyrene by *Aspergillus niger* SK 9317. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 42, p. 636-641, 1994.

YU, J.; CHANG, P. K.; EHRLICH, K. C.; CARY, J. W.; BHATNAGAR D.; CLEVELAND T. E.; PAYNE, G.A.; LINZ, J. E.; WOLOSHUK, C.P.; BENNETT, J. W. Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 1253–1262, 2004.

YU, J.; CHANG, P. K.; BHATNAGAR D, CLEVELAND T. E. Cloning of a sugar utilization gene cluster in *Aspergillus parasiticus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1493, 211-214, 2000.

YU, J. Current Understanding on Aflatoxin Biosynthesis and Future Perspective in Reducing Aflatoxin Contamination. **Toxins**, v. 4, p. 1024-1057, 2012.

ZAFRA, G.; ABSALÓN, A. E.; CORTÉS-ESPINOSA, D. V. Morphological changes and growth of filamentous fungi in the presence of high concentrations of PAHs. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 937-941, 2015.

ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 15, n. 2, p. 129-144, 2011.

ZOTTI, M.; MACHETTI, M.; PERSI, A.; BARABINO, G.; PARODI, A. Onychomycosis: First Case Due to *Aspergillus nomius*. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 91, n. 5, p. 591-592, 2011.

---

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002, 24 p.