LARISSA DE SOUZA FERRANTI

***Aspergillus* section *Nigri* produtores de fumonisina B₂
isolados de castanha-do-brasil**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2012

LARISSA DE SOUZA FERRANTI

***Aspergillus* section *Nigri* produtores de fumonisina B₂
isolados de castanha-do-brasil**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre 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 não autorizada pelo autor

Ferranti, Larissa de Souza.

Aspergillus section *Nigri* produtores de fumonisina B₂ isolados de castanha-do-brasil / Larissa de Souza Ferranti. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Benedito Corrêa.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Fungos toxigênicos e micotoxinas.

Versão do título para o inglês: *Aspergillus* section *Nigri* producing fumonisin B₂ from Brazil nuts.

1. Castanha-do-brasil 2. Fumonisina B₂ 3. *Aspergillus* section *Nigri*
I. Corrêa, Prof. Dr. Benedito II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
III. Título.

ICB/SBIB0170/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Larissa de Souza Ferranti.

Título da Dissertação: *Aspergillus* section *Nigri* produtores de fumonisina B₂ isolados de castanha-do-brasil.

Orientador(a): Prof. Dr. Benedito Corrêa.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

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) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 408/10 referente ao projeto intitulado: “*Aspergillus section nigri produtores de toxinas no café*” sob a responsabilidade de **Larissa de Souza Ferranti**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS 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, 10 de agosto de 2010.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAULO M.A. ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Aos meus pais, pela dedicação, incentivo e apoio
constante durante minha formação, sobretudo
por serem parte fundamental na minha vida.

Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Benedito Corrêa, e à minha colaboradora, Dra. Marta Taniwaki, pela oportunidade, confiança e apoio durante todo o mestrado, pela competência científica, acompanhamento dos trabalhos, ensinamentos e incentivos, assim como pelas críticas, correções e sugestões relevantes feitas durante a orientação.

À minha amiga, Dra. Beatriz Thie Iamanaka, pelas orientações, ensinamentos, acompanhamento e auxílio nos trabalhos, sobretudo pela sua amizade, confiança e incentivos dados durante todos esses anos.

À Profa Maria Helena Fungaro pela oportunidade, orientação e ensinamentos em biologia molecular.

Agradecimento especial aos meus pais, Palmyro e Maria José, por sempre estarem ao meu lado, me aconselhando, apoiando e incentivando minhas escolhas e conquistas. Por nunca deixarem de acreditar na sua filha. Eu amo vocês!

Aos meus irmãos, Frederico e Cássia, que sempre compartilhamos momentos de alegrias e superações e que agora posso dividir mais essa conquista, tão importante da minha vida, com vocês!

À todos os meus familiares e amigos que me apoiaram e torceram pela futura “mestre”. Em especial ao meu primo Theo, que com sua amizade e sabedoria esplêndida me orientou e aconselhou nos momentos mais difíceis.

À Luciana Esper, pela ajuda na implantação desse trabalho e por sua amizade.

Aos pesquisadores, técnicos, funcionários e estagiários dos laboratórios de Microbiologia do CCQA do ITAL, de Micotoxinas do ICB da USP-SP e o de Genética Molecular de Fungos da UEL-PR, que tive o privilégio de conviver e aprender durante esses anos de desenvolvimento dos trabalhos da tese.

Ao Programa de Pós-Graduação de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Ao Instituto de Tecnologia de Alimentos- SP (ITAL).

À TODOS MEU MUITO OBRIGADO!

*“Aprender é a única coisa que a mente
nunca se cansa, nunca tem medo
e nunca se arrepende”.*

Leonardo da Vinci

RESUMO

FERRANTI, L. F. ***Aspergillus* section *Nigri* produtores de fumonisina B₂ isolados de castanha-do-brasil**. 2012. 84 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) é uma planta de grande importância econômica na região da Amazônia e constitui um importante produto exportado pelo Brasil. No entanto, os baixos níveis tecnológicos característicos de sua cadeia produtiva considerada ainda extrativista e as condições inadequadas de manejo da matéria prima, favorecem o aparecimento de contaminação por fungos produtores de micotoxinas. O conhecimento da distribuição de fungos toxigênicos em alimentos é importante porque dá parâmetros para controlar e prevenir a produção destas micotoxinas. A fumonisina B₂ (FB₂) é uma micotoxina produzida por espécies de *Fusarium* e *Aspergillus* section *Nigri*, e é motivo de preocupação para a saúde humana e de animais. O objetivo do presente trabalho foi verificar o potencial toxigênico quanto à produção de fumonisina B₂ das cepas de *Aspergillus* section *Nigri* isolados de castanha-do-brasil e verificar a contaminação desse alimento por essa micotoxina. Foram analisadas 200 cepas, previamente identificadas morfolologicamente como *Aspergillus* section *Nigri*, isoladas de amostras de castanha-do-brasil, pertencentes a coleção de fungos do laboratório de Microbiologia do Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos (CCQA), do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) em Campinas–SP. Para testar o potencial de produção de fumonisina B₂, os isolados foram inoculados em Czapek Yeast Extract Agar Sacarose 20% (CY20S). A toxina foi extraída com metanol e detectada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando reagente o-phthaldialdehydo (OPA) para reação de derivatização. Um total de 100 amostras de castanha-do-brasil provenientes dos Estados do Pará, Amazonas e São Paulo em diferentes etapas da cadeia produtiva da castanha foram analisadas utilizando coluna de imunoafinidade para extração e limpeza das amostras, OPA e CLAE, para detecção e quantificação da fumonisina B₂. De um total de 200 cepas de *Aspergillus* section *Nigri* testadas quanto à capacidade de produção de fumonisina B₂, apenas 39 cepas (19,5%) foram produtoras de FB₂, as concentrações variaram de 0,01 a 37,25 µg/kg. Cento e trinta e oito (69%) não foram produtoras de fumonisina B₂ e 23 cepas (11,5%) apresentaram picos menores que o limite de detecção. A atividade de água destas 100 amostras de castanha-do-brasil variaram de 0,348 a 0,994 e a infecção fúngica de 0 a 100%, nas diferentes etapas de cadeia. Embora várias amostras apresentaram alta contaminação por *Aspergillus* section *Nigri*, nenhuma amostra estava contaminada por fumonisina B₂.

Palavras-chave: *Aspergillus* section *Nigri*. Fumonisina B₂. Castanha-do-brasil.

ABSTRACT

FERRANTI, L. F. ***Aspergillus* section *Nigri* produtores de fumonisina B₂ isolados de castanha-do-brasil**. 2012. 84 p. Masters thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) is a plant with vast economic importance in the Amazon region and is an important product exported by Brazil. However, low levels of technology, and inadequate management of raw material favor the appearance of contamination by fungi that produce toxic metabolites called mycotoxins. The knowledge of the distribution of toxigenic fungi in foods is important because it provides parameters to control and prevent the production of mycotoxins. Fumonisin B₂ (FB₂) is a mycotoxin produced by *Fusarium* species and *Aspergillus* section *Nigri*, and is a concern for human health. The aim of this study was to assess the toxigênic potential for fumonisin B₂ production by *Aspergillus* section *Nigri* strain isolated from brazil nut and check the contamination of food by this mycotoxin. We analyzed 200 strains previously identified morphologically as *Aspergillus* section *Nigri* isolated from brazil nut samples, preserved in silica gel at a temperature of 5 °C, from the fungi collection at the Microbiology laboratory of the Centre for Science and Food Quality (CCQA), Institute of Food Technology (ITAL), Campinas-SP. To test the potential of fumonisin B₂ production, the isolates were inoculated on Czapek Yeast Extract Agar Sucrose 20% (CY20S). The toxin was extracted with methanol and identified by high performance liquid chromatography (HPLC) using o-phthaldialdehyde reagent (OPA) for derivatization reaction. A total of 100 brazil nut samples from the States of Pará, Amazonas and São Paulo at different stages of the nut production chain were analyzed using an immunoaffinity column for extraction and cleanup of samples, HPLC and OPA for the detection and quantification of fumonisin B₂. From a total of 200 strains of *Aspergillus* section *Nigri* tested for the ability to produce fumonisin B₂, only 39 strains (19.5%) were producing FB₂ concentrations ranging from 0.01 to 37.25 g / kg, 138 (69%) were not producing fumonisin B₂, and 23 strains (11.5%) showed peaks less than the detection limit. The water activity of the 100 samples from the brazil nuts ranged from 0.348 to 0.994 and a fungal infection of 0 to 100%, at the different stages of the chain. Although several samples showed high contamination by *Aspergillus* section *Nigri*, no sample was contaminated by fumonisin B₂.

Keywords: *Aspergillus* section *Nigri*. Fumonisin B₂. Brazil nut.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1A - Castanheira (<i>Bertholletia excelsa</i>)	17
Figura 1B - Ouriço contendo as sementes de castanha-do-brasil	17
Figura 2 - Castanha-do-brasil: Balanço de oferta e demanda no Brasil	20
Quadro 1 - Ocorrência de micotoxinas em alimentos e seus efeitos tóxicos em animais	22
Figura 3A - Observação microscópicas das estruturas <i>Aspergillus</i> sp	28
Figura 3B - Observação macroscópica do crescimento de <i>Aspergillus niger</i>	28
Figura 4 - Árvores filogenética com base em análise de dados de sequências de calmodulina de <i>Aspergillus</i> secção <i>Nigri</i>	33
Figura 5 - Estrutura química da ocratoxina A	34
Figura 6 – Estruturas de fumonisinas FB1-4 e FB6	36
Figura 7 – Metabolismo de esfingolipídeos	37
Figura 8 – Cluster do gene de fumonisina em <i>A. niger</i> e <i>F. verticillioides</i> . Comparação estabelecida entre os clusters de fumonisina em <i>F. verticillioides</i> e o cluster de genes da região homologa em <i>A. niger</i>	38
Figura 9 – Cromatograma obtido da injeção do padrão de FB ₂	57
Figura 10 – Curva padrão de fumonisina B ₂	58
Figura 11 – Amostra inoculada com cepa de <i>A. niger</i> produtora de FB ₂	67
Figura 11A – Após 7 dias da inoculação	67
Figura 11B – Após 14 dias a inoculação	67
Figura 12 – Análise de RAPD utilizando <i>primer</i> OPX13	68
Figura 13 – Árvore Filogenética baseada na análise de sequências do gene de β -tubulina, utilizando cepas isoladas da castanha-do-brasil (ITAL) e sequências obtidas no GenBank	69
Figura 14 – Comparação das sequências de β -tubulina das espécies <i>A. niger</i> e <i>A. awamori</i> , diferenciando em apenas um nucleotídeo	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Informações nutricionais dos componentes presentes na castanha-do-brasil e a porcentagem de ingestão diária recomendada	18
Tabela 2 - Comparação de metodologia para extração de fumonisina B ₂	57
Tabela 3 - Cepas de <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> isolados de castanha-do-brasil testados para produção de FB ₂	60
Tabela 4 - Atividade de água (a _w), porcentagem (%) de infecção por <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> e presença de fumonisina B ₂ (FB ₂) nas amostras de castanha-do-brasil coletadas nas florestas	62
Tabela 5 - Atividade de água (a _w), porcentagem (%) de infecção por <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> e presença de fumonisina B ₂ (FB ₂) nas amostras de castanha-do-brasil coletadas nos mercados	63
Tabela 6 - Atividade de água (a _w), porcentagem (%) de infecção por <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> e presença de fumonisina B ₂ (FB ₂) nas amostras de castanha-do-brasil coletadas nas processadoras	64
Tabela 7 - Atividade de água (a _w), porcentagem (%) de infecção por <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> e presença de fumonisina B ₂ (FB ₂) nas amostras de castanha-do-brasil coletadas nos supermercados	65
Tabela 8 - Resultado do teste realizado inoculando cepa produtora de FB ₂ em duas amostras de castanha-do-brasil com diferentes atividades de água	67
Tabela 9 - Produção de fumonisina B ₂ por <i>A. niger</i> e <i>A. awamori</i> isoladas de castanha-do-brasil	71

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Castanha-do-brasil: Aspectos gerais e sua importância	17
2.2 Fungos: Importância em alimentos	20
2.3 Fungos toxigênicos em castanha-do-brasil	25
2.3.1 <u>Aspergillus section Nigri - morfologia e identificação</u>	27
2.3.2 <u>Técnicas moleculares para identificação de fungos da seção Nigri</u>	28
2.3.3 <u>Micotoxinas produzidas por Aspergillus section Nigri</u>	33
2.3.3.1 <u>Fumonisin</u>	35
3 OBJETIVO	40
3.1 Objetivo Geral	40
3.2 Objetivos Específicos	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 Material Biológico	41
4.2 Otimização da metodologia para detecção de fumonisina B ₂ nas cepas de <i>Aspergillus section Nigri</i>	41
4.2.1 <u>Teste de detecção de fumonisina B₂ por cromatografia de camada delgada (CCD)</u>	41
4.2.2 <u>Teste de detecção de fumonisina B₂ por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</u>	44
4.2.2.1 <u>Meio de cultura para produção de FB₂</u>	44
4.2.2.2 <u>Extração de FB₂</u>	44
4.2.2.3 <u>Detecção de fumonisina B₂ e parâmetros da CLAE</u>	44
4.2.2.4 <u>Determinação do limite de detecção do método</u>	45
4.3 Ensaio para detecção de Fumonisin B ₂ em amostras de castanha-do-brasil	45
4.3.1 <u>Amostras</u>	45
4.3.2 <u>Análise da atividade de água</u>	45
4.3.3 <u>Otimização de metodologia para detecção de Fumonisin B₂ em amostras de castanha-do-brasil</u>	46
4.3.3.1 <u>Clean-up</u>	46
4.3.3.2 <u>Parâmetros da CLAE</u>	47

4.3.3.3 <u>Avaliação da performance do método</u>	47
4.3.3.3.1 <u>Teste de recuperação</u>	47
4.3.3.3.2 <u>Determinação do limite de detecção do método</u>	48
4.4 Inoculação do fungo <i>A. niger</i> nas amostras de castanha-do-brasil	48
4.4.1 <u>Isolados testados</u>	48
4.4.2 <u>Inóculo</u>	48
4.4.3 <u>Casca- Esterilização</u>	49
4.4.4 <u>Amêndoas de castanha-do-brasil</u>	49
4.4.5 <u>Inoculação dos fungos nas amêndoas de castanha-do-brasil</u>	49
4.4.6 <u>Extração de fumonisina B₂</u>	50
4.5 Análise molecular dos isolados de <i>Aspergillus section Nigri</i>	50
4.5.1 <u>Obtenção do micélio para extração de DNA genômico</u>	50
4.5.2 <u>Extração do DNA genômico</u>	51
4.5.3 <u>Quantificação do DNA</u>	52
4.5.4 <u>Amplificação da porção Bt2 do gene da β – tubulina</u>	52
4.5.5 <u>Sequenciamento da região Bt2 do gene da β – tubulina</u>	52
4.5.6 <u>Análise por RAPD</u>	53
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1 Teste de detecção de fumonisina B₂ por cromatografia em camada delgada (CCD)	55
5.2 Teste de detecção de fumonisina B₂ por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	56
5.2.1 <u>Extração de fumonisina B₂ pelos isolados fúngicos</u>	57
5.2.2 <u>Avaliação do potencial de produção de fumonisina B₂ pelas cepas de <i>Aspergillus section Nigri</i> isoladas de castanha-do-Brasil</u>	59
5.3 Análises das amostras de castanha-do-brasil	61
5.3.1 <u>Valores de atividade de água, infecção por <i>Aspergillus section Nigri</i> e incidência de fumonisina B₂ nas castanha-do-brasil</u>	61
5.4 Teste de inoculação de cepa de <i>A. niger</i> produtor de fumonisina B₂ em amêndoas de castanha-do-brasil	66
5.5 Análise dos isolados de <i>Aspergillus section Nigri</i> molecularmente	67
6 CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS	74

1 INTRODUÇÃO

A castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) é um produto de elevada importância para a economia dos Estados da Amazônia Brasileira, sendo o principal produto extrativo não madeireiro da floresta amazônica, está ligada à cultura das populações tradicionais onde seus produtos e subprodutos são utilizados como fonte de alimentação e renda há várias gerações. O Brasil abastece 75% do mercado mundial e produz, anualmente, cerca de 26.000 toneladas de castanha-do-brasil, sendo predominante a exportação do produto *in natura*. A amêndoa da castanha-do-brasil é considerada um alimento rico em proteínas, lipídios e vitaminas, além de se constituir em excelente fonte de selênio. Entretanto, o baixo nível tecnológico característico de sua cadeia produtiva bem como as condições inadequadas de manejo e manuseio da matéria-prima favorece a constituição de pontos de contaminação com consequente risco à saúde do consumidor e perdas econômicas comuns em todas as etapas (SOUZA, 2003).

Aspergillus section *Nigri*, conhecidos como *black aspergilli*, são comumente encontrados em alimentos como uvas e produtos de uvas, café, cacau, grãos e cebolas. É considerado um fungo frequente em castanhas, especialmente em amendoim e nozes (PITT; HOCKING, 2009). *A. niger* é um dos mais importantes fungos filamentosos utilizados em biotecnologia. Possui o grau GRAS (*Generally Regarded as Safe*) estabelecido pelo FDA (*US Food and Drugs Administration*), sendo utilizado para a produção de várias enzimas e ácidos orgânicos, em escala industrial (SAMSON; VARGAS, 2009).

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidas por fungos. Apesar de haver um esforço para controlar contaminações fúngicas em alimentos, os fungos toxigênicos estão presentes na natureza e ocorrem regularmente em alimentos como cereais, frutas e castanhas. Os três principais gêneros produtores de toxinas em alimentos são: *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* (MURPHY et al., 2006).

Em 2007, Frisvad et al., relataram pela primeira vez a produção de fumonisina B₂ (FB₂) por *Aspergillus niger*. Até então, a produção de fumonisina havia sido relatada apenas em *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* e outras espécies do gênero *Fusarium*. Mais tarde, Frisvad et al. (2011), demonstram que *A. niger* pode produzir tanto fumonisina B₂ quanto B₄ e B₆, não encontrando cepas produtoras de FB₁ nem FB₃.

A fumonisina B₁ (FB₁) é a mais estudada dentre este grupo de metabólitos, mas quando comparada à FB₂, esta última é mais citotóxica que a FB₁ (GUTLEB; MORRISON; MURK, 2002). Fumonisinas são carcinogênicas, hepatotóxicas e nefrotóxicas. Causadoras de leucoencefalomalácia (relacionadas com lesões necróticas no cérebro) em equinos e edema pulmonar em suínos. O consumo de grãos contaminados por fumonisinas pode estar relacionado ao maior índice de câncer esofágico em humanos (DESJARDINS, 2006; MURPHY et al., 2006).

Nestas condições são necessários estudos a fim de conhecer a incidência de *Aspergillus section Nigri* produtores de fumonisina B₂ nas castanhas-do-brasil, uma vez que a incidência destas espécies neste produto é comum.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Castanha-do-brasil: aspectos gerais e sua importância

A castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) também conhecida como castanha-do-pará e castanha-da-amazônia é uma planta com grande importância econômica na região da Amazônia. Suas sementes comestíveis, juntamente com o látex da *Hevea brasiliensis*, são os principais produtos da reserva extrativista da Amazônia. As castanhas-do-brasil são coletadas principalmente na estação chuvosa (dezembro a junho) e a borracha é extraída na época da seca. A combinação desses dois produtos florestais oferece uma renda para os moradores da floresta durante todo o ano (FAO, 2012).

