

**TATIANA ALVES DOS REIS**

**MICROBIOTA E OCORRÊNCIA DE MICOTOXINAS  
EM AMOSTRAS DE CASTANHA-DO-BRASIL  
PROVENIENTES DE DIFERENTES ESTADOS  
BRASILEIROS**

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

São Paulo  
2013

**TATIANA ALVES DOS REIS**

**MICROBIOTA E OCORRÊNCIA DE MICOTOXINAS  
EM AMOSTRAS DE CASTANHA-DO-BRASIL  
PROVENIENTES DE DIFERENTES ESTADOS  
BRASILEIROS**

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

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Benedito Corrêa

Versão original

São Paulo  
2013

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

Reis, Tatiana Alves dos.

Micobiota e ocorrência de micotoxinas em amostras de castanhas-do-Brasil provenientes de diferentes estados brasileiros / Tatiana Alves dos Reis. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Benedito Corrêa.

Tese (Doutorado) – 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: Mycobiota and mycotoxins occurrence in Brazil nut samples from different brazilian states.

1. Aspergillus 2. Micotoxinas 3. Aflatoxinas 4. Micobiota I. Corrêa, Prof. Dr. Benedito II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0198/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Tatiana Alves dos Reis.

Título da Tese: Micobiota e ocorrência de micotoxinas em amostras de castanhas-do-Brasil provenientes de diferentes estados brasileiros.

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

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

**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

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

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



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cap. 05635-000 São Paulo, SP - Brasil  
Telefone: (55) (011) 28130900 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEP.127/2013.

## DECLARAÇÃO

Em adendo ao Protocolo de Isenção CEP-ICB nº 228/07, aprovado em 12 de setembro de 2007, informo que o título do Projeto foi alterado para "MICROBIOTA E OCORRÊNCIA DE MICOTOXINAS EM AMOSTRAS DE CASTANHA-DO-BRASIL PROVENIENTES DE DIFERENTES ESTADOS BRASILEIROS", sem modificações de seu conteúdo.

São Paulo, 13 de novembro de 2013.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA  
Coordenador da CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. PAULO M.A. ZANOTTO  
Coordenador da CEPISH- ICB /USP

*Aos meus pais e familiares  
que, no decorrer da minha vida,  
proporcionaram-me conhecimentos da  
integridade e da perseverança,  
pelo apoio incondicional  
em todos os momentos.  
Minha imensa gratidão e amor*

## AGRADECIMENTOS

*Ao professor Dr. Benedito Corrêa, pela orientação, confiança e dedicação. Para mim é uma honra tê-lo como orientador, por me ensinar durante anos e, transmitir vasta sabedoria profissional sem a qual, este trabalho não poderia ser realizado. Seu apoio foi imprescindível. Para mim, é um grande orgulho ser sua funcionária e sua orientada. Muito obrigada por tudo!*

*Ao professor Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira, meu orientador de iniciação científica por sua dedicação e apoio que fizeram me apaixonar pela pesquisa. Seu trabalho impecável formou minha base profissional.*

*À professora Dra. Myrna Sabino, pela oportunidade de estagiar em seu laboratório no Instituto Adolfo Lutz. Pelos anos de convívio, ensinamentos e amizade que jamais esquecerei.*

*Aos meus amados pais, Marilena e Nicolau, pelo incentivo, confiança, carinho e doçura. Obrigada por estarem sempre ao meu lado e, por me apoiarem em todas as minhas decisões, mostrando-me que posso realizar meus sonhos. Amo vocês!*

*À minha amada tia Edna Lúcia, por força em todos os momentos. Nunca esquecerei todos seus conselhos. Você, tia, é um exemplo para mim.*

*Às minhas queridas irmãs, Tissiane e Tábata, sempre presentes na minha vida. Nossa união e amizade são meu porto seguro.*

*Aos meus cunhados, João e Joel, por fazerem parte da minha família.*

*À minha querida avó Albertina, por seu bom astral e sua espiritualidade.*

*À minha sobrinha Luana, que sempre enche de alegria minha vida. Sua existência ilumina meu caminho.*

*Ao querido Renato por fazer parte da minha vida.*

*À minha amada prima Pérola, sempre em meu coração, pelos bons momentos que passamos juntas. Aprendi muito com você, minha querida (in memorian).*

*Aos que já partiram, mas que sempre me apoiaram: minha avó Isabel, meus avôs Leocádio e Sílvio, meu tio Roberto, minha tia Leonor (in memorian).*

*À minha flor, Sarah dos Santos Gonçalves, por sua amizade, conhecimento, paciência e carinho. Foi um imenso presente conhecê-la. Obrigada pelo auxílio na metodologia de sequenciamento.*

*À minha querida companheira de trabalho, Shirlei A. Marques, pelos anos de convívio e por suportar minhas manias. Obrigada por tudo que compartilhou comigo desde que comecei a trabalhar com você.*

*À Tainah Drumond de Oliveira, minha estagiária, meu braço direito na execução desse trabalho, sua ajuda foi muito importante, jamais esquecerei.*

*À Arianne Costa Baquião, pela amizade e pelo apoio na execução desse trabalho. Obrigada pela oportunidade de trabalhar com você.*

*À Danielle Diniz Atayde, pela amizade e pelas viagens a trabalho.*

*À Patrícia Zorzete, pelo seu apoio e por estar sempre disposta a ajudar em todos os sentidos.*

*Ao Rodrigo Cardoso de Oliveira, pelo convívio e pela oportunidade de trabalharmos juntos.*

*Aos queridos amigos Ednei Assunção Coelho, Mariana Sconza Soncin, Maitê Oliveira, Priscila Bianchi e Vinícius de Moraes Barroso, Luciana Gimenez pela amizade verdadeira que ultrapassa o ambiente de trabalho.*

*Aos amigos do Laboratório de Micotoxinas do Instituto de Ciências Biomédicas, Sabina, Liliana, Gabriela, Lívia, Vinícius, Aline, Cynara, Márcia, Raquel e demais colegas pelo companheirismo e convívio no laboratório.*

*Aos amigos do Laboratório de Fungos Dimórficos e Patogênicos, representado pelo professor Carlos Taborda, e aos professores Mario Henrique Barros e Kelly Ishida pela oportunidade de trabalhar em conjunto.*

*À equipe de funcionários, formada pelos professores e técnicos, do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pelos conhecimentos adquiridos e pela parceria nestes anos de trabalho.*

*Às empresas que, através de seus representantes, sempre atenderam com presteza solicitações de suporte técnico e vendas, principalmente: Sinc, Life Technologies, Labsynth, Oxoid, Ciencor e Qiagen.*

*À equipe de vigilância do ICB II pela simpatia e cuidado quando eu ficava no laboratório após o expediente e nos finais de semana.*

*Aos funcionários do Setor de Apoio Técnico, pela colaboração sempre solícita prestada.*

*Aos secretários Naíde, Elizabeth, Gisele, Luciana e Celso sempre muito prestativos.*

*Aos funcionários da Biblioteca do ICB, especialmente à Monica Amaral, pela correção da formatação da tese.*

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

*À Universidade de São Paulo, pela qualidade do ensino.*

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq),  
pelo suporte financeiro.*

*A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização  
deste trabalho.*

**MUITO OBRIGADA!**

*Para ser grande, sê inteiro: nada  
Teu exagera ou exclui.  
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és  
No mínimo que fazes.  
Assim em cada lago a lua toda  
Brilha, porque alta vive.*

*(Fernando Pessoa)*

## RESUMO

REIS, T. A. **Micobiota e ocorrência de micotoxinas em amostras de castanha-do-Brasil provenientes de diferentes Estados brasileiros**. 2013. 216 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*) é o mais importante produto florestal não madeireiro extraído da Amazônia comercializado nos mercados interno e externo. Trata-se de uma mercadoria de elevado valor econômico e nutricional, com características de produção peculiares muito complexas e de difícil controle. Desde a floresta, suas sementes são suscetíveis à contaminação por fungos, particularmente os micotoxigênicos e seus metabólitos. Neste contexto, torna-se imprescindível determinar a micobiota e a presença de micotoxinas em castanhas-do-Brasil provenientes dos estados pertencentes à região Amazônica do Brasil, os principais produtores. O objetivo deste estudo foi avaliar a presença de fungos e micotoxinas (aflatoxinas e ácido ciclopiazônico) em amostras de castanha-do-Brasil coletadas em diferentes estados: Acre, Amazonas, Amapá e Pará. Um total de 200 amostras de casca e 200 amostras de amêndoa foram semeadas em ágar *Aspergillus flavus-parasiticus* para pesquisa da micobiota. As micotoxinas foram analisadas tanto nas amêndoas quanto nas cascas por cromatografia líquida de alta eficiência. A morfológica clássica e a análise molecular revelaram a presença dos seguintes fungos, em ordem decrescente de frequência: amêndoas - *Phialemonium* spp. (54%), *Penicillium* spp. (16%), *Fusarium* spp. (13%), *Phaeoacremonium* spp. (11%), e *Aspergillus* spp. (4%), cascas - *Phialemonium* spp. (62%), *Phaeoacremonium* spp. (11%), *Penicillium* spp. (10%), *Fusarium* spp. (9%), e *Aspergillus* spp. Aflatoxinas foram detectadas em 22 (11%) das 200 amostras de amêndoa, sendo que 13 (59,1%) amostras apresentaram níveis de aflatoxina B<sub>1</sub> acima de 15 µg/kg, limite estabelecido pela Comissão Europeia e pela ANVISA. Dezenove (9,5%) das amostras de casca continham aflatoxinas, porém, em menores níveis do que os encontrados nas amêndoas. Ácido ciclopiazônico foi detectado em 44 (22%) das amostras do produto, com níveis entre 98,65 e 161,2 µg/kg. Assim, boas práticas no manejo da castanha-do-Brasil na coleta, durante o beneficiamento, até o armazenamento e comercialização são necessárias para garantir a qualidade do produto.

**Palavras-chave:** Micoflora. *Aspergillus*. Fungo. Castanha-do-Brasil, Aflatoxinas. Ácido ciclopiazônico.

## ABSTRACT

REIS, T. A. **Mycobiota and mycotoxins in Brazil nut samples from different Brazilian states**. 2013. 216 p. Ph. D. thesis (Microbiology) -Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) is the most important non-timber forest products extracted Amazon and marketed in national and international markets. It is a product of high nutritional and economic value, with production characteristics peculiar very complex and difficult to control. Since the forest, the seeds are susceptible to fungal contamination, particularly mycotoxigenic fungi and their metabolites. In this context, it is essential to determine the mycobiota and mycotoxins in Brazil nuts from the states belonging to the Amazon region of Brazil, the main producers. The aim of this study was to evaluate the presence of fungi and mycotoxins (aflatoxins and cyclopiazonic acid) in Brazil nut samples collected in different states: Acre, Amazonas, Amapá and Pará. A total of 200 of husk samples and 200 of almond samples were plated on agar *Aspergillus flavus* - *parasiticus* for mycobiota determination. Mycotoxins were analyzed in both almonds and husks by high performance liquid chromatography. The classical morphological and molecular analysis revealed the presence of the following fungi, in decreasing order of frequency: almonds - *Phialemonium* spp. (54%), *Penicillium* spp. (16%), *Fusarium* spp. (13%), *Phaeoacremonium* spp. (11%) and *Aspergillus* spp. (4%), husks - *Phialemonium* spp. (62%), *Phaeoacremonium* spp. (11%), *Penicillium* spp. (10%), *Fusarium* spp. (9%), and *Aspergillus* spp. Aflatoxins were detected in 22 (11 %) of 200 almond samples, and 13 (59.1%) of the samples contained aflatoxin B<sub>1</sub> levels above 15 µg/kg, the limit established by the European Commission and ANVISA. Nineteen (9.5%) of husk samples contained aflatoxin, but at lower levels than those found in almonds. Cyclopiazonic acid was detected in 44 (22%) of almond samples, with levels between 98.65 and 161.2 µg/kg. So, good practice in the management of Brazil nut in collecting, processing, storage and marketing are necessary to ensure the quality of the product.

**Keywords:** Mycoflora. *Aspergillus*. Fungo. Brazil nut. Aflatoxins. Cyclopiazonic acid.

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Composição média da castanha-do-Brasil por 100 g de parte comestível.....	34
<b>Quadro 2</b> - Quantidade extraída e valor em reais da castanha-do-Brasil no ano de 2011.....	38
<b>Quadro 3</b> - Área das reservas extrativistas nas áreas de produção de castanha-do-Brasil.....	54
<b>Quadro 4</b> - Coordenadas geográficas e altitudes dos locais de estudo.....	58
<b>Quadro 5</b> - Legenda da identificação das amostras.....	75
<b>Quadro 6</b> - Sequências dos iniciadores utilizados no estudo.....	88
<b>Quadro 7</b> - Limites máximos toleráveis para aflatoxinas em castanha-do-Brasil no Brasil e na União Europeia.....	117

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Castanheira.....	31
<b>Figura 2</b>	Castanha-do-Brasil: ouriço, semente e amêndoa.....	32
<b>Figura 3 -</b>	Vitrina de loja no Pará com embalagens com amêndoas e azeite de castanha e peças de artesanato feitas com ouriço e sementes de castanha-do-Brasil: porta-jóias, objetos de decoração e chaveiros.....	33
<b>Figura 4</b>	Evolução da produção de castanha-do-Brasil de 1990 a 2007.....	38
<b>Figura 5 -</b>	Movimentação da produção, do consumo interno e da exportação da castanha-do-Brasil de 2001 a 2011.....	39
<b>Figura 6 -</b>	Valor recebido pelos produtores de castanha-do-Brasil nos Estados do Acre (AC), Amazonas (AM), Amapá (AP), Pará (PA), Roraima (RR) e Rondônia (RO).....	40
<b>Figura 7 -</b>	Cadeia produtiva da castanha-do-Brasil da coleta na floresta às cooperativas.....	41
<b>Figura 8 -</b>	Fluxograma do beneficiamento da castanha-do-Brasil nas cooperativas.....	42
<b>Figura 9 -</b>	Evolução do preço (US\$) de exportação da castanha com e sem casca	43
<b>Figura 10 -</b>	Fotomicrografia de <i>Aspergillus</i> spp. (Coloração: lactofenol azul algodão; 400 x) .....	44
<b>Figura 11</b>	Estruturas químicas das aflatoxinas B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> e G <sub>2</sub> .....	51
<b>Figura 12</b>	Estrutura química do ACP.....	52
<b>Figura 13 -</b>	Localização geográfica da região de estudo (Acre, Amazonas, Amapá e Pará) .....	57
<b>Figura 14</b>	Localização do Rio Branco no Acre.....	58
<b>Figura 15</b>	Fachada da COOPERACRE, Rio Branco, AC.....	59
<b>Figura 16 -</b>	Galpões de armazenamento da castanha-do-Brasil (A, B, C). Interior de galpão (D) .....	59
<b>Figura 17 -</b>	Sacas entregues por cooperado.....	60
<b>Figura 18 -</b>	Resíduos de cascas de castanhas que serão utilizados como fertilizante.....	60
<b>Figura 19</b>	Produtos comercializados pela COOPERACRE.....	60
<b>Figura 20</b>	Localização de Manicoré no Amazonas.....	61
<b>Figura 21</b>	Fachada da COVEMA.....	61
<b>Figura 22</b>	Galpões de armazenamento.....	62
<b>Figura 23</b>	Polidor mecânico para castanha-do-Brasil com cascas.....	62
<b>Figura 24</b>	Forno de autoclave abastecido com resíduos de cascas de castanhas....	63
<b>Figura 25</b>	Autoclave.....	63
<b>Figura 26</b>	Descascadoras de castanhas.....	63
<b>Figura 27</b>	Castanhas descascadas (amêndoas) .....	64
<b>Figura 28</b>	Classificação das amêndoas: G-grande, M-média, P-pequena, K-quebrada.....	64
<b>Figura 29</b>	Produtos comercializados pela COVEMA.....	64
<b>Figura 30</b>	Coleta de amostras para trabalho. (A) amostras que foram comparadas às demais cooperativas e (B) coleta da amostra orgânica..	65
<b>Figura 31</b>	Localização do Laranjal do Jari no Amapá.....	65
<b>Figura 32</b>	Fachada da COMAJA.....	66
<b>Figura 33</b>	Armazenamento de amostras.....	66
<b>Figura 34</b>	Polidor de castanhas.....	67
<b>Figura 35</b>	Armazenamento de castanhas polidas.....	67

<b>Figura 36</b>	Castanheira localizada na COMAJA.....	68
<b>Figura 37</b>	Autoclave.....	68
<b>Figura 38</b>	Cascas de castanhas utilizadas como combustível do forno.....	69
<b>Figura 39</b>	Descascadoras de castanhas.....	69
<b>Figura 40</b>	Amêndoas.....	70
<b>Figura 41</b>	Limpeza das amêndoas, retiradas das quebradas.....	70
<b>Figura 42</b>	Classificação das castanhas.....	71
<b>Figura 43 -</b>	(A) Sala de embalagem (B) Embalagem com identificação de Usina do Pará.....	71
<b>Figura 44</b>	Localização de Acará no Pará.....	71
<b>Figura 45</b>	Comercialização de castanha-do-Brasil em Ver-o-peso.....	72
<b>Figura 46</b>	Comercialização de castanhas.....	72
<b>Figura 47</b>	Comercialização de ouriços e castanhas.....	73
<b>Figura 48</b>	Trabalhador abrindo ouriço em Ver-o-peso.....	73
<b>Figura 49</b>	Pequeno armazém de comerciante em Ver-o-peso de onde as amostras do estado do Pará procederam.....	74
<b>Figura 50 -</b>	Artesanato comercializado no Mercado Ver-o-peso produzido com ouriços e castanhas.....	74
<b>Figura 51</b>	Quebrador utilizado para separar as cascas das amêndoas.....	75
<b>Figura 52</b>	Eletroforese em gel de agarose para verificação da eficiência da PCR.	88
<b>Figura 53 -</b>	Representação cromatográfica das aflatoxinas: (I) padrões, (II) amostra de amêndoa e (III) amostra de casca.....	98
<b>Figura 54</b>	CCD visualizada sob luz UV (360 nm) para separação de aflatoxinas	101
<b>Figura 55 -</b>	Representação cromatográfica de ACP: (I) padrão, (II) amostra de amêndoa e (III) amostra de casca.....	103
<b>Figura 56 -</b>	Representação do número de cepas de <i>A. flavus</i> micotoxigênicas isoladas dos Estados brasileiros.....	109
<b>Figura 57 -</b>	Representação do número de cepas de <i>A. flavus</i> micotoxigênicas isoladas das amostras orgânicas.....	110

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Níveis de atividade de água e de teor de umidade (médios, máximos, mínimos e desvio padrão) em amostras de castanha-do-Brasil (200 amêndoas e 200 cascas) dos 4 Estados brasileiros estudados.....	94
<b>Tabela 2 -</b>	Principais gêneros fúngicos isolados de 400 amostras de amêndoas (200) e cascas (200) provenientes dos 4 Estados brasileiros em estudo (Acre - AC, Amazonas – AM, Amapá – AP, Pará – PA).....	96
<b>Tabela 3 -</b>	Porcentagens de contaminação por aflatoxinas e os valores médios encontrados em 400 amostras de castanhas-do-Brasil (200 amêndoas e 200 cascas) provenientes dos 4 Estados brasileiros (Acre - AC, Amazonas – AM, Amapá – AP, Pará – PA) .....	100
<b>Tabela 4 -</b>	Porcentagens de contaminação por ácido ciclopiazônico e os valores médios encontrados em 400 amostras de castanhas-do-Brasil (200 amêndoas e 200 cascas) provenientes dos 4 estados brasileiros em estudo (Acre - AC, Amazonas – AM, Amapá – AP, Pará – PA) .....	104
<b>Tabela 5 -</b>	Concentração média de selênio (mg/kg) em amostras de amêndoas.....	105
<b>Tabela 6 -</b>	Frequência absoluta das espécies de <i>Aspergillus</i> isoladas nas amostras de castanhas-do-Brasil provenientes de diferentes Estados brasileiros, incluindo as procedentes das amostras orgânicas.....	106
<b>Tabela 7 -</b>	Frequência relativa das 254 cepas <i>Aspergillus</i> isoladas das amostras de castanhas-do-Brasil provenientes dos 4 Estados brasileiros em estudo (Acre - AC, Amazonas – AM, Amapá – AP, Pará – PA) .....	107
<b>Tabela A.1 -</b>	Níveis de umidade (Tu e Aa) e número de unidades formadoras de colônias por grama ( $10^3$ UFC/g) em 50 amostras de amêndoas de castanha-do-Brasil (ACA1 a ACA50), provenientes do Estado do Acre – AC.....	141
<b>Tabela A.2 -</b>	Níveis de umidade (Tu e Aa) e número de unidades formadoras de colônias por grama ( $10^3$ UFC/g) em 50 amostras de cascas de castanha-do-Brasil (ACC1 a ACC50), provenientes do Estado do Acre – AC	143
<b>Tabela A.3 -</b>	Níveis de umidade (Tu e Aa) e número de unidades formadoras de colônias por grama ( $10^3$ UFC/g) em 50 amostras de amêndoas de castanha-do-Brasil (AMA1 a AMA50), provenientes do Estado do Amazonas – AM	145
<b>Tabela A.4</b>	Níveis de umidade (Tu e Aa) número de unidades formadoras de colônias por grama ( $10^3$ UFC/g) em 50 amostras de cascas de castanha-do-Brasil (AMC1 a AMC50), provenientes do Estado do Amazonas – AM	147
<b>Tabela A.5 -</b>	Níveis de umidade (Tu e Aa) e número de unidades formadoras de colônias por grama ( $10^3$ UFC/g) em 50 amostras de amêndoas de castanha-do-Brasil (APA1 a APA50),	

	provenientes do Estado do Amapá – AP.....	149
<b>Tabela A.6 -</b>	Níveis de umidade (Tu e Aa) e número de unidades formadoras de colônias por grama ( $10^3$ UFC/g) em 50 amostras de cascas de castanha-do-Brasil (APC1 a APC50), provenientes do Estado do Amapá – AP.....	151
<b>Tabela A.7 -</b>	Níveis de umidade (Tu e Aa) e número de unidades formadoras de colônias por grama ( $10^3$ UFC/g) em 50 amostras de amêndoas de castanha-do-Brasil (PAA1 a PAA50), provenientes do Estado do Pará-PA.....	153
<b>Tabela A.8 -</b>	Níveis de umidade (Tu e Aa) e número de unidades formadoras de colônias por grama ( $10^3$ UFC/g) em 50 amostras de cascas de castanha-do-Brasil (PAC1 a PAC50), provenientes do Estado do Pará-PA.....	155
<b>Tabela A.9</b>	Potencial aflatoxigênico, potencial de produção de ácido ciclopiazônico, produção de ácido aspergílico e identificação molecular das cepas de <i>Aspergillus</i> .....	157
<b>Tabela A.10 -</b>	Incidência de aflatoxinas ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) e ácido ciclopiazônico ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) em 50 amostras de amêndoas de castanha-do-Brasil (ACA1 a ACA50), provenientes do Estado do Acre – AC.....	163
<b>Tabela A.11 -</b>	Incidência de aflatoxinas ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ácido ciclopiazônico ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) em 50 amostras de cascas de castanha-do-Brasil (ACC1 a ACC50), provenientes do Estado do Acre – AC.....	165
<b>Tabela A.12 -</b>	Incidência de aflatoxinas ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ácido ciclopiazônico ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) em 50 amostras de amêndoas de castanha-do-Brasil (AMA1 a AMA50), provenientes do Estado do Amazonas – AM.....	167
<b>Tabela A.13 -</b>	Incidência de aflatoxinas ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ácido ciclopiazônico ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) em 50 amostras de cascas de castanha-do-Brasil (AMC1 a AMC50), provenientes do Estado do Amazonas – AM.....	169
<b>Tabela A.14 -</b>	Incidência de aflatoxinas ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ácido ciclopiazônico ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) em 50 amostras de amêndoas de castanha-do-Brasil (APA1 a APA50), provenientes do Estado do AMAPÁ – AP.....	171
<b>Tabela A.15 -</b>	Incidência de aflatoxinas ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ácido ciclopiazônico ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) em 50 amostras de cascas de castanha-do-Brasil (APC1 a APC50), provenientes do Estado do AMAPÁ – AP.....	173
<b>Tabela A.16 -</b>	Incidência de aflatoxinas ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ácido ciclopiazônico ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de 50 amostras de amêndoas de castanha-do-Brasil (PAA1 a PAA50), provenientes do Estado do Pará – PA.....	175
<b>Tabela A.17 -</b>	Incidência de aflatoxinas ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ácido ciclopiazônico ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de 50 amostras de cascas de castanha-do-Brasil (PAC1 a PAC50), provenientes do Estado do Pará – PA.....	177

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico B.1-</b>	Porcentagem de cepas de <i>Aspergillus</i> Seção <i>Flavi</i> de 50 amostras de amêndoas de castanha-do-Brasil (ACA1 a ACA50), provenientes do Estado do Acre – AC.....	179
-		
<b>Gráfico B.2-</b>	Porcentagem de cepas de <i>Aspergillus</i> Seção <i>Flavi</i> de 50 amostras de cascas de castanha-do-Brasil (ACC1 a ACC50), provenientes do Estado do Acre – AC.....	179
-		
<b>Gráfico B.3-</b>	Porcentagem dos <i>Aspergillus</i> Seção <i>Flavi</i> de 50 amostras de amêndoas de castanha-do-Brasil (AMA1 a AMA50), provenientes do Estado do Amazonas – AM.....	180
-		
<b>Gráfico B.4-</b>	Porcentagem dos <i>Aspergillus</i> Seção <i>Flavi</i> de 50 amostras de amêndoas de castanha-do-Brasil (AMC1 a AMC50), provenientes do Estado do Amazonas – AM.....	180
-		
<b>Gráfico B.5-</b>	Porcentagem dos <i>Aspergillus</i> Seção <i>Flavi</i> de 50 amostras de amêndoas de castanha-do-Brasil (APA1 a APA50), provenientes do Estado do Amapá – AP.....	181
-		
<b>Gráfico B.6-</b>	Porcentagem do potencial aflatoxigênico dos <i>Aspergillus</i> Seção <i>Flavi</i> de 50 amostras de cascas de castanha-do-Brasil (APC1 a APC50), provenientes do Estado do Amapá - AP.....	181
-		
<b>Gráfico B.7-</b>	Porcentagem dos <i>Aspergillus</i> Seção <i>Flavi</i> de 50 amostras de amêndoas de castanha-do-Brasil (PAA1 a PAA50), provenientes do Estado do Pará-PA.....	182
-		
<b>Gráfico B.8-</b>	Porcentagem dos <i>Aspergillus</i> Seção <i>Flavi</i> de 50 amostras de cascas de castanha-do-Brasil (PAC1 a PAC50), provenientes do Estado do Pará-PA.....	182
-		

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%: por cento

': minutos

°: grau

°C: graus Celsius

±: mais ou menos

<: menor

>: maior

®: marca registrada

µg/kg: micrograma por quilograma

µg/mL: micrograma por microlitro

µg: micrograma

µL/L: microlitro por litro

µL: microlitro

µm: micrometro

<sup>60</sup>Co: cobalto 60

1x: uma vez

400 x: 400 vezes

A.C.: antes de Cristo

A260 nm: absorbância a 260 nanômetros

A280 nm: absorbância a 280 nanômetros

Aa: atividade de água

AANI: análise por ativação neutrônica instrumental

AC: Acre

AC A: amostra de amêndoa de castanhas provenientes do Acre

AC C: amostra de casca de castanhas provenientes do Acre

ACP: ácido ciclopiazônico

AFB<sub>1</sub>: aflatoxina B<sub>1</sub>

AFB<sub>2</sub>: aflatoxina B<sub>2</sub>

AFB<sub>2a</sub>: aflatoxina B<sub>2a</sub>

AFG<sub>1</sub>: aflatoxina G<sub>1</sub>

AFG<sub>2</sub>: aflatoxina G<sub>2</sub>

AFG<sub>2a</sub>: aflatoxina G<sub>2a</sub>

AFPA: *Aspergillus flavus-parasiticus* Agar

Água Milli-Q: água deionizada purificada em um sistema Milli-Q (Millipore Corporation)

AM: Amazonas

AM A: amostra de amêndoa de castanhas provenientes do Amazonas

AM C: amostra de casca de castanhas provenientes do Amazonas

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC: Association of Official Analytical Chemists

AP: Amapá

AP A: amostra de amêndoa de castanhas provenientes do Amapá

APC: amostra de casca de castanhas provenientes do Amapá

Buffer PB: tampão de ligação

Buffer PE: tampão de lavagem

CA: Califórnia

CAST: Concil for Agricultural Science and Technology

CCD: cromatografia em camada delgada

CE: Comissão Europeia

Cepas S: cepas produtoras de esclerócios pequenos (small) < 400  $\mu\text{m}$

Cepas L: cepas produtoras de esclerócios grandes (large) > 400  $\mu\text{m}$

CNEN: Comissão Nacional de Energia Nuclear

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

cm: centímetro

cm<sup>2</sup>: centímetro quadrado

COMAJA: Cooperativa Mista Agroextrativista de Laranjal do Jari

COOPERACRE: Cooperativa Central de Comercialização Extrativista do Acre

CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento

COVEMA: Cooperativa Verde de Manicoré

CRPq: Centro do Reator de Pesquisas

CZ: Czapek

DL50: dose letal média (dose capaz de matar 50% dos indivíduos de uma população em teste)

DNA: ácido desoxirribonucleico

DNAr: ácido desoxirribonucleico ribossomal

dNTP: desoxirribonucleotídeos fosfatados

DO: densidade óptica  
DP: desvio padrão  
Dr.: Doutor  
EC: European Commission  
EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético  
Elution buffer: Tampão de eluição  
et al.: e colaboradores  
EUA: Estados Unidos da América  
FAO: Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura  
g: grama  
h: hora  
HIV-1: vírus da imunodeficiência humana subtipo 1  
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
IMO: Instituto de Mercado Ecológico  
INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia  
IOM: Institute of Medicine  
IPEN: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares  
ISO: International Organization for Standardization  
ITS: internal transcribed spacer  
IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry  
kCal: quilocaloria  
keV: quiloelétron volt  
kg: quilograma  
LAN: Laboratório de Análise por Ativação Neutrônica  
LD: limite de detecção  
LQ: limite de quantificação  
m: metro  
mA: miliampere  
MA: Massachusetts  
Max: máximo  
MD: Maryland  
MEA: Ágar extrato de malte  
MG: Minas Gerais  
mg/kg: miligrama por quilograma

mg: miligrama  
Min: mínimo  
mL: mililitro  
mm: milímetro  
mM: milimolar  
MO: Missouri  
mV: milivolt  
ND: não detectado  
ng/mL: nanograma por microlitro  
ng: nanograma  
NJ: Nova Jersey  
nm: nanômetro  
n°: número  
NOEL: no observable effect level  
O: oeste  
P.A.: para análise  
PA: Pará  
PA A: amostra de amêndoa de castanhas provenientes do Pará  
PA C: amostra de casca de castanhas provenientes do Pará  
pb: pares de bases  
PDA: ágar batata dextrose  
pH: potencial hidrogeniônico  
pmol: picomol  
q.s.p.: quantidade suficiente para  
R\$: real  
RDC: Resolução da Diretoria Colegiada  
Rf: índice de retenção  
rpm: rotação por minuto  
RR: Roraima  
RO: Rondônia  
SIAGRO: Sistema de Agronegócios  
S: sul  
Se: selênio  
SP: São Paulo

spp.: espécie

t: tonelada

TAE: tris acetato EDTA

Tecpar: Instituto de Tecnologia do Paraná

TFA: ácido trifluoracético

™: Trademark

TN: Tennessee

TU: Teor de umidade

UFC/g: unidades formadoras de colônia por grama

US\$: dólar dos Estados Unidos

USDA: United States Department of Agriculture

UV: ultravioleta

v/v: volume para volume

WA: Washington

XIX: dezenove

XX: vinte

YES: Extrato de Levedura – Sacarose

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	27
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	29
<b>2.1 Castanha-do-Brasil</b> .....	30
<b>2.2 Propriedades nutricionais</b> .....	33
<b>2.3 Importância socioeconômica</b> .....	35
<b>2.4 Aspectos produtivos</b> .....	36
<b>2.5 Micobiota</b> .....	43
<b>2.6 Generalidades de <i>Aspergillus spp.</i></b> .....	43
<b>2.7 <i>Aspergillus</i> Seção <i>Flavi</i></b> .....	45
<b>2.8 Micotoxinas</b> .....	46
<b>2.9 Histórico das micotoxinas</b> .....	47
<b>2.10 Aflatoxinas</b> .....	49
<b>2.11 Ácido ciclopiazônico</b> .....	51
<b>3 PROPOSIÇÃO E OBJETIVOS</b> .....	53
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	56
<b>4.1 Área de estudo – caracterização geográfica</b> .....	57
4.1.1 Rio Branco – AC.....	58
4.1.2 Manicoré – AM.....	61
4.1.3 Laranjal do Jari – AP.....	65
4.1.4 Acará – PA .....	71
<b>4.2 Amostras</b> .....	74
<b>4.3 Teor de umidade (Tu) e atividade de água (Aa)</b> .....	76
<b>4.4 Isolamento da micobiota</b> .....	76
<b>4.5 Meios de cultura</b> .....	77
4.5.1 PDA.....	77
4.5.2 AFPA.....	77
4.5.3 MEA.....	78
4.5.4 Ágar Blakelee's.....	78
4.5.5 Ágar CZ.....	78
4.5.6 Ágar YES.....	78
4.5.7 Ágar Coco.....	79

<b>4.6 Determinação de micotoxinas</b> .....	79
4.6.1 Otimização dos métodos para detecção de micotoxinas.....	79
4.6.1.1 LQ e LD.....	79
4.6.1.2 Testes de recuperação de micotoxinas e repetibilidade.....	80
4.6.1.3 Curvas de calibração para aflatoxinas.....	81
4.6.1.4 Curva de calibração para ACP.....	81
4.6.2 Determinação de aflatoxinas em amostras de castanha-do-Brasil.....	81
4.6.3 Determinação de ACP em amostras de castanha-do-Brasil.....	82
4.6.4 Avaliação do potencial aflatoxigênico das cepas de <i>Aspergillus</i> .....	83
4.6.5 Avaliação do potencial toxigênico de ACP das cepas de <i>Aspergillus</i> .....	84
<b>4.7 Caracterização química de selênio nas amostras de castanha-do-Brasil</b> .....	85
4.7.1 Validação da metodologia.....	85
4.7.2 Preparação das amostras e padrões para irradiação.....	86
4.7.3 Medidas da atividade gama induzida.....	86
<b>4.8 Sequenciamento do DNA ribossomal (DNAr) das cepas isoladas</b> .....	86
4.8.1 Extração do DNAr das cepas fúngicas.....	87
4.8.2 Quantificação de DNA e cálculo de pureza das amostras.....	87
4.8.3 Reação de polimerase em cadeia (PCR).....	87
4.8.4 Eletroforese do produto de PCR.....	88
4.8.5 Purificação dos produtos de PCR.....	89
4.8.6 Quantificação da PCR purificada.....	89
4.8.7 Reação de sequenciamento dos produtos das PCR.....	89
4.8.8 Precipitação da reação de sequenciamento.....	90
4.8.9 Denaturação.....	90
4.8.10 Eletroforese capilar.....	90
<b>4.9 Estudo da termotolerância das cepas de <i>Aspergillus</i> Seção <i>Flavi</i></b> .....	91
<b>4.10 Avaliação da produção de ácido aspergílico</b> .....	91
<b>4.11 Capacidade de produção de esclerócios</b> .....	91
<b>5 RESULTADOS</b> .....	93
<b>5.1 Tu e Aa das amostras de amêndoas e cascas</b> .....	94
<b>5.2 Micobiota das amostras de amêndoas e cascas</b> .....	95
<b>5.3 Padronização das condições cromatográficas para aflatoxinas</b> .....	97
5.3.1 LD e LQ para aflatoxinas.....	97