A castanheira é uma árvore alta (30 a 50 metros) com uma copa grande (cerca de 40 metros de diâmetro), dominando o local onde se encontra (FAO, 2012). Desenvolvem-se em terra firme nas Guianas, sudeste da Colômbia, sul da Venezuela, leste do Peru e norte da Bolívia além de toda a Amazônia brasileira. O fruto da castanha, chamado ouriço, pode pesar de 0,5 a 5 quilogramas (kg) podendo conter de 10 a 25 sementes (PACHECO; SCUSSEL, 2006). O ouriço é muito utilizado como carvão vegetal em fornos para a produção de farinha e pães, assim como no artesanato para a confecção de porta-jóias, cinzeiro e até mesmo instrumentos musicais. As cascas das amêndoas são utilizadas para a produção de bicom bustíveis (CAMPO/PAS, 2004), tapetes, peças de artesanato e composição de tintas (BRASIL, 2002) (Figura 1).

Figura 1 - A: Castanheira (*Bertholletia excelsa*); B: Ouriço contendo as sementes de castanha-do-brasil.

Fonte: Rede de sementes do Xingu, 2012.

É uma árvore culturalmente associada às populações da Amazônia e do Estado do Amazonas, seus produtos e subprodutos são utilizados como fonte de alimentação e renda há várias gerações (MENEZES et al., 2005). A amêndoa da castanha-do-brasil é muito apreciada pelos consumidores não só pelo seu sabor como também pelo seu valor nutricional (Tabela 1). Estudos mostram que a castanha-do-brasil apresenta de 60 a 70% de lipídios e de 15 a 20% de proteínas, além de vitaminas (A, B₁, B₂ e C) e minerais (Ba, Br, Ca, Co, Cs, Mg, Ni, Rb, Sr e Se), sendo chamada de “carne vegetal”. É considerada fonte de aminoácidos essenciais como a arginina, a qual é precursora do óxido nítrico, essencial para a função endotelial (CRISHOLM et al., 2005), além de possuir metionina, cisteína e leucina (SUN; LEUNG; TOMIC, 1987). Pode ser consumida crua, assada, salgada, em sorvetes ou como ingrediente para produtos de confeitaria (FAO, 2012; PACHECO; SCUSSEL, 2006).

Tabela 1 - Informações nutricionais dos componentes presentes na castanha-do-brasil e a porcentagem de ingestão diária recomendada

Informação nutricional	Porção de 100g	%VD
Valor calórico	676 kcal	34%
Carboidratos	79g	26%
Proteínas	14g	19%
Gorduras totais	67g	122%
Gorduras saturadas	15g	69%
Gorduras trans	0g	VD não estabelecido
Colesterol	0mg	0%
Fibra Alimentar	8g	32%
Sódio	<5mg	0,08%
Cálcio	146mg	18%
Ferro	2mg	16%
Selênio	204mg	600%

Fonte: COOPERACRE, 2012.

Do ponto de vista econômico, a castanha é o principal produto extrativo não madeireiro da floresta amazônica, sendo de grande importância para a economia dos Estados da Amazônia Brasileira (Amazonas, Pará, Acre, Rondônia, Roraima e Mato Grosso), sendo, em alguns destes, o principal produto extrativista.

A castanha constitui um importante produto exportado, mas em função de ser facilmente substituída por outras amêndoas, devido variações de preço, sua demanda no comércio internacional é muito elástica (MENEZES et al., 2005). Até 1990 o Brasil produzia cerca de 50 mil toneladas de castanha e era considerado o

líder no mercado mundial, com 80% do comércio, mas atualmente a produção brasileira vem diminuindo progressivamente (cerca de 30 mil toneladas anuais), consequentemente a exportação média vem decrescendo. Em 1990 o Brasil exportou 51.195 toneladas, já no ano de 1996, foram 19.301 toneladas exportadas (EUROPEAN UNION, 2003). Esta queda na exportação se deu em parte pela queda da sua produção interna, devido à falta de incentivos governamentais aos produtores extrativistas, o desmatamento da região Amazônica, assim como a falta de organização das cooperativas (responsáveis pela extração das castanhas) que não agregam os devidos valores para concorrer com o mercado externo, a ausência de mão-de-obra especializada e pela competição com outros países produtores (EMBRAPA, 2012; ENRÍQUEZ et al., 2009). Além disso, o surgimento de barreiras não tarifárias impostas por padrões fitossanitários mais rígidos, como a União Européia (principal importador), que em 2002 estabeleceu limite máximo de 2 µg/kg para a aflatoxina B₁ e 4 µg/kg para as aflatoxinas totais (EU, 2003), restringi a sua comercialização devido aos altos níveis de aflatoxinas encontrados nos produtos (HOMMA et al., 2000). Os problemas com a exportação e a perda de participação no mercado mostraram a necessidade de avaliar a competitividade e a eficiência da cadeia produtiva brasileira da castanha-do-brasil (SANTOS; SENA; ROCHA, 2010).

O fato de a Bolívia dominar o mercado, não se trata apenas da quantidade exportada, mas da tecnologia, dos níveis sanitários e do valor agregado do produto boliviano, além disso, a Bolívia não conta com as exigências sanitárias que o Brasil exige para os seus produtos. A exportação da Bolívia teve maior aumento a partir de 1998, segundo dados da FAO (2012). Em 2008 a Bolívia foi responsável por cerca de 70% das exportações, seguidas do Brasil com 25%, e Peru com cerca de 10%. A Bolívia concentrou-se na exportação de castanhas sem casca, importando assim produtos com casca do Brasil, processando e exportando o produto descascado. Verificou-se que as indústrias bolivianas tiveram maior capacidade de se ajustar as novas exigências impostas pela União Européia do que a indústria brasileira (SANTOS; SENA; ROCHA, 2010).

Nos quatro primeiros meses de 2012, o volume total das exportações de castanha-do-brasil atingiu 4.940 toneladas, gerando uma receita de U\$S 6,5 milhões, valor 65,6% superior ao observado no mesmo período de 2011. A elevação na receita com a exportação do produto e nos volumes exportados é reflexo de uma melhora nos preços internacionais, principalmente dos compradores Europeus e

Norte-americanos, pois são os que melhor remuneram o produto. A Figura 2 ilustra a movimentação da produção e do consumo interno, assim como das exportações até o ano de 2011 (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2012).

Figura 2 – Castanha-do-brasil: Balanço de oferta e demanda no Brasil

Fonte: CONAB, 2012.

Atualmente cerca de 70% da produção nacional de castanha-do-brasil são destinados ao consumo interno do país, e 30% são exportados. Os principais importadores são Bolívia, com o produto “*in natura*”, seguida dos Estados Unidos, Hong Kong, Europa, Austrália, com a castanha beneficiada (CONAB, 2012).

2.2 Fungos: importância em alimentos

Os fungos são microrganismos eucariotos e heterotróficos, que podem ser encontrados amplamente distribuídos no solo, na água, em alimentos, nos vegetais, em detritos em geral, em animais e no homem (BENNETT; KLICH, 2003; CROUS et al., 2009; GOMPertz et al., 2008).

Alguns fungos são benéficos para a humanidade, por exemplo, na produção de antibióticos como a penicilina (*Penicillium chrysogenum*), na fabricação de ácido cítrico (*Aspergillus niger*), ácido fórmico (*Rhizopus* spp) e ácido málico (*Penicillium brevicompactum*) na indústria alimentícia, no processo de fermentação da cerveja, vinho e pão, assim como para produção de queijo ou salame, sendo utilizados extensivamente em biotecnologia (KELLER; TURNER; BENNETTI, 2005; PITT; HOCKING, 2009). No entanto, algumas interações entre populações humanas e fungos têm resultados sócio-econômicos negativos, sendo responsáveis por

diversas enfermidades em humanos e animais além de causarem alterações no sabor, odor e textura dos alimentos, podendo ocorrer perdas totais de safras.

Os gêneros mais comumente encontrados em alimentos são: *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Trichoderma* (PITT; HOCKING, 2009; SAMSON et al., 2010).

Os fungos são capazes de crescer em todos os tipos de alimentos: cereais, carne, leite, frutas, legumes e seus derivados. A deterioração das propriedades sensoriais dos alimentos é muitas vezes, devido à produção de exo-enzimas sintetizadas pelos fungos durante seu crescimento, podendo produzir grande número de enzimas como: lipases, proteases e carboidrases (BIGELIS, 1992), resultando em diferentes tipos de deterioração: alterando o sabor, odor, cor e textura (CHELKOWSKI, 1991; TIPPLES, 1995). Um exemplo da ação fúngica é o que ocorre na fabricação de polpa de morango, utilizando frutos íntegros pasteurizados, onde, fungos termorresistentes como *Byssoschlamys fulva* e *Byssoschlamys nivea* se desenvolvem, deteriorando visivelmente o produto (BEUCHAT; RICE, 1979). Além disso, muitos são capazes de biossintetizar metabólitos tóxicos, como as micotoxinas que afetam os humanos e os animais.

As micotoxinas são metabolitos secundários sintetizados por fungos filamentosos. São conhecidas mais de 300 micotoxinas, a maioria produzida por fungos do gênero *Aspergillus*, *Fusarium*, *Stachybotrys*, *Penicillium* e *Alternaria*. A toxicidade desses metabólitos pode variar muito, podendo causar diferentes tipos de câncer e imunossupressão. Entretanto, apenas algumas como aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxina A, patulina, tricotecenos e zearalenona possuem sua toxicidade bem descrita e legislação com limites máximos em alguns alimentos (SAMSON et al., 2010). É importante salientar que diferentes espécies de fungos podem produzir um mesmo tipo de micotoxina, como também, uma única espécie de fungo pode produzir mais de um tipo de toxina. Os efeitos tóxicos das micotoxinas podem ser potencializados pelo sinergismo que pode haver entre elas ou com doenças, principalmente imunossupressores (HUSSEIN; BRASSEL, 2001).

O efeito de uma micotoxina depende da dose e da frequência com que é ingerida e pode ser agudo (letal ou não) ou subagudo. O efeito agudo é de manifestação e percepções rápidas, podendo levar à morte, porque causa alterações irreversíveis, e é resultante da ingestão de doses geralmente elevadas. O efeito subagudo é o resultado de doses menores que provocam distúrbios e

alterações nos órgãos dos humanos e dos animais (BENNETT; KLICH, 2003; MURPHY et al., 2006; SHEPHARD, 2008)(Quadro 1).

Quadro 1 - Ocorrência de micotoxinas em alimentos e seus efeitos tóxicos em animais

Micotoxinas	Ocorrência em alimentos	Efeitos patológicos
Aflatoxinas (B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂)	Amendoim, milho, trigo, arroz, algodão, nozes, figos, frutas secas e outros.	Hepatotoxicidade, hiperplasia dos ductos biliares, hemorragia renal e do trato intestinal, carcinogênese.
Aflatoxinas M ₁	Leite e queijos	Semelhante a aflatoxina B ₁ .
Citrinina	Trigo, cevada, milho e arroz	Nefrotoxicidade (necrose tubular do rim).
Ácido Ciclopiazônico	Milho, amendoim e queijo	Necrose muscular, lesões orais, hemorragia intestinal e edema.
Ocratoxina	Cereais (trigo, cevada, aveia e milho), feijão, amendoim, carne suína, café, passas de uvas, frutas secas, vinho e cacau.	Nefrotoxicidade, nefropatia porcina, danos hepáticos, enterite, teratogênese, carcinogênese e imunossupressão.
Patulina	Maçãs deterioradas, suco de maçã	Edema cerebral e pulmonar, danos nos capilares do pulmão, fígado, baço e rins, paralisia dos nervos motores e convulsões.
Ácido penicílico	Milho armazenado, cereais, feijão desidratado e tabaco.	Danos hepáticos (fígado dilatado, necrose celular) e nos rins, dilatação dos vasos sanguíneos, antidiurese, carcinogênese.
Penitrens	Queijo em creme, nozes inglesas, hambúrguer e cerveja.	Tremores, falta de coordenação motora, diarreia com sangue e morte.
Deoxinivalenol (DON)	Milho, trigo, cevada e aveia	Desordem intestinal e efeitos reprodutivos (incluindo o aborto e o nascimento enfraquecido) em suínos. Afeta a qualidade do ovo e a redução do peso em aves. Perda de apetite no gado podendo afetar a produção de leite.
Toxina T-2	trigo, milho, aveia, cevada, arroz, feijão, soja.	Aleucia tóxica alimentar: angina, cefaléia, vômitos e, em casos mais graves, a leucopenia.
Zearalenona	Milho	Efeitos estrogênicos (edema da vulva, prolapso vaginal e aumento do útero), atrofia dos testículos, atrofia dos ovários, ginecomastia e aborto.
Fumonisinás	Milho e derivados	Leucoencefalomalácia equina e edema pulmonar em suínos, carcinogênese (câncer do esôfago).
Alcalóides do ergot	Cereais (trigo, centeio e aveia) e milho.	Ergotismo (síndrome nervoso e gangrenal).

Fonte: Council for Agricultural Science and Technology (CAST), 2003 modificado.

Fatores genéticos, ambientais e nutricionais, afetam significativamente a formação de micotoxinas. No campo, as condições climáticas, o estresse da planta, os vetores, a espécie fúngica e a carga de esporos infectante, as variações dentro de espécies de plantas, fungos e competição microbiana são fatores que afetam a produção de micotoxinas. Durante a estocagem e transporte, a atividade de água, temperatura, danos durante a colheita, e alguns fatores como a aeração (níveis de O_2 , CO_2), tipos de grãos, pH, e presença ou ausência de específicos nutrientes e inibidores são importantes. Geralmente, o crescimento fúngico, ocorre antes da produção das toxinas (CLIVER; RIEMANN, 2002).

O crescimento de fungos no campo pode resultar na redução da colheita e da produtividade da pecuária, decorrente de doenças e mortes causadas pelo consumo de alimentos contaminados. Na indústria, as micotoxinas são dificilmente eliminadas do alimento através de processos convencionais porque são termorresistentes. No mercado, as micotoxinas podem ser um obstáculo para o mercado nacional e internacional que exigem o cumprimento da legislação (MURPHY, 2006).

As perdas econômicas devido às micotoxinas implicam num custo em vários níveis, como por exemplo: Perdas diretas de produtos agrícolas, diminuição da velocidade de crescimento em animais e mortes, doenças humanas e diminuição da produtividade, custos indiretos dos sistemas de controle existentes para algumas micotoxinas, custos de destoxificação para poder recuperar um produto aceitável, rejeição de produtos pelo mercado importador.

Os custos econômicos de micotoxinas são impossíveis de determinar com precisão (WU, 2007), mas o FDA (US Food and Drug Administration) estimou que nos EUA o custo econômico médio das perdas de safras pela contaminação com micotoxinas (aflatoxinas, fumonisinas, desoxinivalenol) é de US\$ 932 milhões/ano (CAST, 2003).

Com o aumento no número de pacientes imunocomprometidos em hospitais, devido a realização de tratamentos com imunossupressores e um aumento de doenças auto-imunes, tem-se visto um aumento concomitante de infecções fúngicas fatais em seres humanos (HEDAYATI et al., 2007), enquanto que outras espécies de fungos podem causar micoses profundas, mesmo em hospedeiros imunocomprometidos.

O crescimento de fungos em alimentos e a produção de metabólitos secundários por esses microrganismos são regulados por vários fatores tanto

intrínsecos: umidade, atividade de água, pH e a composição nutricional, como extrínsecos (influências externas do ambiente em que o microrganismo está se desenvolvendo): temperatura do processamento e de estocagem, umidade relativa do ar, tempo de armazenagem, microclima, competição entre espécies, entre outros (PITT; HOCKING, 2009).

A atividade de água (a_w – *water activity*) é um dos fatores mais importantes. Determina quais microrganismos serão capazes de se desenvolver sobre um alimento e possivelmente causar sua deterioração, existindo uma diferença entre a a_w mínima para o crescimento e germinação fúngica e para a produção de micotoxinas (MONTVILLE; MATTHEWS, 2008; PITT; HOCKING, 2009). Os fungos capazes de crescerem em a_w de 0,85 ou inferior são denominados fungos xerofílicos. O valor de a_w limitante para o crescimento de qualquer microrganismo é em torno de 0,60 não ocorrendo deterioração microbiana em alimentos abaixo deste valor (PITT; HOCKING, 2009).

A composição nutricional da maioria dos alimentos é adequada ao crescimento de microrganismos, sendo considerado um ótimo substrato para o desenvolvimento. Para o metabolismo dos fungos o substrato mais adequado é o rico em carboidratos enquanto as bactérias preferem alimentos com altos teores de proteínas (PITT; HOCKING, 2009). Portanto o substrato apresenta uma grande influencia sobre a micobiota que se desenvolve em diferentes alimentos, mesmo quando importantes fatores ambientais como atividade de água e temperatura não são considerados (FRISVAD; SAMSON, 1991). A castanha-do-brasil possui em sua composição proteínas, carboidratos e lipídeos, apresentado condições ideais para o desenvolvimento dos microrganismos, assim como a possível produção de micotoxinas.

A temperatura influencia o metabolismo primário e secundário dos fungos. Em ambientes naturais, os fungos ficam expostos a uma ampla variação de temperaturas, diárias e sazonais, de modo que o seu crescimento nem sempre ocorre (CARLILE; WATKINSON; GOODAY, 2001). Segundo Pitt e Hocking (2009) a temperatura mais baixa relatada para crescimento fúngico é de -7 °C a 0 °C para espécies como *Fusarium*, *Cladosporium*, *Penicillium* e *Thamnidium*. *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger* são considerados fungos termotolerantes, que se desenvolvem em temperaturas de 8 a 45 °C. A maioria dos fungos toxigênicos desenvolvem-se entre 5 e 60 °C, entretanto sua temperatura ótima para crescimento

e produção de micotoxinas encontra-se geralmente entre 25 e 35 °C (PITT; HOCKING, 2009). Outras espécies, como *Byssoschlamys fulva*, são termorresistentes, resistindo temperaturas de 90 °C.

A presença de outros microrganismos pode restringir o crescimento e a formação de micotoxinas. A ausência de fungos sobre carnes frescas é explicada pelo rápido crescimento de bactérias. Alguns fungos também podem prejudicar o desenvolvimento de outros fungos (ASHWORK; SCHROEDER; LANGLEY, 1965).

A presença de espécies potencialmente toxigênicas em alimentos, não significa que, conseqüentemente, o produto contém essas substâncias, pois, vários fatores intrínsecos e extrínsecos (atividade de água, temperatura e pH) estão relacionados à produção destas (SAMSON et al., 2010).

2.3 Fungos toxigênicos em castanha-do-brasil

Dentre as espécies fúngicas mais encontradas na castanha do Brasil destacam-se: *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. clavatus*, *P. viridicatum*, *P. citrinum*, *Fusarium sacchari*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides* e *Alternaria alternata* (CAMPO/PAS, 2004).

Segundo Freire, Kozakiewicz e Paterson (2000) *Aspergillus flavus* é a espécie mais comum em castanha-do-brasil, seguida de *A. niger*, *Penicillium citrinum* e *P. glabrum*. Outras espécies como: *Acremonium curvulum*, *Cunninghamella elegans*, *Exophiala* sp., *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus oryzae*, *Scopulariopsis* sp., *Thielavia terricola* e *Trichoderma citrinoviride*, também têm sido relatados.

Baquião et al. (2012), analisaram diversos substratos relacionados a castanha-do-brasil como solo, ar, ouriço, cascas e nozes. Os autores reportaram que os fungos mais frequentes isolados foram: *A. flavus*, *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. Taniwaki et al. (2012), utilizando uma abordagem polifásica, identificou uma nova espécie isolada de amostras de castanha-do-brasil denominada *Aspergillus bertholletius*.

O gênero *Aspergillus*, pertence à classe dos hifomicetos, suas colônias crescem rapidamente, apresentando diferentes colorações. Possuem grandes hifas com paredes espessas das quais emergem os conidióforos com vesículas geralmente esféricas, de onde surgem apenas métulas ou métulas e fiálides que originarão os esporos fúngicos, neste caso os conídios (KLICH; PITT, 1988).

Aspergillus é o gênero mais conhecido, foi descrito há quase 300 anos, pela sua prevalência em ambientes naturais, de fácil cultivo em laboratórios, e com grande importância econômica (KLICH; PITT, 1988). Muitas de suas espécies são utilizadas na indústria, para produção de substâncias químicas como o ácido cítrico (*Aspergillus niger*), na fermentação de alimentos como queijos e molhos, na fabricação de enzimas como amilases (*A. niger*) e para biotransformação (*A. niger*). Algumas espécies como *A. niger* e *A. oryzae* possuem o status GRAS (generally regarded as safe) estabelecido pelo FDA (US Food and drugs Administration). Entretanto, neste gênero estão os principais fungos toxigênicos e deteriorantes de alimentos e rações como *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. carbonarius* entre outros (PITT; HOCKING, 2009; SAMSON et al., 2010). Quanto aos patogênicos ao homem e aos animais encontra-se *A. fumigatus*, com amplo espectro de infecções, incluindo manifestações cutâneas, otomicoses e infecções invasivas como aspergilose pulmonar e endocardites (PAGANO et al., 2007).

As espécies de *Aspergillus* competem com as de *Penicillium* e *Fusarium* pela dominância na micobiota. Fungos do gênero *Aspergillus* são capazes de crescer em temperaturas mais altas e em menores atividades de água do que os *Penicillium*. Apesar de seu crescimento ser mais rápido sua esporulação exige mais tempo, produzindo, em geral, esporos mais resistentes a luz e substâncias químicas (PITT; HOCKING, 2009).

Já foram descritas mais de 260 espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* sendo classificadas através das características morfológicas de suas colônias, pelos perfis de extrólitos, taxas de crescimento em determinadas temperaturas e atividade de água e também pelas sequências de nucleotídeos de determinados genes, denominado taxonomia polifásica (SAMSON; VARGA, 2009). As espécies mais importantes em alimentos pertencem à seção *Flavi*, *Circumdati* e *Nigri* (FRISVAD et al., 2007a; SAMSON et al., 2010).

Baquião et al. (2012), analisando amostras de castanha-do-brasil e seus derivados (ouriço, casca, solo e ar), durante quatro diferentes períodos, definidos com base no tempo de contato das amostras de ouriço com o solo, com intervalo de cinco dias entre as amostragens, mostraram que a espécie de *A. flavus* é predominante e o mais importante em castanha-do-brasil. Por outro lado, Olsen et al. (2008), isolaram além de *A. flavus*, *A. nomius* produtores de aflatoxina B e G, das amostras de castanhas-do-brasil. Estes autores concluíram que *A. nomius* é

mais importante por produzir quantidades maiores de aflatoxinas e do tipo B e G do que os isolados de *A. flavus*. Em geral cerca de 40% das cepas de *A. flavus*, são produtores de aflatoxina somente do tipo B (FRISVAD et al., 2007a; PITT; HOCKING, 2009).

Nem todos os isolados de uma dada espécie são capazes de produzir micotoxinas. As características genéticas dos isolados determinam a quantidade e o tipo de micotoxina produzida. No caso de *A. niger*, num estudo realizado por Frisvad et al. (2011) com cepas isoladas da indústria de biotecnologia, cerca de 80% dos isolados foram produtores de fumonisina B₂.

2.3.1 *Aspergillus section Nigri* - morfologia e identificação

Aspergilos negros (*black Aspergilli*) compreendem espécies que pertencem a *Aspergillus section Nigri*. Nesse grupo incluem espécies de importância na micologia de alimentos, médica e biotecnológica. Muitas causam deterioração em alimentos, mas por outro lado são utilizadas na indústria de fermentação para produzir enzimas hidrolíticas como as amilases ou lipases, e ácidos orgânicos tais como o ácido cítrico e o ácido glucônico (VARGA et al., 2000). O *Aspergillus niger* é utilizado em diferentes processos na indústria de biotecnologia.

Embora a principal fonte de *Aspergillus section Nigri* seja o solo, estão dentre os fungos mais comuns causadores de deterioração de alimentos e biodegradação de outros materiais (ABARCA et al., 2004; FERRACIN et al., 2009; SAMSON et al., 2004). Estas espécies podem contaminar alimentos e rações em diferentes etapas, incluindo pré e pós-colheita, no processamento e durante a manipulação (ABARCA et al., 2004; SAMSON et al., 2004). Estudos mostram que *A. niger*, juntamente com *A. carbonarius* e *A. japonicus*, são frequentemente responsáveis pelo declínio da pós-colheita de frutas frescas como maçãs, peras, pêssegos, frutas cítricas, uvas, figos, morangos, tomates e melões e alguns vegetais, especialmente cebola, alho e inhame, sendo também um dos fungos mais comuns isolados em frutas secas, grãos, sementes e castanhas (JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES, 2002).

A identificação de fungos é tradicionalmente baseada na observação de características morfológicas, observando características macromorfológicas, como coloração da colônia no verso e reverso e seu tamanho, produção de pigmento

solúvel e exsudato, presença de estruturas diferenciadas (extrólitos, esporodóquios entre outros) e estruturas sexuais (cleistotécio, gimnotécio entre outros) e características micromorfológica, incluindo tamanho e forma dos esporos, segmentação das hifas dentre outras características (PITT; HOCKING, 2009; SAMSON et al., 2010).

Figura 3 - A: Observação microscópica das estruturas *Aspergillus* sp; B: Observação macroscópica do crescimento de *Aspergillus niger* em CYA

As técnicas tradicionais para a identificação de fungos toxigênicos em alimentos são dependentes de cultivo e detectam apenas a presença de células viáveis. Ao contrário disso, o uso da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) permite diagnosticar, de forma sensível e específica, estes microrganismos, sem prévio cultivo e mesmo que estes se encontrem inviáveis. Diante disso, recentemente, várias pesquisas vêm sendo realizadas no sentido de viabilizar a detecção de fungos toxigênicos em alimentos através da PCR.

2.3.2 Técnicas moleculares para identificação de fungos da seção *Nigri*

A taxonomia de *Aspergillus* section *Nigri* ainda não está totalmente esclarecida, provavelmente porque durante muitos anos a classificação foi essencialmente baseada em critérios morfológicos e, em alguns casos, as diferenças entre as espécies são muito sutis. A taxonomia dos fungos pertencentes à secção *Nigri* se constitui em uma das mais complexas e confusas do gênero (SAMSON et al., 2007b). Não há um método de análise (morfológica, fisiológica ou molecular) que identifique perfeitamente uma espécie, daí a necessidade da taxonomia polifásica sugerida por vários taxonomistas. Caracteres morfológicos

podem variar, por exemplo, nem sempre os esclerócios que são características de algumas espécies estão presentes em todos os isolados dessa espécie, e sua produção pode variar entre as culturas do mesmo isolado (KLICH et al., 2001). Caracteres fisiológicos também podem sofrer variações, ou no caso dos metabolitos, serem completamente ausentes em alguns isolados. Dados de sequências de nucleotídeos são extremamente úteis para a identificação de espécies, mas não há critérios rigorosos quanto ao local onde se deve traçar a linha entre espécies filogeneticamente diferentes dentro de uma população, de espécies de populações potencialmente capazes de se reproduzirem, ao mesmo tempo, são integradas em um conceito de espécies coerente. Portanto, sempre que possível devemos utilizar as técnicas morfológicas, fisiológicas e moleculares para assim confirmar a espécie isolada. Devido à importância biotecnológica dos *Aspergillus* section *Nigri* e ao contrassenso do potencial de produzirem micotoxinas, a identificação dessas espécies deve ser inequívoca. Samson et al. (2007b), sugeriram uma abordagem polifásica para identificação de *Aspergillus* section *Nigri* utilizando análise morfológica, molecular, crescimento em meios específicos a diferentes temperaturas e produção de metabólitos.

No que diz respeito à identificação molecular, a introdução da PCR, aliada ao sequenciamento de nucleotídeos automatizado foi decisivo para ampliar a geração de dados moleculares sobre os diferentes grupos de fungos, incluindo os *Aspergillus* section *Nigri*. Este fato tem culminando na descrição de várias novas espécies e no desenvolvimento de métodos de detecção baseados em PCR espécie-específica.

Grande parte das análises taxonômicas moleculares tem sido conduzida analisando-se sequências de nucleotídeos do DNA ribossomal nuclear (DNAr). As sequências de DNAr que codificam para a formação de RNA ribossômico, são encontradas universalmente em células vivas e apresentam-se como um *cluster* gênico, o qual é repetido em *tandem* centenas de vezes. Cada unidade de repetição (*cluster* gênico) inclui três genes: DNAr 18S, DNAr 5,8S e DNAr 28S (BRIDGE et al., 1998). Estes genes são separados por regiões denominadas ITS1 e ITS2, as quais são transcritas e processadas para dar origem ao RNA ribossômico maduro. A região 18S, por exemplo, é a mais conservada e por isso é utilizada apenas para comparação de organismos distantemente relacionados. A porção 28S é mais variável e, portanto, é apropriada para a comparação de diferentes gêneros ou, em alguns casos, de diferentes espécies. As regiões ITS evoluem rapidamente e, então,

são apropriadas para discriminar espécies relacionadas ou até mesmo variedades de uma mesma espécie. O fato das regiões ITS serem flanqueadas por segmentos conservados, serem relativamente curtas (600 a 800 pb) e aparecerem em grande número de cópias no genoma permite que sejam amplificadas e sequenciadas com facilidade. Como consequência disso, é grande o número de sequências ITS de diferentes fungos que estão atualmente disponíveis nos bancos de dados de sequências de nucleotídeos (FUNGARO, 2000).

O “Consortium for the Barcode of Life” (CBOL) que conta com o financiamento da Alfred P. Sloan Foundation e da Moore Foundation, foi estabelecido em 2004, com o objetivo de auxiliar no desenvolvimento de um sistema capaz de identificar todas as espécies do planeta baseado na sequência de nucleotídeos de um único gene. Para os fungos, foi estabelecido como código de barras, DNA Barcode, uma região do DNAr (ITS1-5,8S-ITS2). Embora esta iniciativa esteja recebendo apoio e grandes financiamentos indicando que nos próximos anos esta abordagem assumirá um papel de destaque em projetos envolvendo estudos sobre a biodiversidade, já é evidente que para alguns grupos de fungos, incluindo os da seção *Nigri*, a variabilidade encontrada na região ITS1-5,8-ITS2 não é suficiente para discriminar todas as espécies. Neste caso o sequenciamento de genes adicionais (β -tubulina e calmodulina) tem se mostrado essencial para a correta identificação de algumas espécies.

Após varias revisões e alterações, Varga et al. (2011), classificaram 26 espécies pertencentes a seção *Nigri*. Incluindo novas espécies como: *Aspergillus acidus*, *Aspergillus eucalypticola*, *Aspergillus fijiensis*, *Aspergillus indologenus*, *Aspergillus neoniger* e *Aspergillus violaceofuscus*. Podendo ser divididas em cinco clados principais (FRISVAD et al., 2007b)(Figura 4). O clado *A. niger* inclui 10 espécies bisseriadas, sendo subdivididas em três subclasses, com base em dados de sequencias de β -tubulina e calmodulina: subclasses *A. tubingensis*, *A. niger* e *A. brasiliensis*. Apenas *A. niger* é conhecido por ser capaz de produzir ocratoxina A e fumonisinas neste clado (FRISVAD et al., 2007b; SAMSON et al., 2004). Outro clado principal inclui o grupo de *A. carbonarius* (*A. ibericus*, *A. sclerotiumniger* e *A. sclerotiumcarbonarius*). Estas espécies são caracterizadas por conídios relativamente grandes e dois deles, *A. carbonarius* e *A. sclerotiumniger* são capazes de produzir ocratoxina A. *Aspergillus ellipticus* e *A. heteromorphus* formam outro clado,

enquanto que o bisseriado *A. homomorphus* forma um clado distinto. Todas as espécies unisseriadas pertencem ao clado *A. aculeatus*, envolvendo sete espécies.

Frisvad et al., 2011, através da abordagem polifásica, identificaram um grande número de cepas (180) isolados de solos, alimentos e outros habitats. Constatou que *A. niger* foi o mais comum entre os aspergilos pretos (44%), mas que a frequência de *A. tubingensis* foi aproximadamente metade do comumente encontrado (20%), enquanto que *A. acidus* (10%), *A. carbonarius* (7%) e *A. brasiliensis* (4%) eram menos comum, as outras espécies de *Aspergillus* section *Nigri* foram raras (abaixo de 1%).

Quando se deseja identificar um grande número de acessos, alguns autores têm feito uso de uma análise previa de variabilidade genética utilizando-se de marcadores moleculares multilocus, tais como RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*). Este tipo de análise permite agrupar os acessos em função de similaridade genética e selecionar representantes de grupos distintos para serem sequenciados. Trata-se de uma estratégia para diminuir custos e ampliar a confiabilidade dos dados (FERRACIN et al., 2009; FUNGARO et al., 2004; GONÇALVES et al., 2012).

A técnica de RAPD envolve a amplificação de regiões anônimas dispersas pelo genoma. Nesta técnica, não se escolhe a priori a região a ser amplificada, ao contrário disso, utilizam-se *primers* de sequências arbitrárias de bases e analisam-se os produtos amplificados, sendo esta uma grande vantagem dessa metodologia. Além de não ser usados *primers* específicos, os produtos de amplificação são obtidos a partir de uma única sequência iniciadora. Isto ocorrerá quando uma sequência de *primer* reconhecer um sítio de homologia numa das fitas de DNA e também reconhecer o mesmo sítio, porém com orientação invertida, na outra fita da molécula de DNA, dentro do intervalo limite da PCR. O tamanho do *primer* de RAPD é menor (normalmente, 10 nucleotídeos) do que aquele utilizado na PCR específica, justamente para aumentar a chance de haver sítios complementares ao *primer* dentro do intervalo limite da PCR. A presença de um fragmento amplificado em alguns dos genótipos comparado com a ausência desse mesmo fragmento em outros genótipos caracteriza o que se denomina polimorfismo de RAPD. Estes polimorfismos têm sido extremamente úteis para estudos de variabilidade genética. (FUNGARO; VIEIRA, 2001). O AFLP, desenvolvido por Vos et al. (1995), se baseia em amplificações, via PCR, de fragmentos obtidos pela digestão do DNA genômico

com combinações de enzimas de restrições das quais, necessariamente, uma tem sítio de corte raro e a outra de corte frequente. Tais enzimas possuem a propriedade de produzir extremidades coesivas, as quais podem ser ligadas a adaptadores de sequências conhecidas, o que capacita a construção de *primers* complementares às sequências dos adaptadores, permitindo que os fragmentos gerados sejam amplificados. É uma técnica que detecta um grande número de locos por gel, apresentando custos reduzidos por informação genética (LOPES et al., 2002).

Num estudo realizado por Ferracin et al. (2009), com 51 cepas de agregados de *A. niger* isolados de frutas secas (tâmaras, figos secos, ameixas e uvas passas) originários de diferentes países, através da técnica de RAPD, quatro grandes grupos (I, II, III, IV) puderam ser distinguidos. Os isolados de cada um dos grupos foram sequenciados utilizando-se o gene da β -tubulina (β -tub2) para a identificação das espécies. Os isolados do grupo I foram reconhecidos como *A. tubingensis*, que foram subdivididos em dois subgrupos IA e IB, formados por cepas não produtoras de ocratoxina A (OTA). O grupo II foi identificado como *A. foetidus*, também não produtores de OTA. Baseando-se no sequenciamento de β -tubulina todos os isolados do grupo III foram classificados como *A. niger* e *A. lacticoffeatus*, não sendo separados pelo sequenciamento de β -tubulina. O grupo IV foi identificado como *A. niger*. Um polimorfismo de um único nucleotídeo (A→T) em um *intron* 5 da sequência de β -tub2 foi encontrada para diferenciar o grupo III do IV, mas não foram encontradas diferenças na sequência de β -tub1.

Perrone et al. (2011) trouxe à luz uma discussão sobre o status taxonômico de *Aspergillus awamori*. Esta espécie foi primeiramente descrita por Nakazawa (1907), mas posteriormente passou a ser tratada como sinônimo de *A. niger*. Dados morfológicos, fisiológicos e ecológicos se sobrepõem aos dados de *A. niger*. Os autores fizeram uso de dados de AFLP e sequências de nucleotídeos dos genes calmodulina e beta-tubulina e demonstraram que *A. niger* e *A. awamori* se separam em dois grupos. Como conclusão, atualmente *A. awamori* é considerada uma espécie críptica, altamente relacionada com *A. niger*, e em curso de especiação.

Figura 4 - Árvores filogenética com base em análise de dados de sequências de calmodulina de *Aspergillus* secção *Nigri*

Fonte: Varga et al., 2011.

2.3.3 Micotoxinas produzidas por *Aspergillus* section *Nigri*

A principal micotoxina produzida pelos *Aspergillus* section *Nigri* até 2007, era a ocratoxina A (OTA), responsável pela contaminação de uvas e seus produtos, cereais, temperos, cerveja, frutas secas, café e cacau, sendo o foco de inúmeros estudos (CABAÑES et al., 2002; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1993; JECFA, 2002; SAMSON et al., 2004). Em sua estrutura química (Figura 5) a OTA possui uma molécula de cloro, o que a torna única (MURPHY et al., 2006). A OTA é considerada nefrotóxica, teratogênica e imunotóxica, sendo classificada pela IARC como carcinógeno do Grupo 2B (IARC, 2002). Tem sido relacionada à nefropatia endêmica dos Balcãs e também ao desenvolvimento de tumores no trato urinário na Tunísia e no Egito. A exposição humana a OTA, provavelmente se dá pelo consumo de diferentes alimentos ingeridos contaminados

com baixo nível desta toxina. O processo de eliminação desse composto pelo organismo é lento, podendo haver acúmulo da toxina caso esta seja ingerida diariamente, havendo assim, uma concentração de OTA relevante no sangue (CREPPY, 1999; PERAICA et al., 1999).

Figura 5 - Estrutura química da ocratoxina A

Frisvad et al. (2007) detectaram, pela primeira vez a produção de fumonisina B₂ em *Aspergillus niger*. Utilizando a metodologia de ágar *plug* (SMEDSGAARD, 1997) para a extração da toxina das cepas analisadas, e com o auxílio do Cromatógrafo líquido com espectro de massa (LC-MC) para a detecção. Realizando testes com diferentes meios de cultura para a produção de fumonisinas, observaram maior produção de fumonisina B₂ no meio ágar Czapek extrato de levedura 20% de sacarose (CY20S) e no meio de arroz com xarope de milho (RC). Nos meios ágar mínimo glicose (GMM), ágar Czapek extrato de levedura (CYA), caldo de extrato de levedura sacarose (YES), CYA com 5% de cloreto de sódio (CYAS) e ágar Dicloran Glicerol 18% (DG18) também ocorreu a produção. Mas não houve produção de FB₂ nos meios de cultura: ágar extrato de malte (MEA), ágar aveia (OAT), ágar padrão (PCA), ou ágar batata dextrose (PDA). Diferentemente do que ocorre com a produção de FB₁ por *F. verticillioides*, onde a maior produção ocorre nos meios à base de plantas como MEA, RC, OAT, e PDA.

Em 2011, Varga et al. identificaram o gene da biossíntese das fumonisinas FB₂, FB₄ e FB₆ em *A. niger*, *A. awamori* e *A. lacticoffeatus*.

Frisvad et al. (2011) analisaram 180 cepas de *A. niger* utilizadas ou não na indústria de biotecnologia, e 228 cepas de 17 espécies do grupo *Nigri*. Segundo os autores, nenhuma das cepas pertencentes às 17 espécies do grupo *Nigri* foram produtoras de micotoxinas. Enquanto que 81% das cepas de *A. niger* foram produtoras de fumonisinas (B₂, B₄ e B₆), 17% foram produtoras de OTA e 10% das cepas produziram ambas as micotoxinas (OTA e fumonisinas). Entre as cepas industriais as proporções foram 83, 33 e 26% respectivamente. Frisvad et al. (2011)

recomendaram a utilização de cepas de *A. niger* com *clusters* de genes inativos para fumonisinas e ocratoxina, ou escolher cepas de espécies não-toxigênicas como *A. tubingensis*, *A. brasiliensis*, *A. vadensis* ou *A. acidus*, que não produzem fumonisinas nem ocratoxina.