5.3.2	Teste de recuperação para aflatoxinas.....	97
5.3.3	Curvas de calibração para aflatoxinas.....	97
5.3.4	Determinação de aflatoxinas em 400 amostras de amêndoas (200) e cascas (200) de castanhas-do-Brasil.....	99
5.3.5	Potencial aflatoxigênico das de cepas de <i>Aspergillus</i> isoladas.....	101
<b>5.4</b>	<b>Metodologia para pesquisa de ACP.....</b>	<b>102</b>
5.4.1	LD e LQ para ACP.....	102
5.4.2	Curvas de calibração para ACP.....	102
5.4.3	Teste de recuperação para ACP.....	102
5.4.4	Determinação de ACP nas amostras de castanha-do-Brasil.....	104
5.4.5	Potencial aflatoxigênico das cepas de <i>Aspergillus</i> .....	104
<b>5.5</b>	<b>Análise de selênio nas amostras de amêndoas.....</b>	<b>105</b>
<b>5.6</b>	<b>Identificação molecular das cepas de <i>Aspergillus</i> Seção <i>Flavi</i>.....</b>	<b>105</b>
<b>5.7</b>	<b>Estudo da termotolerância das cepas de <i>Aspergillus</i> Seção <i>Flavi</i>.....</b>	<b>108</b>
<b>5.8</b>	<b>Avaliação da produção de ácido aspergílico.....</b>	<b>108</b>
<b>5.9</b>	<b>Capacidade de produção de esclerócios.....</b>	<b>108</b>
<b>5.10</b>	<b><i>Aspergillus</i> Seção <i>Flavi</i> e potencial micotoxigênico.....</b>	<b>108</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>111</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>120</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>122</b>
	<b>APÊNDICES.....</b>	<b>141</b>
	<b>APÊNDICE A – Tabelas suplementares.....</b>	<b>141</b>
	<b>APÊNDICE B – Representações gráficas.....</b>	<b>179</b>
	<b>APÊNDICE C – Curvas de calibração para aflatoxinas.....</b>	<b>183</b>
	<b>APÊNDICE D – Curva de calibração para ACP.....</b>	<b>187</b>
	<b>APÊNDICE E - Trabalho publicado.....</b>	<b>188</b>
	<b>APÊNDICE F - Trabalho enviado.....</b>	<b>196</b>



Este trabalho de doutorado nasceu da ideia de se estudar a diversidade da micobiota em amostras de castanha-do-Brasil. Com essa finalidade, quatro estados brasileiros foram escolhidos pela importância econômica no que se refere à comercialização desse valioso produto. Sob orientação do professor Dr. Benedito Corrêa, o experimento foi delineado e um projeto foi escrito e encaminhado ao CNPq e, quando aprovado, iniciaram-se os trabalhos. Para mim foi um grande privilégio participar desta pesquisa como aluna de doutorado e mais ainda sendo orientada pelo professor Benedito, que é uma pessoa que sempre admirei, sendo para mim um exemplo de pessoa, professor e pesquisador. Meu desejo de trabalhar com pesquisa iniciou quando, após um estágio no Laboratório de Micotoxinas em Pirassununga, SP, em 1996, fui aceita como aluna de iniciação científica do CNPq, sob orientação do professor Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira, que me apresentou o mundo da pesquisa científica. Foram duas iniciações científicas pesquisando efeitos das aflatoxinas em aves e resíduos em ovos. Foi uma época repleta de desafios, mas muito compensadora, pois aprendi muito com um professor admirável que me passou seus conhecimentos sobre os pilares da organização, método e disciplina. Após esses inesquecíveis anos, iniciei o estágio obrigatório no Instituto Adolfo Lutz, onde fui recebida pela pesquisadora e professora Dra. Myrna Sabino que concordou em ser minha supervisora. Já graduada, continuei frequentando seu laboratório como estagiária voluntária e, depois, aluna da Fundap. Foi um período extremamente enriquecedor e gratificante, pois trabalhar com a Dra. Myrna foi conhecer mais do que uma excelente pesquisadora, um ser humano incrível. Em meados de 2000, foi publicada no edital de concursos a abertura de uma vaga de especialista para o Laboratório de Micotoxinas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Candidatei-me à vaga. Fiz prova e entrevista com os professores Benedito Corrêa, Jorge Timenetsky e Manoel dos Santos. Após algumas semanas, saiu o resultado e fui aprovada. A partir do dia 7 de agosto de 2000, iniciei minhas atividades como Especialista em Laboratório, sob a chefia imediata do prestigiado professor Benedito. Desde então, tenho o prazer de trabalhar com o que mais amo: ensino e pesquisa. Em 2009, após conversar com os professores Benedito e Carlos Taborda, e me comprometer a manter a qualidade do trabalho prestado, ingressei no programa de pós-graduação do Departamento de Microbiologia e iniciei um grande empreendimento que está apresentado na forma desta tese. Meu agradecimento especial a todos que participaram dessa história e contribuíram para que esse objetivo fosse alcançado.



## 2.1 Castanha-do-Brasil

A *Bertholletia excelsa* foi originalmente descrita, em 1807, por Humboldt e Bonpland. No entanto, foi Poiteau, em 1825, o primeiro a dar à Lecythidaceae o status de família, removendo os gêneros *Bertholletia*, *Couratari*, *Couroupita* e *Gustavia* da família Myrtaceae, em que eram tradicionalmente classificados (MORI; PRANCE, 1990). A castanheira do Brasil representa a única espécie do gênero *Bertholletia*, embora exista uma considerável variação no tamanho, forma e número de sementes por fruto (MORI; PRANCE, 1990).

A castanheira é uma espécie arbórea de grande porte, cujo caule, de casca escura, é liso e desprovido de ramos até a fronde. É uma espécie típica da floresta amazônica, ocorrendo naturalmente em florestas de terra-firme nos Estados do Pará, Maranhão, Amazonas, Acre, Rondônia e ao norte do Mato Grosso. Ocorre ainda nas florestas limítrofes com o Suriname, Peru, Bolívia, Guiana Francesa e Venezuela (LOUREIRO et al., 1979). As árvores frondosas (Figura 1) chegam a 50 metros de altura e 2 metros de diâmetro no tronco (CLAY; CLEMENT, 1993). Podem viver mais de 500 anos e, frequentemente, chegam a viver 1.000 (MAGNANINI; MAGNANINI, 2003) ou 1.600 anos (TAITSON, 2007).

As flores são grandes e alvas. Seus frutos, descritos por Serrano (2005) como pixídios imperfeitos, são denominados vulgarmente de ouriços e podem conter de 12 a 25 sementes cada (Figura 2).

A castanha-do-Brasil recebe diversos nomes: castanha-do-Pará, castanha-do-Maranhão, amendoeira-da-américa, porém a classificação dada pelo Ministério da Agricultura é castanha-do-Brasil. Brazil nut é a denominação para o mercado internacional.

**Figura 1** – Castanheira



**Figura 2** – Castanha-do-Brasil: ouriço, semente e amêndoa



As castanheiras são encontradas em grandes conjuntos (os castanhais) que florescem entre outubro a dezembro, começam a frutificar aos oito anos, porém, somente aos doze atingem a produção normal de até 5000 kg/árvore/ano de fruto (COGELS, 1972). A época de colheita é de janeiro a março (estação chuvosa), estendendo-se por 6 meses (SOARES; REALE, 1976). O tempo que decorre entre o início do desenvolvimento dos frutos e a maturação é de mais de 12 meses (SCHREIBER, 1950).

Para assegurar a produção, a castanheira depende da atividade de agentes polinizadores, selecionados pela morfologia da flor, capazes de abaixar a lígula para ter acesso ao néctar e ao pólen oferecidos pelas flores da castanheira (MORITZ, 1984). Os principais polinizadores são abelhas médias e grandes, principalmente as espécies *Xylocopa frontalis*, *Xylocopa aurulenta*, *Epicharis rustica*, *Epicaris affinis*, *Centris similis*, *Eulaema nigrita*, *Eulaema cingulata*, *Bombus brevivillus* e *Bombus transversalis* (MAUÉS, 2002). A disseminação das sementes é realizada por roedores, principalmente a cutia, sendo que algumas sementes são consumidas imediatamente, enquanto outras são armazenadas para posterior consumo ou abandonadas em outras áreas, onde germinam. Segundo Peres e Baider (1997), as sementes são dispersas a até 25 metros da árvore adulta e são enterradas individualmente a uma profundidade de 1 a 3 cm.

A semente apresenta rendimento médio de tegumento (casca) entre 48 a 57% e amêndoa, entre 43 a 52%. A amêndoa é composta por cerca de 60% de óleo, 14% de proteínas, 3,5% de fibras e 3,3% de cinzas. A torta, obtida após a extração do óleo, apresenta acima de 40% de proteína e contém todos os aminoácidos essenciais, possuindo, em média, 59 µg de selênio por amêndoa. As amêndoas de castanha-do-Brasil são consideradas uma excelente fonte nutritiva devido à alta concentração de proteínas, carboidratos, gorduras insaturadas, vitaminas e minerais essenciais (USDA, 2013).

O ouriço, após a retirada das sementes, pode ser usado na confecção de peças de artesanato (Figura 3) ou como combustível. A madeira da árvore, apesar de ser muito boa para forros, paredes e soalhos, tem sua utilização é proibida por lei ambiental que impede sua comercialização(Decreto n° 1282, de 19/10/1994) e, além disso, seus frutos possuem maior valor comercial do que sua madeira.

**Figura 3** – Vitrina de loja no Pará com embalagens com amêndoas e azeite de castanha e peças de artesanato feitas com ouriço e sementes de castanha-do-Brasil: porta-jóias, objetos de decoração e chaveiros



## 2.2 Propriedades nutricionais

A castanha-do-Brasil é altamente energética, contém quantidade expressiva de ácidos graxos poliinsaturados e proteína de boa qualidade biológica, além de fonte reconhecida de selênio, cálcio, fósforo, magnésio e vitaminas do complexo B (CARDARELLI; OLIVEIRA, 2000; SOUZA; MENEZES, 2004). O Quadro 1 mostra a composição da castanha-do-Brasil por 100g de parte comestível - cada amêndoa tem cerca de 5 g. A castanha-do-Brasil é considerada uma boa fonte nutricional no enriquecimento e produção de alimentos como forma alternativa para alimentação da população local, em função da disponibilidade regional (CARDARELLI; OLIVEIRA, 2000; GLÓRIA; REGITANO-D'ARCE, 2000).

**Quadro 1** – Composição média da castanha-do-Brasil por 100g de parte comestível

Umidade	3,5%
Energia	643 kCal
Proteína	14,5g
Lipídeos	63,5g
Carboidrato	15,1g
Fibra alimentar	7,9g
Cinzas	3,4g
Cálcio	146mg
Magnésio	365 mg
Ácidos graxos saturados	15,3g
Ácidos graxos monoinsaturados	27,4 g
Ácidos graxos poli-insaturados	21,0g

Fonte: TACO, 2011

A castanha-do-Brasil é mais rica em selênio (Se) do que outras nozes. Vários autores (ANDRADE et al., 1999; BARCLAY, 1995; BOWEN, 1966; VONDERHEIDE et al., 2002) e o USDA (2013) reportam a castanha-do-Brasil como o alimento mais rico nesse mineral. O Se está envolvido no metabolismo da tireóide, tendo um importante papel como antioxidante. A prevenção de câncer é apontada como sua mais marcante característica, sendo o Se utilizado como quimiopreventivo, reduzindo a morbidade e mortalidade por câncer em indivíduos suplementados por esse elemento. A literatura médica mostra que baixos níveis de Se, encontrado no plasma, não causam câncer, porém sua diminuição, aparentemente, aumenta a susceptibilidade ao desenvolvimento de neoplasias dada a exposição a um carcinógeno (CLARK, 1985), ou reduz a habilidade do organismo em resistir ao estresse dos causadores de cânceres (CHU et al., 1984; YU et al., 1985). Baum et al. (1997) demonstraram que a deficiência em Se foi profundamente associada à diminuição da sobrevivência de pacientes portadores de HIV-1. Dessa forma, o consumo de castanha-do-Brasil tem sido relacionado com atividades antienvhecimento e recomendado a atletas, idosos, crianças e pessoas que buscam uma vida saudável (COUTINHO et al., 2002).

A dose de Se permitida é de 55 µg por dia, para pessoas a partir dos 14 anos de idade, sendo o limite de ingestão tolerável diária de 400 µg (IOM, 2000). Em altas doses o Se é tóxico. Em 1961, em uma província chinesa de 248 habitantes, 82,5% ficaram severamente afetados e 50% vieram a óbito, depois de uma intoxicação endêmica por Se no solo da região, o qual foi absorvido pelos vegetais que foram consumidos pelas pessoas. Estudos revelaram que a quantidade média de Se consumida por habitante foi de 5000 µg (YANG et al., 1983).

Dentre os sintomas de intoxicação por selênio estão queda de cabelos e unhas, descoloração da pele, perdas dentárias, hiperreflexia de tendões, torpor, hemiplegia, convulsões e paralisias (YANG et al., 1983).

### **2.3 Importância socioeconômica**

Na Amazônia, grande parte da população depende do extrativismo e comercialização dos produtos da mata para conseguir seu próprio sustento. Porém, a opulência da floresta contrasta com a pobreza dessa população, que vive em situação de extrema penúria.

O povoamento da região se intensificou no final do século XIX, devido à migração de nordestinos que fugiam da seca e buscavam a Amazônia para trabalhar como seringueiros. Com o fim do ciclo da borracha, muitos trabalhadores continuaram na região e passaram a tirar seu sustento dos castanhais.

No século XX, a partir da década de 70, instalaram-se na Amazônia megaprojetos, sendo o maior exemplo o Projeto Jari, iniciado em 1967, quando um empresário norte-americano comprou 1,6 milhões de hectares dos Estados do Pará e Amapá, com a finalidade de implementar a criação extensiva de búfalos e produção de celulose. Além do imenso impacto gerado na estrutura da região, houve grandes danos ambientais com a derrubada da floresta nativa e o plantio de eucaliptos.

Muitas vezes, a figura do atravessador empenha um importante papel para sustentar essa condição de miséria das famílias e dos trabalhadores que vivem coleta da castanha-do-Brasil. O processo inicia quando o atravessador fornece aos castanheiros mantimentos e utensílios para realização do seu trabalho. Depois, esse mesmo atravessador compra a produção a preços ínfimos e, cobra muito caro pelas mercadorias que fornece. Com isso, o extrativista entra num círculo vicioso de dívidas, gerando uma espécie de “escravidão” (NELSON; FUJIWARA, 2002).

A fim de romper esse ciclo de dependência, tem sido criada uma nova lógica de produção na região Amazônica, que visa ofertar infraestrutura para que o castanheiro agregue valor ao seu produto: as cooperativas.

O elemento fundamental dessas cooperativas é a garantia de um suporte aos castanheiros. Os castanheiros vendem seus produtos para cooperativa que tratam do beneficiamento da castanha, produzem derivados (biscoitos, farinha, óleo) e vendem seus produtos e promovem junto aos trabalhadores uma justa distribuição dos excedentes (NELSON; FUJIWARA, 2002).

## 2.4 Aspectos produtivos da castanha-do-Brasil

A produção e extração de castanhas-do-Brasil ocorrem somente no bioma amazônico (FREITAS-SILVA; VENANCIO, 2011). A região da Amazônia brasileira é dividida em regiões leste e oeste. A região oeste compreende parte do Amazonas (começando em Manaus em direção ao oeste), o Acre e o Amapá. A região leste é composta pelos estados do Pará, Amapá, parte do norte do Maranhão e a parte leste do Amazonas (começando em Manaus para direção leste) (Lei nº 1.806 de 06.01.1953).

Segundo Tonini (2007), as florestas com castanheiras cobrem uma superfície de aproximadamente 325 milhões de hectares na Amazônia, com a maior parte distribuída entre o Brasil (300 milhões), a Bolívia (10 milhões) e o Peru (2,5 milhões).

Por séculos, o Brasil dominou o mercado, de tal modo que o produto ainda tem o nome do país. Em 2010, 77% de toda castanha-do-Brasil consumida no mundo foi processada e exportada pela Bolívia (FAO, 2013), um país com muito menos recursos e menor capacidade econômica que seu vizinho a leste (COSLOVSKY, 2014).

A história da indústria da castanha-do-Brasil pode ser dividida em três fases. A primeira fase estende-se desde os tempos coloniais até o início dos anos 1970, nesse período o Brasil manteve o monopólio de processamento e exportação da castanha-do-Brasil (HOMMA; MENEZES, 2008). A segunda fase vai desde início dos anos 1970 até a década de 1990, período no qual as indústrias brasileira e boliviana seguiram trajetórias opostas. No Brasil, o governo federal adotou uma série de políticas que provocaram o desmatamento nas regiões altamente produtoras de castanha-do-Brasil. Essas políticas incluíram construção de projetos de infraestrutura, como estradas, barragens, operações de mineração, a concessão de crédito subsidiado para a pecuária e desapropriação de terras para reforma agrária (BUNKER, 1982; BUNKER et al., 2002; EMMI, 1988). Por conta dessas intervenções, em meados da década de 1980, a área antigamente conhecida como "o polígono dos castanhais" pela riqueza de seus bosques havia se tornado "o cemitério dos castanhais" com inúmeros troncos carbonizados cobrindo a paisagem (HOMMA, 2004). Por outro lado, na Bolívia, as condições de negócios evoluíram de forma bastante diferente. Em 1985, o governo boliviano embarcou em um ambicioso programa de reformas econômicas com a estatal Empresa Nacional de la Castaña (ENACA), uma empresa de processamento de castanha-do-Brasil (ASSIES, 1997; FUNDES, 2003). Com o encerramento das atividades da ENACA, alguns de seus ex-funcionários usaram o conhecimento adquirido e iniciaram a comercialização da castanha. Devido a esse panorama, em 1998, a Bolívia contava com cerca de 20 processadores e

exportadores de castanha-do-Brasil (ASSIES, 1997; FUNDES, 2003; KAIMOWITZ; BOJANIC, 1998). A participação da Bolívia nos mercados dos EUA e da União Europeia era de 43,8%, aproximadamente igual à referida participação do Brasil (Comissão Europeia, 2013; FAO, 2013). Após esse período, iniciou-se a terceira fase de produção, quando autoridades europeias impuseram rígidos padrões sanitários sobre uma gama de produtos alimentares importados, incluindo níveis máximos de tolerância permitidos de aflatoxinas em castanhas-do-Brasil. Nesse momento, os produtores brasileiros sofreram consideráveis perdas, mas seus concorrentes bolivianos foram capazes de realizar melhorias necessárias para o sucesso competitivo (COSLOVSKY, 2014).

Com a falta de investimento do governo brasileiro para reverter essa problemática, testes para pesquisa de aflatoxinas demoravam muito tempo para serem realizados e não eram conduzidos de acordo com os padrões internacionais. Além disso, constatou-se falha de comunicação entre as autoridades aduaneiras e sanitárias, que não checaram a saída de embarcação com lote de castanha-do-Brasil contendo aflatoxinas acima dos limites toleráveis pela União Europeia. A partir desse fato, a importação de castanhas provenientes do Brasil começou a ser paulatinamente rejeitada e, em julho de 2003, esse produto foi considerado de baixa qualidade o que levou ao reforço das exigências de castanhas brasileiras (Decisão da Comissão 2004/493/CE). Somente em maio de 2004, através do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o Brasil reconquistou a licença para exportar castanhas-do-Brasil para União Europeia, entretanto, essa situação maculou a imagem do mercado brasileiro.

Atualmente, o extrativismo de castanha no Brasil se caracteriza pela alta concentração de produção em alguns Estados, sendo que o Acre, o Amazonas e o Pará detentores de 80,7% da produção, os demais Estados (Amapá, Mato Grosso, Rondônia e Roraima) totalizam os 19,3% restantes (TONINI, 2007).

A castanha é um dos produtos não madeireiros mais importantes da economia florestal da Amazônia, após a decadência da borracha. Trata-se da única semente comercializada internacionalmente, cuja coleta é feita com exclusividade em áreas de florestas naturais (CLAY, 1997). Segundo o IBGE (2010), a castanha é o segundo produto florestal não madeireiro em termos comerciais na região norte do Brasil (Quadro 2), perdendo somente para o fruto de açaí (*Euterpe oleracea*).

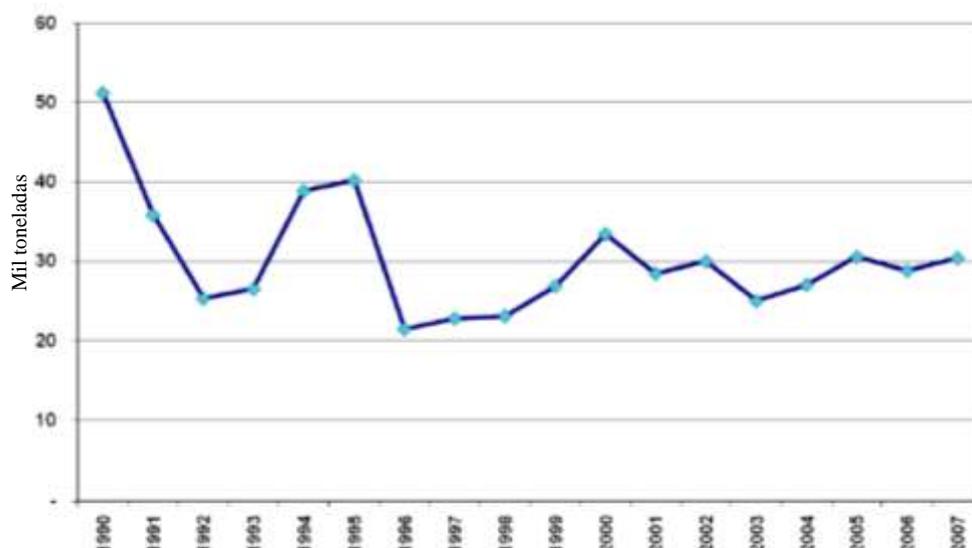
**Quadro 2** - Quantidade extraída e valor em reais da castanha-do-Brasil no ano de 2011

	Quantidade (toneladas)	Valor (x 1000 R\$)
<b>Brasil</b>	<b>42.152</b>	<b>69.404</b>
<b>Norte</b>	<b>39.917</b>	<b>65.159</b>
Acre	14.035	19.329
Amazonas	14.661	25.531
Amapá	401	375
Pará	7.192	12.574
Rondônia	3.523	7.282
Roraima	105	68
<b>Centro-oeste</b>	<b>2.234</b>	<b>4.245</b>
Mato Grosso	2.234	4.245

Fonte: IBGE, 2011

Na última avaliação, a produção brasileira tem mantido, desde 2000, cerca de 30 mil toneladas/ano. A possível contaminação por micotoxinas, que diminui a qualidade do produto, pode ser um fator de desestímulo para a comercialização do mesmo (Figura 4).

**Figura 4** - Evolução da produção de castanha-do-Brasil de 1990 a 2007



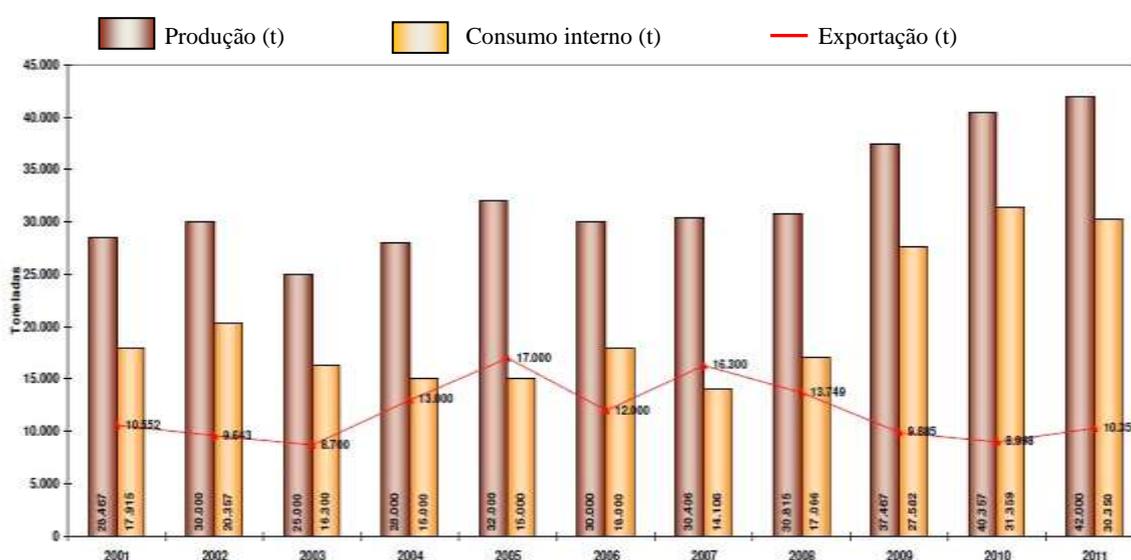
Fonte: IBGE, 2009.

No que se refere à comercialização da castanha-do-Brasil, a produção brasileira obedece dois fluxos: consumo interno e exportação (Figura 5). Essa relação tem-se alterado na proporção de 25 a 30% para a exportação, e 70 a 75% para o consumo interno. No caso das

exportações, pode-se destacar, como principal destino a Bolívia, com o produto “in natura”, seguido dos Estados Unidos (CONAB, 2012).

Nos quatro primeiros meses de 2012, o volume total das exportações de castanha-do-Brasil atingiu 4.940 toneladas, gerando uma receita de US\$ 6,5 milhões, valor 65,6% superior ao observado no mesmo período de 2011. A elevação na receita com a exportação do produto é reflexo de uma melhora nos preços internacionais, principalmente dos compradores europeus e norte-americanos, pois são os que melhor remuneram o produto (CONAB, 2012).

**Figura 5** - Movimentação da produção, do consumo interno e da exportação da castanha-do-Brasil de 2001 a 2011



Fonte: IBGE, 2009

Atualmente, o Brasil é o segundo país exportador de castanha-do-Brasil. Desde a década de 1990, a Bolívia é o principal produtor mundial de castanha (BOJANIC, 2001), sendo atualmente o primeiro produto florestal exportado em importância econômica desse país. A Bolívia domina o mercado da castanha-do-Brasil tanto em exportação, quanto qualidade sanitária e tecnologia empregada, além de ter valor agregado, pois 97% do faturamento da indústria da castanha boliviana provêm da castanha processada, enquanto somente 45% do faturamento brasileiro advem desse produto (COSLOVSKY, 2005).

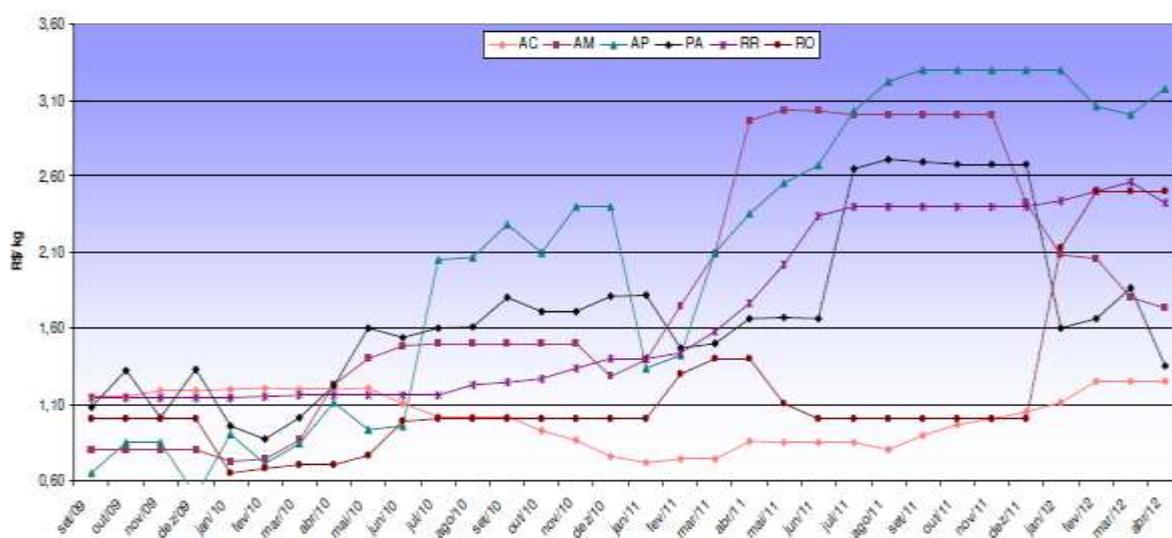
Além da importância do comércio externo, a comercialização da castanha dentro do país é uma importante fonte de renda para milhares de agricultores, seringueiros e povos indígenas que vivem na Amazônia.

As ações governamentais de apoio à produção extrativista têm gerado resultados muito positivos, uma vez que a organização dos núcleos em cooperativas e organizações de classe

tem dado maior poder de negociação. Essas ações fizeram com que o preço médio pago aos produtores se elevasse nos últimos onze anos, praticamente em 460%, passando de uma média de R\$0,35/kg em 2000, para os atuais R\$ 2,05/kg em 2012 (CONAB, 2012).

Um ponto de destaque da comercialização desse produto é a grande sazonalidade dos preços em que são comercializados, como pode ser observado na Figura 6.

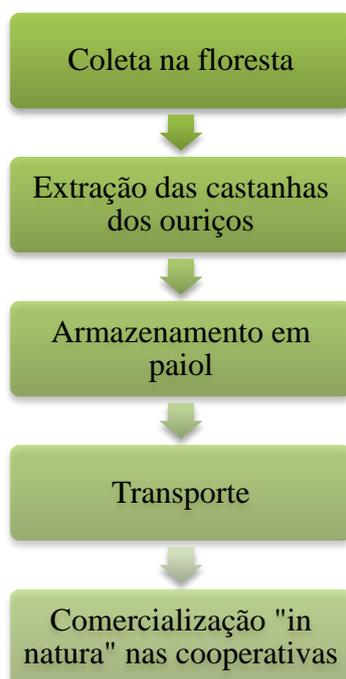
**Figura 6** - Valor recebido pelos produtores de castanha-do-Brasil nos Estados do Acre (AC), Amazonas (AM), Amapá (AP), Pará (PA), Roraima (RR) e Rondônia (RO)



Fonte: CONAB, 2012.

A cadeia produtiva da castanha (Figura 7) caracteriza-se por aspectos peculiares que não estão presentes em outras culturas comumente estudadas, dentre esses aspectos estão o fato de se tratar de um produto do extrativismo realizado pelo povo que habita as proximidades dos castanhais.

**Figura 7** - Cadeia produtiva da castanha-do-Brasil da coleta na floresta às cooperativas

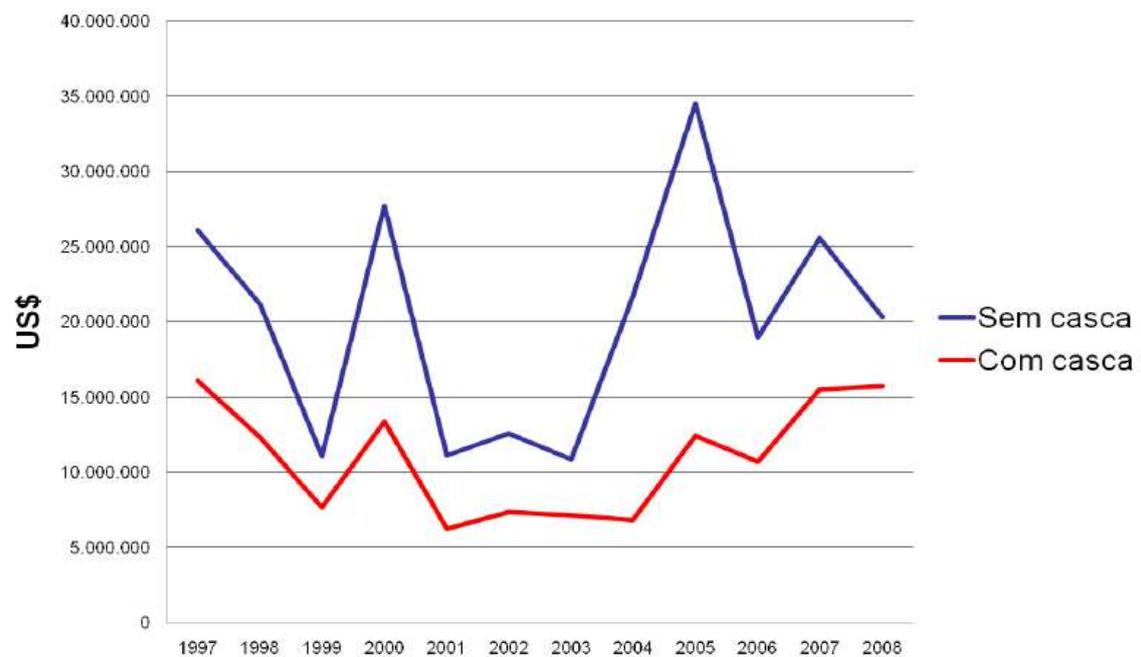


Nas cooperativas ocorre o beneficiamento da castanha, até o produto final para comercialização no mercado interno e externo (Figura 8). As cooperativas têm um importante papel na valorização da castanha, pois o produto vendido sem casca agrega valor principalmente para exportação (Figura 9). Nota-se que durante o beneficiamento ocorre uma etapa de autoclavagem. Nesta etapa, as castanhas “in natura” são colocadas em forno, onde são aquecidas e rapidamente esfriadas, neste momento as cascas se desprendem das amêndoas, facilitando o descascamento.

**Figura 8** – Fluxograma do beneficiamento da castanha-do-Brasil nas cooperativas



**Figura 9** – Evolução do preço (US\$) de exportação da castanha com e sem casca



Fonte: IBGE, 2009

## 2.5 Micobiota

A partir do momento em que o homem primitivo começou a estocar alimentos, os micro-organismos deteriorantes exigiram seu tributo (PITT; HOCKING, 2009).

Os micro-organismos estão presentes ubiquamente em todo ecossistema terrestre de onde são disseminados e podem contaminar as plantas. Desta forma, as sementes são contaminadas por uma ampla gama de bactérias, leveduras e fungos filamentosos através do ar, insetos e chuvas. Assim, quando as sementes ou cereais são colhidos carregam consigo esses contaminantes (MAGAN; ALDRED, 2004).

No armazenamento de grãos e sementes, as condições são mais estáveis e controladas do que no campo, essas circunstâncias oferecem um bom nicho ecológico para os fungos (MAGAN; ALDRED, 2004). O número de espécies fúngicas que podem colonizar sementes e grãos estocados é muito amplo. Os fungos normalmente encontrados nos alimentos armazenados são os que podem germinar a baixos níveis de atividade de água. Por outro lado, a capacidade de germinar rapidamente pode ser uma vantagem na competição efetiva com outros fungos por nutrientes (MAGAN; ALDRED, 2004).