Outros trabalhos reportaram a produção de FB₂ e FB₄ por *A. niger*. Neste sentido, Noonim et al. (2009), analisando 82 cepas de *Aspergillus* section *Nigri* isoladas de grãos de café da Tailândia, detectaram a produção de FB₂ e FB₄ em 67 % das cepas de *A. niger* isoladas.

Mogensen et al. (2010b) avaliaram o potencial toxigênico de 66 cepas de *A. niger*, 4 de *A. tubingensis*, e 16 de *A. acidus*, isoladas de uvas passas. Os autores não detectaram a produção de fumonisinas em cepas de *A. tubingensis* nem de *A. acidus*, mas detectaram em 77% das cepas de *A. niger*, destas, 10 foram capazes de produzir B₂ e B₄. Nenhuma das cepas produziu ocratoxina A.

Das 30 cepas de *A. niger* / *A. awamori* analisadas por Varga et al. (2010), isoladas de uvas passas, 20 cepas (66%) foram capazes de produzir fumonisinas.

No entanto, Abrunhosa et al. (2011), avaliaram 681 cepas de *Aspergillus* section *Nigri*, isolados de uvas utilizadas para produção de vinhos portugueses. Neste trabalho, os autores não detectaram a produção de FB₂ em 75 cepas de *Aspergillus carbonarius* e em 9 de *Aspergillus ibericus*, mas foi detectada a produção em 176 (29%) das cepas pertencentes ao agregado de *A. niger* (n = 597). Apenas 10 cepas apresentaram produção tanto de FB₂ quanto de OTA.

Essa discrepância de resultados de um trabalho para o outro pode ter ocorrido pelo número de cepas analisadas em cada estudo e pela falta de identificação dos agregados de *A. niger*. Havendo assim, uma necessidade de novos estudos nessa área, já que a fumonisina é uma das micotoxinas mais importantes para a segurança alimentar.

2.3.3.1 Fumonisinas

As fumonisinas são um grupo de micotoxinas, originalmente identificadas em *Fusarium verticillioides* (teleomorfo *Gibberella moniliformis*) (GELDERBLOM et al., 1988). Mais tarde, várias outras espécies do gênero *Fusarium* foram descritas como produtoras de fumonisinas, incluindo *Fusarium proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. oxysporum*, *F. globosum* entre outras espécies relacionadas ao complexo *Gibberella*

fujikuroi (DESJARDINS, 2006; MARIN et al., 2004; RHEEDER; MARASAS; VISMER, 2002). Pesquisas recentes identificaram cerca de 100 diferentes isômeros de fumonisinas, mas as fumonisinas B₁, B₂ e B₃ são consideradas as mais importantes (GELDERBLOM et al., 2007; RHEEDER; MARASAS; BARTÓK et al., 2006, 2008, 2010). Fumonisina B₁ é a fumonisina mais estudada, mas quando comparado a toxicidade, a fumonisina B₂, é mais citotóxica do que B₁ (GUTLEB; MORRISON; MURK, 2002). As fumonisinas FB₁ e FB₂ são as mais abundantes (RHEEDER; MARASAS)(Figura 6), por esse motivo são os principais focos da maioria das pesquisas e regulamentos de saúde.

Figura 6 - Estruturas de fumonisinas FB₁₋₄ e FB₆: (Esquerda) Estrutura de fumonisinas FB₂, FB₄ e FB₆; (Direito) Estrutura de fumonisinas FB₁ e FB₃.

Fonte: Hansen et al., 2010.

As fumonisinas não são detectadas por absorção de luz ultra-violeta (UV), ou por meio de cores detectáveis. Isto pode ser o motivo pelo qual não tenha sido descoberto anteriormente a sua produção em *A. niger*, esse estando envolvido principalmente com cromatografias com detecção de UV (NIELSEN et al., 2009).

As fumonisinas apresentam semelhança estrutural com as bases esfingóides livres (RILEY et al., 2001), em particular a esfinganina e esfingosina, intermediários na biossíntese e degradação de outras bases esfingóides de cadeia longa e esfingolípideos mais complexos (FINK-GREMMEIS, 1999)(Figura 7), bloqueando a biossíntese dos esfingolípideos através da inibição da enzima ceramida sintetase (WANG et al., 1991). Os esfingolípideos, tais como esfingomielina, são conhecidos como componentes da membrana, mas a maioria do metabolismo, dos esfingolípideos, está envolvida na sinalização intracelular relacionada com o crescimento celular e apoptose (morte celular).

O efeito cancerígeno da fumonisina pode ser atribuído à inibição da ceramida sintase, pelo fato de que elevados níveis de esfinganina-1-fosfato e baixos níveis de ceramida normalmente ativa a apoptose celular. A presença de fumonisinas favorece as células potencialmente cancerígenas a crescer enquanto "células saudáveis iniciam a apoptose (RILEY et al., 2001).

Figura 7 - Metabolismo de esfingolipídeos

Fonte: Modificado de Pruett et al., 2008.

Um dos efeitos relacionados com a fumonisinas é a leucoencefalomalácia eqüina (ELEM), doença neurotóxica que em cavalos é fatal em doses de 8 - 22 mg FB₁/kg na dieta. A doença foi documentada em 1902 como: "envenenamento de milho embolorado" (MARASAS, 2001; STOCKMANN-JUVALA; SAVOLAINEN, 2008), mas a toxina só foi isolada em 1988 com a descoberta das fumonisinas B₁ e B₂ (GELDERBLOM et al., 1988). No mesmo ano Marasas et al. (1988) realizaram experimentos adicionando fumonisina na alimentação de cavalos, confirmando que a fumonisina é realmente a causadora da ELEM. Outros estudos mostraram que a toxina causa edema pulmonar em suínos, podendo ser fatal para esses animais em determinadas concentrações (superiores a 16 mg FB₁/kg peso corporal/dia) (STOCKMANN-JUVALA; SAVOLAINEN, 2008). Em seres humanos pesquisaram indicaram que existe uma correlação com câncer esofágico e com defeitos do tubo

neural (NTD) em áreas com uma elevada exposição a fumonisinas (MARASAS, 2001; STOCKMANN-JUVALA; SAVOLAINEN, 2008). A interferência das fumonisinas na síntese de esfingolipídios pode explicar as diferentes etiologias da fumonisina quanto a sua toxicidade em animais, animais experimentais, e nos seres humanos (MERRILL; LIOTTA; RILEY, 1996).

Até recentemente, as fumonisinas haviam sido relatados apenas nas espécies de *Fusarium*. No entanto, em 2007, Pel et al., identificaram uma região homóloga aos genes de fumonisina de *Fusarium* em *A. niger*. Os mesmos genes envolvidos na produção de fumonisina em *F. verticillioides* também foram agrupadas em *A. niger*, como muitos outros metabolitos secundários (KELLER; HOHN, 1997). A Figura 8 ilustra as diferenças entre o grupo de genes estabelecido *F. verticillioides* (*Gibberella moniliformis*) e do cluster homólogo seqüenciado em *A. niger* observado por Pel et al. (2007).

Figura 8 - Cluster do gene de fumonisina em *A. niger* e *F. verticillioides*. Comparação estabelecida entre os clusters de fumonisina em *F. verticillioides* e o cluster de genes da região homóloga em *A. niger*.

Fonte: Pel et al., 2007.

Tanto o perfil genético, como a regulação da produção são muito diferentes em *A. niger* e *F. verticillioides*, apesar das duas espécies produzirem a mesma micotoxina. Estas duas espécies fúngicas são distantemente relacionadas, por isso é difícil explicar a ocorrência de fumonisina nestas duas espécies amplamente diferente através de transferência vertical de gene. Estudos indicam haver tantas

diferenças na sequência genética (BAKER, 2006; PEL et al., 2007) e na regulação da produção de fumonisina que a transferência de genes horizontais de todo o cluster de *Fusarium* para *A. niger* é menos provável. Segundo Frisvad et al. (2007a) uma razão para isto pode ser que as espécies de *Fusarium*, que são principalmente fungos de campo, raramente co-ocorrem como fungos de armazenamento como as espécies de *Aspergillus* spp. Isso também reflete na expressão da fumonisina. O cluster de *A. niger* parece ter menos genes, mas são capazes de produzir FB₂, FB₄, e FB₆ (FRISVAD et al., 2007b; PEL et al., 2007). O fato de FB₁ e FB₃ não serem produzidas por *A. niger*, implica na falta do gene FUM2, responsável pela síntese dessas duas fumonisinas em *F. verticillioides* (BUTCHKO; PLATTNER; PROCTOR, 2006; DESJARDINS, 2006; PEL et al., 2007).

Diante do fato de que as espécies de *Aspergillus* section *Nigri* têm sido comumente isoladas em amostras de castanha-do-brasil, são necessários trabalhos que possam diagnosticar a potencialidade destas espécies produzirem a fumonisina B₂, além de conhecer em que condições esta toxina é produzida na castanha-do-brasil e verificar a variabilidade destes isolados.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho foi verificar o potencial toxigênico quanto à produção de fumonisina B₂ das cepas de *Aspergillus* section *Nigri* isolados de castanha-do-brasil e verificar a contaminação desse alimento por essa micotoxina.

3.2 Objetivos Específicos

1. Isolar *Aspergillus* section *Nigri* de amostras de castanha-do-brasil, provenientes de diferentes etapas da cadeia produtiva das regiões produtoras da Amazônia e do mercado no Estado de São Paulo;
2. identificar as cepas de *Aspergillus* section *Nigri* através das características morfológicas (macro, microscópicas) e moleculares;
3. avaliar o potencial de produção de fumonisina B₂ dos isolados de *Aspergillus* section *Nigri*;
4. analisar a presença de fumonisina B₂ em amostras de castanha-do-brasil.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material Biológico

Foram analisadas 200 cepas, previamente identificadas morfológicamente como *Aspergillus section Nigri*, com auxílio da chave classificação de Klich & Pitt (1988) e Samson et al. (2004). Estas cepas foram isoladas de amostras de castanha-do-brasil, provenientes de diferentes regiões dos Estados do Amazonas, Pará e São Paulo, durante os anos de 2008 a 2011. Estes isolados encontravam-se conservados em sílica gel a uma temperatura de 5 °C, e são pertencentes à coleção de fungos do laboratório de Microbiologia do Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos (CCQA), do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) em Campinas - SP.

4.2 Otimização da metodologia para detecção de fumonisina B₂ nas cepas de *Aspergillus section Nigri*

4.2.1 Teste de detecção de fumonisina B₂ por cromatografia de camada delgada (CCD) pelos isolados

Vários testes foram realizados a fim de verificar a possibilidade e as melhores condições para detecção de fumonisina B₂ (FB₂) produzida por *Aspergillus section Nigri*, utilizando o método de cromatografia em camada delgada (CCD). Para os testes foram utilizadas soluções dos padrões de FB₁, FB₂, e FB₃, ocratoxina A e aflatoxina (Sigma-Aldrich), e um isolado de *Aspergillus niger* (ITAL 1469) proveniente de amostra de cacau, previamente conhecida como produtor de FB₂ conforme testado pela equipe do Dr. Frisvad da Denmark Technical University (DTU).

Testes com as soluções padrões de fumonisinas B₁, B₂ e B₃, foram realizados seguindo a metodologia de Cawood et al. (1991), em que os padrões diluídos em acetonitrila:água (1:1 v/v) foram aplicados na placa de sílica gel 60. A fase móvel foi constituída de clorofórmio : metanol : água : ácido acético (55 : 36 : 8 : 1, v/v/v/v). Após a corrida, a placa foi seca à temperatura ambiente e submetida à revelação com nebulização (*spray*) de ninidrina 0,2%. A placa foi aquecida a 120 °C por 15

minutos em estufa até o aparecimento de uma banda de coloração rosa/púrpura para FB₂.

Uma combinação da metodologia de Rottinghaus, Coatney e Minor (1992) com a proposta por Cawood et al. (1991), foi testada. Aplicou-se o padrão de FB₂ na placa de sílica gel, em seguida a placa foi desenvolvida com solução de KCl 1% : metanol (2 : 3, v/v). Após o final da corrida a placa foi seca e submetida à revelação com *spray* de ninidrina 0,2%. A placa foi aquecida a 120 °C por 15 minutos até o aparecimento de banda de coloração rosa/púrpura.

Seguindo a metodologia de Rottinghaus, Coatney e Minor (1992) com algumas modificações foram realizados diferentes testes. Modificou-se primeiramente a solução reveladora, utilizou-se três soluções: tampão borato de sódio 0,1 M, fluorescamina 0,40 mg/ml em acetonitrila e após 1 minuto, solução de ácido bórico 0,01 M : acetonitrila (2 : 3, v/v). Após a secagem, a placa foi observada à luz UV de 366 nm, para visualização da banda de coloração amarela esverdeada. A mesma metodologia foi testada com placas de cromatografia em camada delgada de alta eficiência com fase reversa – C18 (HPTLC-RP C18) ao invés de CCD sílica gel 60. Posteriormente, a fase móvel foi modificada para KCl 4% : metanol (2 : 3, v/v), conforme a metodologia de Preis e Vargas (2000). Nesse teste foram utilizados padrão de FB₂, de ocratoxina A (OTA) e de aflatoxina, e cepa de *Aspergillus niger* produtor de FB₂. O plug de *A. niger* foi extraído conforme a metodologia do ágar *plug* de Filtenborg et al. (1983) com acetonitrila : água (1 : 1). A placa foi desenvolvida em solução KCl 4% : metanol (2 : 3, v/v) e seca à temperatura ambiente. Realizou-se a nebulização utilizando três soluções sequencialmente: tampão borato de sódio 0,1 M, fluorescamina 0,40 mg/ml em acetonitrila e após 1 minuto, solução de ácido bórico 0,01 M : acetonitrila (2 : 3, v/v). Após a secagem, a placa foi observada à luz UV de 366 nm, para visualização de bandas de coloração amarela esverdeada. Com a mesma metodologia descrita acima, modificou-se a fase móvel testada, utilizando clorofórmio : metanol : água : ácido acético (55 : 36 : 8 : 1, v/v/v/v). Em seguida o mesmo teste foi realizado contaminando a cepa ITAL 1469 com o padrão de FB₂, com o objetivo de confirmar a banda, de coloração amarela esverdeada.

A fim de comparar o desempenho das placas de CCD e HPTLC-RP C18 e o perfil dos fungos filamentosos produtores e não produtores de FB₂ foi realizado um teste com padrão de FB₂, um plug do meio de cultura YESA sem o fungo, extraído com acetonitrila : água (branco), um plug de *A. flavus* contaminado com 50 µl de FB₂

e extraído com acetonitrila : água, um plug de *A. flavus* sem contaminação intencional, um plug de *A. section Nigri* isolado de castanha-do-Brasil e um *plug* da cepa ITAL 1469. As placas foram desenvolvidas utilizando como fase móvel clorofórmio : metanol : água : ácido acético (55 : 36 : 8 : 1, v/v/v/v), foram secas a temperatura ambiente, em seguida reveladas com tampão borato de sódio 0,1 M, fluorescamina 0,40 mg/ml em acetonitrila e após 1 minuto, solução de ácido bórico 0,01 M : acetonitrila (2 : 3 v/v), as placas foram observadas à luz UV no comprimento de onda 366 nm antes e após os reveladores, com o objetivo de visualizar bandas de coloração amarela esverdeada.

Com o objetivo de purificar o extrato das cepas analisadas, foram realizados testes utilizando coluna de imunoafinidade (FumoniTestTM WB). A cepa de *A. niger* ITAL 1469 foi crescida no meio ágar extrato de levedura sacarose (YESA). Após o crescimento do fungo todo o meio foi transferido para um saco estéril com 100 ml de solução de metanol : água (8 : 2, v/v) e homogeneizado em *stomacher* por 5 minutos. Após a homogeneização, o extrato foi filtrado em filtro Nalgon nº 2 (filtração média). Dez mililitros (mL) deste extrato filtrado foi transferido para um balão volumétrico de 50 ml e o volume completado com PBS. O extrato diluído foi filtrado através de membrana de fibra de vidro Whatman. Uma alíquota de 10 ml foi purificada através de uma coluna de imunoafinidade, conforme a metodologia de Preis e Vargas (2000) com modificações.

O padrão de FB₂ também foi testado na coluna de imunoafinidade. Foram adicionados 100 µl do padrão num frasco e estes foram evaporados com fluxo de nitrogênio. A este frasco adicionou-se 20 ml de solução metanol : água (8 : 2, v/v). Desta solução, 10 ml foram passados para um balão volumétrico de 50 ml e completado com PBS. 10 ml desta solução foi passado pela coluna de imunoafinidade.

Foram aplicados na placa de HPTLC-RP C18: 10 µl de padrão FB₂ puro, 10 µl de padrão FB₂ passado pela coluna de imunoafinidade e 10 µl do extrato da cepa ITAL 1469 passado pela coluna.

4.2.2 Teste de detecção de fumonisina B₂ por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) pelos isolados

4.2.2.1 Meio de cultura para produção de FB₂

As cepas de *Aspergillus section Nigri* foram inoculadas em meio ágar Czapek extrato de levedura 20% de sacarose (CY20S) e incubados a 25 °C por 7 dias, conforme a metodologia de Frisvad et al. (2007b).

4.2.2.2 Extração de FB₂

Dois solventes para extração foram testados: (i) metanol grau CLAE e (ii) acetonitrila : água (1 : 1). Foram retirados cinco pequenos pedaços do micélio fúngico (*plugs*) da parte central e foram transferidos para dois frascos previamente pesados. Após a adição dos *plugs*, os frascos foram pesados novamente, obtendo assim os pesos dos micélios para posterior cálculo da concentração da fumonisina B₂. Para cada frasco foi colocado 1 ml de metanol ou acetonitrila : água (1 : 1) e agitado em vortex por 3 minutos. Em seguida foram feitas 2 filtrações com membrana Millex acoplada a uma seringa de 5 ml para limpar o extrato, a primeira com membrana de 0,45 µm e a seguinte com membrana de 0,22 µm. Coletaram-se 100 µl deste filtrado e transferiu-se para um frasco com 100 µl do solvente utilizado na extração. Em seguida o frasco foi agitado em vortex e 55 µl do extrato foram transferidos para um *vial* para cromatografia líquida de alta eficiência, adicionando 55 µl do reagente o-phthaldialdehydo (OPA) para reação de derivatização da fumonisina conforme a metodologia de Visconti, Solfrizzo e De Girolamo (2001). O *vial* foi agitado novamente em vortex por 30 segundos. O teste foi realizado com cepas previamente conhecidas como produtoras e não produtoras de fumonisina B₂, isoladas de cacau. E com algumas cepas isoladas de café pertencentes à coleção de fungos do laboratório de Microbiologia do ITAL.

4.2.2.3 Detecção de fumonisina B₂ e parâmetros da CLAE

A detecção de FB₂ por cromatografia de alta eficiência (CLAE) foi realizada conforme a metodologia de Visconti, Solfrizzo e De Girolamo (2001), com algumas

modificações. Foi utilizado o cromatógrafo da marca Shimadzu LC-10VP (Shimadzu, Japão) com detector de fluorescência a 335 nm de excitação e 440 nm de emissão. Para a fase móvel utilizou-se acetonitrila : água : ácido acético (51:47:02 v/v/v). A fase móvel foi filtrada em membrana de 0,45 µm. O fluxo programado da fase móvel foi de 1,0 ml/min. A temperatura do forno foi de 40 °C.

Foram adicionados 55 µl do padrão FB₂ e 55 µl do reagente OPA num *vial* para CLAE. Agitou-se por 30 segundos e injetou-se rapidamente 20 µl no cromatógrafo. O mesmo procedimento foi repetido para os extratos fúngicos como mencionado na seção 4.2.2. O volume de injeção do padrão de FB₂ e dos extratos fúngicos no CLAE foi de 20 µl.