A contaminação fúngica em castanhas-do-Brasil tem sido estudada desde o século passado (BITANCOURT, 1941; CASTRILLON; PURCHIO, 1988; SPENCER, 1921). Sabe-se que as castanhas necessitam de cuidados, pois são susceptíveis a injúrias, infestação por insetos e contaminação por fungos, podendo acumular micotoxinas (CLAY; CLEMENT, 1993).

## 2.6 Generalidades de *Aspergillus* spp.

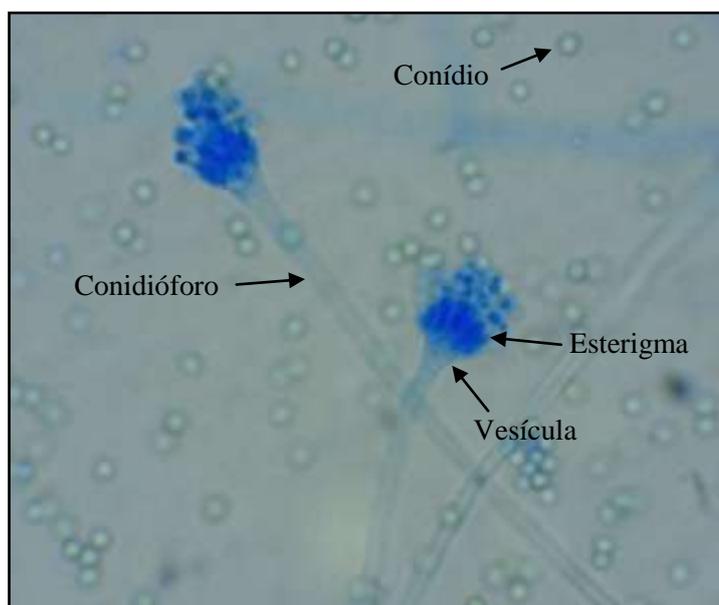
O gênero *Aspergillus* Link foi descrito inicialmente pelo botânico italiano Pier Antonio Micheli, em 1729, que descreveu 1900 plantas e 900 fungos. Neste estudo, a visualização microscópica das estruturas produtoras de esporos das espécies de *Aspergillus*, foi associada a um objeto usado pela igreja católica para borrifar água benta durante uma parte da liturgia, chamado aspérgilo (AINSWORTH, 1976), através dessa observação atribuiu-se o nome *Aspergillus* a esse gênero fúngico. Após cerca de 100 anos, o gênero foi validado por Link (1809). Atualmente, o gênero *Aspergillus* pertence ao filo *Ascomycota*, ordem *Eurotiales*, família *Trichocomaceae*, tendo a descrição mais completa realizada por Raper e Fennell (1965), que reconheceram 132 espécies. Neste tratado, o gênero *Aspergillus*

foi descrito em relação aos aspectos morfológicos e às formas sexuadas (teleomorfo) e assexuadas (anamorfo).

Atualmente, o gênero *Aspergillus* é constituído por aproximadamente 260 (GEISER et al., 2007; SAMSON; VARGA, 2009) a 837 espécies (HAWKSWORTH, 2011), divididas em 7 subgêneros (*Aspergillus*, *Circumdati*, *Fumigati*, *Flavipedes*, *Nidulantes*, *Clavati* e *Ornati*). Cada subgênero é dividido em seções e cada seção compreende um conjunto de espécies correlacionadas.

As espécies de *Aspergillus* encontram-se entre os fungos mais abundantes em todo o mundo, sendo relativamente pouco exigentes em relação aos fatores abióticos de crescimento. Por exemplo, eles podem crescer em uma vasta gama de temperaturas (6-55 °C) e em ambientes com umidade baixa, sendo que algumas espécies de *Aspergillus* requerem atividade de água mínima para crescimento de 0,71 (LACEY, 1989). *Aspergillus* são caracterizados pelo desenvolvimento de colônias coloridas e brilhantes e por produzir conídios em cabeças típicas, do tipo “mop-like” ou escovão (Figura 9) (PITT; HOCKING, 2009).

**Figura 10** – Fotomicrografia óptica de *Aspergillus* spp.  
(Coloração: lactofenol azul algodão; 400 x)



A taxonomia de *Aspergillus* está em constante transição e ainda não há consenso sobre a definição dos táxons dentro dos grupos. Há várias discussões a respeito de quais ferramentas moleculares seriam mais indicadas para a caracterização destes fungos, uma vez que a identificação das espécies é difícil, devido às variações e sobreposição de características

morfológicas e bioquímicas dos isolados. O sequenciamento da região ITS (Internal Transcribed Spacer) do DNA ribossomal é recomendado para a identificação de espécies do gênero *Aspergillus* (SAMSON et al., 2006), porém tem sido indicado o sequenciamento de mais de um gene com o propósito de aumentar a confiabilidade dos resultados. Sendo assim, além da região ITS, o sequenciamento dos genes de  $\beta$ -tubulina (GLASS; DONALDSON, 1995) e calmodulina (CARBONE; KOHN, 1999) têm sido usados. Com isso, o estudo de sequências de DNA pode fornecer informações importantes para a definição das espécies e sua identificação apropriada (HINRIKSON et al., 2005).

## 2.7 *Aspergillus* Seção *Flavi*

*Aspergillus* Seção *Flavi* historicamente inclui espécies com conídios e cabeças em tons de verde-amarelo ao marrom e esclerócios negros. Esta seção alberga 20 espécies teleomórficas e 5 anamórficas (GONÇALVES, S.S. et al., 2012; HEDAYATI et al., 2007; PILDAIN et al., 2008). Os isolados das conhecidas “espécies domesticadas”, tais como *A. oryzae*, *A. sojae* e *A. tamarrii* são utilizados em processos de fermentação na culinária (CAMPBELL-PLATT; COOK, 1989). Espécies de *A. oryzae* geneticamente modificadas são utilizadas para a produção de enzimas incluindo lactase, pectina esterase, lipase, protease e xilanase (PARIZA; JOHNSON, 2001).

Outras espécies desse grupo têm recebido considerável atenção devido à sua habilidade para produzir aflatoxinas: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius*.

A descrição das espécies de *Aspergillus* Seção *Flavi* é baseada principalmente em métodos tradicionais (parâmetros morfológicos, incluindo o diâmetro da colônia, cor e relevo, tamanho e textura de conídios e estrutura conidióforos (KLICH, 2002). Microscopicamente, os conidióforos de *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* surgem a partir de hifas vegetativas septadas. As fiálides podem surgir diretamente de uma vesícula globosa (condição unisseriada) ou a partir da métula que envolve a superfície da vesícula (condição bisseriada). A vesícula, a métula quando presente, as fiálides, e as cadeias de conídios compreendem a cabeça conidial, que no *A. parasiticus*, é predominantemente unisseriada, enquanto no *A. flavus*, a seriação é mais variável (KOKALIS-BURELLE et al., 1997). Os conídios de *A. flavus* e *A. nomius* têm paredes delgadas, lisas ou levemente rugosas, são esféricos a elipsoidais com vesículas maiores que 50  $\mu\text{m}$ , com métulas presentes. Já os conídios de *A.*

*parasiticus* são rugosos, com paredes espessas, esféricos, e suas vesículas não ultrapassam 30 µm, e métulas são incomuns (PITT; HOCKING, 2009).

Outra característica estudada na morfologia das espécies de *Aspergillus* Seção *Flavi* é a capacidade de produção de esclerócios, que são estruturas que servem como propágulos infectantes no solo (ASTORECA et al., 2011). Segundo Kozakiewicz (1994), a produção de esclerócio é uma característica encontrada em algumas espécies de *A. flavus*. Quando produzido, o tamanho do esclerócio divide *A. flavus* em dois fenótipos: cepas S (small) que produzem numerosos pequenos esclerócios (< 400 µm de diâmetro) e cepas L (large) que produzem, em menor quantidade, esclerócios maiores (> 400 µm de diâmetro) (NOVAS; CABRAL, 2002). Muitos estudos correlacionam a produção de esclerócios com a produção de aflatoxinas (COTTY; CARDWELL, 1999; EGEL et al., 1994; MAGGON et al., 1969; SANCHIS et al., 1984; VOGEL et al., 1965) Alguns autores encontraram que cepas L podem produzir ou não aflatoxinas B (EGEL et al., 1994) e as cepas S produzem aflatoxinas B ou aflatoxinas B e G (BARROS et al., 2006; COTTY; CARDWELL, 1999; EGEL et al., 1984).

Apesar da importância dos caracteres clássicos, a diferenciação entre espécies pode ser difícil devido à extensa divergência morfológicas resultantes de um alto nível de variabilidade genética (KUMEDA; ASAO, 1996). Sendo assim, a taxonomia deste grupo de fungos é altamente complexa. Dados recentes indicam que várias espécies atribuídas a Seção *Flavi* não podem ser distinguidos com base somente em características morfológicas (FRISVAD et al., 2005; PILDAIN et al., 2008). Para diferenciá-las, ferramentas moleculares têm sido estudadas para classificar espécies dessa seção (GODET; MUNAUT, 2010).

## 2.8 Micotoxinas

Micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por espécies fúngicas filamentosas que contaminam alimentos no campo, no armazenamento ou após o processamento (MOSS, 1989). Elas englobam uma considerável variedade de compostos com baixo peso molecular com diversas estruturas químicas e atividades biológicas. Algumas micotoxinas são tóxicas para plantas ou micro-organismos, porém esses compostos não são classificados como antibióticos de origem fúngica (CHU; BHATNAGAR, 2004). Como a maioria dos metabólitos secundários microbianos, os benefícios para os próprios fungos que os produzem ainda não foram esclarecidos.

As ações das micotoxinas no organismo humano e animal são chamadas de micotoxicoses. As micotoxicoses são exemplos de "envenenamento por meios naturais" e,

portanto, são análogas às patologias causadas por exposição a pesticidas ou resíduos de metais pesados. Os sintomas de uma micotoxicose dependem do tipo de micotoxina, quantidade e duração da exposição, a idade, saúde e sexo do indivíduo exposto, e muitas outras características mal compreendidas que envolvem genética, estado dietético, além de interações com outras micotoxinas (BENNETT; KLICH, 2003). Sabe-se que, os quadros de intoxicação por micotoxinas podem ser agravados por fatores como a deficiência de vitamina A, privação calórica, abuso de álcool e status de doença infecciosa. Por sua vez, as micotoxicoses podem aumentar vulnerabilidade a doenças microbianas, exacerbando os efeitos da desnutrição e podem interagir em sinergia com outras toxinas.

Devido às suas diversas estruturas químicas, as micotoxinas podem causar um grande número de efeitos biológicos, como carcinogenicidade, mutagenicidade/teratogenicidade e imunotoxicidade (BHATNAGAR et al., 2002; CHU, 1998; WOGAN, 1992).

As micotoxinas são responsáveis por perdas de milhões de dólares anuais, incluindo gastos com saúde humana, animal e produtos agrícolas condenados (HUSSEIN; BRASEL, 2001). Os principais substratos suscetíveis à contaminação por micotoxinas, especialmente aflatoxinas, incluem o amendoim, milho, semente de algodão e castanha-do-Brasil (AMORIM et al., 2000; ARRUS et al., 2005; BAQUIÃO et al., 2012; ELTAWILA et al., 2013; JELINEK, 1987; STEINER et al., 1992).

## **2.9 Histórico das micotoxinas**

Embora as micotoxicoses sejam bem estudadas atualmente, a identificação da micotoxina específica como agente causal das enfermidades não é bem conhecida na maioria dos incidentes (BHATNAGAR et al., 2002).

Pelo menos uma das dez pragas do Egito registradas em Êxodo (430 anos A.C.) estaria associada com contaminação de micotoxinas em alimentos (MARR; MALLOY, 1996). Na idade média, centeio infectado por *Claviceps purpurea*, afligiu grande parte da população europeia, quando o ergotismo era chamado de “fogo sagrado” ou “fogo de Santo Antonio” pela sensação de queimação e subsequente necrose ocasionada pelas propriedades vasoconstritoras da ergotamina. Acreditava-se que uma peregrinação ao santuário de Santo Antonio traria alívio e cura aos enfermos (VAN DONGEN; DE GROOT, 1995). Muitos peregrinos obtiveram recuperações milagrosas, mas nada pode ser afirmado se foi em decorrência do poder da oração ou da mudança de alimentação (MATOSSIAN, 1989).

Nos séculos XIX e XX, o beribéri cardíaco agudo, foi uma doença que acometeu o Japão e outros países asiáticos, esta enfermidade caracterizada por palpitações, náuseas, vômitos, dificuldade respiratória, posterior falência respiratória (UENO, 1974) foi causada pelo consumo de arroz contendo citoveridina produzida por *Eupenicillium ochrosalmoneum* (WICKLOW et al., 1988).

A estaquibotriotoxicose causou a morte de dezenas de milhares de equinos na Rússia entre 1930-1940. O consumo de feno contaminado por *Stachibotrys* spp., produtor de tricotecenos, pode causar manifestação neurológica aguda, como tremor, incoordenação, leucopenia e hemorragia (MOREAU, 1979).

Também na Rússia, durante a primeira metade do século XX, uma doença conhecida como aleucia tóxica alimentar (ATA) matou cerca de 100 mil pessoas entre 1942 e 1948 (JOFFE, 1978). O quadro de diarreia, vômito, dor abdominal, seguido de hemorragias na pele, cavidade oral, seguida de lesões necróticas é atribuído pelo consumo de grãos contaminados por tricotecenos, principalmente a toxina T-2, produzidos por *Fusarium poae* e *Fusarium sporotrichoides*.

Nefropatias causadas por ocratoxinas foram relatadas nos Bálcãs (TANCHEV; DOROSSIEV, 1991). Esta toxina é produzida por *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium verrucosum* e ocorre na cevada e em grãos verdes de café.

Recentemente, a população tem-se preocupado com a zearalenona, pois pode estar relacionada à puberdade prematura em crianças de 7 a 8 anos de idade (PAINTER, 1997). A zearalenona que é um composto estrogênico produzido por *Fusarium graminearum* e por outras espécies de *Fusarium*, que podem contaminar de trigo. Essa micotoxina é frequentemente associada a efeitos de hiperestrogenismo em suínos.

Historicamente, a associação entre consumo de milho mofado e altos níveis de câncer esofágico em regiões da África do Sul (MARASAS, 1993, 1996) e na China (LI et al., 1980; YANG, 1980) é bem conhecida. Isso é devido à produção de fumonisinas por espécies de *Fusarium*, principalmente *F. verticillioides*. Esta micotoxina, mundialmente encontrada em milho, causa leucoencefalomalácia em equinos (KELLERMAN et al., 1990; MARASAS et al., 1988), edema pulmonar em suínos (COLVIN; HARRISON, 1992), hepato e nefrotoxicidade em ratos (GELDERBLOM et al., 1988), camundongos (SHARMA et al., 1997) e coelhos (GUMPRECHT et al., 1998).

No início dos anos de 1960, as micotoxinas ganharam destaque, quando uma misteriosa doença matou aproximadamente 100.000 perus jovens na Inglaterra, essa síndrome foi denominada doença “X” dos perus (turkey “X” disease). As aves morriam geralmente dentro

de uma semana sendo com os seguintes sintomas: perda de apetite, diminuição da mobilidade, fraqueza das asas, das pernas e, no exame pós-morte, observou-se lesões necróticas no fígado. Não tendo sido possível identificar nenhum agente infeccioso, os autores suspeitaram que ela pudesse ser de origem nutricional, pois mudando a alimentação, muitas vezes cessava a mortalidade. Sendo assim, aventou-se que esse fato ocorreu após os animais consumirem ração suplementada com torta de amendoim importada do Brasil (BLOUNT, 1960, 1961). A hipótese foi confirmada por investigações intensas que levaram à descoberta das aflatoxinas como agente etiológico desse surto (BLOUNT, 1960, 1961; SARGEANT et al., 1961). Esse episódio associado à subsequente descoberta da carcinogenicidade das aflatoxinas em ratos e a ocorrência de hepatomas em trutas arco-íris deu à descoberta um maior significado. A partir de então, nasceu a ciência moderna da micotoxicologia (COLE, 1986).

Em uma leitura cuidadosa da publicação original nota-se que a descrição da doença “X” dos perus não é condizente, na sua totalidade, com o quadro de aflatoxicose. Alguns sinais reportados por Blount (1960, 1961) e Siller e Ostler (1961) podem ser atribuídos à outra micotoxina frequentemente produzida por algumas espécies de *A. flavus*. Esta micotoxina é um ácido indol-tetrâmico, nomeado como ácido ciclopiazônico (ACP) (HUSSEIN; BRASEL, 2001). O ACP foi descoberto por ser produzido por *Penicillium cyclopium*. Desta forma, no episódio da doença “X” dos perus, os quadros de enterite hemorrágica, cabeça arqueada para trás, pernas estiradas são atribuídos a co-contaminação por ACP (COLE, 1986).

## 2.10 Aflatoxinas

As aflatoxinas são um grupo estreitamente relacionado e amplamente estudado produzidas por uma variedade de diferentes espécies de *Aspergillus*, mas ainda não encontradas fora do gênero *Aspergillus*. As aflatoxinas foram encontradas em 3 grupos filogeneticamente diferentes: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. parvisclerotigenus*, *A. nomius*, *A. bombycis* e *A. pseudotamarii* na seção *Flavi*, *A. ochraceoroseus* e *A. rambellii* na seção *Ochraceorosei* e *Emericellaastellata* e *E. venezuelensis* na seção *Nidulantes* (FRISVAD et al., 2005).

Em virtude de sua capacidade de ligação ao DNA das células, esses metabólitos são carcinógenos naturais que afetam animais e humanos (BEDARD; MASSEY, 2006). Dentre estes, as aflatoxinas mais comumente estudadas são as aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), aflatoxina B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), aflatoxina G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>) e aflatoxina G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>), que receberam estas denominações, pois emitem fluorescências azuis e verdes ("blue" e "green", respectivamente) sob luz

ultravioleta (ALLCROFT et al., 1966; DE IONGH et al., 1964). A estrutura química das aflatoxinas é formada por um núcleo cumarínico fundido a um anel bifurano e um anel pentanona (AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub>) ou 6-lactona (AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>) (APPLEBAUM et al., 1982).

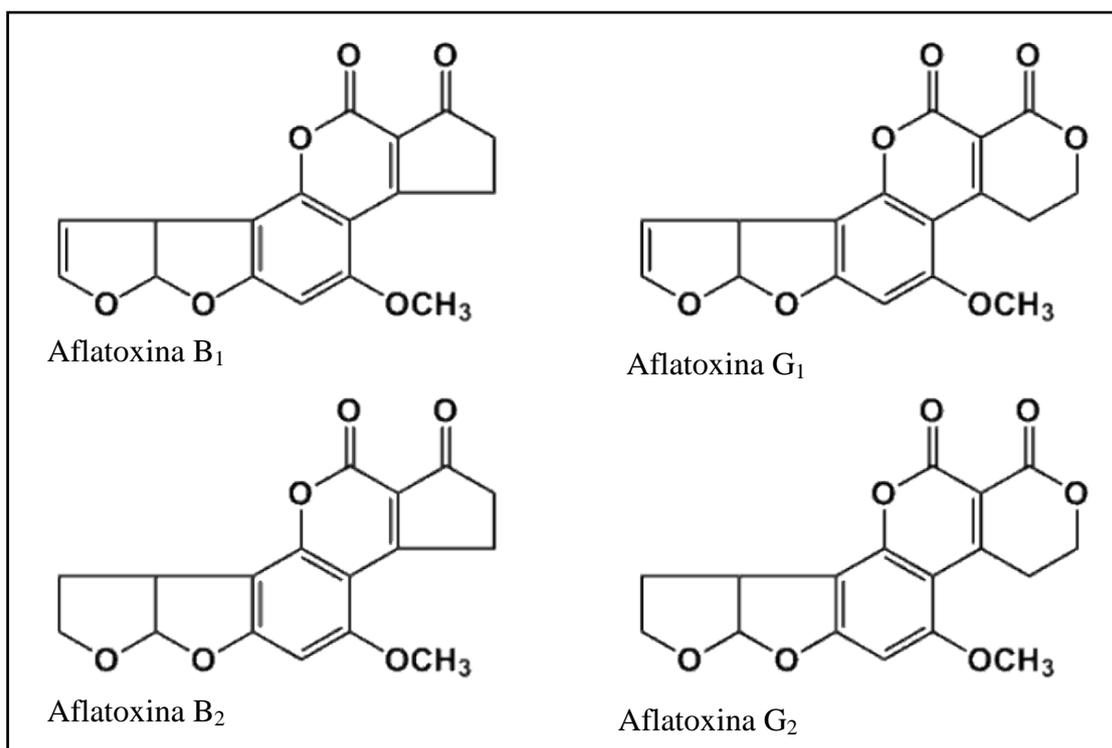
A biotransformação das aflatoxinas é promovida por enzimas e pode ser divididas em duas fases. Na primeira, ocorrem reações de oxidação, redução e hidrólise, tornando as moléculas mais hidrofílicas. Na segunda fase, os compostos produzidos são conjugados a substâncias endógenas (sulfato, glutathione,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

As aflatoxinas mais comumente produzidas pelo *A. flavus* são as AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub>, enquanto *A. parasiticus* e *A. nomius* produzem além das duas aflatoxinas já mencionadas, as AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> (Figura 10). Na maioria dos isolados produtores, a AFB<sub>1</sub> é produzida em grandes quantidades (CAST, 2003; SMITH; ROSS, 1991). AFB<sub>1</sub> é a mais tóxica das quatro principais substâncias, apresentando propriedades hepatotóxicas, teratogênicas e mutagênicas, podendo causar hemorragias, edemas, imunossupressão e carcinoma hepático (SMITH; ROSS, 1991). A manifestação de seus efeitos carcinogênicos ocorre após a conversão hepática em AFB<sub>1</sub>-epóxido, o qual reage com macromoléculas e ácidos nucleicos (BUSBY; WOGAN, 1984). A AFB<sub>1</sub> é classificada no grupo 1 dos carcinógenos humanos pela “International Agency for Research on Cancer” (IARC, 1993).

A contaminação com aflatoxinas é um problema muito sério que preocupa os exportadores brasileiros de castanhas-do-Brasil, desde o estabelecimento dos limites máximos de tolerância para aflatoxinas em castanha-do-Brasil pela Comissão da União Europeia em fevereiro de 2010. Nas amêndoas antes do processamento, os limites são 8,0 µg/kg para AFB<sub>1</sub> e 15,0 µg/kg para aflatoxinas totais (AFB<sub>1</sub>+AFB<sub>2</sub>+AFG<sub>1</sub>+AFG<sub>2</sub>) e para as prontas para consumo, 5,0 µg/kg for AFB<sub>1</sub>e 10,0 µg/ kg para aflatoxinas totais (EC, 2010).

No mercado interno a regulamentação sancionada pela ANVISA (2011), determinou o limite máximo de tolerância de aflatoxinas totais de 20, 10 e 15  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para castanhas-do-Brasil destinadas ao consumo direto com casca, consumo direto sem casca e ao processamento posterior sem casca, respectivamente.

**Figura 11** – Estruturas químicas das aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>



Fonte: Hussein e Brasel, 2001

## 2.11 Ácido ciclopiazônico

O ácido ciclopiazônico (ACP) é um ácido indol tetrâmico tóxico (Figura 11). Tem sido implicado em quadros de intoxicação humana para uma variedade de espécies (RAO; HUSAIN, 1985). A toxina é conhecida por ser produzida por uma variedade de fungos, incluindo algumas espécies de *Penicillium* (HOLZAPFEL, 1968; LE BARS, 1979) e *A. flavus* (YOKOTA et al., 1981). De acordo com Frisvad et al. (2006), *A. versicolor* não é produtor de ACP, em trabalho de Ohomomo et al. em 1973, a cepa *A. oryzae* produtora de ACP havia sido erroneamente identificada como *A. versicolor*.

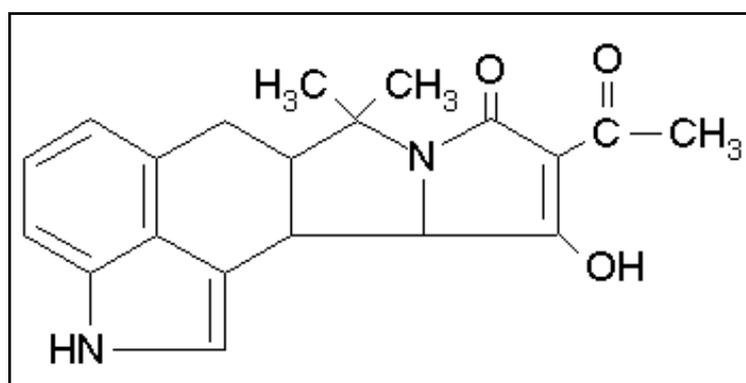
Fungos que produzem ACP podem crescer em muitos substratos, incluindo queijo, carnes, e vários grãos e sementes. A co-contaminação de alimentos por ACP e aflatoxinas tem

sido estudada por diversos pesquisadores (GIORNI et al., 2007; HEPERKAN et al., 2012; LANSDEN; DAVIDSON, 1983; MARTINS; MARTINS, 1999; PIER et al., 1989; VAAMONDE et al., 2003).

ACP é um inibidor específico da ATPase cálcio dependente no retículo endoplasmático, resultando num aumento da contração muscular (RILEY et al., 1992). Em ratos, ACP causa lesões em fígado, rins, pâncreas, baço e coração (PURCHASE, 1971). Frangos de corte alimentados com 100 mg/kg de ACP mostraram proventriculite ulcerativa, necroses hepática e esplênica, necrose na mucosa da moela, e baixo ganho de peso com significativa taxa de mortalidade (DORNER et al., 1983; SMITH et al., 1992). ACP não é considerada como uma potente toxina em quadros agudos, uma vez que a DL50 oral em ratos está entre níveis de 30–70 mg/kg (ANTONY et al., 2003; NISHIE et al., 1987). Surpreendentemente, em relação aos mamíferos, suínos parecem um pouco mais sensíveis ao ACP com NOEL (non-observable-effect level) de aproximadamente 1,0 mg/kg (LOMAX et al., 1984).

Especula-se que ACP pode estar associado a quadros de náusea, depressão, intoxicação e perda da consciência em homens que consumiram milho Kodo em algumas regiões ao norte da Índia (ANTONY et al., 2003; RAO; HUSAIN, 1985). Os efeitos tóxicos do ACP podem ser mascarados pela concorrência de aflatoxicoses, como no caso da torta de amendoim relacionada à doença “X” dos perus (BRADBURN et al., 1994; SPENSLEY, 1963).

**Figura 12** – Estrutura química do ACP



Fonte: Holzapfel, 1968

### **3 PROPOSIÇÃO E OBJETIVOS**

O Brasil é o segundo exportador mundial de castanha-do-Brasil, com produção concentrada na região norte principalmente nos estados do Acre, Amazonas, Pará e Amapá (Quadro 3). Assim, a castanha-do-Brasil apresenta grande importância econômica e social. Análises econômicas apontam potencial crescente deste mercado nacional e internacional.

**Quadro 3**– Área das reservas extrativistas nas áreas de produção de castanha-do-Brasil

<b>Estado</b>	<b>Área (hectares)</b>
Acre	1.721.365
Amazonas	3.074.768
Pará	3.949.166
Amapá	4481.651

Fonte: IBGE, 2009

A castanha-do-Brasil é exposta no campo e no armazenamento a fatores físicos, químicos e biológicos, promovendo deteriorações no substrato, e consequentes perdas econômicas e potenciais perigos à saúde humana. A adequada manutenção das castanhas durante o processo de colheita e manufatura permite a conservação de características organolépticas, nutricionais e de sanidade do grão, preservando a qualidade do produto.

Apesar da importância econômica representada pela contaminação por fungos e micotoxinas em castanha-do-Brasil, poucos estudos científicos relacionados ao controle de qualidade foram relatados. É imprescindível estabelecimento da micobiota e detecção de micotoxinas em castanha-do-Brasil, a fim de apontar medidas de controle micológico e determinar pontos críticos na cadeia produtiva, amenizando-se, com isso, as perdas econômicas.

Além de controlar a presença de fungos e micotoxinas através de métodos químicos e físicos, é importante que se possa controlar também estes fungos através de métodos biológicos. Por este motivo, o conhecimento da diversidade genética das espécies fúngicas é um fator essencial para identificar genótipos mais patogênicos ou que produzam elevados níveis de micotoxinas. Essas informações podem facilitar a produção de fungicidas mais eficientes ou sementes geneticamente modificadas mais resistentes aos patógenos, favorecendo, assim, a adoção de medidas de controle e de prevenção da contaminação fúngica e produção de micotoxinas. Com base nesses dados, a presente investigação teve como objetivos identificar a micobiota e a ocorrência de aflatoxinas e de ácido ciclopiazônico em

castanha-do-Brasil, tanto em amêndoas quanto em cascas, de amostras provenientes de diferentes Estados do Brasil (Acre, Amazonas, Amapá e Pará), além de estudar através de abordagem polifásica as cepas de *Aspergillus* Seção *Flavi* isoladas das amostras.

Os objetivos específicos do trabalho incluíram:

- Determinação da atividade de água, teor de umidade e micobiota em amostras de castanha-do-Brasil (amêndoas e cascas), provenientes da região norte do Brasil (Acre, Amazonas, Amapá e Pará);
- Pesquisa da presença de aflatoxinas e de ácido ciclopiazônico nas amostras;
- Identificação através de abordagem polifásica das cepas de *Aspergillus* seção *Flavi* isoladas de cascas e amêndoas;
- Avaliação do potencial toxigênico (aflatoxinas e ácido ciclopiazônico) de cepas de *Aspergillus* seção *Flavi* isoladas das amostras coletadas;
- Determinação da concentração de selênio em amostras de amêndoas;
- Um objetivo suplementar foi incluído: identificação utilizando abordagem polifásica dos isolados de *Aspergillus* Seção *Flavi* de amostras de cascas e amêndoas de castanha-do-Brasil com certificação orgânica, provenientes de Manicoré, Amazonas.



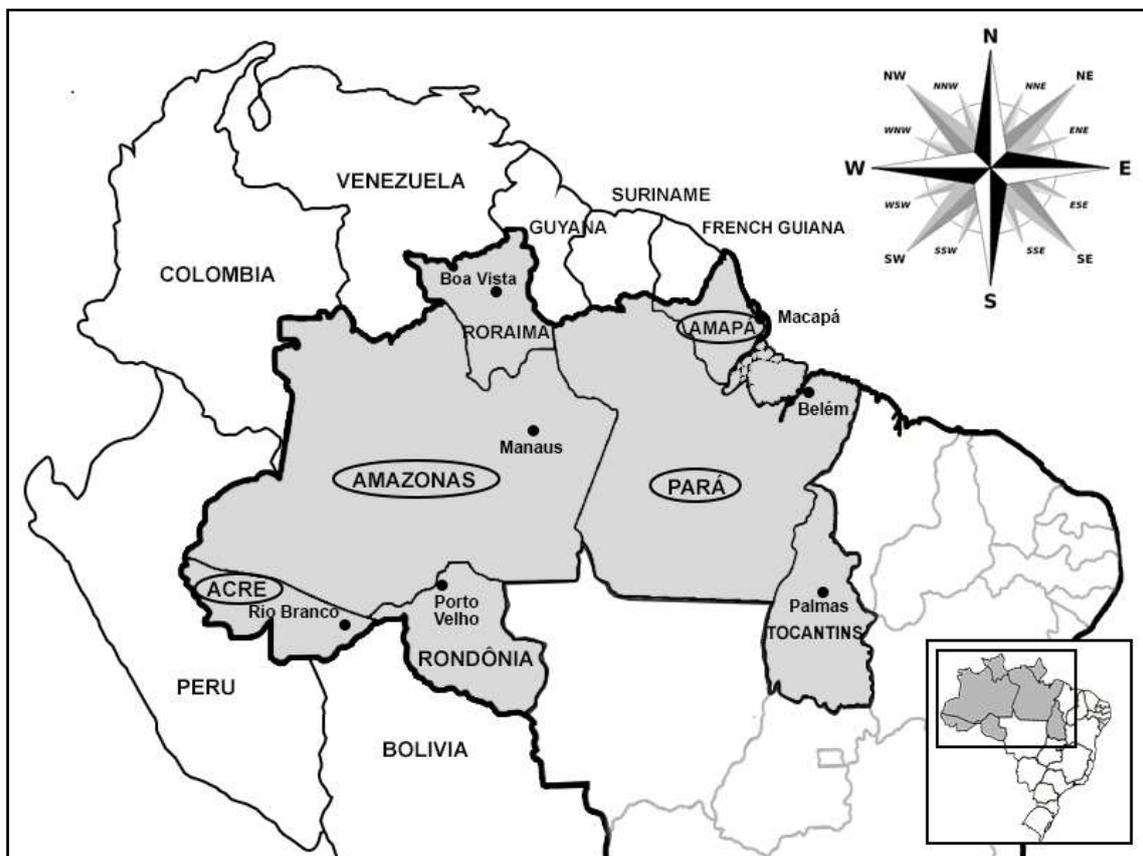
#### 4.1 Área de estudo – caracterização geográfica

As amostras foram provenientes de 4 Estados pertencentes à região norte da Amazônia brasileira, a saber: Acre, Amazonas, Amapá e Pará (Quadro 4, Figura 12).

**Quadro 4** – Coordenadas geográficas e altitudes dos locais de estudo

Estado	Latitude	Longitude	Altitude
Acre	9° 58'S	67° 48'O	153 m
Amazonas	5° 48'S	61° 18'O	45 m
Amapá	1° 07'S	52° 00'O	20 m
Pará	1° 57'S	48° 11'O	10 m

**Figura 13** – Localização geográfica da região de estudo (Acre, Amazonas, Amapá e Pará)

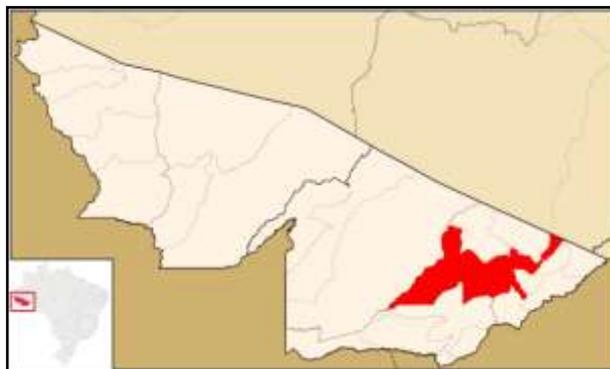


A coleta foi realizada nos 4 estados brasileiros da região norte no mês de abril de 2009, referentes à safra anterior (novembro de 2008). A primeira cooperativa visitada foi a COVEMA no Amazonas onde foram cedidos 2 lotes de amostras de 20 kg não-orgânicas e 20 kg orgânicas. Depois, no Pará, não foi possível coletar amostras de cooperativa, assim sendo, as amostras representativas desse estado, provenientes de Acará, foram adquiridas no Mercado Ver-o-peso, em Belém. Após, no Amapá, a cooperativa COMAJA concedeu 20 kg de amostras. Por fim, no Acre, a COOPERACRE forneceu 20 kg de amostras. Ao todo, o período da coleta foi de 15 dias, sendo que as amostras foram enviadas pelo correio e encaminhadas para o Laboratório de Micotoxinas, armazenadas em temperatura ambiente e processadas logo após o término das coletas. Durante todo trabalho a sequência dos resultados apresentados seguiram a ordem: Rio Branco – AC, Manicoré – AM, Laranjal do Jari – AP e Acará – PA.