4.2.2.4 Determinação do limite de detecção do método

Para determinação do limite de detecção (LOD) foram realizadas 8 extrações paralelas com 8 cepas de *A. niger* produtores de FB₂. Após a quantificação, foi calculado o desvio padrão entre as mesmas. O limite de detecção foi determinado conforme recomendações do documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, 2010, com 99% de confiança.

4.3 Ensaio para detecção de Fumonisina B₂ em amostras de castanha-do-brasil

4.3.1 Amostras

Foram coletadas 100 amostras de aproximadamente 1 a 2 kg de castanhas-do-brasil, conforme disponível, em vários pontos da cadeia: florestas, processadoras, mercados nas ruas do Estado do Amazonas (Mercado Municipal) e Pará (Mercado Verupeso), e supermercados do Estado de São Paulo. As amostras foram embaladas em sacos plásticos e mantidas sobre refrigeração até a data da análise.

4.3.2 Análise da atividade de água

Nas amostras coletadas foram realizadas medidas de atividade de água, utilizando o aparelho Aqualab, modelo 3T (Decagon, USA). As amostras que

apresentavam casca foram previamente descascadas, com o auxílio do descascador manual específico para castanha-do-brasil. As amêndoas foram cortadas em pedaços menores facilitando assim a mensuração da a_w . As leituras foram realizadas em triplicata a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.3.3 Otimização de metodologia para detecção de Fumonisina B₂ em amostras de castanha-do-brasil

A metodologia desenvolvida foi baseada nos parâmetros recomendados pela Vicam® para análise de Fumonisina em milho com algumas modificações, com detecção por fluorescência através de CLAE.

4.3.3.1 Clean-up

De cada amostra coletada de castanha-do-brasil, aproximadamente trezentos gramas de amêndoa foram triturados utilizando moinho analítico (IKA Works do Brasil Ltda – Mod A11). Após homogeneizar a amostra moída foram pesados em frascos de vinte gramas para a realização da análise de fumonisina B₂. As amostras que apresentavam casca foram previamente descascadas utilizando descascador manual específico para castanha-do-brasil.

A extração foi realizada utilizando 50 mL de solução de Metanol : Acetonitrila : Água (25 : 25 : 50). A suspensão foi agitada durante 3 minutos em um homogeneizador Ultra-Turrax (Polytron, Suíça) na velocidade de 10.000 rpm. Esta mistura foi centrifugada (International Equipment Company – Mod: B20A) por 20 minutos à 4000 rpm. O sobrenadante foi retirado por pipetagem e armazenado num frasco de 100 ml, o *pellet* foi ressuspensionado com 50 ml da solução Metanol : Acetonitrila : Água (25 : 25 : 50), agitada novamente durante 3 minutos no homogeneizador Ultra-Turrax (Polytron, Suíça) e centrifugada por 20 minutos a 4000 rpm. Juntaram-se os dois sobrenadantes, e estes foram filtrados através de papel filtro n° 4 da Whatman. Do filtrado, retirou-se uma alíquota de 10 mL sendo transferido para um balão volumétrico de 50 mL. Completou-se o volume com tampão fosfato salino (PBS). Essa solução foi filtrada em filtro de fibra de vidro Whatman. Dez mililitros do filtrado foram passados pela coluna de imunoafinidade

FumoniTest™ WB (Vicam®), em um fluxo de 2-3 mL/min, seguindo-se a lavagem com 10 mL de PBS.

A fumonisina B₂ foi eluída com 1,5 mL de metanol HPLC em um frasco âmbar. Esta solução foi evaporada sob um fluxo de nitrogênio a 40 °C e o extrato seco foi ressuspendido com 0,2 mL de solução acetonitrila : água (1 : 1).

4.3.3.2 Parâmetros da CLAE

Foi utilizado um sistema Shimadzu LC-10VP HPLC (Shimadzu, Japão) com detector de fluorescência (modelo RF-10AxL), comprimentos de onda a 335 nm de excitação e 440 nm de emissão e injetor automático. Foi empregada uma coluna YMC – Pack ODS-A (YMC co., Ltd. Japan) (5 µm, 4,6 x 150 mm) e fase móvel composta de acetonitrila : água : ácido acético (51 : 47 : 02, v/v/v) A fase móvel foi filtrada em membrana de 0,45 µm e utilizada vazão de 1 mL/min. A temperatura do forno foi de 40 °C.

Foram adicionados 55 µl do padrão FB₂ e 55 µl do reagente OPA num *vial* para CLAE. Agitou-se a solução por 30 segundos e injetou-se rapidamente 20 µl no cromatógrafo.

Um padrão de FB₂ (Sigma-Aldrich) foi utilizado para a construção da curva padrão, com a área dos picos *versus* a massa da toxina (ng). A concentração de FB₂ no extrato da amostra foi determinada pela interpolação da área do pico resultante no gráfico de calibração. O volume de injeção foi 20 µL tanto para a solução padrão quanto para os extratos das amostras.

O resultado final, expresso em ppm (µg/g), foi obtido pela divisão da massa de FB₂ pela massa obtida previamente com a pesagem dos *plugs*, considerando as diluições e o volume injetado.

4.3.3.3 Avaliação da performance do método

4.3.3.3.1 *Teste de recuperação*

Para determinação da performance do método utilizada a metodologia anteriormente descrita, fortificando uma amostra de castanha-do-brasil, na qual não

foi detectada fumonisina, com padrão de fumonisina B₂, no nível de 1 µg/g. O teste foi realizado em triplicata.

4.3.3.3.2 *Determinação do limite de detecção do método*

Para determinação do limite de detecção (LOD) foram realizadas 8 extrações paralelas com amostras fortificadas de castanha-do-brasil (nível 0,1 µg/g). Após a quantificação, foi calculado o desvio padrão entre as mesmas. O limite de detecção foi determinado conforme recomendações do documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, 2010, com 99% de confiança.

4.4 Inoculação do fungo *A. niger* nas amostras de castanha-do-brasil

4.4.1 Isolados testados

Para a inoculação nas amêndoas, foi selecionado um isolado (ITAL1206) previamente identificado morfológicamente como *A. niger* e positivo para a produção de fumonisina B₂ (14 µg/g). O fungo foi inoculado em placa de petri contendo ágar Czapek Extrato de Levedura e incubado a 25 °C por 7 dias.

4.4.2 Inóculo

A cepa de *A. niger* foi inoculada no CYA e incubada à 25 °C durante 7 dias. Para o preparo do inóculo, foi realizada uma raspagem de todo o micélio fúngico da placa e o mesmo foi transferido para um frasco com 100 mL de água peptonada 0,1% adicionada de 0,1% de tween 80 e pérolas de vidro. Para a obtenção da concentração da suspensão utilizada para a contaminação das amêndoas, a solução inicial foi filtrada em gaze estéril e diluições decimais seriadas em solução de água peptonada 0,1%, foram realizadas. Foi realizada também a contagem dos esporos na câmara de Neubauer.

4.4.3 Casca- Esterilização

Com a finalidade de não alterar a atividade de água das amêndoas e suas características originais, a casca da castanha-do-brasil foi utilizada como um “veículo” para a contaminação das amostras. A casca foi triturada com o auxílio do moinho analítico, peneirada utilizando peneira de inox (A Bronzinox telas metálicas e sintéticas Ltda) com diâmetro de 425 µm, esterilizada (30 minutos) e seca (30 minutos) em autoclave, garantindo assim o crescimento apenas do fungo desejado. Foi realizado o plaqueamento, antes e após a contaminação da casca, através da diluição em série no meio DG18.

4.4.4 Amêndoas de castanha-do-brasil

Duas amostras com diferentes teores de atividade de água foram selecionadas (230 e 233) para a realização do teste de crescimento de *A. niger* (ITAL1206) e produção de FB₂. Com o objetivo de promover o crescimento do fungo nas amêndoas, em uma das amostras (230) foi adicionada água estéril, aumentando assim sua atividade de água. A a_w foi medida no aparelho Aqualab, modelo 3T (Decagon, USA).

As amostras foram trituradas utilizando moinho analítico e pesadas separadamente em sacos estéreis.

4.4.5 Inoculação dos fungos nas amêndoas de castanha-do-brasil

Em um frasco estéril foi pesada a casca (60 g) e adicionados 10 mL da suspensão inicial de *A. niger*. Foi homogeneizado por agitação utilizando *shaker* (Marconi Equipamentos para Laboratórios Ltda) durante 30 minutos.

Em sacos estéreis foram pesados separadamente 200 gramas de cada amostra de castanha-do-brasil. Acrescentou-se 30 gramas da casca previamente contaminada com fumonisina B₂. Em frascos estéreis de 100 mL, foram pesados 20 gramas da mistura casca contaminada + amêndoa. Para cada amostra foram realizadas 10 replicatas. Foi feito o controle branco desse teste, contendo apenas a amêndoa com a casca estéril.

As amostras foram mantidas a 30 °C por um período de 28 dias, sendo analisadas em duplicata a cada 7 dias.

4.4.6 Extração de fumonisina B₂

As extrações foram realizadas seguindo a metodologia descrita na seção 4.3.3.1. As amostras eram retiradas da incubadora a cada sete dias. Eram realizados controles positivos e negativos de cada extração. Os controles positivos foram preparados e analisados segundo a metodologia descrita na seção 4.3.3.3.

4.5 Análise molecular dos isolados de *Aspergillus section Nigri*

Foram selecionadas 18 cepas (ITAL 103, ITAL 238, ITAL 671, ITAL 714, ITAL 716, ITAL 578, ITAL1642, ITAL1732, ITAL 2636, ITAL 3738, ITAL 4195, ITAL 4751, ITAL 4956, ITAL 5274, ITAL 6503, ITAL 6504, ITAL 6573, ITAL 6951), previamente identificadas morfológicamente como *Aspergillus section Nigri* e testados seu potencial toxigênico para Fumonisina B₂. Estas foram isoladas de amostras de castanhas-do-brasil, provenientes dos Estados de São Paulo, Pará e Amazonas. Houve a presença de cepas produtoras e não produtoras de FB₂.

4.5.1 Obtenção do micélio para extração de DNA genômico

Precedendo a extração de DNA genômico foram obtidas colônias monoespóricas, para cada um dos isolados fúngicos. Após o crescimento, foi realizada uma suspensão de aproximadamente 10⁷ conídios de 2,5 de mL “Tween 80”. Foi inoculado 1 mL desta solução em frasco de erlenmeyer contendo 50 mL de meio completo líquido descrito por Pontecorvo et al. (1953) (6,0 g de NaNO₃; 1,5 g de KH₂PO₄; 0,5 g de MgSO₄.7H₂O; 5 g de KCl; 0,001 g de FeSO₄; 0,001 g de Zn SO₄; 10,0 g de glicose; 0,5 g de extrato de levedura; 2,5 g de peptona; 1,5 g de caseína hidrolisada e 1,0 mL de solução de vitaminas, pH 6,8, completar o volume para 1000 mL de água destilada esterilizada). Após a preparação do inóculo, a cultura foi incubada sob agitação de 180 rpm (rotação por minuto) a 28 °C por 24 horas. Decorrido esse período, o micélio foi coletado por filtração e lavado em água

destilada estéril para retirada de resíduos do meio de cultura. O peso úmido do micélio foi determinado, e este foi utilizado para o processo de extração de DNA.

4.5.2 Extração do DNA genômico

Os ácidos nucleicos foram extraídos conforme descrito por Azevedo et al. (2000). Um grama do micélio, obtido na etapa anterior através da filtração, foi triturado utilizando nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó fino. Este pó foi transferido para um microtubo de 2 mL, adicionou-se 800 µL de tampão de extração (4 mL Tris-HCl 1 M pH 8,0; 1 mL EDTA 0,5 M pH 8,0; 2 mL SDS 10% p/v; 1 mL NaCl 5 M; 12 mL água destilada e esterilizada). Após a homogeneização, o microtubo foi submetido a 65 °C por 15 minutos. Posteriormente, adicionou-se uma alíquota de 800 µL de tampão fenol (Pharmacia), homogeneizou-se por inversão do tubo e centrifugou-se por 15 minutos a 12.000 rpm. A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo, acrescentaram-se 800 µL de solução de clorofane (tampão fenol, clorofórmio e álcool isoamílico, na proporção 25 : 24 : 1, respectivamente). Homogeneizou-se novamente por inversão de tubo e centrifugou-se por 15 minutos a 12.000 rpm, a fase aquosa foi pipetada e transferida para um novo microtubo e acrescentaram-se 800 µL de Clorofil (Clorofórmio e Álcool isoamílico na proporção 24 : 1, respectivamente) sendo misturado por inversão de tubo. Após a centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos a fase aquosa foi transferida para tubos limpos (aproximadamente 400 µL para cada tubo), acrescentaram-se aproximadamente 40 µL de NaCl 3 M (ou seja 1/10 do volume) e 800 µL de etanol absoluto gelado (2 volumes). A mistura foi incubada a - 20 °C por 1 hora para a precipitação dos ácidos nucleicos. Em seguida, a amostra foi novamente submetida à centrifugação de 12.000 rpm por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante, adicionaram-se 300 µL de etanol 70% ao *pellet* e centrifugando os tubos por 5 minutos a 12.000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e deixou o DNA secar a temperatura ambiente por aproximadamente 1 hora. Após o material secar completamente, foram ressuspensos em 100 µL de tampão TE (1 mL Tris-HCl 1 M pH 8,0; 0,2 mL EDTA 0,5 mL pH 8,0; 98,8 mL água) e mantido a - 20 °C.

4.5.3 Quantificação do DNA

A quantificação do DNA foi determinada por leitura da intensidade de fluorescência de brometo de etídio (0,5 µg/ml) após migração eletroforética em gel de agarose 0,8% (p/v). Para a quantificação foi comparada a fluorescência das amostras com a fluorescência de amostras padrões conhecidas de DNA de fago *lambda*, nas concentrações de 10, 50, 100 e 200 ng. Baseando-se no resultado da quantificação, as soluções contendo o DNA extraído foram padronizadas, por diluição, para concentrações em torno de 5 ng/µl, divididas em alíquotas e armazenadas a - 20 °C.

4.5.4 Amplificação da porção Bt2 do gene da β – tubulina

A amplificação de uma região do gene β -tubulina foi realizada usando o seguinte par de *primers*: Bt2a (5' GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC 3') e Bt2b (5' ACC CTC AGT GTA GTG ACC GGC CTT 3'), como descrito por Glass e Donaldson (1995). A reação de amplificação foi realizada em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.), utilizando a temperatura de hibridização dos *primers* de 64 °C. Após a amplificação, as amostras foram submetidas a reações de sequenciamento.

4.5.5 Sequenciamento da região Bt2 do gene da β – tubulina

Os produtos da PCR foram purificados através do uso do Wizard® SV Gel e PCR Clean-Up System (Promega). Os fragmentos resultantes da PCR foram submetidos ao sequenciamento direto (i.e. sem clonagem), segundo o método de Sanger et al. (1977), utilizando-se os *primers* M13F (5' gTA AAA CgA Cgg CCA g 3') ou M13R (5' CAg gAA ACA gCT ATg AC 3'), marcados com dideoxinucleotídeos fluorescentes. Para a reação, foi utilizado o Kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Standard kit Version 3.1 (Applied Biosystems).

A reação foi submetida a um termociclador "Mastercycler gradient" (Eppendorf), previamente programado para 35 ciclos após desnaturação inicial de 1 minuto a 95 °C. Cada ciclo de amplificação foi constituído de três etapas: desnaturação (95 °C/ 20 segundos), pareamento (55 °C/ 15 segundos) e extensão (60 °C/ 1 minuto).

Após a amplificação, foram realizadas duas lavagens subsequentes. Na primeira lavagem foram adicionados 27,5 µL de etanol absoluto e 1 µL de acetato de amônio 7,5 M. Centrifugou-se rapidamente (“*Spin*”) até 4000 rpm. O material foi mantido a uma temperatura de 4 °C por aproximadamente 1 hora, embrulhado em papel alumínio. Em seguida, centrifugou-se por 40 minutos a 20 °C, 4000 rpm. Após o descarte do sobrenadante por inversão da placa, procedeu-se, com a placa invertida sobre o papel toalha, um pulso a 300 rpm por 5 segundos. Em seguida, 150 µL de etanol 70% foram adicionados, seguido da centrifugação por 15 minutos a 4000 rpm, 20 °C. O sobrenadante foi descartado, com a placa invertida sobre o papel toalha, um pulso a 300 rpm por 5 segundos. Em seguida foi realizada a segunda lavagem. Adicionaram-se 0,2 µL de acetato de amônio 7,5 M e 80 µL de isopropanol 80%, homogeneizou-se em vortex e deixou-se o material descansar por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida os tubos foram centrifugados por 40 minutos a 4000 rpm, 20 °C. Após sobrenadante ser descartado, foram adicionados 80 µL de álcool 70%, seguido da centrifugação por 10 minutos a 4000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e com a placa invertida sobre o papel toalha, um pulso a 300 rpm foi realizado. O material foi seco em estufa. Ao final, um volume de HiDi formamide (10 µL) foi adicionado aos produtos de sequenciamento, os quais foram processados em Analisador Genético ABI 3500XL (Applied Biosystems). A qualidade das seqüências foram analisadas através do pacote computacional Phred/Phrap/Consed. Para a identificação do isolado, as seqüências de nucleotídeos obtidas foram comparadas com aquelas já depositadas no banco de dados do National Center for Biotechnology and Information (NCBI), fazendo uso da ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (ALTSCHUL et al., 1990). A análise de agrupamento foi realizada pelo método *Neighbor Joining*, utilizando o programa MEGA5, com *bootstrap* de 1000 repetições.

4.5.6 Análise por RAPD

Essa análise foi realizada para ilustrar a variabilidade que pode ocorrer dentro de uma determinada espécie fúngica. Para a análise de RAPD (WILLIAMS et al., 1990), foram utilizados os *primers* OPX 3, OPX 7 e OPX 11 (Invitrogen®). As reações de amplificação foram feitas em um volume final de 25 µl contendo 2,5 µl de tampão (Invitrogen®, 200 mM Tris - HCl, pH 8,4; 500 mM KCl, 10x concentrado), 0,25 mM de

dNTP, 0,25 μ M de *primer*, 3,0 mM de $MgCl_2$ (Invitrogen[®]), 0,4 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen[®]) e 10 ng da amostra de DNA. Para as reações controles foi omitido o DNA genômico, substituindo-se o DNA genômico por água. A reação foi submetida ao termociclador PTC-100 (MJ Reserch, Inc.) previamente programado com um ciclo inicial de desnaturação a 94 °C por 5 minutos; 39 ciclos constituídos de desnaturação a 92 °C por 40 segundos, pareamento a 40 °C por 1 minuto e 30 segundos e, extensão a 72 °C por 2 minutos, com um ciclo final de extensão à 72 °C por 5 minutos. Após a amplificação, as amostras foram separadas por eletroforese em gel de agarose 1,4% e corrido em tampão TBE 1x (Tris 0,45 mM; ácido bórico 45 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0). Os géis foram corados com brometo de etídio e fotodocumentados em sistema de imagem digital LPIX Loccus[®].

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Teste de detecção de fumonisina B₂ por cromatografia em camada delgada (CCD)

Foram testadas várias metodologias para separação das fumonisinas por cromatografia em camada delgada (CCD), pelo fato de ser uma técnica prática e rápida, a fim de verificar as melhores condições para detecção da produção de fumonisina B₂ (FB₂) pelos isolados de *Aspergillus section Nigri* de castanha-do-brasil.

A metodologia de Cawood et al. (1991), cujo revelador foi nebulização com ninidrina, não apresentou bons resultados, embora no início fosse obtida uma banda de cor rósea púrpura para FB₂, esta não foi observada nos experimentos seguintes. Por esta razão, outras metodologias foram testadas.

Nas metodologias de Rottinghaus, Coatney e Minor (1992) e Preis e Vargas (2000) utilizando a fluorescamina como revelador, foi observada uma banda visível amarelo esverdeada para o padrão de FB₂ demonstrando uma melhor eficiência da fluorescamina.

Nos testes com placas de HPTLC-C18 a corrida foi extremamente lenta (aproximadamente 4 horas), utilizando como fase móvel KCl 1% : metanol, a fumonisina não se moveu. Com a fase móvel modificada para KCl 4% : metanol conforme Preis e Vargas (2000), novamente a fumonisina ficou no local de aplicação e na corrida do *plug* da cepa ITAL 1469 várias bandas apareceram, porém nenhuma no mesmo local e com coloração típica da FB₂, conforme relatam os autores Preis e Vargas (2000). A cepa de *Aspergillus niger* ITAL 1469, isolada do cacau, foi utilizada como padrão de produção de FB₂, por ter sido previamente confirmada como produtora de FB₂.

Para tentar solucionar a dificuldade referente à separação de FB₂, a fase móvel de clorofórmio : metanol : água : ácido acético (55 : 36 : 8 : 1) segundo Cawood et al. (1991) foi testada. Nesta fase móvel, a banda de FB₂ foi arrastada acima do ponto de aplicação. O *plug* da cepa ITAL 1469 apresentou inúmeras bandas inclusive uma próxima a FB₂ com a coloração semelhante, porém para se ter certeza de que a banda era FB₂, foi realizado outro teste, acrescentando um *plug* da cepa ITAL 1469 contaminado com 50 µl do padrão de FB₂. Neste teste foram

observadas bandas semelhantes e com grande intensidade de fluorescência tanto na corrida do *plug* da cepa ITAL 1469 contaminado quanto o não contaminado.

No teste para verificar o perfil das bandas de fungos filamentosos produtores e não produtores de FB₂, o padrão de FB₂ foi visível, *A. flavus* contaminado com FB₂ apresentou banda bem evidente com coloração característica. O *plug* da cepa ITAL 1469 apresentou perfil pouco diferente dos *Aspergillus section Nigri* isolado da castanha testados, porém nada conclusivo.

Após todos estes testes foi visto que a placa HPTLC-C18 foi melhor em relação à CCD e a fase móvel clorofórmio : metanol : água : ácido acético (55 : 36 : 8 : 1) foi mais eficiente quando comparada com as outras fases móveis testadas KCl 4% : metanol (2 : 3, v/v) e KCl 1% : metanol (2 : 3, v/v). Contudo não foi possível observar claramente a FB₂ produzida pela cepa ITAL 1469, provavelmente pelo alto limite de detecção que esta técnica apresenta.

O teste realizado, purificando o padrão de FB₂ e o extrato da cepa ITAL 1469 com coluna de imunoafinidade, FUMONITEST™, não apresentaram a banda de FB₂, sinalizando a necessidade de otimização da metodologia de coluna de imunoafinidade. O padrão FB₂ aplicado diretamente na placa apresentou visualização de banda de FB₂. O método de cromatografia em camada delgada tanto com a placa de sílica gel 60 como com HPTLC–RP C18 não apresentaram uma boa sensibilidade para detecção de FB₂ produzido pelo fungo. Portanto nesta etapa a técnica de CCD não é recomendada para detectar a produção de FB₂ por *Aspergillus section Nigri*, e a técnica de imunoafinidade deve ser validada para esta finalidade.

5.2 Teste de detecção de fumonisina B₂ por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Nos testes com cromatografia líquida de alta eficiência foi obtido pico bem evidente com o padrão de FB₂ quando se utilizou a metodologia de Visconti, Solfrizzo e De Girolamo (2001) modificando a fase móvel. O FB₂ apareceu com o tempo de retenção aproximadamente de 15 minutos como mostra a Figura 9.

Figura 9 - Cromatograma obtido do padrão de FB₂

5.2.1 Extração de fumonisina B₂ pelos isolados fúngicos

O emprego do metanol para extração de fumonisina B₂ pelos isolados fúngicos, gerou um melhor desempenho comparando-se ao uso de acetonitrila : água (1 : 1), conforme mostra a Tabela 2.

Tabela 2 - Comparação de metodologia para extração de fumonisina B₂

Espécie fúngica	Nº ITAL	Origem	Metanol FB ₂ (µg/g)	Acetonitrila : água (1 : 1) FB ₂ (µg/g)
<i>A. tubingensis</i>	1001	Cacau	ND	ND
<i>A. tubingensis</i>	1633	Cacau	ND	ND
<i>A. carbonarius</i>	792	Cacau	ND	ND
<i>A. carbonarius</i>	1150	Cacau	ND	ND
<i>A. niger</i>	632	Cacau	11,43	8,61
<i>A. niger</i>	1246	Cacau	13,96	11,96
<i>A. niger</i>	1240	Cacau	14,67	8,12
<i>A. niger</i>	1469	Cacau	13,06	12,56

O solvente acetonitrila : água (1 : 1), foi utilizado em trabalhos como de Rottinghaus, Coatney e Minor (1992) e Dupuy et al. (1993), como diluente dos padrões e de extratos das amostras. Mas para testes realizados nesse trabalho o metanol apresentou um melhor resultado.

O primeiro estudo realizado com cepas de *Aspergillus niger* produtor de FB₂, foi desenvolvido por Frisvad et al. (2007), utilizando como solvente de extração a

solução de metanol : água (3 : 1). Posteriormente, vários estudos realizados por: Abrunhosa et al. (2011), Frisvad et al. (2011), Noonim et al. (2009) e Varga et al. (2010) também utilizaram o mesmo solvente. No presente estudo a cepa ITAL 1469 foi testado com o solvente proposto por Frisvad et al. (2007), no entanto comparado com as outras soluções testadas (metanol HPLC e acetonitrila : água 1 : 1) não foi considerado o melhor solvente para a extração de FB₂.

No entanto, estudo realizado anteriormente por Ferracin et al. (2009), utilizaram metanol grau HPLC como solvente de extração das cepas de *Aspergillus section Nigri* testadas para a produção de ocratoxina A. O mesmo solvente foi testado nesse trabalho para detectar produção de FB₂. Obtendo resultados melhores comparados com testes realizados com os outros soluções descritas na literatura como acetonitrila : água (1 : 1) e metanol : água (3 : 1).

A Figura 10 mostra a curva padrão de FB₂ obtida através das injeções de diferentes concentrações do padrão de FB₂. O padrão foi diluído ate a menos concentração detectada pelo sistema. A equação da curva obteve um R², igual a 1.

Figura 10 - Curva padrão de fumonisina B₂

Os limites de detecção e quantificação de fumonisina B₂ produzida pelas cepas de *A. section Nigri* isolados de castanha-do-brasil foram de 0,076 µg/g e 0,13 µg/g respectivamente. No entanto o limites de detecção e quantificação de fumonisina B₂ nas amostras de castanha-do-brasil foram de 0,324 µg/g e 0,054 µg/g respectivamente.

5.2.2 Avaliação do potencial de produção de fumonisina B₂ pelas cepas de *Aspergillus* section *Nigri* isoladas de castanha-do-Brasil

A Tabela 3 apresenta a produção de FB₂ pelas cepas de *Aspergillus* section *Nigri* isoladas de castanha-do-brasil. Das 200 cepas testadas, 138 (69%) não foram produtoras de fumonisina B₂, 23 cepas (11,5%) apresentaram valores menores que o limite de detecção. Apenas 39 cepas (19,5%) foram produtoras de FB₂, as concentrações variaram de 0,01 a 37,25 µg/g. Neste sentido, estudos realizados na Tailândia por Noonim et al. (2009), apontaram elevado percentual (93%) das cepas de *A. niger* produtoras de FB₂. No mesmo trabalho os autores mencionam o não isolamento de cepas produtoras de FB₂ em café proveniente do sul da Tailândia. Por sua vez, em Portugal, Abrunhosa et al. (2011), obtiveram o percentual de 29% das cepas de *A. niger*, isoladas de uvas, produtora de FB₂.

No trabalho de Frisvad et al. (2011), a frequência de cepas *A. niger*, utilizadas na indústria de biotecnologia, produtores de FB₂ foi de 81%. Sugerindo, a utilização de espécies não toxigênicas como *A. acidus*, *A. brasiliensis*, *A. tubingensis* e *A. vadensis*, nos processos biotecnológicos das indústrias, ao invés de cepas possivelmente toxigênicas de *A. niger*. Samson et al. (2007), também aconselharam a substituição de *A. carbonarius* produtor de OTA por espécies não toxigênicas intimamente relacionadas como: *A. ibericus* e *A. sclerotii carbonarius*.

O baixo percentual (31%) encontrado nesse trabalho pode ser justificado pelo fato das cepas isoladas não terem sido identificadas ao nível de espécie. Os dados deste trabalho mostram a alta potencialidade das espécies de *Aspergillus* section *Nigri*, isolados de castanha-do-brasil, produzir FB₂. Este é o primeiro relato de cepas de *A. section Nigri* isoladas de castanhas-do-brasil produtoras de FB₂.

Tabela 3 - Cepas de *Aspergillus section Nigri* isolados de castanha-do-brasil testados para produção de FB₂ (ug/g)

Nº ITAL	FB ₂ *	Nº ITAL	FB ₂ *	Nº ITAL	FB ₂ *	Nº ITAL	FB ₂ *	Nº ITAL	FB ₂ *
102	ND	871	ND	1279	ND	2301	ND	5456	ND
103	ND	873	ND	1280	<LD	2302	ND	5461	ND
154	ND	874	<LD	1326	ND	2334	ND	5470	9,43
155	ND	875	ND	1329	ND	2396	ND	5538	ND
156	ND	879	ND	1331	ND	2504	ND	5614	ND
157	<LD	880	ND	1333	ND	2514	ND	5630	<LD
160	ND	901	ND	1338	ND	2845	ND	5691	ND
161	0,15	902	ND	1339	ND	2862	ND	5693	ND
162	0,09	903	4,63	1340	0,43	3510	ND	5694	ND
163	<LD	906	ND	1344	1,36	3609	ND	5752	ND
181	ND	915	ND	1345	ND	3737	ND	5823	ND
238	ND	917	ND	1346	ND	3738	ND	5829	ND
361	ND	920	0,97	1348	ND	3779	12,82	6462	<LD
363	ND	925	ND	1349	ND	4117	0,85	6488	ND
390	ND	926	<LD	1350	ND	4138	1,17	6503	ND
429	2,53	927	0,03	1351	ND	4195	3,77	6504	2,44
432	ND	929	ND	1353	ND	4262	29,57	6543	<LD
433	<LD	930	<LD	1354	ND	4410	ND	6562	ND
578	33,43	932	ND	1355	ND	4584	ND	6570	ND
670	<LD	933	0,13	1356	ND	4585	ND	6571	ND
671	26,63	934	0,82	1357	ND	4592	ND	6573	24,55
676	1,26	935	ND	1400	ND	4598	ND	6591	ND
678	1,64	987	ND	1631	<LD	4646	ND	6626	2,19
683	0,1	1001	0,5	1633	ND	4648	<LD	6842	ND
684	ND	1102	ND	1530	ND	4751	ND	6844	ND
685	ND	1138	ND	1532	ND	4812	ND	6854	ND
686	ND	1139	ND	1534	<LD	4956	1,83	6906	ND
712	ND	1140	ND	1536	ND	5017	ND	6951	37,25
713	0,09	1147	ND	1543	<LD	5023	ND	6952	ND
714	ND	1157	0,61	1546	2,04	5082	ND	7009	ND
715	ND	1158	ND	1547	2,22	5087	ND	7011	ND
716	ND	1206	14,0	1551	ND	5156	ND	7059	ND
747	ND	1207	<LD	1553	<LD	5157	ND	7061	0,98
748	ND	1208	ND	1555	ND	5274	ND	7094	ND
749	0,27	1211	ND	1642	15,63	5342	ND	7097	ND
768	ND	1212	ND	1728	ND	5343	0,02	7098	ND
769	ND	1213	ND	1732	ND	5345	0,02	7110	ND
797	ND	1214	4,94	2208	0,18	5348	<LD	7113	ND
798	2,74	1215	<LD	2220	ND	5394	ND	7315	ND
868	<LD	1276	ND	2221	3,63	5446	2,191	7377	ND

* µg/g – ppm; ND = não detectado.

5.3 Análises das amostras de castanha-do-brasil

5.3.1 Valores de atividade de água, infecção por *Aspergillus section Nigri* e incidência de fumonisina B₂ nas castanha-do-brasil

As Tabelas 4 a 7 apresentam os valores de atividade de água, porcentagem de infecção por *Aspergillus section Nigri* e fumonisina B₂, nas amostras de castanhas-do-brasil coletadas nas florestas, mercados, processamentos e supermercados, respectivamente. A metodologia de extração de fumonisina B₂ na castanha apresentou uma recuperação de 109%, que está dentro da faixa aceitável da Eurachem Guide (1998) que é de 60 a 110%. A atividade de água das 100 amostras de castanha-do-brasil variaram de 0,348 a 0,994 nas diferentes etapas da cadeia produtiva da castanha.

As amostras coletadas nas florestas apresentaram atividade de água entre 0,472 a 0,980 e infecção fúngica de 0 a 100%. Uma amostra apresentou 100% de infecção por *Aspergillus section Nigri*, mostrando que estas espécies são comuns nas florestas e encontram ambiente favorável ao seu desenvolvimento. As amostras coletadas nos mercados do Amazonas e Pará apresentaram a_w entre 0,583 a 0,994 e infecção fúngica entre 0 a 58%. As amostras coletadas nas processadoras no Amazonas e Pará apresentaram atividade de água entre 0,316 a 0,984, devido as diferentes etapas de processamento colhidas e a infecção variou de 0 a 84%. As amostras coletadas nos supermercados no Estado de São Paulo estavam todas processadas e apresentaram baixa a_w entre 0,365 a 0,586, e infecção por estas espécies entre 0 a 58%. Embora várias amostras apresentaram alta contaminação por *Aspergillus section Nigri*, nenhuma amostra estava contaminada por fumonisina B₂, podendo-se concluir que a castanha não é um bom substrato e não oferece condições ideais para a produção de FB₂. Este é o primeiro relato sobre incidência de fumonisina B₂ em castanha-do-brasil.

Tabela 4 - Atividade de água (a_w), porcentagem (%) de infecção por *Aspergillus section Nigri* e presença de fumonisina B₂ (FB₂) nas amostras de castanha-do-brasil coletadas nas florestas

Nº da amostra	Origem	Atividade de água	Infecção por <i>A. section Nigri</i> (%)	Fumonisin B ₂ (µg/kg)
213	Amazonas	0,992	22	ND
215	Amazonas	0,472	2	ND
217	Amazonas	0,545	10	ND
257	Amazonas	0,993	0	ND
259	Amazonas	0,980	2	ND
260	Amazonas	0,796	2	ND
104	Pará	0,753	50	ND
105	Pará	0,974	100	ND
106	Pará	0,971	18	ND
107	Pará	0,939	48	ND
108	Pará	0,978	6	ND
109	Pará	0,964	64	ND
110	Pará	0,943	22	ND
111	Pará	0,938	60	ND
112	Pará	0,970	24	ND
113	Pará	0,968	2	ND
114	Pará	0,984	2	ND
117	Pará	0,992	2	ND
118	Pará	0,964	20	ND
119	Pará	0,974	38	ND
120	Pará	0,981	10	ND
122	Pará	0,981	20	ND
152	Pará	0,968	2	ND
153	Pará	0,982	2	ND
160	Pará	0,977	2	ND

ND: Não Detectado

Tabela 5 - Atividade de água (a_w), porcentagem (%) de infecção por *Aspergillus section Nigri* e presença de fumonisina B₂ (FB₂) nas amostras de castanha-do-brasil coletadas nos mercados

Nº da amostra	Origem	Atividade de água	Infecção por <i>A. section Nigri</i> (%)	Fumonisina B ₂ (µg/kg)
4	Amazonas	0,583	0	ND
6	Amazonas	0,610	0	ND
7	Amazonas	0,966	4	ND
8	Amazonas	0,586	24	ND
71	Amazonas	0,974	22	ND
73	Amazonas	0,968	0	ND
76	Amazonas	0,620	24	ND
24	Amazonas	0,979	2	ND
25	Amazonas	0,905	38	ND
26	Amazonas	0,945	12	ND
28	Amazonas	0,915	2	ND
29	Amazonas	0,950	2	ND
78	Amazonas	0,925	6	ND
79	Amazonas	0,899	8	ND
80	Amazonas	0,957	4	ND
81	Amazonas	0,659	12	ND
218	Amazonas	0,993	58	ND
219	Amazonas	0,994	4	ND
220	Amazonas	0,994	8	ND
221	Amazonas	0,992	10	ND
222	Amazonas	0,985	2	ND
223	Amazonas	0,720	10	ND
227	Amazonas	0,444	2	ND
228	Amazonas	0,495	2	ND
229	Amazonas	0,704	6	ND
230	Amazonas	0,705	12	ND
232	Amazonas	0,893	10	ND
233	Amazonas	0,965	6	ND
234	Amazonas	0,973	8	ND
14	Pará	0,490	8	ND
15	Para	0,593	2	ND
17	Pará	0,569	4	ND
31	Pará	0,980	0	ND
32	Pará	0,971	24	ND
34	Pará	0,681	0	ND

ND: Não Detectado

Tabela 6 - Atividade de água (a_w), porcentagem (%) de infecção por *Aspergillus section Nigri* e presença de fumonisina B₂ (FB₂) nas amostras de castanha-do-brasil coletadas nas processadoras

Nº da amostra	Origem	Atividade de água	Infecção por <i>A. section Nigri</i> (%)	Fumonisina B ₂ (µg/kg)
68	Amazonas	0,635	6	ND
69	Amazonas	0,606	6	ND
70	Amazonas	0,597	2	ND
36	Pará	0,845	14	ND
37	Pará	0,843	70	ND
38	Pará	0,437	12	ND
41	Pará	0,787	0	ND
43	Pará	0,348	6	ND
44	Pará	0,912	72	ND
46	Pará	0,830	2	ND
47	Pará	0,678	12	ND
48	Pará	0,503	0	ND
52	Pará	0,667	12	ND
168	Pará	0,968	22	ND
169	Pará	0,716	2	ND
171	Pará	0,929	6	ND
173	Pará	0,964	4	ND
174	Pará	0,984	24	ND
175	Pará	0,857	26	ND
176	Pará	0,551	84	ND
177	Pará	0,399	6	ND
178	Pará	0,966	48	ND
179	Pará	0,913	28	ND
180	Pará	0,887	6	ND
181	Pará	0,316	14	ND
182	Pará	0,903	2	ND
195	Pará	0,548	2	ND

ND: Não Detectado

Tabela 7 - Atividade de água (a_w), porcentagem (%) de infecção por *Aspergillus section Nigri* e presença de fumonisina B₂ (FB₂) nas amostras de castanha-do-brasil coletadas nos supermercados

Nº da amostra	Origem	Atividade de água	Infecção por <i>A. section Nigri</i> (%)	Fumonisina B ₂ (µg/kg)
9	Campinas	0,365	8	ND
21	São Paulo	0,553	2	ND
196	São Paulo	0,586	2	ND
197	São Paulo	0,586	8	ND
198	São Paulo	0,544	8	ND
199	São Paulo	0,597	6	ND
200	São Paulo	0,495	10	ND
201	São Paulo	0,516	4	ND
202	São Paulo	0,456	2	ND
203	São Paulo	0,489	0	ND
207	São Paulo	0,484	2	ND
208	São Paulo	0,543	6	ND
209	São Paulo	0,431	58	ND

ND: Não Detectado

Estudos realizados por Mogensen et al. (2010a), comparando o crescimento e produção de FB₂ em cepas de *A. niger* e *Fusarium* spp, mostraram que as cepas de *A. niger* podem crescer em valores de a_w de 0,92 a 1,0, mas a produção de FB₂ foi maior em a_w de 0,99 e 0,98. Por outro lado, Frisvad et al. (2007), reportaram que *A. niger* foi capaz de produzir quantidades elevadas de fumonisinas em meios de cultura com a_w de 0.955. Vários alimentos como compota de frutas, figos secos e castanhas podem estar dentro desta a_w . Dados sobre a ocorrência e o papel de *Black Aspergilli* na contaminação de produtos agrícolas com alto teor de açúcar são necessários para esclarecer a importância de *A. niger* na segurança alimentar.