#### 4.1.1 Rio Branco - Acre

Rio Branco é um município brasileiro, capital do Acre (Figura 14). Localiza-se às margens do Rio Acre, no Vale do Acre e na microrregião homônima. Principal município do Estado, de acordo com uma estimativa do IBGE (2013) a cidade possui uma população de 348.354 habitantes. Na capital situa-se a COOPERACRE (Figuras 15, 16, 17, 18 e 19).

**Figura 14** - Localização do Rio Branco



Fonte: Wikipédia. Ficheiro: Acre Municip RioBranco.svg

**Figura 15** – Fachada da COOPERACRE, Rio Branco, AC



**Figura 16** – Galpões de armazenamento da castanha-do-Brasil (A, B, C). Interior de galpão (D)



**Figura 17** – Sacas entregues por cooperado



**Figura 18** – Resíduos de cascas de castanhas utilizadas como fertilizante



**Figura 19**– Produtos comercializados pela COOPERACRE



#### 4.1.2 Manicoré - AM

Manicoré é um município brasileiro do interior do estado do Amazonas (Figura 20). Pertence à mesorregião do sul amazonense e à microrregião do Rio Madeira. Sua população é estimada em 48.373 habitantes (IBGE, 2013). Neste município localiza-se a COVEMA (Figuras 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 e 30).

**Figura 20**– Localização de Manicoré no Amazonas



Fonte: Wikipédia. Ficheiro: Amazonas Municip Manicore.svg

**Figura 21** – Fachada da COVEMA



**Figura 22** – Galpões de armazenamento



**Figura 23** – Polidor mecânico para castaneda-Brasil com cascas



**Figura 24** – Forno de autoclave abastecido com resíduos de cascas de castanhas



**Figura 25** - Autoclave



**Figura 26**– Descascadoras de castanhas



**Figura 27**– Castanhas descascadas (amêndoas)



**Figura 28** – Classificação das amêndoas: G-grande, M-média, P-pequena, K-quebrada



**Figura 29** – Produtos comercializados pela COVEMA



**Figura 30** – Coleta de amostras para trabalho: (A) amostras que foram comparadas às demais cooperativas e (B) coleta da amostra orgânica



#### 4.1.3 Laranjal do Jari – AP

Laranjal do Jari é um município do sul do estado do Amapá (Figura 31). A população é estimada em 40.357 habitantes (IBGE, 2013). Seus limites são Vitória do Jari a sul; Oiapoque, Pedra branca do Amapari e Mazagão a leste; Almeirim (PA) a sul, Guiana Francesa ao norte e Suriname a noroeste. Neste município localiza-se a COMAJA (Figuras 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 e 43).

**Figura 31** – Localização do Laranjal Jari no Amapá



Fonte: Wikipédia. Ficheiro: Amapa Municip LaranjaldoJari.svg

**Figura 32** – Fachada da COMAJA



**Figura 33** – Armazenamento de amostras



**Figura 34** – Polidor de castanhas



**Figura 35**– Armazenamento de castanhas polidas



**Figura 36** – Castanheira localizada na COMAJA



**Figura 37-** Autoclave



**Figura 38-** Cascas de castanhas utilizadas como combustível do forno



**Figura 39 –** Descascadoras de castanhas



**Figura 40**– Amêndoas



**Figura 41**– Limpeza das amêndoas, retiradas das quebradas



**Figura 42** – Classificação das castanhas



**Figura 43**– (A) Sala de embalagem (B) Embalagem com identificação de Usina do Pará



#### 4.1.4 Acará – PA

Acará é um município do sul do estado do Pará (Figura 44). A população é estimada em 60.039 habitantes (IBGE, 2013). Pertence à microrregião de Tomé-Açu. As castanhas adquiridas neste estado foram provenientes de Acará e comercializadas no Mercado Ver-o-peso em Belém (Figuras 45, 46, 47, 48, 49, 50 e 51).

**Figura 44**– Localização de Acará no Pará



Fonte: Wikipédia. Ficheiro: Para Municip Acara. svg

**Figura 45** – Comercialização de castanha-do-Brasil em Ver-o-peso



**Figura 46**– Comercialização de castanhas



**Figura 47**– Comercialização de ouriços e castanhas



**Figura 48** – Trabalhador abrindo ouriço em Ver-o-peso



**Figura 49** – Pequeno armazém de comerciante em Ver-o-peso de onde as amostras do estado do Pará procederam



**Figura 50** – Artesanato comercializado no Mercado Ver-o-peso produzido com ouriços e castanhas



#### 4.2. Amostras

Foram utilizadas 400 amostras de amêndoas (200) e cascas (200) de castanha-do-Brasil coletadas “in loco” em cooperativas de castanha-do-Brasil localizadas na região norte do Brasil, nos estados: Amazonas (AM), Pará (PA), Amapá (AP) e Acre (AC) durante o mês de março de 2009. As amostras foram provenientes da coleta realizada na safra anterior (novembro de 2008). Foram coletadas 50 amostras de 400g de cada por estado, correspondendo a 20 kg de castanhas de cada região. As cascas de cada castanha foram

cuidadosamente e assepticamente removidas por quebra utilizando um quebrador (Figura 51). Depois de descascadas, as amostras foram divididas em 200 amostras de cascas e 200 amostras de amêndoas. Essas amostras foram analisadas para teor de umidade (Tu), atividade de água (Aa), presença de fungos, aflatoxinas e ácido ciclopiazônico. As identificações das amostras seguem a legenda referida no Quadro 5. Para a realização de o objetivo suplementar, foram coletados 20 kg de amostras com certificação orgânica da região de Manicoré, as quais foram divididas em 50 amostras de cascas e 50 amostras de amêndoas.

**Figura 51** – Quebrador utilizado para separar as cascas das amêndoas



**Quadro 5** – Legenda da identificação das amostras

Estados	Amostras	Siglas
Acre (AC)	Amêndoas	AC A
	Cascas	AC C
Amazonas (AM)	Amêndoas	AM A
	Cascas	AM C
Amapá (AP)	Amêndoas	AP A
	Cascas	AP C
Pará (PA)	Amêndoas	PA A
	Cascas	PA C

### 4.3 Teor de umidade (Tu) e Atividade de água (Aa)

A análise do Tu foi realizada em duplicata por método clássico de acordo com a ISO 712. As cascas e amêndoas de castanhas-do-Brasil foram trituradas e 5g ( $\pm$  1mg) de cada amostra foi colocada em uma placa de metal em um forno ventilado em temperatura constante (130 – 133 °C) por 3 horas e as amostras foram pesadas novamente. O percentual da diferença entre os pesos inicial e final das amostras foi o Tu.

A Aa foi medida através de método instrumental em duplicata por ponto de orvalho através de equipamento Aqualab CX-2 (Decagon Devices, Inc., Pullman, WA, EUA). As cascas e amêndoas de castanhas-do-Brasil foram trituradas foram colocados em um cepo descartável e a Aa foi determinada.

### 4.4 Isolamento da Micobiota

A metodologia escolhida para o isolamento da micobiota das amostras foi diluição seriada com plaqueamento em superfície. Para isso, as amostras foram quebradas assepticamente e separadas em amêndoas e cascas. Dez gramas de cada amostra de castanha-do-Brasil (amêndoa e casca), previamente trituradas mecanicamente, foram diluídas em 90 mL de água destilada estéril (diluição  $10^{-1}$ ). A partir desta, foram realizadas diluições decimais sucessivas até  $10^{-4}$ , e inoculado 0,1 mL de cada amostra em meio de cultura AFPA (FRÄNDBERG et al., 2003; OLSEN et al., 2008; PITT et al., 1983). Após, as placas foram incubadas a temperatura de 25 °C por até 5 dias, sendo procedida a contagem das colônias. Posteriormente, foi realizada a correção do fator de diluição, a fim de obtenção do número de unidades formadoras de colônia por grama (UFC/g) tanto das amostras de casca como de amêndoa (BUSTA et al., 1984). Todas as análises foram realizadas em duplicata. Os diferentes tipos morfológicos foram isolados em Ágar Batata Dextrose e identificados pela técnica de microcultivo (RIDDELL, 1950). Os fungos foram classificados até gênero, já aqueles pertencentes aos gêneros *Aspergillus* foram classificados como pertencentes à Seção *Flavi*, de acordo com os compêndios de Raper e Fennel (1965) e Arx (1981) e, após, mantidos em micoteca para estudo polifásico.

## 4.5 Meios de cultura

Todos os componentes dos meios de cultura foram procedentes da empresa Oxoid (Waltham, MA, EUA), exceto o cloranfenicol que foi adquirido de farmácias de manipulação em São Paulo.

Com a finalidade de isolamento da microbiota das amostras de castanha-do-Brasil e a pesquisa de produção de ácido aspergílico foi utilizado o meio Ágar *Aspergillus flavus-parasiticus* (AFPA). Ágar Batata Dextrose (PDA) foi utilizado nas etapas de manutenção das cepas fúngicas isoladas.

Para estudo morfológico das cepas de *Aspergillus* foi utilizado Ágar Extrato de Malte (MEA) e Ágar Czapek (CZ).

Foram utilizados os meios de Ágar Blakeslee de Malte (Blakeslee's Malt Agar) e CZ para o estudo de termorresistência.

O potencial toxigênico das cepas de *Aspergillus* foi realizado em Ágar Coco para a produção de aflatoxinas e Ágar Extrato de Levedura – Sacarose (YES) para produção de ácido ciclopiazônico e também pra crescimento dos isolados fúngicos para posterior extração de DNA.

### 4.5.1 PDA

PDA foi utilizado no isolamento, identificação e manutenção dos fungos isolados (PITT; HOCKING, 2009). No preparo, foi acrescido cloranfenicol e corrigido para pH 5,6.

Preparo:O meio de cultura foi dissolvido em água fervente conforme determinação do fabricante: 39 g em água destilada q.s.p (1000 mL) e, em seguida, foi adicionado o cloranfenicol (100 µg/mL). Foram distribuídos 15 mL em tubos de ensaio. O meio foi então autoclavado a 121 °C durante 15 minutos.

### 4.5.2 AFPA

Meio seletivo utilizado para isolamento de *Aspergillus* Seção *Flavi* nas amostras de castanha-do-Brasil (amêndoas e cascas) (PITT et al., 1983).Composição:peptona (10 g); extrato de levedura (20 g); citrato férrico amoniacal (0,5g); ágar bacteriológico (15 g); cloranfenicol (0,1 g); dicloran (2 mg – 0,2% em etanol); água destilada q.s.p. (1000 mL).Preparo:Os componentes foram dissolvidos em água destilada fervente. O meio foi

autoclavado a 121 °C durante 15 minutos e volumes de 20 mL foram distribuídos em placas de petri esterilizadas 90 x 15 mm.

#### 4.5.3 MEA

Esse meio de cultura foi utilizado para o estudo macroscópico das colônias de *Aspergillus* (PITT; HOCKING, 2009). Composição: extrato de malte (10 g); ágar bacteriológico (25 g); cloranfenicol (0,1 g); água destilada q.s.p. (1000 mL). Preparo: Os componentes do meio de cultura foram dissolvidos em água fervente e em seguida, foi adicionado o cloranfenicol (100 µg/mL). O meio foi autoclavado a 121 °C durante 15 minutos e volumes de 20 mL foram distribuídos em placas de petri esterilizadas 90 x 15 mm.

#### 4.5.4 Agar Blakeslee's Malt

Este meio foi utilizado no estudo de termorresistência das cepas de *Aspergillus* spp. (KURTZMAN, 1987). Composição: extrato de malte (20 g); peptona (1 g); glicose (20g); ágar bacteriológico (20 g); água destilada q.s.p. (1000 mL). Preparo: Os componentes do meio de cultura foram dissolvidos em água fervente e em seguida, foi adicionado o cloranfenicol (100 µg/mL). O meio foi autoclavado a 121 °C durante 15 minutos e volumes de 20 mL foram distribuídos em placas de petri esterilizadas 90 x 15 mm.

#### 4.5.5 Ágar CZ

Este meio foi utilizado no estudo de termorresistência das cepas de *Aspergillus* spp. (PITT; HOCKING, 2009). Composição: caldo czapek (33,4 g); ágar bacteriológico (20 g); água destilada q.s.p. (1000 mL). Preparo: Os componentes do meio de cultura foram dissolvidos em água fervente e em seguida, foi adicionado o cloranfenicol (100 µg/mL). O meio foi autoclavado a 121 °C durante 15 minutos e volumes de 20 mL foram distribuídos em placas de petri esterilizadas 90 x 15 mm.

#### 4.5.6 Ágar YES

Este meio foi utilizado para a produção de ACP e para o crescimento de micélio para extração de DNA (PITT; HOCKING, 2009). Composição: extrato de levedura (20 g);

sacarose (150 g); ágar bacteriológico (20 g); água destilada q.s.p. (1000 mL). Preparo: Os componentes do meio de cultura foram dissolvidos em água fervente e em seguida, foi adicionado o cloranfenicol (100 µg/mL). O meio foi autoclavado a 121 °C durante 15 minutos e volumes de 10 mL foram distribuídos em placas de petri esterilizadas 60 x 15 mm.

#### 4.5.7 Ágar Coco

Utilizado para a avaliação do potencial aflatoxigênico das cepas de *A. flavus* e *A. parasiticus* (LIN; DIANESE, 1976). Composição: leite de coco (200 mL); ágar bacteriológico (20 g); água destilada q.s.p. (1000 mL). O pH foi corrigido para 6,9. Preparo: Os componentes do meio de cultura foram dissolvidos em água fervente e em seguida, foi adicionado o cloranfenicol (100 µg/mL). O meio foi autoclavado a 121 °C durante 15 minutos e volumes de 10 mL foram distribuídos em placas de petri esterilizadas 60 x 15 mm.

### 4.6 Determinação de micotoxinas

Todos os solventes utilizados nas etapas de determinação de micotoxinas (amêndoas e cascas) foram grau cromatográfico. A água Milli-Q foi produzida em nosso departamento utilizando o equipamento de purificação de água: Academic System (Millipore, Marlborough, MA, EUA).

#### 4.6.1 Otimização dos métodos para detecção de micotoxinas

Os métodos para determinação de micotoxinas das amostras de amêndoa, casca e da potencialidade toxigênica das cepas de *Aspergillus* Seção *Flavi* foram previamente testados e otimizados.

Com essa finalidade, foram avaliados os seguintes parâmetros: porcentagem de recuperação, repetibilidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).

##### 4.6.1.1 LD e LQ

O LD foi determinado como a concentração mais baixa que possa ser determinado sendo diferente a partir de uma amostra branca, ou seja, livre da micotoxina estudada. Os valores estimados da LD foram baseados na relação de cinco vezes o ruído de linha de base e

determinado por análise das soluções padrão de cada analito, diminuindo as concentrações até ao nível mínimo detectável (IUPAC, 1999).

O LQ foi definido como o nível acima do qual os resultados quantitativos podem ser obtidos com um grau de confiança especificado (IUPAC, 1999). O LQ foi determinado por análise das soluções padrão de cada micotoxina, diminuindo as concentrações até o nível mais baixo quantificado com precisão e exatidão aceitável.

Os LD e LQ foram realizados através da inoculação de solução padrão contendo as aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> ou ACP tanto nas amêndoas quanto nas cascas. Após evaporação do solvente em que o padrão estava ressuspendido, procedeu-se a extração, limpeza e separação por CLAE. O método de quantificação foi através de curva de calibração.

#### *4.6.1.2 Testes de recuperação de micotoxinas e repetibilidade*

De acordo com o INMETRO (2003), a porcentagem de recuperação expressa a precisão de uma metodologia, sendo estimada pela adição de quantidades conhecidas do analito em uma determinada amostra. Repetibilidade é utilizada para avaliar a dispersão dos resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, e em condições definidas.

Para os testes de recuperação, realizados em quintuplicata, foram utilizadas amostras previamente analisadas e que apresentaram níveis de micotoxinas não detectada. Sendo assim, 5g de amostras de castanha-do-Brasil (amêndoas e cascas) foram adicionadas de uma mistura dos padrões das quatro aflatoxinas ou ACP. As amostras foram deixadas em repouso durante a noite e, em seguida, foram extraídas utilizando os métodos descritos para determinação de aflatoxinas e ACP, de acordo com as seções 4.6.2 e 4.6.3, respectivamente.

A quantificação das micotoxinas foi realizada através de curva de calibração construída a cada lote (batch).

Para os testes de recuperação para aflatoxinas, foi inoculada solução-padrão correspondente à concentração de 10 µg/kg de cada aflatoxina na matriz. Após, executaram-se as etapas de extração, limpeza, derivatização e separação por CLAE (seção 4.6.2). Foram calculados os percentuais de recuperação para cada aflatoxina e os respectivos coeficientes de variação da recuperação.

No que diz respeito ao ACP, o teste de recuperação foi realizado a partir da inoculação da solução-padrão, diluída em metanol, correspondente à concentração de 50 µg/kg. A partir da inoculação, foram executadas as etapas de extração e quantificação por CLAE (seção 4.6.3).

#### 4.6.1.3 *Curvas de calibração para aflatoxinas*

O valor final de massa injetado no cromatógrafo corresponde a 1g de amostra (tanto para amêndoas quanto para cascas). Dessa forma, as curvas de calibração para as aflatoxinas, com 5 pontos e em quintuplicata, foram realizadas injetando-se soluções derivatizadas dos padrões nas concentrações de 0,625; 1,25; 2,5; 5 e 10 ng/mL para cada aflatoxina. Essas concentrações correspondem aos valores de 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 µg/kg, respectivamente.

#### 4.6.1.4 *Curva de calibração para ACP*

Foi injetado no cromatógrafo, valor final de 1,2 g de amostra (tanto para amêndoas quanto para cascas). Assim, a curva de calibração para ácido ciclopiazônico, com 5 pontos e em quintuplicata, foi realizada injetando-se 40 µL soluções-padrões nas concentrações de 166,0; 333,4; 500,0; 666,7 e 833,0 ng/mL. Essas concentrações correspondem aos valores de 55,2; 97,6; 166,7; 222,23 e 277,66 µg/kg;

#### 4.6.2 *Determinação de aflatoxinas em amostras de castanha-do-Brasil*

Foram determinadas as aflatoxinas em amêndoas e cascas. Para etapa de extração de aflatoxinas foram testados diferentes protocolos, dentre eles: Trucksess (1991), Stroka e Anklam (2000), AOAC (2000), Lebret et al. (2004) e Tanaka et al. (2002).

O protocolo utilizado foi baseado nas metodologias propostas por Lebret et al. (2004) e Tanaka et al. (2000) com modificações. Para tal, as amostras foram trituradas e homogeneizadas, e 2,5 g de cada amostra de amêndoa e 5 g de cada amostra de casca foram transferidos para um tubo de polipropileno com fundo cônico (tipo Falcon) de 50 mL, adicionou-se 12,5 mL de solução acetonitrila:água (85:15, v/v). Os tubos foram submetidos a agitador vórtex por 1 minuto e, posteriormente, a agitador mecânico horizontal durante 60 minutos. Os tubos foram centrifugados a 10000 rpm durante 3 minutos. Cinco mililitros do sobrenadante foram, então, transferidos para outro tubo de polipropileno (tipo Falcon) de 50 mL e adicionados 45 mL de água acidificada com ácido acético glacial a 0,5%. O tubo foi, então, agitado vigorosamente. A partir desta solução foi realizada a extração em fase sólida, utilizando cartucho Strata C18-E 500 mg/3 mL, previamente condicionado com 3 mL de metanol e 6 mL de água acidificada 0,5%. A solução foi submetida completamente a fluxo de 1 gota/segundo, com auxílio de bomba a vácuo. Após esta etapa, a limpeza foi realizada pela

adição de 12 mL de água acidificada e a eluição das aflatoxinas foi feita com 1 mL de metanol em frasco âmbar. O metanol foi evaporado a resíduo e os frascos foram armazenados a -4 °C até o momento da derivatização química.

A derivatização química dos extratos, utilizando ácido trifluoracético (TFA) e hexano (STUBBLEFIELD, 1986), foi realizada com a finalidade de aumentar os sinais cromatográficos das AFB<sub>1</sub> e AFG<sub>1</sub>, transformando-as em AFB<sub>2a</sub> e AFG<sub>2a</sub>, respectivamente, confirmando a identidade química desses compostos. Assim, o procedimento foi realizado pela adição de 200 µL de hexano e 100 µL TFA, os frascos foram incubados a 40 °C por 15 minutos e, a seguir, a solução derivatizante foi evaporada sob nitrogênio. Após esse processo, as amostras foram ressuspensas em 500 µL de solução metanol: água (1:1, v/v) e 50 µL de cada amostra foram injetados.

A separação das aflatoxinas foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), tendo como fase móvel isocrática, baseada em trabalho de Scott et al. (1990), composta por água:acetonitrila:metanol (8:1,5:1,5 v/v/v) acrescido de 0,1% TFA a um fluxo de 1 mL/min. O equipamento utilizado para separação dos compostos foi o cromatógrafo líquido de alta eficiência - Prominence da marca Shimadzu (Shimadzu Corporation, Quioto, Japão), modelo LC 20, com coluna analítica de fase reversa C18 Shim-Pack VP-ODS 5 µm 150L X 4,6 (Shimadzu) e cartucho de pré-coluna Shim-Pack GVP-ODS 10 X 4,6 (Shimadzu), acoplada em forno CTO-20A com temperatura constante de 40 °C. Foi utilizado detector de fluorescência RF 10 AXL (365 nm de excitação e 450 nm de emissão), com injetor automático de volume variável de 1 a 100 µL. O cromatógrafo foi conectado ao computador através do módulo de interface CBM 20A. Para análise dos resultados foi utilizado o programa LC Solution (Shimadzu).

Os padrões de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> (Sigma, St. Louis, MO, EUA) utilizados nas análises foram ressuspensos em solução de benzeno:acetonitrila (98:2, v/v) e quantificados em espectrofotômetro DU-640 (Beckman Coulter, Brea, CA, EUA). A partir da concentração encontrada, foi realizada diluição a 1 µg/mL de cada aflatoxina. A partir dessa solução foram realizadas as diluições para uso nas atividades propostas.

#### 4.6.3 Determinação de ACP em amostras de castanha-do-Brasil

Na literatura, não encontramos métodos validados para análise de ACP em amêndoas e cascas de castanha-do-Brasil, assim, diferentes protocolos foram testados (HAYASHI;

YOSHIZAWA, 2005; MOLDES-ANAYA et al., 2009; MOTTA; SOARES, 2000; URANO et al., 1992), porém, os resultados obtidos nos testes de recuperação não foram satisfatórios.

A metodologia que apresentou melhores resultados foi a de Urano et al. (1992) com modificações, conforme descrito a seguir. Cinco gramas de cada amostra triturada foi acrescida de 20 mL de metanol:bicarbonato de sódio 2% em água (7:3, v/v). Após 30 minutos em agitador mecânico horizontal, o conteúdo do frasco foi filtrado em papel de filtro. Cinco mililitros do extrato foram transferidos para funil de separação e adicionados 10 mL de hexano, o funil foi agitado e a porção superior (lipídica) foi descartada. A fase inferior foi transferida para um béquer com 50 mL de solução de cloreto de potássio 10%, o pH dessa solução foi corrigido para 3,0 com solução de ácido clorídrico. Essa solução foi transferida para funil de separação e foram realizadas 2 partições com 10 mL cada de clorofórmio. O extrato foi evaporado sob nitrogênio até resíduo e armazenado a - 20 °C até momento da cromatografia. Na separação cromatográfica, os extratos foram diluídos em 1 mL de metanol e injetados 100 µL no cromatógrafo (Shimadzu modelo Prominence) através de injetor automático. O ACP, quando presente, foi separado em cromatógrafo líquido de alta eficiência - Prominence da marca Shimadzu, modelo LC 20, com coluna analítica de fase reversa C18 Shim-Pack VP-ODS 5 µm 150L X 4,6 e cartucho de pré-coluna Shim-Pack GVP-ODS 10 X 4,6 acoplada em forno CTO-20A com temperatura constante de 40 °C. A fase móvel utilizada foi baseada em Urano et al. (1992) com algumas modificações, modo isocrático composta por metanol:água (7:3, v/v) a um fluxo de 0,6 mL/min. Foram utilizados detector UV-VIS SPA-10 (282 nm). Para análise dos resultados foi utilizado o programa LC Solution, Shimadzu.

O padrão de ACP (Sigma) utilizado nas análises foi ressuspendido em metanol e diluído a 1 µg/mL. A partir dessa solução foram realizadas as diluições para uso nas atividades propostas.

#### 4.6.4 Avaliação do potencial toxigênico das cepas de *Aspergillus*

Todas as cepas de *Aspergillus* isoladas durante o estudo foram avaliadas quanto à potencialidade para produção de aflatoxinas, utilizou-se, para essa finalidade, a metodologia preconizada por Lin e Dianese (1976).

Um inóculo de cada colônia de *Aspergillus*, obtido do cultivo de 7 dias da cepa em PDA a 25 °C, foi semeado em meio de cultivo ágar coco e incubado a 25 °C por 15 dias.

Após esse período, todo o conteúdo da placa foi transferido para frasco erlenmeyer de 250 mL e a cada 10 g da cultura com o ágar foi acrescida de 30 mL de clorofórmio. Os

frascos foram submetidos a agitador mecânico horizontal durante 30 minutos. Os extratos clorofórmicos foram filtrados em papel de filtro para frascos âmbar. Os filtrados foram evaporados até resíduo em banho-maria (60 °C) e armazenados a -4 °C até a realização da cromatografia. Foi realizada triagem através de cromatografia em camada delgada (CCD) com os extratos ressuspensos em 1 mL de clorofórmio e aplicados 10 µL de cada extrato em cromatofolha de sílica gel G60 (Merck, Darmstadt, Alemanha). A cromatografia foi realizada em cuba cromatográfica contendo como fase móvel solução saturada de clorofórmio:acetona (9:1, v/v). Após a separação, as cromatofolhas foram secas em capela de exaustão e observadas em sala escura sob luz UV com comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 360 nm. As manchas das amostras foram comparadas as dos padrões de aflatoxinas (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>) de acordo com o Rf dos padrões.

A quantificação das aflatoxinas foi realizada por CLAE. Para essa finalidade, cada extrato foi ressuspensado em 2 mL de clorofórmio e uma alíquota de 100 µL desta solução foi transferida para outro frasco âmbar e evaporada até resíduo. A partir daí, o extrato foi ressuspensado em 3 mL de solução de acetonitrila:água (85:15,v/v), agitado em vórtex durante 1 minuto e diluído em 27 mL de água acidificada (0,5% ácido acético glacial) e novamente agitada. A partir desta solução foi realizada a extração em fase sólida, utilizando cartucho de sílica Strata C18-E 500 mg/3 mL, conforme metodologia descrita para as amostras de castanhas (seção 4.6.1).

#### 4.6.5 Avaliação do potencial toxigênico de ACP das cepas de *Aspergillus*

Para avaliação do potencial de produção de ácido ciclopiazônico foi utilizada a técnica preconizada Trucksess et al. (1987).

Um inóculo da colônia de *Aspergillus*, obtido do cultivo da cepa em ágar Batata Dextrose, foi semeado em meio de cultivo ágar YES e incubado a 25 °C por 12 dias.

Após esse período, todo o conteúdo da placa foi transferido para frasco erlenmeyer de 250 mL e a cada 10 g da cultura com o ágar foi acrescida de 30 mL de metanol. Os frascos foram submetidos a agitador mecânico horizontal durante 30 minutos. Os extratos metanólicos foram filtrados em papel de filtro para frascos âmbar. Os filtrados foram evaporados até resíduo em banho-maria (60 °C) e armazenados a -4 °C até a realização da cromatografia. Os extratos foram diluídos em 1 mL de metanol e a cromatografia para separação de ACP nas amostras foi realizada conforme a seção 4.6.2.

## 4.7 Caracterização química de selênio das amostras de castanha-do-Brasil

A caracterização química de selênio (Se) das amostras de amêndoas de castanha-do-Brasil foi desenvolvida com a colaboração da Professora Deborah Inês Teixeira Favaro do Laboratório de Análise por Ativação Neutrônica – LAN, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN, Centro do Reator de Pesquisas – CRPq localizado na Universidade de São Paulo *campus* de São Paulo.

O conteúdo de Se foi determinado através de análise por ativação neutrônica instrumental - AANI (AOAC, 1995), essa técnica tem sido largamente utilizada para análise de alimentos e dietas, devido às suas características de alta precisão, exatidão e sensibilidade, além de ser uma técnica multielementar (FAVARO et al., 2009; PARR, 2000; IYENGAR et al., 2004).

### 4.7.1 Validação da metodologia

A precisão e a exatidão do método de AANI foram verificadas por meio da análise dos materiais de referência e Apple Leaves (NIST SEM 1515), Peach Leaves (NIST SRM 1547), que possuem valores certificados de concentração para os elementos analisados.

Os padrões sintéticos dos elementos analisados foram preparados a partir de soluções padrão da marca SPEX CERTIPREP (Metuchen, NJ, EUA), diluídas a concentrações apropriadas.

Utilizou-se o método de AANI comparativo, segundo o qual amostras e padrões (contendo quantidades conhecidas do elemento de interesse) são irradiados simultaneamente, sob um fluxo de nêutrons, ocorrendo formação de isótopos radioativos por meio de reações nucleares. Uma vez que cada isótopo produzido no processo de ativação possui características de emissão próprias (meia vida e energia das partículas ou radiação gama emitidas) é possível efetuar determinações quantitativas da concentração por comparação com padrões.

### 4.7.2 Preparação de amostras e padrões para irradiação

Cerca de 200 mg de amostras (duplicata) e materiais de referência do National Institute of Standards and Technology –NIST (Gaithersburg, MD, EUA) Apple Leaves (NIST SEM 1515), Peach Leaves (NIST SRM 1547) e os padrões sintéticos dos elementos de interesse, foram irradiados conjuntamente. As amostras e padrões foram irradiados durante 8

horas, sob um fluxo de nêutrons térmicos de  $1 \text{ a } 5 \times 10^{12} \text{ n.cm}^{-2}\text{s}^{-1}$ , no reator de pesquisa IEA-R1 do IPEN/CNEN-SP.

#### 4.7.3 Medidas da atividade gama induzida

A primeira medida foi realizada após um tempo de decaimento de 5 a 7 dias, por aproximadamente 90 minutos para amostras e materiais de referência, e de 15 a 30 minutos para os padrões sintéticos. A segunda medida foi realizada após um tempo de decaimento de 15 a 20 dias, com um tempo de contagem de 15 horas para as amostras e materiais de referência e de cerca de 30 minutos, para os padrões sintéticos.

As medidas da radiação gama emitida pelos radioisótopos produzidos na irradiação das amostras e padrões foram feitas num espectrômetro gama, constituído de detector de Ge hiperpuro, modelo 20190 POP TOP da EG&G ORTEC, com resolução de 1,9 keV para o pico de 1332,49 keV do  $^{60}\text{Co}$ , acoplado a uma placa ACE 8K da EG&G ORTEC (Midland Road Oak Ridge, TN, EUA) e eletrônica associada e a microcomputadores para aquisição e análise dos dados.

Para o processamento dos espectros, utilizou-se o programa de computação VISPECT2, em linguagem TURBOBASIC, desenvolvido pelo Dr. Piccot, Saclay, França.

### 4.8 Sequenciamento do DNA ribossomal (DNAr) das cepas isoladas

As cepas de *Phialemonium* spp. e *Phaeoacremonium* spp. foram confirmadas através de sequenciamento da região ITS (WHITE et al., 1990).

As cepas de *Aspergillus* foram confirmadas por sequenciamento das regiões ITS,  $\beta$ -tubulina (GLASS; DONALDSON, 1995) e calmodulina (CARBONE; KHON, 1999).

#### 4.8.1 Extração de DNAr dos fungos

O DNAr foi extraído e purificado diretamente das colônias fúngicas a partir do cultivo em ágar YES (ABDOLLAHI; BUCHANAN, 1981, DEGOLA et al., 2007), seguindo o protocolo do kit PrepMan Ultra<sup>®</sup> (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA). Para tal, os isolados foram inoculados em ágar YES e cultivados por 3 dias em estufa a 30 °C, em seguida, com o auxílio de um bisturi, um fragmento de micélio de aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup> foi recortado da periferia da colônia. Removeu-se o ágar, e o micélio foi transferido para um

microtubo de 1,5 mL contendo 300  $\mu$ L de PrepMan Ultra<sup>®</sup>. O microtubo foi agitado em vórtex por um minuto e colocado em banho de água a 100 °C por 15 minutos e centrifugado por 7 minutos a 14000 rpm em temperatura ambiente. Após, o sobrenadante foi transferido para outro microtubo de 1,5 mL e armazenado a -4°C até o momento da quantificação e realização da Reação de Polimerase em Cadeia (PCR).

#### 4.8.2 Quantificação de DNA e cálculo de pureza das amostras

Para quantificação, o DNA extraído foi diluído 1:50 em água Milli-Q e quantificado em NanoDrop<sup>™</sup> 2000c (Thermo Scientific Waltham, MA, EUA) em comprimento de onda de 260 nm, também foi realizada a medida da absorbância no comprimento de onda de 280 nm para verificar a presença de proteínas e calcular a pureza do DNA através da razão entre densidade óptica (DO) A260 nm e A280 nm (DO260/DO280) (SAMBROOK et al., 1989). Valores abaixo de 1,8 indicam grande quantidade de contaminantes e proteínas, nesse caso, a extração de DNA foi realizada novamente. O DNA foi diluído a 40 ng/ $\mu$ L para realização da reação de polimerase em cadeia.

#### 4.8.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a PCR foram utilizados microtubos de 0,2 mL. O fragmento da região ITS foi amplificado com ITS1 e ITS4. Parte do gene de  $\beta$ -tubulina foi amplificada usando os iniciadores T22 e TUB-F. Parte do gene da calmodulina foi amplificada usando os iniciadores CDM42 e CDM637. As sequências dos iniciadores utilizados estão no Anexo 6. A PCR foi realizada com 12,5  $\mu$ L de PCR Master Mix (Promega, San Luis Obispo, CA, EUA), 6,5  $\mu$ L de água Milli-Q e 2  $\mu$ L de DNA (40 ng) e 2  $\mu$ L (20 pmol) de cada iniciador (Prodimol Biotecnologia, MG, Brasil) para um volume final de 25  $\mu$ L. O programa de amplificação incluiu uma denaturação inicial (94 °C por 3 min), seguido por 35 ciclos de denaturação (94 °C por 1 min), anelamento a 57 °C (ITS), 49 °C ( $\beta$ -tubulina), ou 54 °C (calmodulina) por 1 min, e extensão a 72 °C 1 min. Uma etapa de extensão final a 72 °C por 5 min foi incluída ao final da amplificação.

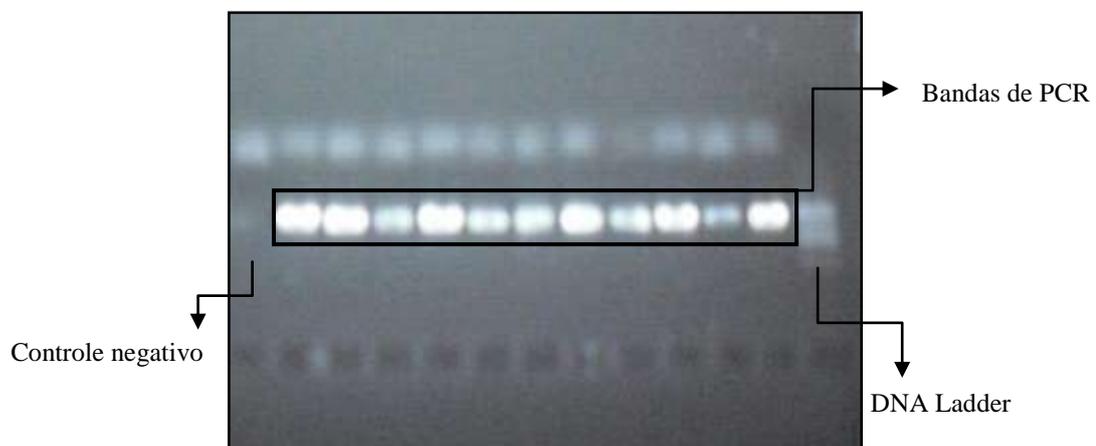
**Quadro 6** - Sequências dos iniciadores utilizados no estudo

Gene	Iniciador	Sequência do iniciador (5' – 3')
Internal transcribed spacer	ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG
	ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT
$\beta$ -tubulina	T22	TCTGGATGTTGTTGGGAATCC
	TUB-F	CTGTCCAACCCCTCTTAGGGCGACT
Calmodulina	CMD42	GGCCTTCTCCCTATTCGTAA
	CMD637	CTCGCGGATCATCTCATC

4.8.4 Eletroforese do produto de PCR

Após a realização da PCR, todas as amostras foram submetidas à eletroforese em gel para verificação da eficiência da amplificação (Figura 52). O gel de agarose foi preparado a uma concentração de 1,2% em solução de TAE 1x (Tris Acetato EDTA) acrescidos de Gel Red (Biotium, Hayward, CA, EUA) ou Sybr Safe (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) (1  $\mu$ L a cada 10 mL de gel). Para aplicação das amostras nos poços do gel, 3  $\mu$ L das amostras foram previamente coradas com azul de bromofenol (2 $\mu$ L) e aplicados 3  $\mu$ L em cada poço. O gel foi submetido a 100 volts a 400 mA por 1 hora. Como referência, para confirmar o tamanho dos fragmentos, foram adicionados 6  $\mu$ L de DNA Ladder 100 pb (Invitrogen), preparados na proporção de 1:5 (DNA Ladder: corante que acompanha, v/v) no primeiro poço de cada linha.

**Figura 52**– Eletroforese em gel de agarose para verificação da eficiência da PCR



#### 4.8.5 Purificação dos produtos da PCR

A purificação do produto da reação de PCR teve como objetivo a remoção de iniciadores, dNTPs, enzimas e sais dos produtos de PCR que pudessem interferir na reação de sequenciamento. Para isso, várias formas de purificação foram testadas e a que apresentou melhor desempenho foi a do kit QIAquick PCR purification (Qiagen, Hilden, Alemanha), otimizado conforme descrito a seguir: ao volume de 17  $\mu\text{L}$  do produto de PCR (20  $\mu\text{L}$  total menos 3  $\mu\text{L}$  que fora aplicado no gel de eletroforese) foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  do Buffer PB – Binding Buffer (Tampão de Ligação) e todo conteúdo foi transferido para coluna que acompanha o kit, a qual foi deixada em repouso por um minuto, centrifugada a 13000 rpm por 1 minuto e descartada a fase inferior do microtubo. Após, foi adicionado 700  $\mu\text{L}$  de Buffer PE – Wash Buffer (Tampão de Lavagem), foi deixado em repouso por um minuto, centrifugado a 13000 rpm por 1 minuto e descartado a fase inferior do microtubo. O conjunto foi centrifugado novamente a 13000 rpm por 3 minutos para remoção total do tampão de lavagem. Para eluição, a coluna foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL e adicionando 20  $\mu\text{L}$  de EB – Elution Buffer (Tampão de Eluição) no centro da coluna, deixado por 1 minuto em repouso e centrifugado 13000 rpm por 1 minuto.

#### 4.8.6 Quantificação da PCR purificada

Após a purificação, foi realizada quantificação do produto de PCR purificado em NanoDrop, onde também foi verificada a pureza do produto conforme explicado na seção 4.7.2. Para a etapa de sequenciamento, utilizaram-se amostras com valores de pureza estava maior ou igual a 1,80, caso contrário a etapa de PCR foi repetida.

#### 4.8.7 Reação de sequenciamento dos produtos de PCR

Os produtos de PCR purificados foram sequenciados bidirecionalmente (“forward” e “reverse”) utilizando o kit Big Dye Terminator v3.1. Cycle Sequencing (Applied Biosystems). Os iniciadores utilizados foram os mesmos utilizados na PCR. A reação foi realizada em placa de 96 poços (MicroAmp Optical – 96-Well Reaction Plate com MicroAmp Full Plate Cover (Applied Biosystems), contendo o produto de PCR purificado diluído na quantidade entre 40 a 80 ng (adicionando-se água Milli-Q para um volume final 5  $\mu\text{L}$ ) adicionado da mistura

contendo: 3  $\mu\text{L}$  de tampão; 1  $\mu\text{L}$  do Big Dye e 1  $\mu\text{L}$  do iniciador na concentração de 3,2 pmol, assim, com volume final de 10  $\mu\text{L}$ .

Foi realizado um “spin” na placa (até 1000 rpm) para sedimentação da reação, a seguir, a placa foi colocada no mesmo termociclador utilizado para a PCR com a seguinte ciclagem: 25 ciclos de 95 °C por 20 segundos, 50 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Após a reação, a placa foi armazenada a -20 °C.

#### 4.8.8 Precipitação da reação de sequenciamento

Após a ciclagem de sequenciamento, o produto foi precipitado a fim de retirar o excesso de possíveis interferentes.

Para tal, foram adicionados a cada poço da placa: 40  $\mu\text{L}$  de solução álcool isopropílico P.A. 65%, a placa foi submetida a agitador vórtex, spin e incubada em temperatura ambiente, protegida da luz por 15 minutos. Após esse período, a placa foi centrifugada a 3000 rpm por 30 minutos com temperatura de 20 °C. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado por inversão, seguido de spin com a placa invertida com papel absorvente. Foram, então, adicionado 150  $\mu\text{L}$  de álcool etílico P.A. 70%, 3800 rpm por 10 minutos com temperatura de 4 °C. Novamente o sobrenadante foi descartado por inversão, seguindo de spin com a placa invertida com papel absorvente e o excesso de etanol foi evaporado em termociclador a 94 °C por 4 minutos. A placa foi armazenada a -20°C embrulhada em papel alumínio para proteção da luz.

#### 4.8.9 Denaturação

Imediatamente antes de a placa ser colocada no sequenciador, os fragmentos foram denaturados com 10  $\mu\text{L}$  de formamida HiDi (Applied Biosystems) adicionados em cada poço da placa que foi, então vedada, homogeneizada por 20 segundos em vórtex, seguido de spin e incubada a 94 °C por 3 minutos e choque térmico em gelo por 5 minutos.

#### 4.8.10 Eletroforese capilar

A separação eletroforética em capilar foi realizada em um sequenciador ABI Prism 3100 (Applied Biosystems), utilizando POP6 (Applied Biosystems) e tampão TAE 1x durante 54 °C por 30 minutos, 1300 volts, com laser de potência de 25%.

#### 4.8.11 Edição, avaliação da qualidade e análise das sequências geradas

Sequências consenso foram obtidas usando o programa CodonCode Aligner Versão 3.7.1. (CodonCode Corporation, Centerville, MA, EUA). As sequências usadas foram pesquisadas no BLASTn ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) (ALTSCHUL et al., 1990) de forma a confirmar identificações preliminares.

#### 4.9 Estudo da termotolerância das cepas de *Aspergillus* Seção *Flavi*

Para verificar a termotolerância dos isolados, cada cepa de *Aspergillus* Seção *Flavi* foi semeada em 3 placas de Petri (90x15 mm) contendo ágar CZ, MEA, PDA e incubadas, no escuro, em 3 diferentes temperaturas (25, 37 e 42 °C) (PETERSON et al., 2001, KURTZMAN et al., 1987), totalizando 9 placas por cepa. Os diâmetros das colônias foram mensuradas após 7 dias de incubação utilizando régua milimétrica.

#### 4.10 Avaliação da produção de ácido aspergílico

A produção de ácido aspergílico foi avaliada utilizando o AFPA (PITT et al., 1983). Cada isolado de *Aspergillus* Seção *Flavi* foi semeado em placa de Petri (60x15 mm) contendo AFPA e observados o verso após incubação a 30 °C por 48h. A presença de coloração laranja foi considerada positiva para produção de ácido aspergílico. Esta reação ocorre em cepas de *A. flavus* e *A. parasiticus*, os quais produzem moléculas de ácido aspergílico que reagem citrato férrico presente na composição do meio.

#### 4.11 Capacidade de produção de esclerócios

A capacidade de produção de esclerócios foi avaliada utilizando a metodologia de Barros et al. (2006). Para tal, cada cepa de *Aspergillus* foi cultivada em ágar CZ e mantida a 30 °C, por 14 dias. Em seguida, a superfície da cultura foi lavada com solução Tween 20 (100 µL/L) e filtrada em papel de filtro Whatmann. Os esclerócios foram secos e armazenados em microtubos de 1,5 mL a -4 °C. Cada cepa foi classificada em produtora ou não produtora. Quando produzidos, 10 esclerócios foram selecionados aleatoriamente e a média do diâmetro, em micrômetros, foi realizada no microscópio Nikon, com o auxílio de uma lâmina

milimétrica ( $5+ 100/100 \text{ mm} \pm 0,2 \text{ }\mu\text{m}$ ) e ocular com retículo (CRL W 10x/18) da marca Carl Zeiss do Brasil (SP, Brasil).



### 5.1 Tu e Aa das amostras de amêndoas e cascas

A média geral do Tu das 200 amostras de amêndoa foi de 4,4%, sendo o maior valor médio encontrado no Amapá (5,8%) e o menor (3,7%) no Acre. Em relação às 200 amostras de casca, a média do teor de umidade foi de 14,9%, sendo a maior média nas amostras do Amapá (16,7%) e a menor no Amazonas (14,1%) (Tabela 1).

A mensuração dos níveis de Aa revelou que a média geral nas amostras de amêndoa foi de 0,76, com a maior média (0,81) no Amazonas e a menor (0,65) no Pará. Já em relação às amostras de cascas, a média geral foi de 0,70, sendo a maior média, mas amostras do Acre (0,77) e a menor no Pará (0,63) (Tabela 1).

**Tabela 1** – Níveis de atividade de água e de teor de umidade (médios, máximos, mínimos e desvio padrão) em amostras de castanha-do-Brasil (200 amêndoas e 200 cascas) dos 4 Estados brasileiros estudados

Estados	Amostras	Atividade de água				Teor de umidade (%)			
		Média <sup>a</sup>	DP <sup>b</sup>	Max <sup>c</sup>	Min <sup>d</sup>	Média	DP	Max	Min
AC	Amêndoa	0,85	0,08	0,96	0,69	3,70	0,36	5,30	3,20
	Casca	0,77	0,10	0,94	0,51	14,30	0,50	15,30	13,40
AM	Amêndoa	0,81	0,05	0,93	0,68	3,83	0,25	4,50	3,40
	Casca	0,75	0,06	0,87	0,58	14,1	0,66	16,30	13,10
AP	Amêndoa	0,76	0,11	0,95	0,55	5,82	1,59	10,30	3,80
	Casca	0,68	0,08	0,85	0,56	16,73	2,44	22,00	12,90
PA	Amêndoa	0,64	0,06	0,79	0,56	4,15	0,85	8,30	2,50
	Casca	0,62	0,03	0,71	0,55	14,51	1,36	17,10	12,20

<sup>a</sup>Nível médio

<sup>b</sup> Desvio padrão

<sup>c</sup>Nível máximo

<sup>d</sup>Nível mínimo

### 5.2 Micobiota das amostras de amêndoas e cascas

A pesquisa da micobiota das amostras de castanha-do-Brasil (cascas-200 e amêndoas-200), provenientes dos 4 Estados, realizada por morfologia clássica e molecular, revelou a presença dos seguintes fungos por ordem decrescente de frequência: Amêndoas- *Phialemonium* spp. (54%); *Penicillium* spp. (16%) *Fusarium* spp. (13%); *Phaeoacremonium* spp. (11%) e *Aspergillus* spp. (4%) (Tabela 2); Cascas- *Phialemonium* spp. (62%); *Phaeoacremonium* spp. (11%); *Penicillium* spp. (10%) *Fusarium* spp. (9%) e *Aspergillus* spp.

(5%) (Tabela 2). Dentro do gênero *Phialemonium*, o mais frequente nas amostras analisadas, a espécie *P. dimorphosporum* (= *P. curvatum*).

**Tabela 2** - Principais gêneros fúngicos isolados de 400 amostras de amêndoas (200) e cascas (200) provenientes dos 4 Estados brasileiros em estudo (Acre - AC, Amazonas – AM, Amapá – AP, Pará – PA)

Estados	Amostras	Frequência dos principais fungos isolados				
		<i>Aspergillus spp.</i>	<i>Phialemonium spp.</i>	<i>Phaeoacremonium spp.</i>	<i>Penicillium spp.</i>	<i>Fusarium spp.</i>
AC	Amêndoa	10%	61%	10%	11%	5%
	Casca	16%	57%	5%	16%	2%
AM	Amêndoa	1%	50%	12%	14%	22%
	Casca	1%	68%	9%	11%	10%
AP	Amêndoa	3%	54%	12%	6%	23%
	Casca	3%	55%	12%	6%	24%
PA	Amêndoa	2%	50%	12%	34%	2%
	Casca	2%	68%	19%	9%	2%
Média	Amêndoa	4%	54%	11%	16%	13%
	Casca	5%	62%	11%	10%	9%

A presença do gênero *Aspergillus* spp., considerado um dos mais importantes fungos do ponto de vista micotoxicológico, foi constatada nas cascas (5%) e amêndoas (4%). Em relação ao grau de contaminação (número de UFC/g) foram detectados os seguintes valores de *Aspergillus*: amêndoas: 307 UFC/g (AM); 910 UFC/g (AC); 377 UFC/g (AP) e 91 UFC/g (PA). Nas cascas, os resultados foram: 1948 UFC/g (AM); 9000 UFC/g (AC); 1521 UFC/g (AP) e 687 UFC/g (PA).

### **5.3 Padronização da metodologia para pesquisa de aflatoxinas**

O método proposto para detecção de aflatoxinas nas amostras, baseado nos descritos por Leuret et al. (2004) e Tanaka et al. (2002) com modificações, foi escolhido por apresentar maior confiabilidade.

#### **5.3.1 LD e LQ para aflatoxinas**

Para amêndoas e cascas de castanha-do-Brasil, os limites de quantificação e detecção para todas as aflatoxinas foram 1,5 µg/kg e 0,75 µg/kg, respectivamente.

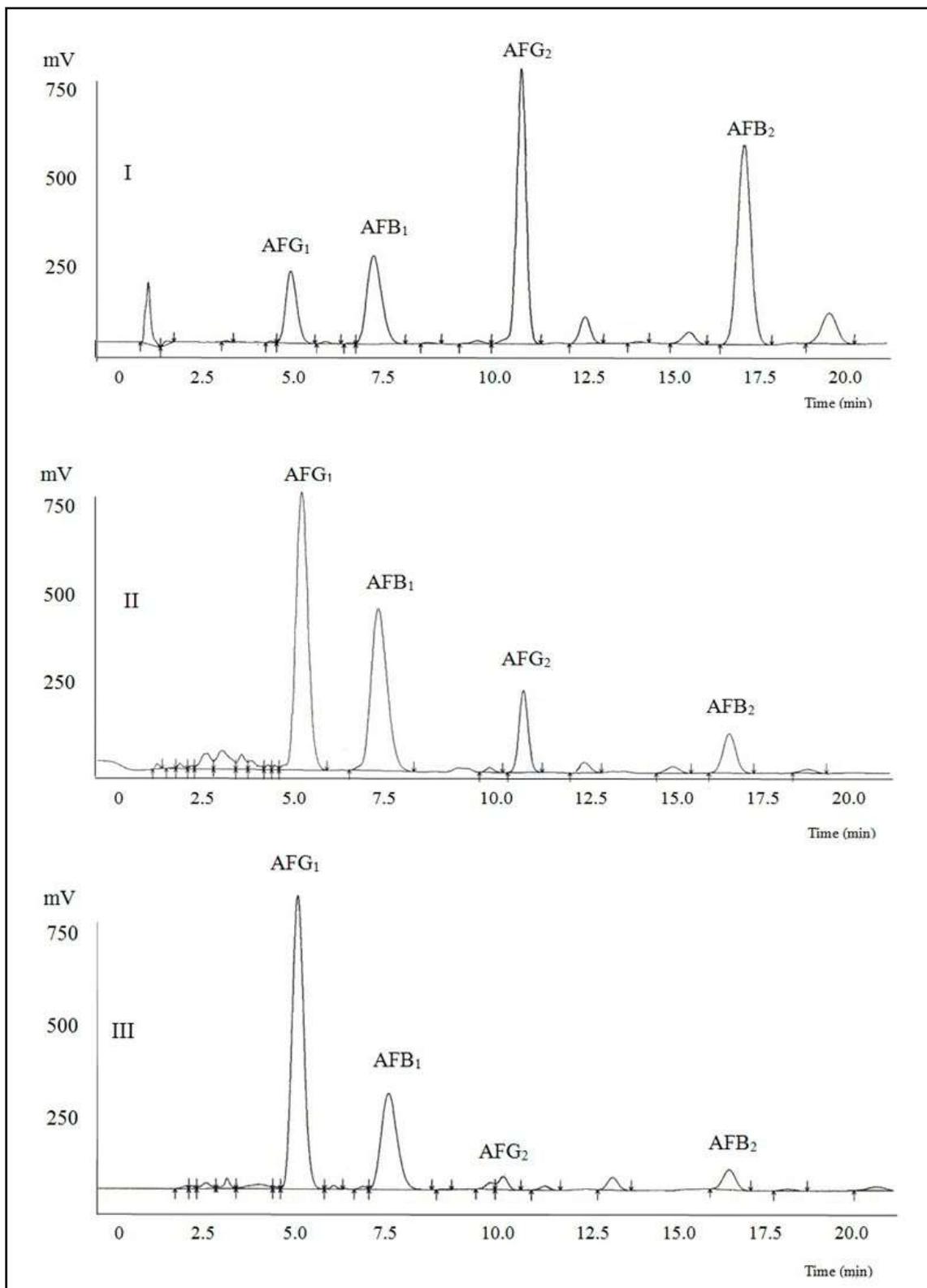
#### **5.3.2 Teste de recuperação para aflatoxinas**

Os coeficientes de recuperação obtidos foram para aflatoxinas B<sub>1</sub>, 80,44%; B<sub>2</sub>, 83,28%; G<sub>1</sub>, 116,06% e G<sub>2</sub>, 84,26%, e os coeficientes de variação da recuperação foram: 6,4%; 3,5%; 4,7%, e 6,7% para AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>, respectivamente. Os tempos de retenção foram 5; 7,5; 11 e 17 minutos (± 5%) para AFG<sub>1</sub>, AFB<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub> e AFB<sub>2</sub>, respectivamente (Figura 53).

#### **5.3.3 Curvas de calibração para aflatoxinas**

Os valores dos coeficientes de correlação foram de 0,999 para todas as aflatoxinas (Figura 53).

**Figura 53** – Representação cromatográfica das aflatoxinas: (I) padrões, (II) amostra de amêndoa e (III) amostra de casca



#### 5.3.4 Determinação de aflatoxinas em 400 amostras de amêndoas (200) e cascas (200) de castanhas-do-Brasil

Em relação à pesquisa de aflatoxinas nas 200 amostras de amêndoas, foram encontrados os seguintes resultados positivos para aflatoxinas: Acre (8%), Amazonas (18%), Amapá (10%) e Pará (8%) (Tabela 3).

Das 4 amostras positivas do estado do Acre, todas apresentaram níveis superiores a 15  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Segundo a ANVISA (2011), o limite máximo de tolerância para aflatoxinas em castanha-do-Brasil sem casca para processamento posterior é de 15  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Nessa região também foi detectada amostra com maior concentração de aflatoxinas: 1.058,00  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para  $\text{AFB}_1$  e 1.655,04  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para aflatoxinas total. Das 9 amostras positivas provenientes do estado do Amazonas, 8 estavam com níveis de aflatoxinas total acima de 15  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . No estado do Amapá, das amostras contaminadas, apenas uma esteve acima de 15  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (46,41  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de aflatoxinas total). Quatro amostras positivas também foram encontradas nas amêndoas provenientes do estado do Pará, porém, o valor máximo detectado foi de 7,12  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de aflatoxinas total. Em relação à presença de aflatoxinas nas 200 amostras de cascas, os valores detectados foram abaixo dos encontrados nas amêndoas: Acre (10%), Amazonas (14%), Amapá (10%) e Pará (4%) (Tabela 3).

**Tabela 3-** Porcentagens de contaminação por aflatoxinas e os valores médios encontrados em 400 amostras de castanhas-do-Brasil (200 amêndoas e 200 cascas) provenientes dos 4 Estados brasileiros (Acre - AC, Amazonas – AM, Amapá – AP, Pará – PA)

Estados	Amostras	Aflatoxinas							
		AFB <sub>1</sub>		AFB <sub>2</sub>		AFG <sub>1</sub>		AFG <sub>2</sub>	
		Amostras positivas (%)	Faixa (µg/kg)						
AC	Amêndoa	8	11,9-1.058,0	6	13,7 – 130,4	6	17,9 – 243,0	4	14,7-223,6
	Casca	12	6,8 – 61,8	4	1,1 – 3,1	8	4,4-46,3	2	6,0
AM	Amêndoa	18	6,8- 36,6	4	1,1 – 1,6	14	2,7 – 12,6	2	1,8
	Casca	14	2,9 – 9,5	ND <sup>a</sup>	-	14	1,6 – 3,2	ND	-
AP	Amêndoa	10	2,5 – 38,7	4	0,5 – 7,7	2	2,9	2	0,8
	Casca	10	3,6 – 15,1	ND	-	2	1,9	ND	-
PA	Amêndoa	8	1,7 – 6,9	ND	-	ND	-	ND	-
	Casca	4	2,8 – 3,3	ND	-	ND	-	ND	-

<sup>a</sup> Não detectado.

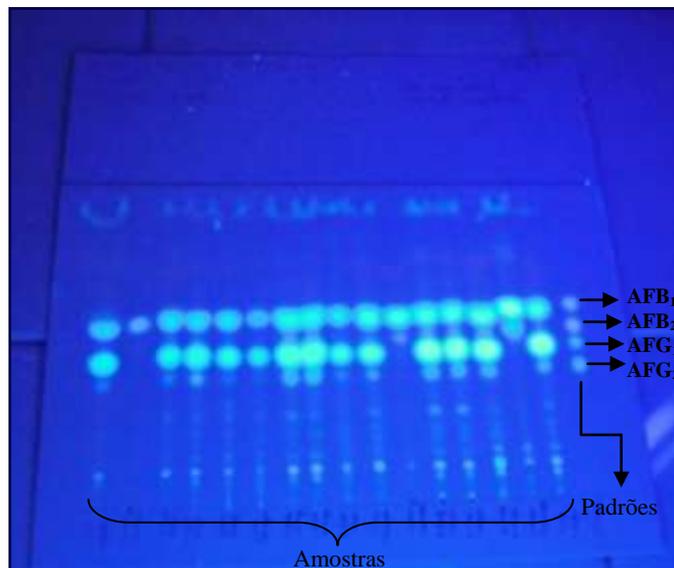
### 5.3.5 Potencial aflatoxigênico das cepas de *Aspergillus* isoladas

Através da CCD foi possível fazer uma triagem das cepas aflatoxigênicas e inferir o coeficiente de diluição dos extratos, previamente à separação por CLAE (Figura 54).

Os níveis de aflatoxinas B<sub>1</sub> variaram de 12,47 µg/kg (amêndoa do Estado do Acre) a 349.070,06 µg/kg (amêndoa do Estado do Amazonas). Em relação à aflatoxina B<sub>2</sub> variaram de 6,98 µg/kg (casca do Estado do Amazonas) a 4.690,27 µg/kg (amêndoa do Estado do Amazonas). Para aflatoxina G<sub>1</sub> os valores foram de 11,60 µg/kg (amêndoa do Estado do Amapá) a 43.196.137,65 µg/kg (amêndoa do Estado do Acre), e para G<sub>2</sub> 9,57 µg/kg (casca do Estado do Pará) a 14.687,02 µg/kg (amêndoa do Estado do Amazonas).

O potencial aflatoxigênico das cepas referentes às amostras de castanhas orgânicas revelou que os níveis de AFB<sub>1</sub> variaram de 0,78 µg/kg a 1.167,03 µg/kg, AFB<sub>2</sub> de 1,15 a 22,57 µg/kg, AFG<sub>1</sub> de 11,12 a 8.337,03 µg/kg e AFG<sub>2</sub> de 1,14 a 4,92 µg/kg.

**Figura 54-** CCD visualizada sob luz UV (360 nm) para separação de aflatoxinas



## 5.4 Metodologia para pesquisa de ACP

A metodologia que apresentou melhores resultados foi a de Urano et al. (1992) com modificações descritas na seção 4.6.2.

### 5.4.1 LD e LQ para ACP

Tanto para amêndoas, quanto para cascas de castanha-do-Brasil, os LD e LQ foram 50,0 µg/kg e 100,0 µg/kg, respectivamente.

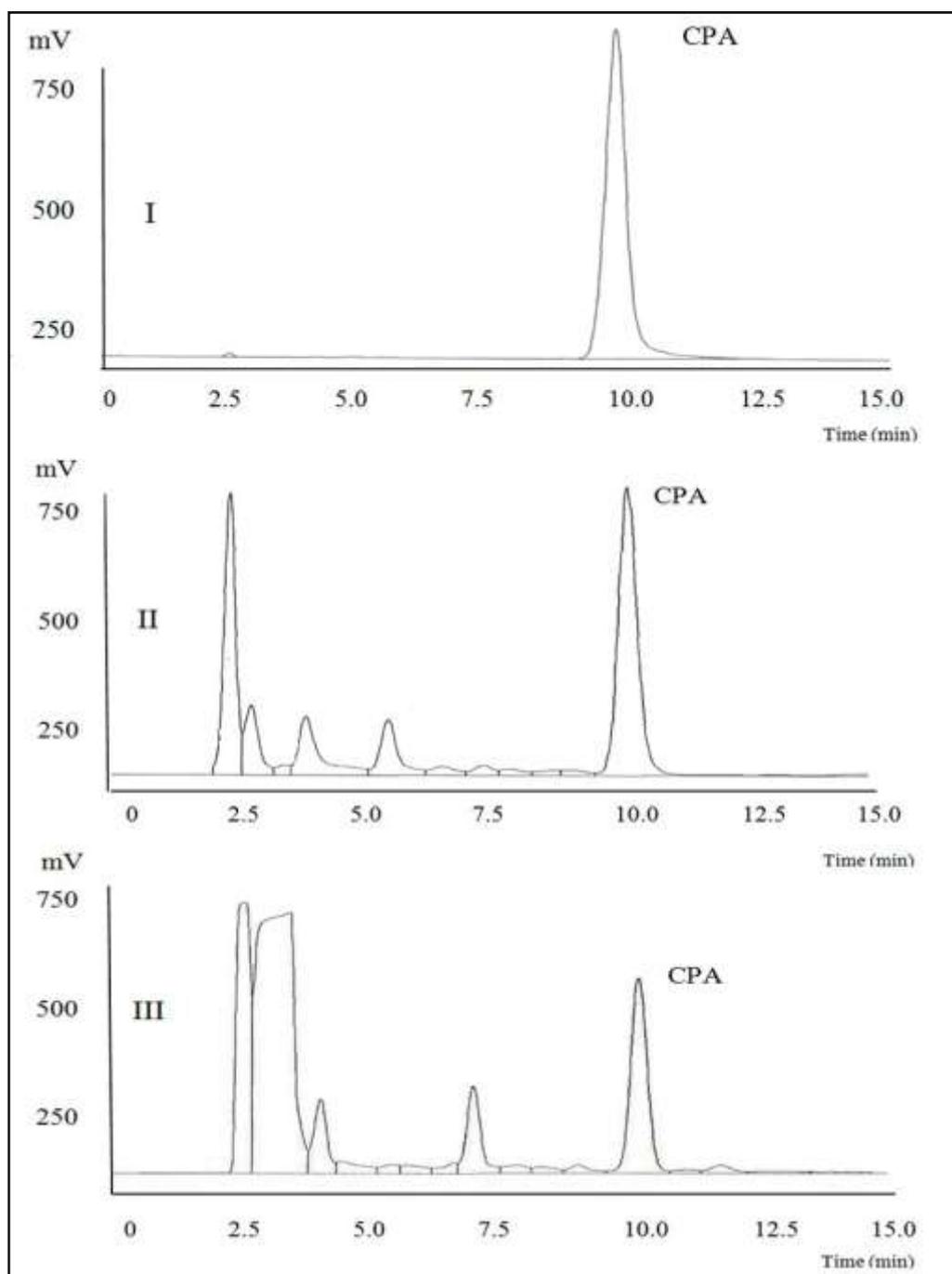
### 5.4.2 Curva de calibração para ACP

O valor do coeficiente de correlação foi de 0,999.

### 5.4.3 Teste de recuperação para ACP

A recuperação média foi de 82% para amêndoas e 74% para cascas. e os coeficientes de variação da recuperação foram de 6,5 e 7,0% para amêndoas e cascas, respectivamente. O tempo de retenção foi 10 minutos ( $\pm 5\%$ ) (Figura 55).

**Figura 55** – Representação cromatográfica de ACP: (I) padrão, (II) amostra de amêndoa e (III) amostra de casca



#### 5.4.4 Determinação de ACP em amostras de castanhas-do-Brasil

A pesquisa de ácido ciclopiazônico nas 200 amostras de amêndoas revelou os seguintes resultados positivos: Acre (6%), Amazonas (2%), Amapá (4%) e Pará (10%).

As amostras (3) positivas provenientes do Estado no Acre apresentaram valores entre 124,67 µg/kg a 151,33 µg/kg; amostra (1) positiva proveniente do Estado do Amazonas apresentou concentração de 132,86 µg/kg. Das amostras do Amapá, 2 foram positivas com valores de 143,26 µg/kg e 161,2 µg/kg e das amêndoas provenientes do Estado do Pará 5 (cinco) apresentaram valores entre 98,65 µg/kg a 123,31 µg/kg. Nas cascas, a presença de ACP foi constatada em 10% das amostras do Acre, 10% do Amapá e 10% no Pará (Tabela 4). Salienta-se a não detecção de ACP nas amostras provenientes do Amazonas.

**Tabela 4-** Porcentagens de contaminação por ácido ciclopiazônico e os valores médios encontrados em 400 amostras de castanhas-do-Brasil (200 amêndoas e 200 cascas) provenientes dos 4 estados brasileiros em estudo (Acre - AC, Amazonas – AM, Amapá – AP, Pará – PA)

Estados	Amostras	Amostras positivas (%)	Faixa(µg/kg)
AC	Amêndoa	6	124,7 – 151,3
	Casca	10	101,3 – 133,5
AM	Amêndoa	2	132,8
	Casca	ND <sup>a</sup>	ND
AP	Amêndoa	4	143,3 – 161,2
	Casca	10	105,8 – 133,5
PA	Amêndoa	10	98,65 -123,31
	Casca	10	101,9 – 151,1

<sup>a</sup> Não detectado.

#### 5.4.5 Potencial de produção de ACP das cepas de *Aspergillus* isoladas

O valor médio das 43 cepas de *Aspergillus* produtoras de ACP foi de 2.889,56 µg/kg. Os níveis mínimo e máximo foram de 353,38 µg/kg e 7.991,67 µg/kg, respectivamente, e ambos determinados em cepas isoladas de amêndoas provenientes do Estado do Amapá.

### 5.5 Análise de selênio nas amostras de amêndoas

A determinação de selênio nas amostras de amêndoas de castanha-do-Brasil revelou maior concentração média de selênio nas amostras provenientes do Amazonas e a menor naquelas provenientes do Acre (Tabela 5).

**Tabela 5** - Concentração média de selênio (mg/kg) em amostras de amêndoas

Estados	Concentração de selênio (mg/kg)
AC	1,71
AM	6,65
AP	5,81
PA	5,14

### 5.6 Identificação molecular de fungos

A identificação molecular foi realizada através do sequenciamento da região ITS, parte do gene calmodulina e  $\beta$ -tubulina, sendo possível identificar todas as espécies de *Aspergillus* isoladas (Tabelas 6 e 7).

Dentre as 254 *Aspergillus* espécies isoladas de amêndoas e cascas, 98 cepas foram provenientes do Acre, 31 do Amazonas, 81 do Amapá e 44 do Pará. Dentre elas, 240 são pertencentes à Seção *Flavi*. A espécie mais frequentemente isolada foi *A. nomius*, seguida por *A. flavus*. Em menor quantidade foram isolados *A. parasiticus*, *A. pseudotamarii*, *A. tamarii* e *A. caelatus*. Outras espécies de *Aspergillus* não pertencentes à Seção *Flavi* também foram identificadas: *A. sclerotium*, *A. versicolor*, *A. sydowii* e *A. persii*. Ao todo foram classificadas 240 cepas de *Aspergillus* Seção *Flavi*.

Já em relação às amostras orgânicas de castanha-do-Brasil, foram isolados 47 cepas de *Aspergillus* Seção *Flavi*, sendo a maioria classificada como *A. flavus*, seguida por *A. nomius*, *A. caelatus* e *A. tamarii*. Outras espécies não foram encontradas nestas amostras.

**Tabela 6** – Frequência absoluta das espécies de *Aspergillus* isoladas nas amostras de castanhas-do-Brasil provenientes de diferentes Estados brasileiros, incluindo as procedentes das amostras orgânicas

Procedência das cepas	Espécies de <i>Aspergillus</i>									
	<i>A. nomius</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. parasiticus</i>	<i>A. pseudotamarii</i>	<i>A. caelatus</i>	<i>A. tamarii</i>	<i>A. sclerotium</i>	<i>A. persii</i>	<i>A. sydowii</i>	<i>A. versicolor</i>
AC	50	30	2	2	0	6	1	0	2	5
AM	24	4	0	0	1	1	0	0	0	1
AP	55	22	2	0	0	0	0	1	0	1
PA	25	14	1	0	1	0	0	0	2	1
Orgânicas	6	35	0	0	5	1	0	0	0	0

**Tabela 7** – Frequência relativa das 254 cepas *Aspergillus* isoladas das amostras de castanhas-do-Brasil provenientes dos 4 Estados brasileiros em estudo (Acre - AC, Amazonas – AM, Amapá – AP, Pará – PA)

Estados	Amostras	Frequência das espécies de <i>Aspergillus</i> (%)									
		<i>A. nomius</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. parasiticus</i>	<i>A. pseudotamarii</i>	<i>A. caelatus</i>	<i>A. tamarii</i>	<i>A. sclerotium</i>	<i>A. sydowii</i>	<i>A. persii</i>	<i>A. versicolor</i>
AC	Amêndoa	52,5	17,5	2,5	0	0	15,0	2,5	2,5	0	7,5
	Casca	50,0	39,6	1,7	3,5	0	0	0	1,7	0	3,5
AM	Amêndoa	80,0	13,3	0	0	0	0	0	0	0	6,7
	Casca	75,0	12,5	0	0	6,25	6,25	0	0	0	0
AP	Amêndoa	67,7	19,4	6,5	0	0	0	0	0	3,2	3,2
	Casca	66,0	34,0	0	0	0	0	0	0	0	0
PA	Amêndoa	7,7	69,2	0	0	0	0	0	15,4	0	7,7
	Casca	77,4	16,2	3,2	0	3,2	0	0	0	0	0
Média	Amêndoa	56,0	24,5	2,85	0	0	6,1	0,8	2,85	0,8	6,1
	Casca	63,8	30,5	1,3	1,3	1,3	0,5	0	0	0	1,3

### **5.7 Estudo da termotolerância das cepas de *Aspergillus* Seção *Flavi***

O estudo de termotolerância demonstrou que todos os isolados cresceram vigorosamente em 7 dias às temperaturas de 25 e 37 °C, com crescimento médio de 63 e 56 mm, respectivamente. Por outro lado, os isolados testados a 42 °C tiveram crescimento médio de 22 mm. Esse resultado descartou a possibilidade de isolamento de *A. bombycis*, espécie estreitamente relacionada à *A. nomius*.