As fumonisinas são as principais contaminantes de milho e dos produtos a base de milho em todo o mundo. Nas ultimas décadas tem sido relatado no Brasil, Bulgária, Camarões, Croácia, República Tcheca, Índia, Irã, Itália, Japão, Quênia, Espanha, Suíça, Tanzânia, Tunísia, Uganda, Estados Unidos e Reino Unido (CHULZE, 2010). Recentemente têm sido encontrada em outros substratos como no trigo (KUSHIRO et al., 2009; MANOVA; MLANDENOVA, 2009; MONBALIU et al., 2010), na mandioca (MANJULA et al., 2009), alimentos para cavalos (LIESENER et al., 2010), uvas e produtos como o vinho de uva (LOGRIECO et al., 2009; MOGENSEN et al., 2010a, b), cerveja (AOYAMA et al., 2010; ROMERO-GONZALEZ

et al., 2009), figos (MORETTI et al., 2010), soja e milho (AOYAMA et al., 2010), aspargos (AOYAMA et al., 2010; WAŚKIEWICZ et al., 2010) e leite (GAZZOTTI et al., 2009). Não havendo nenhum relato em castanha-do-brasil.

A castanha-do-brasil, tem sido o foco de estudos no Brasil e em vários outros países (ARRUS et al., 2005; BAQUIÃO et al., 2012; CALDAS; SILVA; OLIVEIRA, 2002; CALDERARI, 2011; FREIRE; KOZAKIEWICZ; PATERSON, 2000; OLSEN et al., 2008; PACHECO; SCUSSEL, 2007; SIMÕES, 2004; SOUZA, 2003) quanto à contaminação com aflatoxinas e fungos aflatoxigênicos, devido à exigência estabelecida, primeiramente pela União Européia (EU, 2010), e recentemente pela legislação nacional (ANVISA, 2011), estabelecendo limites máximos de aflatoxinas totais de 10,0 µg/kg para castanhas-do-brasil sem casca destinadas diretamente ao consumo humano, 15 µg/kg para castanha sem casca para posterior processamento e 20 µg/kg para castanha com casca para consumo direto. Contudo nenhum estudo investigou a presença de *Aspergillus section Nigri* e produção de fumonisina B₂ nas castanhas-do-brasil. No entanto novos estudos são necessários para confirmar ausência de fumonisinas na castanha-do-brasil, pois esse trabalho realizou análise apenas para fumonisina B₂, sabendo-se que os *Aspergillus section Nigri*, são capazes de produzir fumonisinas B₂, B₄ e B₆ (FRISVAD et al., 2011; MÅNSSON et al., 2010).

5.4 Teste de inoculação de cepa de *A. niger* produtor de fumonisina B₂ em amêndoas de castanha-do-brasil

A Tabela 8 mostra o resultado da produção de FB₂ nas castanhas-do-brasil durante um período de 28 dias. Conforme a Tabela 8, não houve produção de fumonisina FB₂ nas amêndoas de ambas as amostras de castanha-do-brasil (230 e 233), previamente contaminadas com cepa de *Aspergillus section Nigri* produtora de FB₂. Os testes foram realizados em duplicata (1 e 2). Os dados obtidos neste teste comprovaram que a castanha-do-brasil não é um bom substrato para a produção de FB₂ por fungos pertencentes à *Aspergillus section Nigri*.

Tabela 8 - Resultado do teste realizado inoculando cepa produtora de FB₂ em duas amostras de castanha-do-brasil com diferentes atividades de água

	230 (1)	230 (2)	233 (1)	233 (2)
0 dias	ND	ND	ND	ND
7 dias	ND	ND	ND	ND
14 dias	ND	ND	ND	ND
21 dias	ND	ND	ND	ND
28 dias	ND	ND	ND	ND

As amostras selecionadas para a realização desse teste apresentavam diferentes níveis de atividade de água, a amostra 233 com a_w de 0,965 e amostra 230 com a_w de 0,85. Na amostra com alta atividade de água (0,965) houve um crescimento significativo do fungo inoculado, já na amostra com baixa a_w (0,85) observou-se o crescimento de diferentes espécies fúngicas presentes na amostra, como mostra a Figura 11.

Figura 11 - Amostra inoculada com cepa de *A. niger* produtora de FB₂; A: após 7 dias da inoculação; B: após 14 dias a inoculação

5.5 Análise molecular dos isolados de *Aspergillus* section *Nigri*

De acordo com Perrone et al. (2011) oito espécies morfologicamente indistinguíveis, *Aspergillus niger*, *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus acidus*, *Aspergillus brasiliensis*, *Aspergillus costaricensis*, *Aspergillus piperis*, *Aspergillus vadensis* e *A. awamori*, representam o que é denominado de “agregado” *Aspergillus niger*. Após a publicação de Perrone e colaboradores mais duas espécies foram descritas e incluídas no agregado, trata-se de *Aspergillus neoniger* e *Aspergillus eucalypticola* (VARGA et al., 2011).

Dentre as cepas estudadas nesta dissertação, dezoito foram selecionadas para serem analisadas molecularmente. A escolha dos isolados não foi ao acaso, deu-se preferência para analisar materiais de origens distintas e perfis de produção de micotoxinas distintos. A Análise de Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso (RAPD) permitiu uma discreta subdivisão dos isolados em dois grupos (Figura 12), mas esta subdivisão não foi sustentada por valores estatísticos aceitáveis (valores de bootstrapping) em um dendrograma (dados não apresentados). Diante deste fato, todos os isolados foram submetidos ao sequenciamento de uma porção do gene que codifica para β -tubulina (*benA*) com o objetivo de precisar a identificação. As sequências obtidas foram alinhadas com as sequências de linhagens tipo do “agregado” *A. niger* depositadas no banco de dados do National Center for Biotechnology and Information (NCBI) e uma árvore filogenética foi reconstruída. Conforme se observa na Figura 13, dez das cepas analisadas mostraram maior similaridade com *A. niger sensu stricto* enquanto que as demais (8) com *A. awamori*.

Figura 12 - Análise de RAPD utilizando *primer* OPX13

Aspergillus awamori é morfologicamente indistinguível de *A. niger*, mas algumas poucas diferenças em sequências de nucleotídeos têm sido sugeridas como úteis para a discriminação destes materiais. Segundo Perrone et al. (2011) na sequência do gene que codifica para β -tubulina há uma base T que está presente

em todas as cepas de *A. niger*, mas que em *A. awamori* está substituída por A (veja posição 133 da Figura 14). Esta Figura demonstra a concordância dos resultados obtidos neste trabalho com os dados de Perrone et al. (2011).

Figura 13 - Árvore Filogenética baseada na análise de sequências do gene de β -tubulina, utilizando cepas isoladas da castanha-do-brasil (ITAL) e sequências obtidas no GenBank

*indica as linhagens Tipo de *A. niger* e *A. awamori*.

Figura 14 - Ilustração das sequências de nucleotídeos de uma porção do gene da de β -tubulina de *A. niger* e *A. awamori*. Posição 133 indica uma base T que está presente em todas as cepas de *A. niger*, mas que em *A. awamori* está substituída por A.

Resultados semelhantes foram obtidos no trabalho realizado por Ferracin et al. (2009) que analisou a relação genética entre 51 isolados obtidos de amostras de frutas secas provenientes de diferentes regiões do previamente identificados como pertencentes ao agregado *A. niger* e 7 isolados de *Aspergillus tubingensis* obtidos de amostras de café do Brasil. Baseando-se nos dados de RAPD e sequências de nucleotídeos do gene da β -tubulina, dois grupos de *A. niger* foram observados. Apesar disso, os autores não sugeriram a subdivisão em duas espécies, uma vez que esta estava apenas pautada em dados moleculares e naquela época *A. awamori* tida como sinônimo de *A. niger*.

Em concordância com os dados de Perrone et al. (2011), Varga et al. (2011) realizaram análise de sequência de gene de calmodulina e β -tubulina, AFLP, UP-

PCR e análise de RFLP DNA mitocondrial e concluíram que as espécies *A. niger* e *A. awamori* podem ser separadas apenas através de abordagens moleculares, sendo considerada, pelos autores, duas espécies intimamente relacionadas. Esse mesmo trabalho revelou que as características morfológicas (tamanho, cor e forma dos conídios, comprimento e ornamentação das cepas) dos isolados analisados de *A. niger* e *A. awamori* se sobrepõem. Os perfis de extrólitos das duas espécies estudadas foram semelhantes, não havendo produção de metabólitos distintos para qualquer uma delas. A ocratoxina A foi produzido por alguns isolados de *A. niger* e alguns isolados de *A. awamori*. As fumonisinas B₂ e B₄ foram produzidos por isolados de ambas as espécies (*A. niger* e *A. awamori*).

A Tabela 9 mostra a produção de fumonisina B₂ por *A. niger* e *A. awamori* isoladas de castanha-do-brasil. Das 8 cepas identificadas molecularmente como *Aspergillus awamori*, 6 (75%) delas foram produtoras de FB₂, em altas concentrações (15,6 – 37,2 µg/g), enquanto das 10 cepas de *A. niger*, 5 (50%) foram produtoras de FB₂ (0,08 – 3,7 µg/g).

Tabela 9 - Produção de fumonisina B₂ por *A. niger* e *A. awamori* isoladas de castanha-do-brasil

Nº da cepa	Identificação	Origem	FB ₂ *
238	<i>A. niger</i>	Coari - AM	ND
103	<i>A. niger</i>	Jari – AM	0,08
578	<i>A. awamori</i>	Manaus - AM	33,4
671	<i>A. awamori</i>	Manaus - AM	26,6
714	<i>A. awamori</i>	Manaus – AM	ND
716	<i>A. awamori</i>	Manaus - AM	17,4
4195	<i>A. niger</i>	Manaus - AM	3,7
4751	<i>A. niger</i>	Manaus - AM	ND
6951	<i>A. awamori</i>	Manaus - AM	37,2
6503	<i>A. awamori</i>	São Paulo	ND
6504	<i>A. niger</i>	São Paulo	2,4
6573	<i>A. awamori</i>	São Paulo	23,5
1642	<i>A. awamori</i>	Belém - PA	15,6
1732	<i>A. niger</i>	Belém - PA	ND
2636	<i>A. niger</i>	Obidus - PA	2,9
3738	<i>A. niger</i>	Ipixuna - PA	ND
5274	<i>A. niger</i>	Oriximiná - PA	ND
4956	<i>A. niger</i>	Oriximiná - PA	1,8

* µg/g – ppm; ND = não detectado

De acordo com Varga et al. (2010), *A. niger* pode ser subdividida em dois clados representados por *A. niger sensu stricto* e *A. awamori*. Se o clado *A. awamori* for aceito como espécie, esta espécie será considerada como uma das melhores produtoras de fumonisina B₂. Portanto a diferenciação destes dois clados fornece uma informação mais precisa da incidência de *Aspergillus* section *Nigri* produtores de fumonisina B₂ e ocratoxina A.

6 CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos a partir deste estudo, podemos concluir que a infecção por *Aspergillus section Nigri* em castanha-do-brasil pode variar dependendo da região, da etapa do processo, e das boas práticas realizadas.

Os valores de atividade de água das amostras de castanha-do-brasil coletadas na floresta do Estado do Pará e do Amazonas foram mais elevados que os valores encontrados nas processadoras e nos mercados.

As cepas de *Aspergillus section Nigri* mostraram potencialidade para produção de fumonisina B₂, *Aspergillus awamori*, apresentou uma maior produção de FB₂, comparado às com *Aspergillus niger*.

A presença de *black aspergilli* em alimentos é comum, exigindo um estudo mais detalhado em relação à estas espécies em alimentos consumidos pela população.

Através da análise molecular foi observado grande variabilidade genética dentro da espécie de *Aspergillus niger*. Utilizando sequenciamento do gene β -tubulina, foi concluído que as espécies *Aspergillus awamori* e *Aspergillus niger*, se diferenciam por apenas uma base nitrogenada na posição 133 do gene, confirmando que para a identificação destas espécies a utilização da biologia molecular junto a análise morfológica é imprescindível.

Apesar das amostras de castanha-do-brasil apresentarem contaminação por fungos produtores de fumonisina B₂, nenhuma amostra estava contaminada com essa micotoxina, assim pode-se concluir que a castanha-do-brasil não é um bom substrato para a produção de FB₂ por *Aspergillus section Nigri*.

REFERÊNCIAS*

- ABARCA, M. L.; ACCENSI, F.; CANO, J.; CABAÑES, F. J. Taxonomy and significance of *black Aspergilli*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 86, p. 33-49, 2004.
- ABRUNHOSA, L.; CALADO, T.; VENÂNCIO, A. Incidence of Fumonisin B₂ Production by *Aspergillus niger* in Portuguese Wine Regions. **J. Agric. Food Chem.**, v. 59, p. 7514-7518, 2011.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC Nº7 de 18 de fevereiro de 2011. **Diário Oficial da União**. n. 37, seção 1, 22 de fevereiro de 2011.
- AOYAMA, K.; NAKAJIMA, M.; TABATA, S.; EIICHI, I.; TANAKA, T.; NORIZUKI, H.; ITOH, Y.; FUJITA, K.; KAI, S.; TSUTSUMI, T.; TAKAHASHI, M.; TANAKA, H.; IIZUKA, S.; OGISO, M.; MAEDA, M.; YAMAGUCHI, S.; SUGIYAMA, K. I.; SUGITA-KONISHI, Y.; KUMAGAI, S. Four-year surveillance for ochratoxin A and fumonisins in retail foods in Japan. **Journal of Food Protection**, v. 73, p. 344-352, 2010.
- ARRUS, K.; BLANKA, G.; ABRAMSONB, D.; CLEARC, R.; HOLLEYA, R. A. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. **J. Stor. Prod. Research**, v. 41, p. 513-527, 2005.
- ASHWORK, L. J.; SCHROEDER, H. W.; LANGLEY, B. C. Aflatoxins: Environmental Factors Governing Occurrence in Spanish Peanuts. **Science**, v. 148, p. 1228-1229, 1965.
- AZEVEDO, A. C. S.; FURLANETO, M. C.; SOSA-GOMEZ, D. R.; FUNGARO, M. H. P. Molecular characterization of *Paecilomyces fumosoroseus* (*Deuteromycotina: Hyphomycetes*) isolates. **Scientia Agricola**, v. 57, p. 729-732, 2000.
- BAKER, S. *Aspergillus niger* genomics: Past, present and into the future. **Medical Mycology**, v. 44, p. S17-S21, 2006.
- BARTÓK, T.; SZÉCSI, Á.; SZEKERES, A.; MESTERHÁZY, Á.; BARTÓK, M. Detection of new fumonisin mycotoxins and fumonisin-like compounds by reversed-phase highperformance liquid chromatography/electrospray ionization ion trap mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, p. 2447-2462, 2006.
- BARTÓK, T.; SZEKERES, A.; SZÉCSI, Á.; BARTÓK, M.; MESTERHÁZY, Á. A new type of fumonisin series appeared on the scene of food and feed safety. **Cereal Research Communications**, v. 36, p. 315-319, 2008. Suppl. B.

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

BARTÓK, T.; TÖLGYESI, L.; SZEKERES, A.; VARGA, M.; BARTHA, R.; SZÉCSI, Á.; BARTÓK, M.; MESTERHÁZY, Á. Detection and characterization of twenty-eight isomers of fumonisin B₁ (FB₁) mycotoxin in a solid rice culture infected with *Fusarium verticillioides* by reversed-phase high-performance liquid chromatography/electrospray ionization time-of-flight and ion trap mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 24, p. 35-42, 2010.

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

BEUCHAT, L. R.; RICE, S. L. *Byssochlamys* spp. and their importance in processed fruits. **Adv. Food Res.**, v. 25, p. 237-288, 1979.

BIGELIS, R. Food enzymes. In: FINKELSTEIN, D. B.; BALL, C. (Ed.). **Biotechnology of filamentous fungi: technology and products**. Boston, MS: Butterworth-Heinemann, 1992. p. 361-415.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Projeto de **Monitoramento da castanha-do-brasil**: relatório de atividades. Brasília, 2002. 110 p.

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.

BRIDGE, P. D.; ARORA, D. K.; REDDY, C. A.; ELANDER, R. P. **Application of PCR in mycology**. London, UK: CAB International, 1998. 368 p.

BUTCHKO, R. A.; PLATTNER, R. D.; PROCTOR, R. H. Deletion analysis of FUM genes involved in tricarballic ester formation during fumonisin biosynthesis, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 25, p. 9398-9404, 2006.

CABAÑES, F. J.; ACCENSI, F.; BRAGULAT, M. R.; ABARCA, M. L.; CASTELLA, G.; MINGUEZ, S.; PONS, A. What is the source of ochratoxin A in wine?. **International Journal of Food Microbiology**, v. 79, p. 213-215, 2002.

CALDAS, E. D.; SILVA, S. C.; OLIVEIRA, J. N. Aflatoxinas e ocratoxinas A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista Saúde Pública**, v. 36, n. 3, p. 319-323, 2002.

CALDERARI, T. O. **Biodiversidade de fungos aflatoxigênicos e aflatoxinas em castanha-do-brasil**. 2011. 145 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

CAMPO/PAS, **Manual de segurança e qualidade para a cultura da castanha-do-brasil**. Brasília, DF: Campo PAS, 2004. (Série Qualidade e Segurança dos Alimentos).

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. **The fungi**. 2nd ed. London, UK: Academic Press, 2001. 588 p.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY (CAST). **Mycotoxins:** risks in plant, animal, and human systems. Raleigh, US: Task Force Report, 2003. 109 p.

CAWOOD, M. E.; GELDERBLOM, W. C. A.; VLEGGAAR, R.; BEHREND, Y.; THIEL, P. G.; MARASAS, W. F. O. Isolation of the fumonisin mycotoxins: A quantitative approach. **J. Agric. Food Chem.**, v. 39, p. 1958-1962, 1991.

CHELKOWSKI, J. **Cereal grain:** mycotoxins, fungi and quality in drying and storage. Amsterdam: Elsevier, 1991. 607 p.

CLIVER, D. O.; RIEMANN, H. **Foodborne diseases**. 2nd ed. Amsterdam: Academic Press, 2002. 424 p.

CHULZE, S. N. Strategies to reduce mycotoxin levels in maize during storage: a review. **Food Additives and Contaminants**, v. 27, pt. A, p. 651-657, 2010.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Conjuntura Mensal**. abr. 2012. Disponível em: <www.conab.gov.br>. Acesso em: 7 jun. 2012.

COOPERATIVA CENTRAL DE COMERCIALIZAÇÃO EXTRATIVISTA DO ESTADO DO ACRE (COOPERACRE). **Ficha técnica de produtos:** castanha-do-brasil. Disponível em: <www.cooperacre.gov.br>. Acesso em: 20 jul. 2012.

CROUS, P. W.; VERKLEY, G. J. M.; GROENEWALD, J. Z.; SAMSON, R. A. **Fungal Biodiversity**. Uthrech, NL: CBS Fungal Biodiversity Center, 2009. 269 p. (CBS Laboratory Manual Series, 1).

CREPPY, E. E. Human ochratoxicosis. **J. Toxicol. Toxin Reviews**, v. 18, p. 277-293, 1999.

CRISHOLM, A.; MC AULEY, K.; MANN, J.; WILLIAMS, S.; SKEAFF, M. Cholesterol lowering effects of nuts compared with a Canola oil enriched cereal of similar fat composition. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 15, n. 4, p. 284-292, 2005.