### **5.8 Produção de ácido aspergílico pelas cepas de *Aspergillus* Seção *Flavi***

Os isolados de *A. flavus* aflatoxigênicos e não-aflatoxigênicos e *A. parasiticus* apresentaram verso alaranjado, o que confirma a produção de ácido aspergílico em AFPA. As cepas de *A. nomius* apresentaram, em geral, coloração bege, sendo que algumas apresentaram produção de ácido aspergílico.

### **5.9 Estudo da produção de esclerócios pelas cepas de *Aspergillus* Seção *Flavi***

Todos os esclerócios analisados foram considerados do tipo L (large), ou seja, apresentaram diâmetro acima de 400 µm. De modo que todos estavam na faixa de 400 a 1100 µm de diâmetro.

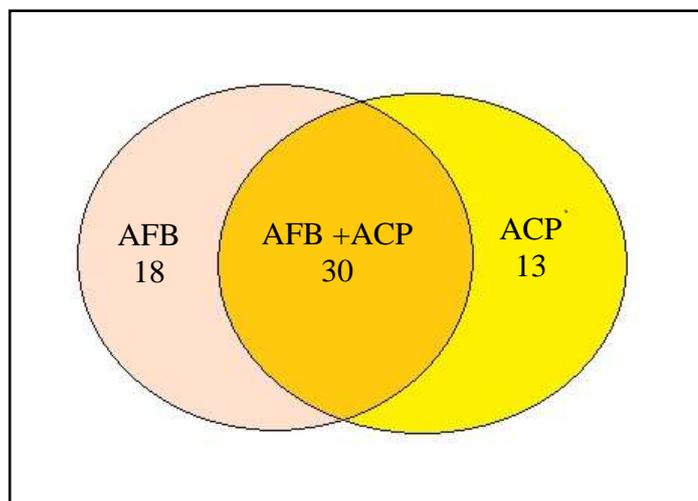
Dentre as 240 cepas de *Aspergillus* testadas para produção de esclerócios, 70 os produziram. Destas, 53 foram identificadas como *A. nomius* e 17 como *A. flavus*, sendo 15 aflatoxigênicas e, as outras 2 não foram produtoras de aflatoxinas.

Em relação aos 47 isolados provenientes das amostras orgânicas, apenas 3 produziram esclerócios, sendo 1 *A. nomius*, 1 *A. flavus* aflatoxigênico e 1 *A. flavus* não-aflatoxigênico.

### **5.10 *Aspergillus* Seção *Flavi* e potencial micotoxigênico**

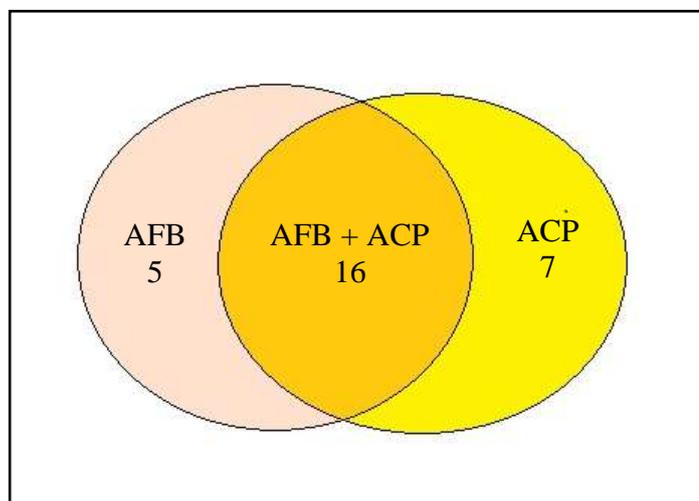
Todas as cepas de *A. nomius* (155/155), *A. pseudotamarii* (2/2) e *A. parasiticus* (5/5) produziram AFB e AFG, porém, nenhuma delas produziu ACP, já as cepas de *A. tamarii* (0/7) e *A. caelatus* (0/2) isoladas não produziram nem aflatoxinas e nem ACP. Do total das 71 cepas de *A. flavus* isoladas 85,1% (61/71) foram micotoxigênicas, sendo que 25,3% (18/71) produziram somente AFB, 18,3% (13/71) produziram somente ACP e 42,2% (30/71), tanto AFB quanto ACP concomitantemente (Figura 56).

**Figura 56** – Representação do número de cepas de *A. flavus* micotoxigênicas isoladas das 4 cooperativas



Dos 47 isolados de *Aspergillus* Seção *Flavi* referentes às amostras de castanha orgânica, 74,4% (35/47) foram classificados como *A. flavus*, seguido de *A. nomius* (12,7%, 6/47), *A. caelatus* (10,6%, 5/47) e *A. tamaritii* (2,1%, 1/47). Em relação ao potencial micotoxigênico das referidas cepas, todas as cepas de *A. nomius* foram produtoras de AFB e AFG e nenhuma delas produziram ACP, já no que concernem as cepas *A. flavus*, 80% (28/35) foram micotoxigênicas, sendo que 14,2% (5/35) cepas produziram apenas AFB, 20% (7/35) produziram somente ACP e 45,7% (16/35) produziram AFB e ACP concomitantemente. As cepas isoladas das amostras de castanha orgânicas de *A. tamaritii* e *A. caelatus* também não foram aflatoxigênicas e tampouco produziram ACP. Em referência ao ACP, 65,7% (23/35) das cepas de *A. flavus* foram produtoras (Figura 57).

**Figura 57** – Representação do número de cepas de *A. flavus* micotoxigênicas isoladas das amostras orgânicas





As características extrativas do modo de produção da castanha-do-Brasil são difíceis de serem controladas (FREITAS-SILVA; VENÂNCIO, 2011). Além disso, o clima da região amazônica, caracterizado por uma temperatura média de 26 °C e umidade relativa de 80-95% favorecem o crescimento fúngico. Com isso, indústrias e produtores têm realizado esforços consideráveis ao longo dos últimos 15 anos para minimizar o crescimento de fungos, principalmente *Aspergillus* e, conseqüentemente, a contaminação por aflatoxinas.

As principais etapas da produção da castanha-do-Brasil são: coleta do ouriço na floresta, abertura do fruto, retirada das sementes, armazenamento em paiós e transporte para as cooperativas, onde são beneficiadas e comercializadas (FREITAS-SILVA; VENÂNCIO, 2011). Na floresta amazônica, após a queda dos ouriços, eles ficam em contato direto com o solo durante vários dias antes da coleta e, durante este tempo, o fruto pode ser contaminado com espécies de fungos (ARRUS et al., 2005). Trabalho realizado por Baquião et al. (2012) apontou o solo como a principal via de contaminação por fungos em castanhas-do-Brasil.

A partir do solo, reconhecido como paraíso dos fungos, a infecção fúngica pode ocorrer através porosidade da casca (SPENCER, 1921), fissuras feitas por insetos, pássaros ou outros danos mecânicos. Essas condições associadas ao clima da região favorecem a penetração e propagação de fungos do ouriço, para a casca e, finalmente, atingindo a amêndoa das castanhas (ARRUS et al., 2005; CASTRILLON; PURCHIO, 1988).

Em nosso estudo foi observado maior frequência de isolamento de fungos nas cascas do que nas amêndoas. As cascas das castanha-do-Brasil são compostas principalmente de lignina e celulose (BONELLI et al., 2001). A celulose fornece característica higroscópica à casca, que associada à condição climática da região amazônica, confere à casca seu maior teor de umidade. Há uma tendência para o equilíbrio higroscópico entre umidade relativa do ar de umidade e o teor de água da casca. Por outro lado, devido ao seu elevado teor de lipídios (característica hidrofóbica) nas amêndoas, o teor de umidade das cascas não é inteiramente transferido para amêndoas. Isto pode explicar os diferentes valores de umidade encontrados em amostras de casca (média: 14,96) e amêndoa (média: 4,37). Embora o teor de umidade mensure uma quantidade total de água em determinado substrato, a atividade de água refere-se à quantidade de água livre, disponível ao crescimento de micro-organismos. No ponto de equilíbrio higroscópico são esperados valores similares de atividade de água entre cascas e amêndoas. No presente estudo, os níveis médios de atividade de água foram 0,70 e 0,76 para cascas e amêndoas, respectivamente. Ressaltamos que esses valores estavam abaixo do intervalo mínimo de atividade de água (0,78-0,80) estabelecido para o crescimento de *Aspergillus* (LACEY et al., 1991) e produção de micotoxinas (superior a 0,85) (SCHMIDT-

HEYDT et al., 2009). A maior frequência de isolamento fúngico nas cascas, comparativamente as amêndoas, pode ser atribuída à proteção exercida pela casca da castanha, mantendo assim a qualidade da amêndoa (RIBEIRO et al., 1993).

No presente estudo, *Phialemonium* spp. foi o principal fungo isolado. De acordo com Guarro et al. (1999), *Phialemonium* spp. é caracterizado pela sua semelhança morfológica com o gêneros *Fusarium* e *Acremonium*. *Phialemonium* spp. é um fungo demáceo, sem pigmentação escura evidente. Esse gênero fúngico foi inicialmente descrito como intermediário entre os gêneros *Acremonium* spp. e *Phialophora* spp. (GAMS; MCGINNIS, 1983). O gênero *Phialemonium* inclui as espécies o *Phialemonium curvatum*, *Phialemonium dimorphosporum* e *Phialemonium obovatum*. No entanto, *P. dimorphosporum*, a espécie mais frequente, é considerada um sinônimo de *P. curvatum* (GUARRO et al., 1999). Estes fungos são amplamente distribuídos na natureza e já foram isolados em solo, ar, efluentes industriais e esgotos (GAMS; MCGINNIS, 1983; PERDOMO et al., 2011).

Bitancourt (1941) isolou dentre outros fungos, *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Cephalosporium* spp. (= *Acremonium* spp.). Castrillon e Purchio (1988) identificaram *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Acremonium* spp. como gêneros dominantes isolados em amostras de castanha-do-Brasil. Freire et al. (2000) relataram o predomínio de *Aspergillus* spp. em cascas de castanha-do-Brasil, ademais outros gêneros fúngicos como *Penicillium*, *Cunninghamella*, *Rhizopus*, *Fusarium* e *Acremonium*, também foram isolados neste estudo.

Em relação às espécies de *Aspergillus*, a diferenciação morfológica (macro e microscopia) não é suficiente para distingui-los, isso ocorre devido às semelhanças interespecíficas e variabilidade intraespecífica de seus isolados (RODRIGUES et al., 2009). Samson e Varga (2009) relataram que, isoladamente, nenhum método é perfeito para identificação das espécies. De acordo com os autores, a taxonomia polifásica, com o emprego de estudos morfológicos, análise de extrólitos e sequenciamento de diferentes regiões do DNA, devem ser considerados em conjunto. No presente trabalho, as espécies de *Aspergillus* isoladas foram identificadas utilizando uma abordagem polifásica. Consoante à nossa investigação, autores citam a dificuldade de, através de estudo morfológico, diferenciar as espécies *A. flavus* e *A. nomius*, pois estas compartilham muitas características comuns (KURTZMAN et al., 1987). Neste caso, para diferenciá-las é necessário conhecer o perfil toxigênico, uma vez que *A. flavus* pode produzir AFB e *A. nomius* produz AFB e AFG. Outra constatação importante é o fato de isolados de *A. nomius* não produzirem ACP e, além disso, eles são diferenciados pela sequência de nucleotídeos de seus genes. Semelhanças morfológicas também são encontradas entre as espécies *A. nomius* e *A. bombycis*, que também

apresentam o mesmo perfil de produção de aflatoxinas (AFB e AFG). Nesse caso, para diferenciá-las é necessário estudar a taxa de crescimento e realizar sequenciamento de diferentes regiões do DNA (PETERSON et al., 2001). No quesito termorresistência, isolados de *A. bombycis* crescem moderadamente a 37 °C (em média 15 mm de diâmetro), porém, não crescem a 42 °C. Por outro lado, isolados de *A. nomius* crescem vigorosamente a 37 °C (em média 65 mm de diâmetro) e também crescem a 42 °C (em média 19,8 mm de diâmetro) (PETERSON et al., 2001). Em nosso trabalho, todos os isolados testados cresceram a 42 °C, excluindo a hipótese de se tratar de *A. bombycis*. Sendo assim, a combinação de resultados obtidos da morfologia, da determinação do potencial de produção de micotoxinas (aflatoxinas e ACP), da produção de ácido aspergílico em AFPA, de testes de termorresistência e da análise de sequências de 3 genes (ITS, calmodulina e  $\beta$ -tubulina) foi capaz de assegurar a identificação das espécies de *Aspergillus* isoladas.

Dentro do gênero *Aspergillus*, a maior frequência de isolamento de *A. nomius* vem de encontro com os achados de Olsen et al. (2008), que estudaram lotes de castanha-do-Brasil. Nesse estudo, isolados de *A. nomius* produziram altos níveis de aflatoxinas.

Além de ter sido isolado em castanhas-do-Brasil (BAQUIÃO et al., 2012; CALDERARI et al., 2013; GONÇALVES, J. C. et al., 2012; OLSEN et al., 2008), *Aspergillus nomius* já foi encontrado em pistache (FEIBELMAN et al., 1998), trigo (KURTZMAN et al., 1987), milho e amendoim (PITT et al., 1993), solo agrícola dos Estados Unidos (EGEL et al., 1994; KURTZMAN et al., 1987), do Irã (RAZZAGHI-ABYANEH et al., 2006) e da Tailândia (EHRlich et al., 2007). Amplamente distribuída na natureza, esta espécie é considerada grande produtora de aflatoxinas em castanhas-do-Brasil (STDF, 2009). Além disso, *A. nomius* reveste-se de grande importância pela produção de níveis mais elevados de aflatoxinas, comparativamente aos isolados de *A. flavus*.

Dos isolados de *Aspergillus*, a espécie *A. flavus*, a segunda mais frequente em nossa investigação, tem sido isolada predominantemente no solo, em produtos vegetais, principalmente amendoim, milho e em outras culturas (BARROS et al., 2006; NEPOTE et al., 1997; NESCI; ETCHEVERRY, 2002; NOVAS; CABRAL, 2002; PILDAIN et al., 2004, 2005; RESNIK et al., 1996; VAAMONDE et al., 1995). Algumas de suas espécies são capazes de produzir ACP concomitantemente às aflatoxinas (BURDOCK; FLAMM, 2000). Desta forma, a contaminação de alimentos por cepas de *A. flavus* capazes de produzir simultaneamente aflatoxinas e ACP pode resultar na coocorrência destas toxinas, como reportado por diversos estudos (FERNANDEZ-PINTO et al., 2001; LANDSEN; DAVIDSON, 1983; MARTINS; MARTINS, 1999; VAAMONDE et al., 2003). Múltiplos

fatores estão envolvidos no desenvolvimento de *A. flavus* e consequente na biossíntese de metabólitos secundários, como umidade, temperatura, composição do substrato, danos mecânicos ou causados por insetos, e a interação entre espécies fúngicas que compartilham o mesmo nicho ecológico (ASTORECA et al., 2013). Em nosso estudo, a coocorrência das espécies *A. flavus* e *A. nomius* no mesmo substrato pode ter ocasionado uma competição de ambas as espécies pelo mesmo substrato, sendo mais favorável ao *A. nomius* nas condições de armazenamento das cooperativas estudadas (Acre, Amazonas e Amapá).

Por sua vez, nas amostras orgânicas houve prevalência de *A. flavus*, indicando que o fungo está mais adaptado às condições de campo do que *A. nomius*. Esse resultado foi similar ao das amostras provenientes do Pará, onde não foi possível realizar a coleta em uma cooperativa propriamente dita. A maior frequência de *A. flavus* em amostras de castanha-do-Brasil está de acordo com os achados de Baquião et al. (2012). No citado estudo, as amostras provenientes da Agropecuária Aruanã (Itacoatiara, Amazonas) receberam, após o período da realização da pesquisa (2009), o selo oficial do Sistema Brasileiro de Avaliação da Conformidade Orgânica, concedido pela Tecpar (Instituto de Tecnologia do Paraná) credenciada para certificação de orgânicos com acreditação pelo INMETRO. As amostras orgânicas foram provenientes da cooperativa COVEMA (Manicoré, Amazonas), essa cooperativa obteve a certificação da IMO-Control em 2004.

Das 106 cepas de *A. flavus* (71 cepas do estudo original + 35 cepas isolados de castanhas orgânicas), 29,2% (31/106) foram não-aflatoxigênicas. Isolados de *A. flavus* não produtores de aflatoxinas não são comuns na Argentina (VAAMONDE et al., 2003), mas são predominantes no Irã, em solos utilizados para o cultivo de milho. Isolados não aflatoxigênicos são considerados de grande importância pela possibilidade de serem utilizados como agentes de biocontrole na prevenção de contaminação por espécies aflatoxigênicas (RAZZAGHI-ABYANEH et al., 2006)

Apesar do não isolamento de *A. parasiticus* em amostras de castanha-do-Brasil em estudos anteriores (ARRUS et al., 2005; BAQUIÃO et al., 2012), e o isolamento em baixa frequência em nossa pesquisa, trata-se de uma espécie importante do ponto de vista toxigênico, uma vez que isolados não-aflatoxigênicos desta espécie são raros (BLANEY et al., 1989; HORN et al., 1996; TRAN-DINH et al., 1999).

Estudo recente identificou uma nova espécie isolada de castanha-do-Brasil: *Aspergillus bertholletius*, cujos isolados são não-aflatoxigênicos (TANIWAK et al. 2012).

Por definição, a agricultura orgânica é um sistema de manejo sustentável da unidade de produção com enfoque sistêmico que privilegia a preservação ambiental, a

agrobiodiversidade, os ciclos biogeoquímicos e a qualidade da vida humana (RICCI et al., 2006). Como um dos critérios para obtenção da certificação orgânica, os extrativistas receberam treinamento para coleta e para os primeiros cuidados das castanhas, que incluíram pré-seleção das castanhas deterioradas, secagem adequada antes do encaminhamento às cooperativas. Ressaltamos que a castanha-do-Brasil é, naturalmente orgânica, pois não são utilizados agrotóxicos nos castanhais, entretanto para certificação orgânica é necessário que haja uma validação dessa qualidade. O fato de ser “livre de aflatoxina” compreende uma importante característica de um alimento orgânico.

Em relação aos esclerócios, a mais eficiente fonte de inoculo para iniciar o ciclo de infecção na planta hospedeira (WILSON et al., 1989), as condições de temperatura, meio de cultivo e tempo que utilizamos para indução da produção foram de 30 °C, em ágar CZ, por 14 dias (BARROS et al., 2006). Autores registraram que a temperatura atua como um fator muito importante para sua produção, sendo que a esporulação é aumentada gradativamente de 10 a 30-35 °C, principalmente em se tratando de ágar CZ e, em temperaturas superiores, observa-se diminuição da produção (GIORNI et al., 2012). No que se refere ao tamanho dos esclerócios foi observado que todos os isolados, quando produziram esclerócios, foram L. Outros trabalhos também relataram cepas L dominantes (HORN; DORNER, 1998), por outro lado, alguns autores encontraram maior número de cepas S (PROBST, 2005). Constatamos também baixa frequência de isolados produtores, visto que, das 106 cepas de *A. flavus* estudadas (71 cepas do estudo original + 35 cepas isolados de castanhas orgânicas), 79 foram aflatoxigênicas, e destas 20,2% (16/79) foram produtoras de esclerócios. Nosso resultado está de acordo com outros autores que reportaram que a produção de esclerócio é uma característica rara encontrada em algumas espécies de *A. flavus* (KOZAKIEWICZ et al., 1994). Já em relação às 161 cepas de *A. nomius* (155 cepas do estudo original + 6 cepas isolados de castanhas orgânicas) todas foram aflatoxigênicas e destas 32,9% (53/161) produziram esclerócios. Alguns autores não encontraram correlação entre produção de aflatoxinas e esclerócios (BENNETT et al., 1979; ABEYWICKRAMA; BEAN, 1991). Algumas tentativas de correlacionar altos índices de produção de aflatoxinas e esclerócios demonstram resultados contraditórios. Probst (2005) encontrou cepas S altamente produtoras de aflatoxinas, enquanto Abbas et al. (2005) constatou que cepas L produzem altos níveis de aflatoxinas. Existem indicações que o fenótipo produtor de esclerócios possa estar relacionado à procedência da cepa estudada (COTTY, 1997; HORN; DORNER, 1998; YIN et al., 2009), o que pode explicar a falta de consenso entre os autores. Em nosso estudo, nenhum comentário neste aspecto foi possível.

Dezoito aflatoxinas já foram identificadas, porém somente AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> são encontradas em alimentos (DECASTELLI et al., 2007). Uma maneira de controlar o consumo de alimentos contaminados por micotoxinas é realizada por leis. Atualmente, a regulamentação das aflatoxinas ocorre em mais de 75 países (EL TAVILA et al., 2013). Sendo que, em todo mundo, os limites de AFB<sub>1</sub> e aflatoxinas totais variam de 1 a 20 µg/kg e 0 a 35 µg/kg, respectivamente (FAO, 2004). A Comissão Europeia estabeleceu o limite máximo de tolerância para castanha-do-Brasil para processamento de 15 µg/kg para a soma das aflatoxinas AFB<sub>1</sub>+AFB<sub>2</sub>+AFG<sub>1</sub>+AFG<sub>2</sub> e 8 µg/kg para AFB<sub>1</sub> (CE, 2010). No ano seguinte, 2011, a ANVISA estabeleceu limites similares para comercialização do produto em mercado nacional (Quadro 7). Essa iniciativa aumentou a proteção dos consumidores brasileiros, pois evita que mercadorias rejeitadas por outros países sejam vendidas em território nacional. À vista disso, a presença de aflatoxinas em alimentos é uma questão de grande preocupação para exportadores e comerciantes locais de castanha-do-Brasil.

**Quadro 7** - Limites máximos toleráveis para aflatoxinas em castanha-do-Brasil no Brasil e na União Europeia

	AFB <sub>1</sub> (µg/kg)	Aflatoxinas totais (µg/kg)
<b>ANVISA</b>		
com casca para consumo direto	Não se aplica	20
sem casca para consumo direto	Não se aplica	10
sem casca para processamento posterior	Não se aplica	15
<b>União Europeia</b>		
sem casca para consumo direto	5	10
sem casca para processamento posterior	8	15

Fonte: ANVISA, 2011; Comissão Europeia (2010)

Em nosso estudo, os estados brasileiros que tiveram amostras com níveis de aflatoxinas superiores ao limite máximo de tolerância foram Amazonas (8/9) e Acre (4/4). Por outro lado, apenas uma amostra de Amapá (1/5) e nenhum do Pará (0/4) apresentaram níveis superiores a 15 µg/kg.

Em relação ao ACP, estudos sobre a ocorrência de desta micotoxinas em castanha-do-Brasil são escassos e, até o presente trabalho, não havia sido detectada ACP em amostras de castanha-do-Brasil (BAQUIÃO et al., 2012). Todavia, estudos confirmam a presença de ACP em amostras de amendoim, milho e tomate (MOTTA; SOARES, 2000; URANO et al., 1992; ZORZETE et al., 2011). Em nossa pesquisa, 5% das amostras de amêndoas foram positivas para ACP, sendo os níveis mínimo e máximo de 98,65  $\mu\text{g}/\text{kg}$  e 161,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectivamente (Tabela 4). É importante ressaltar que não há legislação no que diz respeito ao limite máximo tolerável de ACP em nenhum lugar do mundo.

Por sua vez, os dados obtidos da determinação de selênio das amêndoas indicaram que as amostras provenientes do Estado do Acre (Estado localizado a extremo oeste do Brasil) foram as que apresentaram menores concentrações de selênio (1,71 mg/kg) comparado às amostras provenientes dos demais Estados (Amazonas, Amapá e Pará), cuja média foi de 5,87 mg/kg. A detecção de menores níveis de Se nas amostras provenientes do oeste, em relação às amostras provenientes do leste da região norte do Brasil foi relatada em estudos anteriores (PACHECO; SCUSSEL, 2007), em que os níveis de selênio foram de 23,5 mg/kg e 43,8 mg/kg em amostras coletadas a oeste e leste, respectivamente. Este fato ocorre, pois a composição do solo da região apresenta quantidade de variável de Se (PACHECO e SCUSSEL, 2007). De acordo com FAO (1993), a razão das castanhas-do-Brasil serem ricas em selênio ocorre devido à similaridade química entre o selênio e o enxofre, que é um nutriente essencial para formação de aminoácidos (metionina e cisteína) e proteínas nas castanhas. Como existe deficiência de enxofre no solo amazônico, se o solo contiver Se, este pode ser utilizado pela planta substituindo o enxofre. Vale enfatizar que, a dose permitida de ingestão de Se é de 55  $\mu\text{g}$  por dia, para pessoas a partir do 14 anos de idade, sendo o limite de ingestão tolerável diária de 400  $\mu\text{g}$  (IOM, 2000). Considerando que uma amêndoa da castanha-do-Brasil tem em média 5 g, uma amêndoa proveniente da região do Acre, tem cerca de 8,5  $\mu\text{g}$  de Se, enquanto que uma amêndoa proveniente dos outros Estados estudados (Amazonas, Amapá e Pará) contém 29,3  $\mu\text{g}$  deste micronutriente.

Atualmente, não há uma tecnologia disponível que elimine completamente a contaminação por micotoxinas em alimentos (HALÁSZ et al., 2009; SCUSSEL et al., 2011; SHAPIRA; PASTER, 2004,). A maioria das estratégias de controle é baseada na prevenção, tanto na pré-coleta, coleta, transporte e armazenamento. A proposta de uso da aplicação de ozônio parece ser um método promissor, principalmente pelo seu baixo custo, eficiência (SCUSSEL et al., 2011), alterações ínfimas nas características sensoriais e a possibilidade de uso em larga escala (FREITAS-SILVA; VENÂNCIO, 2010). O efeito na detoxificação de

aflatoxinas tem sido estudado em castanha-do-Brasil (FREITAS-SILVA; VENÂNCIO, 2010, SCUSSEL et al., 2011), em amendoim (CHEN et al., 2014) e em milho (LUO et al., 2014). Especula-se que o mecanismo de ação ocorra pelo ataque do ozônio nas duplas ligações de carbono C8 e C9 das aflatoxinas.

No presente estudo, a presença de isolados aflatoxigênicos indica também a necessidade de controle dos fatores abiótico no armazenamento, como a utilização de atmosferas controladas em termos de umidade relativa do ar, temperatura, tratamento com ozônio e redução do oxigênio.

Como constatamos, a cadeia de produção das castanhas-do-Brasil tem muitas peculiaridades, o que exige uma abordagem holística. Sua produção se inicia na floresta, quando os frutos que contêm as sementes caem no solo, após, eles são coletados e armazenados por extrativistas que são responsáveis pelo tratamento inicial ainda na floresta. Em primeiro lugar, este sistema não permite que pragas e doenças causem danos caracteristicamente observados em monoculturas, por causa do equilíbrio do ecossistema florestal (FREITAS-SILVA; VENÂNCIO, 2011). No contexto da castanha-do-Brasil, os parâmetros mais influentes são os que afetam o desenvolvimento de fungos e a produção de micotoxinas. Boas práticas na coleta dos ouriços, secagem adequada que deve ocorrer logo após a colheita e tão rapidamente quanto possível, armazenamento em condições de baixas temperaturas e umidades evita que o nível de atividade de água das castanhas aumente e estas se tornem um bom substrato para espécies micotoxigênicas.

## **7. CONCLUSÕES**

A realização deste trabalho permitiu chegar às seguintes conclusões:

- Devido à presença de celulose nas cascas, que lhes confere características higroscópicas, há uma tendência para o equilíbrio higroscópico entre a umidade relativa do ar e as cascas, resultado em maiores níveis de teor de umidade em comparação às amêndoas;
- A composição lipídica das amêndoas impede que o teor de umidade seja transferido das cascas para as amêndoas, embora os níveis de atividade de amêndoas e cascas sejam similares;
- *Phialemonium* spp. foi o fungo mais isolado tanto nas amostras de casca quanto amêndoa, porém a maior frequência de contaminação fúngica nas cascas dos que as amêndoas, demonstra que a contaminação ocorre das cascas para as amêndoas;
- Aflatoxinas e ácido ciclopiazônico foram encontrados nas amostras de amêndoas e cascas;
- A utilização de abordagem polifásica foi essencial para diferenciação das cepas de *Aspergillus*, sendo possível discriminar espécies estreitamente relacionadas;
- *Aspergillus nomius* foi a espécie mais frequente dentre o gênero *Aspergillus* spp., excetuando-se nas amostras orgânicas, nas quais *Aspergillus flavus* foi o mais isolado, este resultado foi similar ao das amostras de amêndoa provenientes do Estado do Pará;
- A determinação de selênio nas amostras de amêndoas revelou que as amostras provenientes do extremo oeste da região amazônica brasileira foram as que apresentaram menores concentrações desse elemento;
- Apesar da maior frequência de isolamento de *Aspergillus* toxigênicos nas cascas, essas não são um bom substrato para a produção de aflatoxinas.
- A presença do fungo não implica necessariamente em um alimento contaminado, porém, o isolamento de cepas de *Aspergillus* potencialmente aflatoxigênicas; mostra que a amêndoa da castanha-do-Brasil é um substrato suscetível para o desenvolvimento de fungos micotoxigênicos;
- Boas práticas no manejo da castanha-do-Brasil desde a coleta, beneficiamento, armazenamento e até sua comercialização são necessárias para garantir a qualidade do produto, para que o mesmo não cause danos à saúde dos consumidores e prejuízos econômicos.

**REFERÊNCIAS\***

## REFERÊNCIAS\*

- ABBAS, H. K.; WEAVER, M. A.; ZABLOTOWICZ, R. M.; HORN, B.; SHIER, W. T. Relationships between aflatoxin production, sclerotia formation and source among Mississippi Delta *Aspergillus* isolates. **Eur. J. Plant Pathol.**, v. 112, p. 283-287, 2005.
- ABDOLLAHI, A.; BUCHANAN, R. L. Regulation of aflatoxin biosynthesis: induction of aflatoxin production by various carbohydrates. **J. Food Sci.**, v. 46, p. 633-635, 1981.
- ABEYWICKRAMA, K.; BEAN, G. A. Toxigenic *Aspergillus flavus* and aflatoxins in Sri Lankan medicinal plant material. **Mycopathologia**. v. 113, p. 187-190, 1991.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução - RDC n° 7 de 18 de fevereiro de 2011, publicada em 22 de fevereiro de 2011, republicada em 9 de março de 2011.
- AINSWORTH, G. C. **Introduction to the history of mycology**. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1976. 359 p.
- ALLCROFT, R.; ROGERS, H.; LEWIS, G.; NABNEY, J.; BEST, P.E. Metabolism of aflatoxin in sheep: excretion of the milk toxin. **Nature**. v. 209, p. 154-155, 1966.
- ALTSCHUL, S.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.; LIPMAN, D.J. Basic Local Alignment Search Tool. **J. Mol. Biol.**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- AMORIM, S. S.; SILVA, C. M. G.; PIRES, R. A.; SANTOS, E. A.; CASTRO, L.; SA, T. A. Occurrence of mycotoxins in food and feed in Brazil. In: Official Program and Abstract Book of the 10<sup>th</sup> International IUPAC Symposium on Mycotoxin and Phycotoxin. 2000, São Paulo. **Abstracts...** São Paulo, 2000. p. 141.
- ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S.; STREICH, R.; MARX, F. Seed composition of Amazonian Lecythidaceae Species: Part 3 in the Series "Studies of Edible Amazonian Plants". **J. Food Comp. Anal.**, v. 12, p. 37-51. 1999
- ANTONY, M.; SHUKLA, Y.; JANARDHANAN, K. K. Potential risk of acute hepatotoxicity of kodo poisoning due to exposure to cyclopiazonic acid. **J. Ethnopharmacol.**, v. 87, p. 211-214, 2003.
- APPLEBAUM, R. S.; BRACKETT, R. E.; WISEMAN, D. W.; MARTH, E. H. Responses of dairy cows to dietary aflatoxin: feed intake and yield, toxin content, and quality of milk of cows treated with pure and impure aflatoxin. **J. Dairy Sci.**, v. 65, p. 1503-1508, 1982.
- ARRUS, K.; BLANK, G.; ABRAMSON, D.; CLEAR, R.; HOLLEY, R. A. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. **J. Stored Prod. Res.**, v. 41, p. 513-527, 2005.

---

\* De acordo com:

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

ARX, J. A. **The genera of fungi sporulating in pure culture**. 3rd ed. Vaduz: J. Cramer, 1981. 424 p.

ASSIES, W. **Going nuts from the rainforest: Non-timber Forest Products, forest conservation and sustainability in Amazon**. Amsterdam: Thela Publishers, 1997. 96 p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS INTERNATIONAL (AOAC). **Official method 991.31**. Aflatoxin in corn, raw peanuts, peanut butter. Immunoaffinity column (aflatest) method. AOAC International, 2000. p. 42.2.18.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS INTERNATIONAL (AOAC). **Official methods of analysis**. 16th ed. Arlington, 1995. v. 2, 474 p.

ASTORECA, A. L.; DALCERO, A. M.; FERNANDES-PINTO, V.; VAAMONDE, G. A survey on distribution and toxigenicity of *Aspergillus* section *Flavi* in poultry feeds. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 146, p. 38-43, 2011.

ASTORECA, A.; VAAMONDE, G.; DALCERO, A.; MARIN, S.; RAMOS, A. Abiotic factors and their interactions influence on the co-production of aflatoxin B<sub>1</sub> and cyclopiazonic acid by *Aspergillus flavus* isolated from corn. **Food Microbiol.**, 2013. In Press.

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.

BARCLAY, F. Transformaciones en el espacio rural loretano tras el período cauchero. In: JORDÁN, P. G. (Coord.) **La construcción de la Amazonía andina (siglos XIX-XX)**. Quito: Eds. Abya-Yala, 1995. p. 229-285.

BARROS, G. G.; TORRES, A. M.; RODRIGUEZ, M. I. Genetic diversity within *Aspergillus flavus* strains isolated from peanut-cropped soils in Argentina. **Soil Biol. Biochem.**, v. 38, p. 145-152, 2006.

BAUM, M. K.; SHOR-POSNER, G.; LAI, S.; ZHANG, G.; LAI, H.; FLETCHER, M. A.; SAUBERLICH, H.; PAGE, J. B.. High risk of HIV related mortality is associated with selenium deficiency. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.**, v. 15, p. 370-374, 1997.

BEDARD, L. L.; MASSEY, T. E. Aflatoxin B<sub>1</sub>-induced DNA damage and its repair. **Cancer Letters**, v. 241, p. 174-183, 2006.

BENNETT, J. W.; HOROWITZ, P. C.; LEE, L. S. Production of sclerotia by aflatoxigenic and nonaflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. **Mycologia**, v. 71, p. 415-422, 1979.

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

BHATNAGAR, D.; YU, J.; EHRlich, K. C. Toxins of filamentous fungi. **Chem. Immunol.**, v. 81, p. 167-206, 2002.

BLANEY, B. J.; KELLY, M. A.; TYLER, A. L.; CONNOLE, M. D. Aflatoxin and cyclopiazonic acid production by Queensland isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Aust. J. Agric. Res.**, v. 40, p. 395-400, 1989.

BLOUNT, W. P. Disease of turkey poults. **Vet. Rec.**, v. 72, n. 38, p. 786, 1960.

BLOUNT, W. P. Turkey "X" disease. **Turkeys**, v. 9, n. 52, p. 55-58, 1961.

BOJANIC, A. J. H. El balance es hermoso: desarrollo sostenible y los bosques de la Amazonas Boliviana. **Programa Manejo de Bosques de la Amazonia Boliviana**. Santa Cruz, Bolívia: Série Científica 3, 2001.

BONELLI, P. R.; DELLA ROCCA, P. A.; CERRELLA, E. G.; CUKIERMAN, A. L. Effect of pyrolysis temperature on composition, surface properties and thermal degradation rates of Brazil Nut shells. **Bioresour. Technol.**, v. 76, p. 15-22, 2001.

BOWEN, H. J. M. **Trace elements in biochemistry**. London: Academic Press, 1966. 241 p.

BRADBURN, N.; COKER, R. D.; BLUNDEN, G. The etiology of turkey "X" disease. **Phytochemistry**, v. 35, p. 817, 1994.

BUNKER, S. G. Os programas de crédito e a desintegração não intencional das economias extrativas de exportação no médio Amazonas do Pará. **Pesquisa e Planejamento Econômico**, v. 12, p. 231-260, 1982.

BUNKER, S.; COELHO, M. C. N.; LOPES A. G. Ferro, Castanha-do-Pará, e a luta pela terra no entorno de um Projeto de Mineração na Amazônia Oriental. In: SILVA, J. M. P; SILVERIA, M. R. (Ed.), **Geografia econômica do Brasil: Temas regionais**. São Paulo, Brasil: UNESP, 2002, p. 5-40.

BURDOCK, G. A.; FLAMM, E. G. Review article: Safety assessment of the mycotoxin cyclopiazonic acid. **Int. J. Toxicol.**, v. 19, p. 195-218, 2000.

BUSBY, W. F.; WOGAN, G. N. Aflatoxins. In: SEARLE, C. E. (Ed.). **Chemical carcinogens**. Washington, DC: American Chemical Society, 1984. p. 945-1136. ISBN 0841208697

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

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

CAMPBELL-PLATT G.; COOK, P. E. Fungi in the production of foods and food ingredients. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 18, p. 117S-131S, 1989.

CARBONE, I.; KOHN, L. M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**, v. 91, p. 553–556, 1999.

CARDARELLI, H. R.; OLIVEIRA, A. J. Conservação do leite de Castanha-do-Brasil. **Sci. Agric.**, v. 57, p. 617-622, 2000.

CASTRILLON, A. L.; PURCHIO, A. Ocorrência de aflatoxinas em castanha do pará (*Bertholletia excelsa*, HUMB. e BONPL., 1808). **Acta Amaz.**, v. 18, p. 173-183, 1988.

CHEN, R.; MA, F.; LI, P. W.; ZHANG, W.; DING, X. X.; ZHANG, Q.; LI, M.; WANG, Y. R.; XU, B. C. Effect of ozone on aflatoxins detoxification and nutritional quality of peanuts. **Food Chem.**, v. 146, p. 284-288, 2014.

CHU, A. M.; COPE, O.; RUSSO, R.; LEW, R. Patterns of local-regional recurrence and results in Stage I and II breast cancer treated by irradiation following limited surgery: An update. **Amer. J. Clin. Oncol.**, v. 7, p. 221-229, 1984.

CHU, E. S.; BHATNAGAR, D. Mycotoxins. In: ARORA, D. K. (Ed.) **Fungal biotechnology in agricultural, food and environment applications**. New York, USA: Marcel Dekker Inc., 2004, p. 325-342.

CHU, F. S. Recent studies on immunoassays for mycotoxin. In: BEIER, R. C.; STANKER, L. H. (Ed.) **Immunoassays for residue analysis: Food Safety**. Washington, DC.: American Chemical Society Symposium Series book, 1998. n. 621, p. 294-313.

CLARK, L. C. The epidemiology of selenium and cancer. **Fed. Proc.**, v. 44, p. 2584–2589, 1985.

CLAY, J. W., 1997. Brazil nuts: The use of a keystone species for conservation and development. In: FREESE, C. H. (Ed.), **Harvesting Wild Species: Implications for Biodiversity Conservation**. Baltimore, Maryland: The Johns Hopkins University Press, p. 246–282.

CLAY, J. W.; CLEMENT, C. R. **Selected species and strategies to enhance income generation from Amazonian Forests**. FAO, 1993. Disponível em: <[www.fao.org/docrep/v0784e/v0885e0k.htm](http://www.fao.org/docrep/v0784e/v0885e0k.htm)>. Acesso em: 12 nov. 2013.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/index.php>>. Acesso em 12 nov. 2013.

COGELS, G. **A integração da Amazônia e a racionalização do extrativismo**. São Paulo: Edições Loyola, 1972. 171 p.

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

COLVIN, B. M.; HARRISON, L. R. Fumonisin-induced pulmonary edema and hydrothorax in swine. **Mycopathologia**, v. 117, p. 79–82, 1992.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY (CAST). **Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems**. Ames, Iowa: Task Force Report, 2003. n. 139, 199 p.

COSLOVSKY, S. V. **Determinantes de sucesso na indústria da castanha: como a Bolívia desenvolveu uma indústria competitiva enquanto o Brasil ficou para trás**. Rio de Janeiro: Ebape, 2005. 21 p.

COSLOVSKY, S.V. Economic development without pre-requisites: how Bolivian producers met strict food safety standards and dominated the global Brazil-Nut Market. **World Dev.**, v. 54, p. 32–45, 2014.

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

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

COUTINHO, V. F.; BITTENCOURT, V. B.; COZZOLINO, S. M. F. **Effects of supplementation with Brazil nuts (CP, *Bertholletia excelsa* H.B.K.) in capoeira players on selenium (Se) concentration and glutathione peroxidases activity (GSH-PX, E.C.1.11.1.9). In: trace elements in man and animal**. Springer, 2002. Part 2.

DECASTELLI, L.; LAI, J.; GRAMAGLIA, M.; MONACO, A.; NACHTMANN, C.; OLDANO, F.; RUFFER, M.; SEZIAN, A.; BANDIROLA, C. Aflatoxins occurrence in milk and feed in Northern Italy during 2004–2005. **Food Control**, v. 18, p. 1263–1266, 2007.

DE IONGH, H.; VLES, R. O.; VAN PELT, J. G. Milk of mammals fed on aflatoxin-containing diet. **Nature**, v. 202, n. 4931, p. 466-467, 1964.

DEGOLA, F.; BERNI, E.; DALL'ASTA, C.; SPOTTI, E.; MARCHELLI, R.; FERRERO I.; RESTIVO, F. M. A multiplex RT-PCR approach to detect aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*, **J. Appl. Microbiol.**, v. 103, p. 409–441, 2007.

DORNER, J. W.; COLE, R. J.; LOMAX, L. G.; GOSSER, H. S.; DIENER, U. L. Cyclopiazonic acid production by *Aspergillus flavus* and its effects on broiler chickens. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 46, p. 698–703, 1983.

EGEL, D. S.; COTTY, P. J.; ELIAS, K. S. Relationships among isolates of *Aspergillus* sect. *Flavi* that vary in aflatoxin production. **Phytopathology**, v. 84, p. 906-912, 1994.

EHRlich, K. C.; KOBbEMAN, K.; MONTALBANO, B. G.; COTTY, P.J. Aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Thailand. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 114, p. 153-159, 2007.

ELTAWILA, M. M.; NEAMATALLAH, A.; SERDAR, S. A. Incidence of aflatoxins in commercial nuts in the holy city of Mekkah. **Food Control**, v. 29, p. 121-124, 2013.

EMMI, M. F. A oligarquia do Tocantins e o domínio dos castanhais. Belém, Centro de Filosofia e Ciências Humanas/Núcleo de Altos Estudos Amazônicos/UFGA. **Cad. Dif. Tecnol. Brasília**, v. 6, n. 1, p.157–163, 1988.

EUROPEAN COMMISSION (EC). **Commission Regulation. 2010. n° 165/2010 of 26 February 2010. amending Regulation (EC) n°. 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins.** Official Journal of the European Union. L50, 2010. p. 8-12.

FAVARO, D. I. T. ; CHIOCCOLA, G. S.; TADDEI, M. H. Caracterização química e radiológica de refeições servidas pelo COSEAS/USP-SP. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 29, n. 1, p. 189-194, 2009.

FEIBELMAN, T. P.; COTTY, P. J.; DOSTER, M. A.; MICHAILIDES, T. J. A morphologically distinct strain of *Aspergillus nomius*. **Mycologia**, v. 90, p. 618–623, 1998.

FERNANDEZ-PINTO, V.; PATRIARCA, A.; LOCANI, O.; VAAMONDE, G. Natural co-occurrence of aflatoxin and cyclopiazonic acid in peanuts grown in Argentina. **Food Add. Contam.**, v. 18, p. 1017-1020, 2001

FICHEIRO: ACRE MUNICIPAL RIOBRANCO.SVG. In WIKIPÉDIA: A enciclopédia livre. Disponível em <[http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Acre\\_Municip\\_RioBranco.svg](http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Acre_Municip_RioBranco.svg)> Acesso em: 11 nov. 2013.

FICHEIRO: AMAZONAS MUNICIPAL MANICORÉ. SVG. In WIKIPÉDIA: A enciclopédia livre. Disponível em: <[http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Amazonas\\_Municip\\_Manicore.svg](http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Amazonas_Municip_Manicore.svg)> Acesso em: 11 nov. 2013.

FICHEIRO: AMAPA MUNICIPAL LARANJALDOJARI.SVG. In WIKIPÉDIA: A enciclopédia livre. Disponível em: <[http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Amapa\\_Municip\\_LaranjaldoJari.svg](http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Amapa_Municip_LaranjaldoJari.svg)> Acesso em: 11 nov. 2013.

FICHEIRO: PARA MUNICIPAL ACARA. SVG. In: WIKIPÉDIA. A enciclopédia livre. Disponível em <[http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Para\\_Municip\\_Acara.svg](http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Para_Municip_Acara.svg)> Acesso em: 11 nov. 2013.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). “FAO/WHO expert consultation on human vitamin and mineral requirements”, Chapter 5. Selenium, 1993. p. 235-255.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. In: FAO Food and Nutrition, n.73. Rome: FAO, 2004.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). 2013 FAOSTAT. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/535/default.aspx#ancor.>>. Acesso em: 11 de out. 2013.

FRÄNDBERG, E.; PITT J.; OLSEN, M. Quality control of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* agar and comparison with dichloran 18% glycerol agar: a collaborative study. **Int.**

**J. Food Microbiol.**, v. 89, p. 99-102, 2003.

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

FREITAS-SILVA, O.; VENANCIO, A. Brazil nuts: Benefits and risks associated with the contamination by fungi and mycotoxins. **Food Res. Int.**, v. 144, p. 1434-1440, 2011.

FREITAS-SILVA, O.; VENANCIO, A. Ozone applications to prevent and degrade mycotoxins: a review. **Drug Metab. Rev.**, v. 42, n. 4, p. 1-9, 2010.

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

FRISVAD, J. C.; SKOUBOE, P.; SAMSON, R. A. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B<sub>1</sub>, sterigmatocystin and 3-o-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 28, p. 442–453, 2005.

FUNDES. **Estudio de identificación, mapeo y análisis competitivo de la Cadena Productiva de la Castaña**. Study requested by Ministerio de Asuntos Campesinos y Agropecuarios (MACIA) of Bolivia. Manuscript, 2003.

GAMS, W.; MCGINNIS, M. R., *Phialemonium*, a new anamorph genus intermediate between *Phialophora* and *Acremonium*. **Mycologia**, v.75, p. 977-987, 1983.

GEISER, D. M.; KLICH, M. A.; FRISVAD, J. C.; PETERSON, S. W.; VARGA, J.; SAMSON, R. A. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. **Study Mycology**, v.59, p.1-10, 2007.

GELDERBLUM, W. C. A.; JASKIEWICZ, K.; MARASAS, W. F. O.; THIEL, P. G.; HORAK, R. M.; VLEGGAAR, R.; KRIEK, N. P. J. Fumonisin - Novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 54, p. 1806–1811, 1988.

GIORNI, P.; MAGAN, N.; PIETRI, A.; BERTUZZI, T.; BATTILANI, P. Studies on *Aspergillus* Section *Flavi* isolated from maize in northern Italy. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 113, p. 330–338, 2007.

GIORNI, P.; CAMARDO-LEGGIERI, M.; MAGAN, N.; BATTILANI, P. Comparison of temperature and moisture requirements for sporulation of *Aspergillus flavus* sclerotia on natural and artificial substrates. **Fungal Biol.**, v. 116, p.637-642, 2012.

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.

GLÓRIA, M. M.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Concentrado e isolado protéico de torta de castanha-do-Pará: obtenção e caracterização química e funcional. **Ciênc. Tecnol. Alim.**, Campinas, v. 2, p. 240-245, 2000.

GODET, M.; MUNAUT, F. Molecular strategy for identification in *Aspergillus* section *Flavi*. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 304, n. 2, p. 157-168, 2010.

GONÇALVES, J. S.; FERRACIN, L. M.; CARNEIRO-VIEIRA, M. L.; 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, n. 4, p. 1817-1825, 2012.

GONÇALVES, S. S.; STCHIGEL, A. M.; CANO, J. F.; GODOY-MARTINEZ, P.; COLOMBO, A. L.; GUARRO, J. *Aspergillus novoparasiticus*: a new clinical species of the section *Flavi*. **Med. Microbiol.**, v. 50, p. 153-160, 2012.

GUARRO, J.; NUCCI, M.; AKITI, T.; GENÉ, J.; CANO, J.; DA GLORIA, M.; BARREIRO, C.; AGUILAR, C. *Phialemonium* fungemia: two documented nosocomial cases. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 2493-2497, 1999.

GUMPRECHT, L. A.; BEASLEY, V. R.; WEIGEL, R. M.; PARKER, H. M.; TUMBLESON, M. E.; BACON, C. W.; MEREDITH, F. I.; HASCHEK, W. M. Development of fumonisin-induced hepatotoxicity and pulmonary edema in orally dosed swine: morphological and biochemical alterations. **Toxicol. Pathol.**, v. 26, p. 777-788, 1998.

HALÁSZ, A.; LÁSZTITY, R.; ABONYI, T.; BATA, Á. Decontamination of mycotoxin-containing food and feed by biodegradation. **Food Rev. Int.**, v. 25, p. 184-298, 2009.

HAWKSWORTH, D. L. Naming *Aspergillus* species: progress towards one name for each species. **Med. Mycol.**, v. 49, S70-S76, 2011.

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

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

HEPERKAN, D.; MORETT, A.; DIKMEN, C. D.; LOGRECO, A. F. Toxigenic fungi and mycotoxin associated with figs in the Mediterranean area. **Phytopathol. Mediterr.**, v. 51, p. 119-130, 2012.

HINRIKSON, H. P.; HURST, S. F.; DE AGUIRRE, L.; MORRISON, C. J. Molecular methods for identification of *Aspergillus* species. **Med. Mycol. Suppl.**, v. 43, p. 129-137, 2005.

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

HOMMA, A. K. O. Cemitério das castanheiras. **Ciência Hoje**. São Paulo, v.34, n.202, 2004.

HOMMA, A. K. O.; MENEZES, A. J. E. A. Evaluation of a Brazil-nut Beneficiation Industry, in the Microregion of Cametá, PA. Belém: **Comunicado Técnico**, v. 213, p. 1-10, 2008.

HORN, B. W.; SOBOLEV, V. S.; DORNER, J. W.; POWELL, J. H.; LAYTON, R. C. Association of morphology and mycotoxin production with vegetative compatibility groups in *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, and *A. tamarii*. **Mycologia**, v.88, p.574–587, 1996.

HORN, B. W.; DORNER, J. W. Soil population of *Aspergillus* species from section *flavi* along a transect through peanuts-growing region of the United States. **Mycologia**, v. 90, p. 767–776, 1998.

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

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

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**. Lyon: IARC, 1993. v. 56, p. 445-446.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Levantamento sistemático da produção agrícola. 2009. Disponível em: <[www.sidra.ibge.gov.br](http://www.sidra.ibge.gov.br)>. Acesso em: 12 nov. 2013.

INSTITUTE OF MEDICINE (IOM). **Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids**. Washington, DC.: National Academic Press, 2000. 509 p.

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

IYENGAR, G. V.; KAWAMURA, H.; DANG, H. S.; PARR, R. M.; WANG, J.; AKHTER, P.; CHO, S. Y.; NATERA, E.; MIAH, F. K.; DOJOSUBROTO, J.; NGUYEN, M. S. Dietary Intakes of seven elements of importance in radiological protection by Asian population: comparison with ICRP Data. **Health Physics**, v. 86, n. 6, p. 557-564, 2004.

JELINEK, C. F. **Distribution of mycotoxin**: an analysis of worldwide commodities data, including data from FAO/WHO/UNEP food contamination monitoring programme. Joint FAO/WHO/UNEP. International Conference on Mycotoxins. Bangkok, Thailand, September 28 to October 3<sup>rd</sup>, 1987.

JOFFE, A. Z. *Fusarium poae* and *F. sporotrichioides* as principal causal agents of alimentary toxic aleukia. In: WYLLIE, T. D.; MOREHOUSE L. G. (Ed.). **Mycotoxic Fungi, Mycotoxins, Mycotoxicoses: an Encyclopaedic Handbook**. New York: Marcel Dekker, 1978. v. 3, p. 21-86.

KAIMOWITZ, D.; BOJANIC, A. Riberalta: extractivistas bajo una élite tradicional. In: PACHECO, P.; KAIMOWITZ, D. (Ed.). **Municipios y gestión forestal en el trópico boliviano**. Center for International Forestry Research, Centro de Estudios para el Desarrollo Laboral y Agrario, Taller de Iniciativas en Estudios Rurales y Reforma Agraria, Bolivia Sustainable Forest Management project, La Paz, 1998. (Serie Bosques y Sociedad, n. 3).

KELLERMAN, T. S.; MARASAS, W. F. O.; THIEL, P. G.; GELDERBLUM, W. C. A.; CAWOOD, M.; COETZER, J. A. W. Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B<sub>1</sub> **Onderstepoort J. Vet. Res.**, v. 57, p. 269–275, 1990.

KLICH, M. A. **Identification of common *Aspergillus* species**. The Netherland: CBS, Utrecht, 2002.

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

KOZAKIEWICZ, Z., 1994. Taxonomy: the key to mycotoxin identification in food and feedstuffs. Proceedings of 6<sup>th</sup> International Working Conference on Stored-product Protection. National convention centre, Canberra. HIGHLEY, E.; WRIGHT, E. J.; BANKS, H. J.; CHAMP, B. R. (Ed.). CAB International, Washington, DC. Oxford 2, p. 999-1006.

KUMEDA, Y.; ASAO, T. Single-strand conformation polymorphism analysis of PCR-amplified ribosomal DNA internal transcribed spacers to differentiate species of *Aspergillus* section *flavi*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, p. 2947–2952, 1996.

KURTZMAN, C. P.; HORN, B. W.; HESSELTINE, C. zsw. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamaris*. **A. Van Leeuw.**, v. 53, p. 147-158, 1987.

LACEY, J. Pre- and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products. **J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.**, p. 1S-25S, 1989.

LACEY, J.; RAMAKRISHNA, N.; HAMER, A.; MAGAN, N.; MARFLEET, C. Grain fungi. In: DILIP, K.; ARORA, D. K.; MUKERJI, K. G.; MARTH, E. H. (Ed.). **Handbook of Applied Mycology: foods and feeds**. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 121-177.

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

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

LEBRET, D. T.; MARTINS JR., H. D. A.; WANG, A.; BUSTILLOS, O. V. Rapid method to determinate of mycotoxins compounds in food samples using high-performance liquid chromatography with APCI ionization tandem mass spectrometry (LC-APCI-MS/MS) in simultaneous positive and negative ion mode. 10<sup>th</sup> Latin American Congress on

Chromatography and Related Techniques – COLACRO X, Campos de Jordão, São Paulo, Brasil, 2004. **Anais...** Campos de Jordão, São Paulo, 2004.

LI, M.; LU, S.; JIN, C.; WANG, Y.; WANG, M.; CHENG, S.; TIAN, G. Experimental studies on the carcinogenicity of fungus-contaminated food from Linxian County. In: GELBOIN, H.V. (Ed.). **Genetic and environmental factors in experimental human cancer**. Tokyo: Japan Science Society Press, 1980. p. 139-148.

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

LINK, H. F. Observationes in Ordines plantarum naturales. Dissertatio prima, complectens Anandrarum ordines Epiphytas, Mucedines Gastomycos et Fungos Der Gesellschaft Naturforschender Freunde zu Berlin. **Magazin für die neuesten Entdeckungen in der gesamten Naturkunde**, v. 3, p. 1–42, 1809.

LOMAX, L. G.; COLE, R. J.; DORNER, J. W. The toxicity of cyclopiazonic acid in weaned pigs. **Vet. Pathol.**, v. 21, p. 418–424, 1984.

LOSITO, I.; MONACI, L.; ARESTA, A.; ZAMBONIN, C. G. LC-ION trap eletrospray MS-MS for determination of cyclopiazonic acid in milk samples. **Analyst.**, v. 127, n. 4, p. 499-502, 2002.

LOUREIRO, A. A.; SILVA, M. F.; ALENCAR, J. C. Essências madeireiras da Amazônia. **INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia)**, v. 1, p. 121-125, 1979.

LUO, X.; WANG, R.; WANG, L.; LI, Y.; BIAN, Y.; CHEN, Z. Effect of ozone treatment on aflatoxin B<sub>1</sub> and safety evaluation of ozonized corn. **Food Control**, v. 37, p. 171-176, 2014.

MAGAN, N.; ALDRED, D. Postharvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 19, p. 131–139, 2004.

MAGGON, K. K.; VISWANATHAN, L.; VENKITASUBRAMANIAN, T. A.; MUKERJI, K. G. Aflatoxin formation by some Indian strains of *Aspergillus flavus* Link ex Fries **J. Gen. Microbiol.**, v. 59, p. 119-124, 1969.

MAGNANINI, A.; MAGNANINI, C. **Árvores gigantescas da terra e as maiores assinaladas no Brasil**. 2. ed. 2003. 46 p. (Série Ciência e Pesquisa, Caderno 20), São Paulo.

MARASAS, W. F. O. Fumonisin: history, worldwide occurrence and impact. In: JACKSON, L. S.; DEVRIES, J. W.; BULLERMAN, L. B. (Ed.). **Fumonisin in Food**. New York: Plenum, 1996. p. 1-17.

MARASAS, W. F. O.; KELLERMAN, T. S.; GELDERBLOM, W. C. A.; COETZER, J. A. W.; THIEL, P. G.; VAN DER LUGT, J. J. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B<sub>1</sub> isolated from *Fusarium moniliforme*. **Onderstepoort J. Vet. Res.**, v. 55, p. 197–203, 1988.

MARASAS, W. F. O. Occurrence of *Fusarium moniliforme* and fumonisins in maize in relation to human health. **S. Afr. Med. J.**, v. 83, p. 382-383, 1993.

- MARR, J. S.; MALLOY, C. D. An epidemiologic analysis of the ten plagues of Egypt. **Cadeceus**, v. 12, p. 7-24, 1996.
- MARTINS, M. L.; MARTINS, H. M. Natural and in vitro coproduction of cyclopiazonic acid and aflatoxins. **J. Food Prot.**, v. 62, p. 292–294, 1999.
- MATOSSIAN, M. K. **Poisons of the past: molds, epidemics and history**. New Haven, Connecticut: Yale University Press, 1989. 190 p.
- MAUÉS, M. M. Reproductive phenology and pollination of the Brazil nut tree (*Bertholletia excelsa* Humb. and Bonpl.) in eastern Amazonian. In: KEVAN P.; IMPERATRIZ, F. (Ed.). **Pollinating bees: the conservation link between agriculture and nature**. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, 2002. p. 245-254.
- MOLDES-ANAYA, A. S.; ASP, T. N.; ERIKSEN, G. S.; SKAAR, I.; RUNDBERGET, T. Determination of cyclopiazonic acid in food and feeds by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A.**, v. 1216, p. 3812-3818, 2009.
- MOREAU, C. **Moulds, Toxins and Food**. Chichester: John Wiley, 1979. 477 p.
- MORI, S. A.; PRANCE, G. T. Taxonomy, ecology and economic botany of the Brazil nut (*Bertholletia excelsa*, Humb and Bonpl.: Lecythidaceae). In: PRANCE, G. T.; BALICK, M. J. (Ed.). **New directions in the study of plants and people: research contributions from the Institute of Economic Botany**. New York: The New York Botanical Garden, 1990, v. 8, p. 130-150.
- MORITZ, A. **Estudos biológicos da floração da Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.)**. Belém, Pará: EMBRAPA, CPATU, 1984. 82 p.(Documentos, 29).
- MOSS, M. O. Mycotoxins of *Aspergillus* and other filamentous fungi. **J. Appl. Bacteriol. (Suppl.)**, p. 69-81, 1989.
- MOTTA, S.; SOARES, L. M. V. Simultaneous determination of tenuazonic and cyclopiazonic acid in tomato products. **Food Chem.**, v. 71, p. 111-116, 2000.
- NELSON, D.; FUJIWARA, L. **Projeto Castanha-do-Brasil**. Programa Gestão Pública e Cidadania, 2002. 16 p.
- NEPOTE, M. C.; PIONTELLI, E.; SAUBOIS, A. Occurrence of *Aspergillus flavus* strains and aflatoxins in corn from Santa Fe, Argentina. **Latinoam Nutr.**, v. 47, p. 262–264, 1997.
- NESCI, A.; ETCHEVERRY, M. *Aspergillus* section *Flavi* populations from field maize in Argentina, **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 34, p. 343-348, 2002.
- NISHIE, K.; COLE, R. J.; DORNER, J. W. Toxic effects of cyclopiazonic acid in the early phase of pregnancy in mice. **Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.**, v. 55, p. 303–315, 1987.

NOVAS, M. V.; CABRAL, D. Association of mycotoxin and sclerotia production with compatibility groups in *Aspergillus flavus* from peanut in Argentina. **Plant Disease**, v. 86, p. 215-219, 2002.

OHOMOMO, S.; SUGITA, M.; ABE, M. Isolation of cyclopiazonic acid, cyclopiazonic acid imine and bisecodehydro cyclopiazonic acid from cultures of *Aspergillus versicolor* (Viull.) Tiraboschi. **J. Agric. Chem. Soc. Jpn.**, v. 47, p. 57-63, 1973.

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

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.

PAINTER, K. **Puberty signs evident in 7- and 8- year old girls.** Washington, DC.: USA Today, April 8<sup>th</sup>, 1997, P.A-1.

PARIZA, M. W.; JOHNSON, E. A. Evaluating the safety of microbial enzyme preparations used in food processing: update for a new century. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v. 33, p. 173-186, 2001.

PARR, R. M. Current role of NAA in biological and health-related environmental studies as exemplified by programs of the IAEA. **J. Radioanal. Nucl. Chem.**, v.244, n.1, p.17-21, 2000.

PERDOMO, H.; SUTTON, D. A.; GARCÍA, D.; FOTHERGILL, A. W.; GENE, J.; CANO, J.; SUMMERBELL, R. C.; RINALDI, M. G.; GUARRO, J. Molecular and phenotypic characterization of *Phialemonium* and *Lecythophora* isolates from clinical samples. **J. Clin. Microbiol.**, v. 49, p. 1209-1216, 2011.

PERES, C. A.; BAIDER, C. Seed dispersal, spatial distribution and population structure of Brazil nut trees (*Bertholletia excelsa*) in Southeastern Amazonia. **J. Trop. Ecol.**, v. 13, p. 595-616, 1997.

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

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

PILDAIN, M. B.; CABRAL, D.; VAAMONDE, G. Poblaciones de *Aspergillus flavus* en maní cultivado en diferentes zonas agroecológicas de la Argentina, caracterización morfológica y toxigénica. **Rev. Invest. Agropec.**, v. 34, p. 3-19, 2005.

PILDAIN, M. B.; FRISVAD, J. C.; VAAMONDE, G.; CABRAL, D.; VARGA, J.; SAMSON, R. A. Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 58, p. 725-735, 2008.

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

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. 3rd ed. Londres, Inglaterra: Blackie Academic and Professional, 2009. 519 p.

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

PROBST, C. **In the World Mycotoxin Forum: the third conference the international networking conference for the food and feed industry**, Noordwijk aan Zee, the Netherlands. 2005.

PURCHASE, I. F. H. The acute toxicity of the mycotoxin cyclopiazonic acid to rats. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 18, p. 114–123, 1971

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

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

RAZZAGHI-ABYANEH, M.; SHAMS-GHAHFAROKHI, M.; ALLAMEH, A.; KAZEROON-SHIRI, A.; RANJBAR-BAHADORI, S.; MIRZAHOSEINI, H.; REZAEI, M.B. A survey on distribution of *Aspergillus* section *Flavi* in corn field soils in Iran: population patterns based on aflatoxins, cyclopiazonic acid and sclerotia production. **Mycopathologia**. v. 161, n. 3, p. 183-192, 2006.

RESNIK, S.; NEIRA, S.; PACIN, A.; MARTINEZ, E.; APRO, N.; LATREITE, S. A survey of the natural occurrence of aflatoxins and zearalenone in Argentina field maize: 1983–94. **Food Add. Contam.**, v. 13, p. 115–120, 1996.

RIBEIRO, M. A. A.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; LIMA, U.A.; BAGGIO, C. E. Whole and shelled brazil nut storage: effect of the temperature on their resistance to rancidity. **Scientiae Agriculturae**, v. 50, n. 3, p. 343-348, 1993.

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

RILEY, R. T.; GOEGER, D. E.; YOO, H.; SHOWKER, J. L. Comparison of three tetramic acids and their ability to alter membrane function in cultured skeletal muscle cells and sarcoplasmic reticulum vesicles. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 114, p. 261–267, 1992.

RODRIGUES, P.; VENÂNCIO, A.; KOZAKIEWICZ, Z.; LIMA, N. A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* Section *Flavi* isolated from Portuguese almonds. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 129, p. 187–193, 2009.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.653 p.

SAMSON, R. A.; HONG, S. B.; FRISVAD, J. C. Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. **Med. Mycol.**, v. 44, p. 133-148, 2006.

SAMSON, R. A.; VARGA, J. What is a species in *Aspergillus*? **Med. Mycol.**, v.47, p. 13-20, 2009.

SANCHIS, V.; VINAS, I.; JIMENEZ, M.; HERNANDEZ, E. Diferencias morfológicas y enzimáticas entre cepas de *Aspergillus flavus* productoras de aflatoxinas. **An. Biol. Spec. Sect.**, v. 1, p. 109-114, 1984.

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

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

SCHREIBER, W. R. **The Amazon basin Brazil nut industry**, **Foreign Agriculture Report n. 49**. Washington, DC.: US Department of Agriculture, 1950.

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

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

SERRANO, R. O. P. **Regeneração e estrutura populacional de *Bertholletia excelsa* H.B.K. em áreas com diferentes históricos de ocupação no vale do Rio Acre (Brasil)**. 2005. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Manejo de Recursos Florestais) – Universidade Federal do Acre – UFAC, Rio Branco, 2005.

SHAPIRA, R.; PASTER, N. Control of mycotoxins in storage and techniques for their decontamination. In: MAGGAN, N.; OLSEN, M. (Ed.) **Mycotoxins in food: detection and control**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited and CRC Press, 2004. p.190-223.

SHARMA, R. P.; DUGYALA, R. R.; VOSS, K. A. Demonstration of in-situ apoptosis in mouse liver and kidney after short-term repeated exposure to fumonisin B<sub>1</sub>. **J. Comp. Pathol.**, v. 117, p. 371–381, 1997.

SILLER, W. G.; OSTLER, D. C. The histopathology of an entero-hepatic syndrome of turkey poult. **Vet. Rec.**, v. 73, p. 134-138, 1961.

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

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

SOARES, L. P.; REALE, V. B. **Castanha-do-Brasil**: Levantamento preliminar. Ministério da Agricultura. DEMA-Pará e FAEPA, 1976. 69 p.

SOUZA, M. L.; MENEZES, H. C. Processamento de amêndoa e torta de Castanha-do-Brasil e farinha de mandioca: parâmetros de qualidade. **Ciênc. Tecnol. Alim.**, Campinas, v. 24, n. 1, p.120-128, 2004.

SPENCER, E. R. Decay of Brazil nuts. **The Botanical Gazette**, v. 72, p. 265-288, 1921.

SPENSLEY, P. C. Aflatoxin, the active principle in turkey "X" disease. **Endeavour**, v. 22, p.7 5-79, 1963.

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

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

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

TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS (TACO). 4.ed. Campinas: NEPA-UNICAMP, 2011. 161 p.

TAITSON, B. **Harvesting nuts, improving lives in Brazil**, WWF, 18 Jan 2007.

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

TANCHEV, Y.; DOROSSIEV, D. The first clinical description of Balkan endemic nephropathy (1956) and its validity 35 years later. In: CASTEGNARO, M.; PLESTINA, R.; DIRHEIMER, G.; CHERNOZEMSKY, I. N.; BARTSCH, H. (Ed.) **Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumors**. Lyon: IARC Scientific Publications, 1991. n. 115, p. 21-28.

TANIWAK, M. H.; PITT, J. I.; IAMANAKA, B. T.; 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, p. 1-7, 2012.

TONINI, H. **Castanheira-do-brasil**: uma espécie chave na promoção do desenvolvimento com conservação. Boa Vista: EMBRAPA Roraima, 2007. 3 p.

TRAN-DINH, N.; PITT, J. I.; CARTER, D. A. Molecular genotype analysis of natural toxigenic and nontoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Mycol. Res.**, v. 103, n. 11, p. 1485–1490 1999.

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

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

UENO, Y. Citreoviridin from *Penicillium citreoviride* Biourge. In: PURCHASE, I. F. H. (Ed.) **Mycotoxins**. New York: Elsevier Scientific Publ Co, 1974.p. 283-302.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). National Nutrient Database for Standard Reference, Food Group: 12 nut and seed products. Disponível em: <<http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome>> Acesso em: 25 set. 2013.

URANO, T.; TRUCKSESS, M. W.; MATUSIK, J.; DORNER, J. W. Liquid chromatographic determination of cyclopiazonic acid in corn and peanuts. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 75, n. 2, p. 319-322, 1992.

VAAMONDE, G.; DEGROSSI, C.; COMERIO, R.; FERNANDEZ-PINTO, V. *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* en maní cultivado en la provincia de Córdoba (Argentina): Características diferenciales y capacidad aflatoxicogénica. **Bol. Soc. Argent Bot.**, v. 30, p. 191–198, 1995.