DESJARDINS, A. E. **Fusarium mycotoxins:** chemistry, genetics and biology. Minnesota: APS Press, 2006. 260 p.

DUPUY, J.; LE BARS, P.; BOUDRA, H.; LE BARS, J. Thermostability of fumonisin B₁, a mycotoxin from *Fusarium moniliforme*, in corn. **Applied and Env. Microbiology**, v. 59, n. 9, p. 2864-2867, 1993.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Pesquisas tentam livrar castanha-do-brasil da contaminação por fungos**. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/>>. Acesso em: 10 jun. 2012.

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. **Parceria Estratégica**, v. 14, n. 28, p. 51-118, 2009.

EURACHEM GUIDES. **The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics**. Teddington: LGC, 1998.

EUROPEAN UNION (EU). Commission Decision of 4 July 2003, imposing special conditions on the import of Brazil nuts in shell originating in or consigned from Brazil (2003/493/EC) L 163. **Official Journal of the European Union**, v. 46, p. 33-38 2003.

EUROPEAN UNION (EU). Commission regulation No 165/2010 of 16 February 2010. Amending regulation (EC) N. 1881/2006. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuff as regards aflatoxins. **Official Journal of the European Union**, v. 53, p. 1-18, 2010.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **International trade in non-wood forest products: an overview**. Disponível em: <www.fao.org>. Acesso em: 7 jun. 2012.

FERRACIN, L. M.; FRISVAD, J. C.; TANIWAKI, M. H.; IAMANAKA, B. T.; SARTORI, D.; SCHAPOVALOFF, M. E.; FUNGARO, M. H. P. Genetic Relationships among Strains of the *Aspergillus niger* Aggregate. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 52, n. special, p. 241-248, 2009.

FINK-GREMMELS, J. H. Micotoxins: Their implications for human and animal health. **Veterinary Quarterly**, v. 21, n. 4, p. 115-120, 1999.

FREIRE, F. C. O.; KOZAKIEWICZ, Z.; PATERSON, R. M. Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. **Mycopathologia**, v. 149, n. 1, p. 13-19, 2000.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Filamentous fungi in foods and feeds: ecology, spoilage and mycotoxin production. In: ARORA, D. K.; MUKERJI, K. G.; MARTH, E. H. (Ed.), **Handbook of applied mycology**: volume 3. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 31-68.

FRISVAD, J. C.; LARSEN, T. O.; DE 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, 2007a.

FRISVAD, J. C.; SMEDSGAARD, J.; SAMSON, R. A.; LARSEN, T. O.; THRANE, U. Fumonisin B₂ production by *Aspergillus niger*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 9727-9732, 2007b.

FRISVAD, J. C.; LARSEN, T. O.; THRANE, U.; MEIJER, M.; VARGA, J.; SAMSON, R. A.; NIELSEN, K. Fumonisin and Ochratoxin production in industrial *Aspergillus niger* strains. **Plos One**, v. 6, n. 8, p. 1-5, 2011.

FUNGARO, M. H. P. PCR na micologia: biotecnologia. **Ciência e Desenvolvimento**, v. 17, p. 12-16, 2000.

FUNGARO, M. H. P.; VIEIRA, M. L. C. Marcadores moleculares. In: SERAFINI, I.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba, PR: Agropecuária, 2001. p.153-199.

FUNGARO, M. H. P.; VISSOTTO, P. C.; SARTORI, D.; VILAS-BOAS, L. A.; FURLANETO, M. C.; TANIWAKI, M. H. A molecular method for detection of *Aspergillus carbonarius* in coffee beans. **Current Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 123-127, 2004.

GAZZOTTI, T.; LUGOBONI, B.; ZIRONI, E.; BARBAROSSA, A.; SERRAINO, A.; PAGLIUCA, G. Determination of fumonisin B1 in bovine milk by LC-MS/MS. **Food Control**, v. 20, p. 1171-1174, 2009.

GELDERBLOM, W. C.; JASKIEWICZ, K.; MARASAS, W. F.; THIEL, P. G.; HORAK, R. M.; VLEGGAAR, R.; KRIEK, N. P. Fumonisin-Novel Mycotoxins with Cancer-Promoting Activity Produced by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 7, p. 1806-1811, 1988.

GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, p. 1323-1330, 1995.

GOMPERTZ, O. F.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R.; CORRÊA, B. Características gerais dos fungos. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p. 479-491.

GONÇALVES, J. S.; FERRACIN, L. M.; VIEIRA, M. L. C.; IAMANAKA, B. T.; TANIWAKI, M. H.; FUNGARO, M. H. P. Molecular analysis of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 28, p. 1817-1825, 2012.

GUTLEB, A. C.; MORRISON, E.; MURK, A. J. Cytotoxicity assays for mycotoxins produced by *Fusarium* strains: a review. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 11, p. 309-320, 2002.

HANSEN, C. C. **The characterization of fumonisin B₆ biosynthesis in *Aspergillus niger***. 2010. 79 p. Masters thesis - Center for Microbial Biotechnology Department of Systems of Biology Technical University of Denmark, Denmark, 2010.

HEDAYATI, M. T.; PASQUALOTTO, A. C.; WARN, P. A.; BOWYER, P.; DENNING, D. W. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. **Microbiology**, v. 153, p. 1677-1692, 2007.

HOMMA, A. K. O.; CARVALHO, R. A.; FERREIRA, C. A. P.; NASCIMENTO JR, J. D. B. **A destruição de recursos naturais: o caso da Castanha-do-Brasil do Pará no**

sudeste paranaense. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2000. 74 p. (Documentos, 32).

HUSSEIN, S. H.; BRASELL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, n. 2, p. 101-134, 2001.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. In: _____. **Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans**. Lyon, France, 1993. v. 56, p. 571.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene a styrene. In: _____. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**. Lyon, France, 2002. v. 82, p. 171-300.

JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES (JECFA). **Evaluation of 56 certain Mycotoxins in food**. Geneva: World Health Organization. 2002. (WHO Technical Report Series, 906).

KELLER, N. P.; HOHN, T. M. Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi, **Fungal Genetics and Biology**, v. 21, n. 1, p. 17-29, 1997.

KELLER, N. P.; TURNER, G.; BENNETTI, J. W. Fungal secondary metabolism - Biochemistry to genomics. **Nature Publishing Group – Nature Reviews**, v. 3, p. 937-947, 2005.

KLICH, M. A.; PITT, J. I. Differentiation of *Aspergillus flavus* from *Aspergillus parasiticus* and other closely related species. **Transactions of the British Mycology Society**, v. 91, p. 99-108, 1988.

KLICH, M. A.; MENDOZA, C.; MULLANEY, E.; KELLER, N. P.; BENNETT, J. W. A new sterigmatocystin-producing *Emericella* variant from agricultural desert soils. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 24, p. 131-138, 2001.

KUSHIRO, M.; ZHENG, Y.; NAGATA, R.; NAKAGAWA, H.; NAGASHIMA, H. Limited surveillance of fumonisins in brown rice and wheat harvested in Japan. **Journal of Food Protection**, v. 72, p. 1327-1331, 2009.

LIESENER, K.; CURTUI, V.; DIETRICH, R.; MÄRTLBAUER, E.; USLEBER, E. Mycotoxins in horse feed. **Mycotoxin Research**, v. 26, p. 23-30, 2010.

LOGRIECO, A.; FERRACANE, R.; HAIDUKOWSKY, M.; COZZI, G.; VISCONTI, A.; RITIENI, A. Fumonisin B₂ production by *Aspergillus niger* from grapes and natural occurrence in must. **Food Additives and Contaminants**, v. 26, pt. A, p. 1495-1500, 2009.

LOPES, M. S.; LOPES, M. T. G.; FIGUEIRA, A.; CAMARGO, L. E. A.; FUNGARO, M. H. P.; CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M. L. C. Marcadores moleculares dominantes

(RAPD e AFLP). **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 5, n. 29, p. 56-60, 2002.

MANJULA, K.; HELL, K.; FANDOHAN, P.; ABASS, A.; BANDYOPADHYAY, R. Aflatoxin and fumonisin contamination of cassava products and maize grain from markets in Tanzania and Republic of the Congo. **Toxin Reviews**, v. 28, p. 63-69, 2009.

MANOVA, R.; MLADENOVA, R. Incidence of zearalenone and fumonisins in Bulgarian cereal production. **Food Control**, v. 20, p. 362-365, 2009.

MÅNSSON, M.; KLEJNSTRUP, M. L.; PHIPPS, R. K.; NIELSEN, K. F.; FRISVAD, J. C.; GOTFREDSEN, C. H.; LARSEN, T. O. Isolation and characterization of fumonisin B₆, a new fumonisin from *Aspergillus niger*. **J. Agric. Food Chem.**, v. 58, p. 949-953, 2010.

MARASAS, W. F. O.; KELLERMAN, T. S.; GELDERBLUM, W. C. A.; COETZER, J. A. W.; THIEL, P. G.; VAN DER LUGT, J. J. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B₁ isolated from *Fusarium moniliforme*. **Onderstepoort J. Vet. Res.**, v. 55, p. 197-203, 1988.

MARASAS, W. F. Discovery and occurrence of the fumonisins: a historical perspective. **Environ. Health Perspect.**, v. 109, p. 239-243, 2001. Suppl. 2.

MARIN, S.; MAGAN, N.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V. Fumonisin-Producing Strains of *Fusarium*: a review of their ecophysiology. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 8, p. 1792-1805, 2004.

MENEZES, M.; PINHEIRO, M. R.; GUAZZELLI, A. C.; MARTINS, F. Cadeia produtiva da castanha do Brasil no estado do Amazonas. **Série técnica meio ambiente e desenvolvimento sustentável**, Manaus, v. 3, p. 1-21, 2005.

MERRILL, A. E.; LIOTTA, D. C.; RILEY, R. T. Fumonisin: naturally occurring inhibitors of ceramide synthesis. **Trends Cell Biol.**, v. 6, p. 218-223, 1996.

MOGENSEN, J. M.; LARSEN, T. O.; NIELSEN, K. F. Widespread occurrence of the mycotoxin fumonisin B₂ in wine. **J. Agric. Food Chem.**, v. 58, p. 4853-4857, 2010a.

MOGENSEN, J. M.; FRISVAD, J. C.; THRANE, U.; NIELSEN, K. F. Production of Fumonisin B₂ and B₄ by *Aspergillus niger* on Grapes and Raisins. **J. Agric. Food Chem.**, v. 58, p. 954-958, 2010b.

MONBALIU, S.; VAN POUCKE, C.; DETAVERNIER, C.; DUMOULIN, F.; VAN DE VELDE, M.; SCHOETERS, E.; VAN DYCK, S.; AVERKIEVA, O.; VAN PETEGHEM, C.; DE SAEGER, S. Occurrence of mycotoxins in feeds as analyzed by a multi-mycotoxin LC-MS/MS method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 66-71, 2010.

MONTVILLE, T. J.; MATTHEWS, K. R. **Food microbiology: an introduction**. 2nd ed. Washington: ASM, 2008. 446 p.

MORETTI, A.; FERRACANE, L.; SOMMA, S.; RICCI, V.; MULÈ, G.; SUSCA, A.; RITIENI, A.; LOGRIECO, A. F. Identification, mycotoxin risk and pathogenicity of *Fusarium* species associated with fig endosepsis in Apulia, Italy. **Food Additives and Contaminants**, v. 27, pt. A, p. 718-728, 2010.

MURPHY, P. A.; HENDRICH, S.; LANDGREN, S.; BRYANT, C. M. Food mycotoxin: An update. **Journal of food Science**, v. 71, n. 5, p. 51-65, 2006.

NIELSEN, K. F.; MOGENSEN, J. M.; JOHANSEN, M.; LARSEN, T. O.; FRISVAD, J. C. Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 395, n. 5, p. 1225-1242, 2009.

NOONIM, P.; MAHAKARNCHANAKUL, W.; NIELSEN, K. F.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Fumonisin B₂ production by *Aspergillus niger* in Thai coffee beans. **Food Additives and Contaminants**, v. 26, n. 1, p. 94-100, 2009.

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

PEL, H. J. et al. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 2, p. 221-231, 2007

PACHECO, A. M.; SCUSSEL, V. M. **Castanha-do-brasil: da floresta tropical ao consumidor**. Florianópolis: Editograf, 2006. 176 p.

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

PAGANO, L.; CAIRA, M.; PICARDI, M.; CANDONI, A.; MELILLO, L.; FIANCHI, L.; OFFIDANI, M.; NOSARI, A. Invasive Aspergillosis in patients with acute leukemia: update on morbidity and mortality-SEIFEM-C Report. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, p. 1524-1525, 2007.

PERAICA, M.; RADIC, B.; LUCIC, A.; PAVLOVIC, M. Toxic effects of mycotoxins in humans. **World Health Organ.**, v. 77, p. 754-766, 1999.

PERRONE, G.; STEA, G.; EPIFANI, F.; VARGA, J.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. *Aspergillus niger* contains the cryptic phylogenetic species *A. awamori*. **Fungal Biology**, v. 115, p. 1138-1150, 2011.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 3rd ed. New York: Springer. 2009, 471 p.

PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; HEMMONS, L. M.; MACDONALD, K. D.; BUFTON, A. W. J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, v. 5, p. 141-148, 1953.

PREIS, R. A.; VARGAS, E. A. A method for determining fumonisin B1 in corn using immunoaffinity column clean-up and thin layer chromatography/densitometry. **Food Addit. Contamin.**, v. 17, pt. A, p. 463-468, 2000.

PRUETT, S. T.; BUSHNEV, A.; HAGEDORN, K.; ADIGA, M.; HAYNES, C. A.; SULLARDS, M. C.; LIOTTA, D. C.; MERRILL JR, A. H. Biodiversity of sphingoid bases ("sphingosines") and related amino alcohols. **Journal of lipid research**, v. 49, n. 8, p. 1621-1639, 2008.

REDE DE SEMENTES DO XINGU. Disponível em: <<http://www.sementesdoxingu.org.br/web/detalhesementes.php?id=74>> Acesso em: 25 de jul. de 2012.

RHEEDER, J. P.; MARASAS, W. F. O.; VISMER, H. F. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2101-2105, 2002.

RILEY, R. T.; ENONGENE, E.; VOSS, K. A.; NORRED, W. P.; MEREDITH, F. I.; SHARMA, R. P.; SPITSBERGEN, J.; WILLIAMS, D. E.; CARLSON, D. B.; MERRILL JR., A. H. Sphingolipid perturbations as mechanisms for fumonisin carcinogenesis. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 109, p. 301-308, 2001. Suppl. 2.

ROMERO-GONZALEZ, R.; VIDAL, J. L. M.; AGUILERA-LUIZ, M. M.; FRENICH, A. G. Application of conventional solid-phase extraction for multimycotoxin analysis in beers by ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 9385-9392, 2009.

ROTTINGHAUS, G. E.; COATNEY, C. E.; MINOR, H. C. A rapid, sensitive thin layer chromatography procedure for the detection of fumonisin B₁ and B₂. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 4, p. 326-329, 1992.

SAMSON, R. A.; HOUBRAKEN, J. A. M. P.; KUIJPERS, A. F. A.; FRANK, J. M.; FRISVAD, J. C. New ochratoxin or sclerotium producing species in *Aspergillus* section Nigri. **Studies in Mycology**, v. 50, p. 45-61, 2004.

SAMSON, R. A.; NOONIM, P.; MEIJER, M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; VARGA, J. Diagnostic tools to identify *black Aspergilli*. **Studies in Mycology**, v. 59, p. 129-145, 2007.

SAMSON, R. A.; VARGA, J. What is a species in *Aspergillus*?. **Medical Mycology**, p. S1-S8, 2009.

SAMSON, R. A.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; THRANE, U.; ANDERSEN, B. **Food and Indoor fungi**. Uthrecht, NL: CBS Fungal Biodiversity Center, 2010. 390 p. (CBS Laboratory Manual Series, 2).

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SANTOS, J. C.; SENA, A. L. C.; ROCHA, C. I. L. Competitividade brasileira no comércio internacional de castanha do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA SOCIEDADE DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL – SOBER, 48., Campo Grande, MS, 2010. **Anais...** Campo Grande, MS: Sober, 2010. 14 p.

SHEPHARD, G. S. Determination of mycotoxins in human foods. **Chem. Soc. Ver.**, v. 37, p. 2468-2477, 2008.

SMEDSGAARD, J. Micro-scale extraction procedure for standardized screening of fungal metabolite production in cultures. **J. Chromatog.**, v. 760, pt. A, p. 264-270, 1997.

SIMÕES, A. V. **Impactos de tecnologias alternativas e do manejo da Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*, Humb. & Bonpl., 1808) no controle da contaminação por aflatoxinas em sua cadeia produtiva.** 2004. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2004.

SOUZA, M. L. **Processamento de cereais matinais extrusados de castanha-do-Brasil com mandioca.** 2003. 191 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

STOCKMANN-JUVALA, H.; SAVOLAINEN, K. A review of the toxic effects and mechanisms of action of fumonisin B₁. **Human & Experimental Toxicology**, v. 27, n. 11, p. 799-809, 2008.

SUN, S.; LEUNG, F.; TOMIC, J. Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) Proteins: Fractionation, Composition and Identification of a sulfur-rich protein. **J. Agric. Food Chem.**, v. 35, p. 232-235, 1987.

TANIWAKI, M. H.; PITT, J. I.; IAMANAKA, B. T.; DANIELE SARTORI, D.; COPETTI, M. V.; BALAJEE, A.; FUNGARO, M. H. P.; FRISVAD, J. C. *Aspergillus bertholletius* sp. nov. from Brazil Nuts. **Plos One**, v. 7, n. 8, p. 1-7, 2012.

TIPPLES, K. H. Quality and nutritional changes in stored grain. In: JAYAS, D. S.; WHITE, N. D. G.; MUIR, W. E. (Ed.). **Stored Grain Ecosystems.** New York: Marcel Dekker, 1995. p. 325-351.

VARGA, J.; KEVEI, F.; HAMARI, Z.; TÓTH, B.; TÉREN, J.; CROFT, J. H.; KOZAKIEWICZ, Z. Genotypic and phenotypic variability among black *Aspergilli*. In: SAMSON, R. A.; PITT, J. I. (Ed.). **Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification.** Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 2000. p. 397-411.

VARGA, J.; KOCSUBÉ, S.; SURI, K.; SZIGETI, G.; SZEKERES, A.; VARGA, M.; TÓTH, B.; BARTÓK, T. Fumonisin contamination and fumonisina producing *black Aspergilli* in dried vine fruits of different origin. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 143, n. 3, p. 143-149, 2010.

VARGA, J.; FRISVAD, J. C.; KOCSUBÉ, S.; BRANKOVICS, B.; TÓTH, B.; SZIGETI, G.; SAMSON, R. A. New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. **Studies in Mycology**, v. 69, p. 1-17, 2011.

VISCONTI, A.; SOLFRIZZO, M.; DE GIROLAMO, A. Determination of fumonisins B₁ and B₂ in corn and corn flakes by liquid chromatography with immunoaffinity column cleanup: Collaborative study. **J. Offic. Assoc. Analyt. Chem. Internat.**, v. 84, p. 1828-1838, 2001.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; ADRIE FRITERS, A.; POT, J.; PALEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucl. Acids Res.**, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.

WANG, E.; NORRED, W. P.; BACON, R. T.; RILEY, R. T.; MERRIL JR, A. H. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins: implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 14486-14490, 1991.

WAŚKIEWICZ, A.; IRZYKOWSKA, L.; BOCIANOWSKI, J.; KAROLEWSKI, Z.; KOSTECKI, M.; WEBER, Z.; GOLINŃSKI, P. Occurrence of *Fusarium* fungi and mycotoxins in marketable asparagus spears. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 19, p. 219-225, 2010.

WU, F. Measuring the economic impacts of *Fusarium* toxins in animal feeds. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v. 137, p. 363–374, 2007.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, A. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary *primers* are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.