VAAMONDE, G.; PATRIARCA, A.; FERNANDEZ-PINTO, V.; COMERIO, R.; DEGROSSI, C. Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* section *Flavi* from different substrates in Argentina. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 88, p. 79–84, 2003.

VAN DONGEN, P. W. J., DE GROOT A. N. J. A. History of ergot alkaloids from ergotism to ergometrine. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reproduct. Biol.**, v. 60, p. 109–116, 1995.

VOGEL, P.; RHEE, R.; BLANCHE-KOELENSMID, W. A .A. A Rapid screening test for Aflatoxin-synthesizing *Aspergilli* of the *flavus-oryzae* Group. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 28, p. 213–220, 1965.

VONDERHEIDE, A. P.; WROBEL, K.; KANNAMKUMARATH, S. S.; B'HYMER, C.; MONTES-BAYÓN, M.; PONCE DE LEÓN, C.; CARUSO, J. A. Characterization of selenium species in Brazil nuts by HPLC-ICP-MS and ES-MS. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 5722-5728, 2002.

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

WICKLOW, D. T.; STUBBLEFIELD, R. D.; HORN, B. W.; SHOTWELL, O. L. Citreoviridin levels in *Eupenicillium ochrosalmoneum* infested maize kernels at harvest. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 54, p. 1096-1098, 1988.

WOGAN, G. N. Aflatoxin as risk factors for hepatocellular carcinoma in humans. **Cancer Res.**, v. 52, n. 7, p. 2114-2118, 1992.

YANG, G. Q.; WANG, S. Z.; ZHOU, R. Z. H.; SUN, S. Z. Endemic selenium intoxication of humans in China. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 37, p. 872-881, 1983.

YANG, C. S. Research on esophageal cancer in China: A review. **Cancer Res.**, v. 40, p. 2633-2644, 1980.

YIN, Y.; LOU, T.; YAN, L.; MICHAILIDES, T. J.; MA, Z. Molecular characterization of toxigenic and toxigenic *Aspergillus flavus* isolates, collected from peanut fields in China. **J. Appl. Microbiol.**, v. 107, p. 1857-1865, 2009.

YOKOTA, T.; SAKURAI, A.; IRIUCHIUMA, S.; TAKAHASHI, N. Isolation and <sup>13</sup>C NMR study of cyclopiazonic acid, a toxic alkaloid produced by muscardine fungi *Aspergillus flavus* and *A. oryzae*. **Agric. Biol. Chem.**, v. 45, p. 53-56, 1981.

YU, S. Y.; CHU, Y. J.; GONG, X. L.; HOU, C. Regional variation of cancer mortality and its relation to selenium levels in China. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 7, p. 21-29, 1985.

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

**APÊNDICE A – Tabelas suplementares**

**Tabela A.1-** Níveis de umidade (teor de umidade e atividade de água) e número de unidades formadoras de colônias por grama ( $10^3$  UFC/g) em 50 amostras de amêndoas de castanha-do-Brasil (ACA1 a ACA50), provenientes do Estado do Acre – AC

Amostras	Tu*	Aa**	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Phialemonium</i> spp.	<i>Pheacremonium</i> spp.	<i>Trichoderma</i> spp.	FNE***	<i>Rhizopus</i> spp.	<i>Verticillium</i> spp.
ACA1	3,5	0,72	0,2	-	-	0,3	-	0,1	0,1	-	0,1
ACA2	3,7	0,96	-	-	-	12	2	-	1	-	-
ACA3	3,5	0,83	1	-	-	15	-	-	-	-	-
ACA4	4,2	0,89	1	4	1	37	9	-	-	-	-
ACA5	3,8	0,95	-	23	-	54	13	-	-	-	-
ACA6	3,6	0,88	1	13	-	12	-	-	-	-	-
ACA7	3,9	0,82	1	-	-	5	-	2	-	-	-
ACA8	3,8	0,95	2	6	1	49	11	-	-	-	-
ACA9	4,0	0,87	3	-	-	9	8	-	1	-	-
ACA10	3,8	0,84	-	1	-	8	6	-	-	-	-
ACA11	3,5	0,92	40	-	40	-	-	-	-	-	-
ACA12	3,4	0,96	0,4	-	0,7	-	-	-	-	-	-
ACA13	3,6	0,95	3	-	1	6	-	1	-	-	-
ACA14	3,6	0,94	-	2	-	14	-	-	-	-	-
ACA15	3,7	0,78	-	2	2	-	-	-	6	-	-
ACA16	3,9	0,69	20	-	-	17	3	-	-	-	-
ACA17	3,8	0,88	-	1	-	4	-	-	-	-	-
ACA18	3,6	0,88	1	2	1	-	-	-	-	-	-
ACA19	3,7	0,78	-	-	-	4	-	-	-	-	-
ACA20	3,8	0,78	1	4	-	10	-	-	-	-	-
ACA21	3,7	0,86	-	5	-	8	-	-	-	-	-
ACA22	3,8	0,74	-	-	-	4	-	-	-	-	-
ACA23	3,4	0,68	1	-	-	11	5	-	-	-	-
ACA24	3,7	0,74	-	1	-	19	1	-	-	-	-
ACA25	3,6	0,88	-	22	-	-	-	-	-	-	-

Amostras	Tu*	Aa**	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Phialemonium</i> spp.	<i>Pheacremonium</i> spp.	<i>Trichoderma</i> spp.	FNE***	<i>Rhizopus</i> spp.	<i>Verticillium</i> spp.
ACA26	4,0	0,86	-	-	-	51	18	-	1	-	-
ACA27	3,4	0,91	1	2	1	1	-	1	-	-	-
ACA28	5,3	0,67	1	1	-	18	10	-	-	-	-
ACA29	4,2	0,87	0,8	0,4	-	-	-	-	0,1	-	-
ACA30	3,6	0,66	-	-	-	-	-	2	-	-	-
ACA31	3,7	0,73	1	1	-	16	7	-	-	-	-
ACA32	3,7	0,92	8	4	-	9	4	-	-	-	-
ACA33	3,4	0,87	0,6	-	0,1	7	4	-	-	-	-
ACA34	3,8	0,83	-	-	-	1	-	-	1	-	-
ACA35	3,7	0,58	0,6	-	0,5	-	-	-	0,2	-	-
ACA36	3,6	0,63	1	2	-	-	-	3	-	-	-
ACA37	3,3	0,67	3	4	-	27	3	-	-	-	-
ACA38	3,6	0,88	0,6	-	-	-	-	0,1	-	-	-
ACA39	3,6	0,93	2	-	-	10	-	-	-	-	-
ACA40	4,5	0,86	0,3	0,9	-	6,3	-	-	-	-	-
ACA41	3,6	0,79	-	10	-	145	5	-	-	-	-
ACA42	3,7	0,64	0,2	0,4	0,5	-	-	-	0,1	-	-
ACA43	4,5	0,91	0,3	1,5	0,2	0,2	-	-	-	-	-
ACA44	4,4	0,94	-	-	2	11	-	-	-	-	-
ACA45	3,4	0,81	0,5	0,5	-	3,3	-	-	-	-	-
ACA46	3,4	0,95	-	-	1	24	3	-	-	-	-
ACA47	3,2	0,63	0,4	0,2	0,1	-	-	0,2	-	-	-
ACA48	3,2	0,95	3	2	3	-	-	-	-	-	-
ACA49	3,5	0,76	1	-	-	7	-	-	-	-	-
ACA50	3,5	0,75	0,1	0,1	0,2	1	-	0,3	0,2	-	-
Média	3,7	0,82	2,0	2,3	1,1	12,7	2,2	0,2	0,2	0,0	0,0

\*Tu: Teor de umidade

\*\*Aa: Atividade de água

\*\*\*FNE: Fungo não-esporulado

Limite de detecção: 50 UFC/g

**Tabela A.2-** Níveis de umidade (teor de umidade e atividade de água) e número de unidades formadoras de colônias por grama ( $10^3$  UFC/g) em 50 amostras de cascas de castanha-do-Brasil (ACC1 a ACC50), provenientes do Estado do Acre – AC

Amostras	Tu*	Aa**	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Phialemonium</i> spp.	<i>Pheacremonium</i> spp.	<i>Trichoderma</i> spp.	FNE***	<i>Rhizopus</i> spp.	<i>Verticillium</i> Spp.
ACC1	14,4	0,61	10	2	-	-	-	1	4	-	-
ACC2	14,5	0,94	-	30	-	20	10	10	-	-	-
ACC3	14,5	0,83	30	30	-	98	2	-	-	-	-
ACC4	14,3	0,78	20	-	10	18	2	-	-	-	-
ACC5	13,8	0,88	5	1	-	18	9	-	1	-	-
ACC6	14,1	0,83	4	-	4	-	-	1	-	-	-
ACC7	13,7	0,84	6	-	-	-	-	4	-	-	-
ACC8	14,4	0,89	90	-	10	370	-	-	-	-	-
ACC9	13,9	0,74	8	-	2	-	-	-	-	-	-
ACC10	13,6	0,78	5	1	1	53	-	-	-	-	-
ACC11	14,6	0,76	3	-	-	18	8	2	-	-	-
ACC12	13,5	0,92	20	-	10	19	1	-	10	-	-
ACC13	14,3	0,94	50	40	-	-	-	-	-	-	-
ACC14	13,4	0,93	20	50	-	77	3	-	-	-	-
ACC15	13,7	0,60	30	80	-	222	8	10	-	-	-
ACC16	14,6	0,64	30	20	-	-	-	-	20	-	-
ACC17	15,2	0,74	20	-	-	77	13	10	-	-	-
ACC18	14,6	0,78	4	1	-	2	-	2	2	-	-
ACC19	14,8	0,82	3	2	-	19	14	-	-	-	-
ACC20	14,9	0,64	50	130	-	100	10	-	-	-	-
ACC21	14,9	0,70	7	-	-	12	-	2	1	-	-
ACC22	13,8	0,64	15	2	-	17	2	2	-	-	-
ACC23	13,5	0,67	10	80	30	-	-	-	-	-	-
ACC24	14,6	0,71	50	60	-	747	33	-	-	-	-
ACC25	14,3	0,86	10	-	6	28	-	-	-	-	-

Amostras	Tu*	Aa**	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Phialemonium</i> spp.	<i>Pheacremonium</i> spp.	<i>Trichoderma</i> spp.	FNE***	<i>Rhizopus</i> spp.	<i>Verticillium</i> spp.
ACC26	15,0	0,74	20	10	10	132	18	-	-	-	-
ACC27	14,4	0,92	8	-	-	-	-	-	4	-	-
ACC28	15,2	0,63	40	30	-	341	19	-	-	-	-
ACC29	15,2	0,74	-	40	-	48	12	-	-	-	-
ACC30	14,6	0,61	4	-	1	3	-	-	-	-	-
ACC31	14,6	0,51	2	-	1	8	7	-	2	-	-
ACC32	14,7	0,86	2	-	-	2	-	1	-	-	-
ACC33	14,3	0,79	30	20	-	199	31	-	-	-	-
ACC34	15,1	0,72	20	20	10	41	9	-	-	-	-
ACC35	14,1	0,79	5	8	-	-	-	1	-	-	-
ACC36	13,7	0,83	20	40	-	215	45	10	-	-	-
ACC37	13,9	0,79	20	10	-	-	-	-	-	-	-
ACC38	13,7	0,81	30	20	-	10	-	-	-	-	-
ACC39	14,8	0,75	15	-	-	-	-	1	-	-	-
ACC40	14,5	0,75	30	70	-	46	14	-	-	-	-
ACC41	14,4	0,66	30	1	2	-	-	-	-	-	-
ACC42	13,9	0,68	8	-	-	-	-	-	5	-	-
ACC43	14,7	0,86	7	11	-	-	-	1	2	-	-
ACC44	13,9	0,85	8	3	-	5	-	-	-	-	-
ACC45	14,1	0,63	10	1	-	32	-	-	2	-	-
ACC46	14,8	0,90	16	4	1	10	-	-	-	-	-
ACC47	14,2	0,64	-	2	-	-	-	2	-	-	-
ACC48	14,4	0,92	20	20	-	33	17	-	-	-	-
ACC49	15,3	0,76	20	20	10	64	6	-	10	-	-
ACC50	13,9	0,76	20	10	-	10	-	-	10	-	-
Média	14,3	0,77	17,7	17,4	2,2	62,3	5,9	1,2	1,5	0,0	0,0

\*Tu: Teor de umidade

\*\*Aa: Atividade de água

\*\*\*FNE: Fungo não-esporulado

Limite de detecção: 50 UFC/g

**Tabela A.3-** Níveis de umidade (teor de umidade e atividade de água) e número de unidades formadoras de colônias por grama ( $10^3$  UFC/g) em 50 amostras de amêndoas de castanha-do-Brasil (AMA1 a AMA50), provenientes do Estado do Amazonas – AM

Amostras	Tu*	Aa**	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Phialemonium</i> spp.	<i>Phaeoacremonium</i> spp.	<i>Trichoderma</i> spp.	FNE***	<i>Rhizopus</i> spp.	<i>Verticillium</i> spp.
AMA1	3,6	0,86	-	1	96	-	-	-	-	-	-
AMA2	3,8	0,86	-	5	2	97	89	-	-	-	-
AMA3	3,6	0,83	-	-	8	21	15	-	-	-	-
AMA4	3,5	0,83	-	1	-	23	12	-	2	-	-
AMA5	4,5	0,88	-	-	3	14	-	-	-	-	-
AMA6	3,6	0,83	0,2	0,9	9,8	-	-	-	-	-	-
AMA7	3,8	0,83	-	1	10	-	-	-	-	-	-
AMA8	3,7	0,86	-	4	6	-	-	-	-	-	-
AMA9	4,1	0,86	-	7	15	-	-	-	-	-	-
AMA10	3,9	0,76	-	2	-	5	-	-	-	-	-
AMA11	3,7	0,68	-	8	9	-	-	-	-	-	-
AMA12	3,9	0,82	-	5	-	9	-	-	-	-	-
AMA13	3,9	0,79	1	7	18	-	-	-	-	-	-
AMA14	3,6	0,89	-	3	-	15	12	-	-	-	-
AMA15	3,5	0,81	-	4	16	8	7	-	1	-	-
AMA16	4,0	0,87	1	4	18	-	-	-	-	-	-
AMA17	3,9	0,88	-	7	1	12	9	-	-	-	-
AMA18	3,9	0,80	1	3	-	43	10	-	-	-	-
AMA19	4,1	0,83	1	10	-	17	-	-	-	-	-
AMA20	4,0	0,75	-	6	-	15	-	-	-	-	-
AMA21	3,7	0,81	-	10	-	59	19	-	-	-	-
AMA22	3,5	0,84	-	6	-	20	17	-	-	-	-
AMA23	3,8	0,82	-	7	-	41	16	-	-	-	-
AMA24	4,4	0,69	-	38	-	-	-	-	-	-	-
AMA25	3,9	0,93	-	56	-	-	-	-	-	-	-

Amostras	Tu*	Aa**	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Phialemonium</i> spp.	<i>Phaeoacremonium</i> spp.	<i>Trichoderma</i> spp.	FNE***	<i>Rhizopus</i> spp.	<i>Verticillium</i> spp.
AMA26	3,8	0,80	-	3	-	7	-	1	-	-	-
AMA27	3,7	0,85	6	20	-	-	-	-	-	-	-
AMA28	3,4	0,83	1	20	11	-	-	-	-	-	-
AMA29	3,7	0,85	3	6	11	-	-	-	-	-	-
AMA30	3,8	0,70	1	6	12	-	-	-	-	-	-
AMA31	3,8	0,77	-	-	15	-	-	-	-	-	-
AMA32	4,3	0,80	-	6	-	13	10	-	5	-	-
AMA33	3,8	0,76	1	2	8	-	-	-	-	-	-
AMA34	4,1	0,85	3	4	15	-	-	-	-	-	-
AMA35	3,4	0,83	-	17	18	-	-	-	-	-	-
AMA36	4,0	0,75	1	-	-	-	-	-	-	-	-
AMA37	3,9	0,84	-	9	15	-	-	3	-	-	-
AMA38	3,8	0,75	-	12	1	-	-	-	-	-	-
AMA39	3,7	0,74	-	11	13	-	-	-	-	-	-
AMA40	3,8	0,75	-	7	16	-	-	1	-	-	-
AMA41	4,4	0,79	1	10	-	27	15	-	-	-	-
AMA42	3,6	0,76	-	-	40	-	-	-	-	-	-
AMA43	4,1	0,83	-	10	-	606	24	-	-	-	-
AMA44	3,5	0,82	10	20	150	155	25	-	-	-	-
AMA45	3,9	0,79	-	2	2	25	12	-	-	-	-
AMA46	4,2	0,84	0,4	0,8	3,6	-	-	-	-	-	-
AMA47	3,6	0,69	1	1	2	7	-	-	-	-	-
AMA48	3,8	0,79	-	9	67	-	-	-	-	-	-
AMA49	3,7	0,83	-	20	-	66	14	-	-	-	-
AMA50	3,8	0,71	0,1	-	0,3	78	34	-	-	-	-
Média	3,8	0,81	0,7	7,8	12,2	27,7	6,8	0,1	0,2	0,0	0,0

\*Tu: Teor de umidade

\*\*Aa: Atividade de água

\*\*\*FNE: Fungo não-esporulado

Limite de detecção: 50 UFC/g

**Tabela A.4-** Níveis de umidade (teor de umidade e atividade de água) e número de unidades formadoras de colônias por grama ( $10^3$  UFC/g) em 50 amostras de cascas de castanha-do-Brasil (AMC1 a AMC50), provenientes do Estado do Amazonas – AM

Amostras	Tu*	Aa**	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Phialemonium</i> spp.	<i>Phaeoacremonium</i> spp.	<i>Trichoderma</i> spp.	FNE***	<i>Rhizopus</i> spp.	<i>Verticillium</i> spp.
AMC1	14,5	0,81	-	-	4	133	21	-	-	-	-
AMC2	14,1	0,78	20	40	-	728	102	-	-	-	-
AMC3	14,3	0,76	-	90	10	402	88	-	-	-	-
AMC4	14,8	0,68	-	40	-	804	96	-	-	-	-
AMC5	15,6	0,79	30	120	-	158	22	-	-	-	-
AMC6	13,4	0,77	-	12	-	99	33	-	-	-	-
AMC7	14,1	0,80	10	20	10	305	35	-	-	-	-
AMC8	14,5	0,71	0,8	2,3	5,2	-	-	-	-	-	-
AMC9	15,4	0,76	2	-	1	61	22	-	-	-	-
AMC10	14,7	0,76	-	40	-	759	41	-	10	-	-
AMC11	14,4	0,66	-	19	-	116	16	-	-	-	-
AMC12	15,5	0,72	-	1	-	7	-	-	-	-	-
AMC13	14,6	0,79	1	18	-	44	10	-	-	-	-
AMC14	13,1	0,84	-	20	120	-	-	-	-	-	-
AMC15	13,3	0,87	10	40	-	508	22	-	10	-	-
AMC16	14,0	0,85	-	40	10	909	61	-	-	-	-
AMC17	15,1	0,74	2	12	-	37	-	-	-	-	-
AMC18	16,3	0,79	-	40	20	252	38	-	-	-	-
AMC19	14,7	0,78	80	-	40	149	51	-	-	-	-
AMC20	13,8	0,71	-	-	-	916	74	-	-	-	-
AMC21	13,5	0,75	4	17	6	-	-	-	-	-	-
AMC22	13,3	0,69	-	40	260	-	-	-	-	-	-
AMC23	13,2	0,80	-	-	40	826	74	-	-	-	-
AMC24	13,9	0,68	-	30	-	69	21	-	-	-	-
AMC25	13,6	0,79	4	37	-	-	-	-	-	-	-

Amostras	Tu*	Aa**	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Phialemonium</i> spp.	<i>Phaeoacremonium</i> spp.	<i>Trichoderma</i> spp.	FNE***	<i>Rhizopus</i> spp.	<i>Verticillium</i> spp.
AMC26	13,7	0,79	3	17	-	19	-	-	-	-	-
AMC27	13,4	0,75	-	60	-	202	18	10	-	-	-
AMC28	14,0	0,74	10	8	-	21	2	-	-	-	-
AMC29	13,9	0,70	2	3	-	-	-	-	-	-	-
AMC30	14,0	0,63	2	7	1	-	-	-	-	-	-
AMC31	14,0	0,86	1	-	-	-	-	-	-	-	-
AMC32	13,7	0,74	-	230	-	387	43	-	-	-	-
AMC33	13,5	0,84	-	-	-	2944	256	-	-	-	-
AMC34	14,2	0,79	-	50	-	272	78	-	-	-	-
AMC35	14,2	0,70	-	70	10	750	210	-	-	-	-
AMC36	13,7	0,74	-	20	-	42	18	10	-	-	-
AMC37	14,2	0,84	-	50	-	225	5	-	-	-	-
AMC38	14,4	0,67	-	130	-	151	19	-	-	-	-
AMC39	13,4	0,84	-	-	120	72	38	-	-	-	-
AMC40	14,2	0,75	10	-	90	494	46	-	-	-	-
AMC41	14,0	0,71	10	80	80	-	-	-	-	-	-
AMC42	14,2	0,66	3	-	15	20	3	-	-	-	-
AMC43	14,1	0,75	-	40	-	412	58	-	-	-	-
AMC44	13,7	0,72	-	20	70	88	12	-	-	-	-
AMC45	14,3	0,77	-	90	30	1278	201	-	-	-	-
AMC46	13,6	0,83	-	610	-	197	12	-	-	-	-
AMC47	13,2	0,57	-	-	40	267	23	-	-	-	-
AMC48	13,6	0,71	-	10	50	254	27	-	-	-	-
AMC49	13,9	0,76	-	-	1270	54	46	-	-	-	-
AMC50	14,0	0,69	-	270	120	-	-	-	-	-	-
Média	14,1	0,75	4,1	48,9	48,4	308,6	38,8	0,4	0,4	0,0	0,0

\*Tu: Teor de umidade

\*\*Aa: Atividade de água

\*\*\*FNE: Fungo não-esporulado

Limite de detecção: 50 UFC/g

**Tabela A.5-** Níveis de umidade (teor de umidade e atividade de água) e número de unidades formadoras de colônias por grama ( $10^3$  UFC/g) em 50 amostras de amêndoas de castanha-do-Brasil (APA1 a APA50), provenientes do Estado do Amapá - AP

Amostras	Tu*	Aa**	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Phialemonium</i> spp.	<i>Phaeoacremonium</i> spp.	<i>Trichoderma</i> spp.	FNE***	<i>Rhizopus</i> spp.	<i>Verticillium</i> spp.	<i>Curvularia</i> spp.
APA1	7,2	0,88	0,2	-	0,8	1,2	-	-	0,3	-	-	-
APA2	6,9	0,88	-	-	-	48	32	-	-	-	-	-
APA3	8,0	0,88	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
APA4	6,7	0,86	1	-	2	20	14	-	-	-	-	-
APA5	10,3	0,79	0,11	0,4	-	0,83	-	-	-	-	-	-
APA6	7,4	0,88	-	-	0,6	6,3	-	-	-	-	-	-
APA7	4,8	0,80	-	-	-	24	6	10	-	-	-	-
APA8	7,2	0,89	-	1	7	8	-	-	-	-	1	-
APA9	4,9	0,84	0,1	-	-	9,3	-	-	-	-	-	-
APA10	5,1	0,95	-	6	1	4	-	-	-	-	-	-
APA11	5,4	0,77	0,3	0,7	-	10	1	0,1	-	-	-	-
APA12	4,5	0,71	-	-	180	-	-	-	-	-	-	-
APA13	5,7	0,75	-	-	-	19	3	-	-	-	-	-
APA14	5,7	0,73	0,1	0,7	0,1	4	-	0,1	-	-	-	-
APA15	5,3	0,78	0,1	1,4	0,2	18	1	-	-	-	-	-
APA16	4,9	0,69	-	2	-	62	5	-	-	-	-	-
APA17	6,3	0,67	0,2	2	-	2,3	-	0,1	-	-	-	-
APA18	4,2	0,67	-	-	3	12	-	-	-	-	-	-
APA19	4,3	0,63	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-
APA20	4,0	0,59	1	1	-	8	-	-	-	-	-	-
APA21	4,5	0,61	0,3	0,7	0,3	1,5	-	-	-	-	-	-
APA22	4,5	0,62	0,2	0,2	-	9,2	-	-	-	-	-	-
APA23	4,2	0,55	0,5	3,2	-	1,8	-	-	-	-	-	-
APA24	3,8	0,65	-	2	-	66	8	-	-	-	-	-
APA25	4,0	0,65	10	2,7	-	1,2	-	-	-	-	-	-

Amostras	Tu*	Aa**	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Phialemonium</i> spp.	<i>Pheacremonium</i> spp.	<i>Trichoderma</i> spp.	FNE***	<i>Rhizopus</i> spp.	<i>Verticillium</i> spp.	<i>Curvularia</i> spp.
APA26	4,5	0,57	-	1	2	12	5	-	-	-	-	-
APA27	4,9	0,60	-	0,2	0,4	1,3	-	-	-	-	-	-
APA28	4,6	0,65	0,2	0,8	0,1	4,2	-	-	-	-	-	-
APA29	4,7	0,65	-	2	1	1	-	-	-	-	-	-
APA30	4,0	0,59	0,1	-	-	4,3	-	-	-	-	-	-
APA31	5,6	0,58	-	-	-	7	3	-	-	-	-	-
APA32	4,0	0,82	-	10	-	70	7	-	-	-	-	-
APA33	4,9	0,69	-	-	10	3	-	-	-	-	-	-
APA34	5,4	0,82	-	-	2	3	-	1	-	-	-	-
APA35	9,8	0,89	4	2	-	24	4	-	-	-	-	-
APA36	8,5	0,89	2,3	-	-	1,6	-	0,1	-	-	-	-
APA37	6,0	0,74	-	10	10	35	15	-	-	-	-	-
APA38	6,4	0,79	1	-	-	37	12	1	-	-	-	-
APA39	7,4	0,90	1	-	-	11	-	-	2	-	2	-
APA40	4,6	0,75	-	1	-	27	3	-	-	-	-	-
APA41	7,5	0,78	1,1	1,7	-	2,2	-	-	-	-	-	-
APA42	6,9	0,78	-	3	2	-	-	1	-	-	-	-
APA43	8,5	0,85	0,3	0,5	-	1,7	-	0,1	-	-	-	-
APA44	4,4	0,78	0,1	2,8	-	3,7	-	-	-	-	-	-
APA45	8,4	0,86	0,6	0,5	-	4	1	-	-	-	-	-
APA46	4,8	0,82	10	-	50	33	17	-	-	-	-	-
APA47	6,2	0,91	-	3	13	-	-	-	-	-	-	-
APA48	6,2	0,82	-	5	-	24	5	-	-	-	-	-
APA49	5,9	0,88	-	2	1	16	1	-	1	-	-	-
APA50	7,1	0,86	1,8	0,1	-	-	-	-	-	0,1	-	-
Média	5,8	0,76	0,7	1,4	5,8	13,3	2,9	0,3	0,1	0,0	0,1	0,0

\*Tu: Teor de umidade

\*\*Aa: Atividade de água

\*\*\*FNE: Fungo não-esporulado

Limite de detecção: 50 UFC/g

**Tabela A.6-** Níveis de umidade (teor de umidade e atividade de água) e número de unidades formadoras de colônias por grama ( $10^3$  UFC/g) em 50 amostras de cascas de castanha-do-Brasil (APC1 a APC50), provenientes do Estado do Amapá - AP

Amostras	Tu*	Aa**	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Phialemonium</i> spp.	<i>Pheacremonium</i> spp.	<i>Trichoderma</i> spp.	FNE***	<i>Rhizopus</i> spp.	<i>Verticillium</i> spp.	<i>Curvularia</i> spp.
APC1	21,2	0,81	4	10	-	28	2	-	1	-	-	-
APC2	18,8	0,82	10	20	-	597	13	10	-	-	-	-
APC3	19,0	0,80	-	2	-	39	3	1	-	-	1	-
APC4	19,9	0,70	7	13	1	30	2	-	-	-	-	-
APC5	18,7	0,77	4	12	1	-	-	-	-	-	-	-
APC6	20,7	0,84	-	10	1	-	-	-	-	-	-	-
APC7	17,4	0,74	-	-	1	38	14	3	-	-	-	6
APC8	22,0	0,82	8	-	-	22	8	3	-	-	-	-
APC9	15,4	0,63	2	19	-	77	16	1	-	-	-	-
APC10	19,7	0,76	4	7	-	9	-	-	-	-	-	-
APC11	16,2	0,63	8	12	-	19	9	3	-	-	-	-
APC12	16,0	0,64	-	60	40	33	20	10	-	-	-	-
APC13	18,2	0,75	5	-	6	46	17	2	-	-	-	-
APC14	16,9	0,63	9	8	-	11	5	-	-	1	-	-
APC15	18,0	0,68	6	21	-	-	-	1	-	-	-	-
APC16	18,8	0,67	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-
APC17	15,4	0,64	7	12	-	9	-	-	1	-	-	-
APC18	14,9	0,58	2	10	2	22	-	-	1	-	-	-
APC19	13,0	0,58	2	-	20	-	-	3	-	-	-	-
APC20	13,1	0,59	1	12	-	2	-	-	-	-	-	-
APC21	15,4	0,65	4	10	4	39	4	-	-	-	-	-
APC22	13,0	0,59	2	7,3	0,4	1,6	-	-	-	-	-	-
APC23	14,8	0,58	5	12	2	27	5	1	-	-	-	-
APC24	14,4	0,58	2	12	3	-	-	4	-	-	-	-
APC25	14,6	0,65	-	-	-	2,1	-	0,2	-	-	-	-

Amostras	Tu*	Aa**	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Phialemonium</i> spp.	<i>Pheacremonium</i> spp.	<i>Trichoderma</i> spp.	FNE***	<i>Rhizopus</i> spp.	<i>Verticillium</i> spp.	<i>Curvularia</i> spp.
APC26	13,5	0,58	-	0,4	-	5,4	-	0,1	-	-	-	-
APC27	15,8	0,63	-	-	7	75	7	2	-	-	-	-
APC28	13,9	0,62	2	13	-	12	3	-	-	-	-	-
APC29	14,0	0,56	1	9	1	6	-	-	-	-	-	-
APC30	12,9	0,56	4	2	-	7	6	2	-	-	-	-
APC31	13,8	0,58	4	4	1	20	7	-	-	-	-	-
APC32	16,1	0,69	3	6	-	48	10	1	-	-	-	-
APC33	14,8	0,68	5	29	-	49	23	-	-	-	-	-
APC34	15,9	0,67	4	13	1	19	4	-	1	-	-	-
APC35	19,1	0,84	5	-	-	11	7	1	-	1	-	-
APC36	18,1	0,75	3	-	-	38	8	-	-	-	-	-
APC37	15,8	0,70	3	9	-	8	5	4	-	-	-	-
APC38	15,3	0,71	2	3	-	28	6	1	-	-	-	-
APC39	20,0	0,83	-	49	1	5	-	1	-	-	-	-
APC40	14,5	0,64	9	9	2	53	11	-	-	-	-	-
APC41	20,8	0,77	3	6	-	-	-	1	-	-	-	-
APC42	15,7	0,65	2	-	1	8	-	2	-	-	-	-
APC43	19,9	0,69	12	4	-	24	9	-	-	-	-	-
APC44	16,4	0,70	2	10	23	-	-	-	-	-	-	-
APC45	16,4	0,65	3	6	-	18	-	1	-	-	-	-
APC46	17,0	0,71	0,1	1	-	1,8	-	-	-	-	-	-
APC47	18,8	0,79	3	7	-	-	-	4	-	-	-	-
APC48	18,5	0,76	2	20	1	27	7	-	-	-	-	-
APC49	15,3	0,61	9	1	-	18	4	3	-	-	-	-
APC50	19,0	0,74	-	-	-	50	12	1	-	-	-	-
Média	16,7	0,68	0,7	1,4	5,9	13,3	2,9	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0

\*Tu: Teor de umidade

\*\* : Atividade de água

\*\*\*FNE: Fungo não-esporulado

Limite de detecção: 50 UFC/g.

**Tabela A.7-** Níveis de umidade (teor de umidade e atividade de água) e número de unidades formadoras de colônias por grama ( $10^3$  UFC/g) em 50 amostras de amêndoas de castanha-do-Brasil (PAA1 a PAA50), provenientes do Estado do Pará-PA

Amostras	Tu*	Aa**	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Phialemonium</i> spp.	<i>Pheacremonium</i> spp.	<i>Trichoderma</i> spp.	FNE***	<i>Rhizopus</i> spp.	<i>Verticillium</i> spp.	<i>Curvularia</i> spp.
PAA1	2,5	0,62	1	13	1	8	6	-	-	-	-	-
PAA2	2,9	0,61	-	2	-	6	1	-	-	-	-	-
PAA3	3,1	0,57	-	-	-	28	5	-	-	-	-	-
PAA4	3,3	0,64	-	8	-	1	-	-	-	-	-	-
PAA5	3,5	0,68	2	85	-	3	-	-	-	-	-	-
PAA6	3,4	0,64	-	0,1	0,1	1,3	-	0,3	-	-	-	-
PAA7	3,7	0,59	0,6	-	-	1,4	-	-	-	-	-	-
PAA8	5,4	0,56	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PAA9	4,1	0,68	-	11	-	-	-	-	-	-	-	-
PAA10	3,7	0,60	0,1	0,2	-	18	5	-	-	-	-	-
PAA11	3,8	0,60	-	1	-	10	-	-	-	-	-	-
PAA12	4,2	0,57	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
PAA13	4,3	0,62	-	1	-	17	6	-	-	-	-	-
PAA14	3,7	0,58	-	0,1	0,1	0,6	-	-	-	-	-	-
PAA15	3,8	0,57	-	-	-	27	-	-	-	-	-	-
PAA16	5,5	0,61	-	1	-	1,5	-	0,1	-	-	-	-
PAA17	3,5	0,58	0,1	3,5	-	0,3	-	-	-	-	-	-
PAA18	3,8	0,64	-	6	-	16	8	-	-	-	-	-
PAA19	4,3	0,71	-	2,6	0,1	0,6	-	-	-	-	0,1	-
PAA20	3,9	0,61	-	0,2	0,4	3	1	-	-	-	-	-
PAA21	3,8	0,59	-	3	0,1	1,3	-	-	-	-	-	-
PAA22	4,2	0,63	-	-	-	19	7	-	-	-	-	-
PAA23	3,9	0,71	-	4,6	0,1	1,2	-	-	-	-	-	-
PAA24	4,4	0,56	1,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PAA25	3,9	0,60	-	1,5	1,5	-	-	-	-	-	-	-

Amostras	Tu*	Aa**	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Phialemonium</i> spp.	<i>Pheacremonium</i> spp.	<i>Trichoderma</i> spp.	FNE***	<i>Rhizopus</i> spp.	<i>Verticillium</i> spp.	<i>Curvularia</i> spp.
PAA26	4,0	0,67	-	24	-	16	6	-	-	-	-	-
PAA27	8,3	0,63	-	2	1	5	-	-	-	-	-	-
PAA28	4,7	0,60	-	7,1	0,1	-	-	0,1	-	-	-	-
PAA29	4,4	0,74	-	-	-	6	2	-	-	-	-	-
PAA30	4,6	0,79	-	0,6	0,9	-	-	0,1	-	-	-	-
PAA31	4,2	0,627	-	1,8	0,1	2,8	-	-	-	-	-	-
PAA32	4,6	0,756	-	0,2	-	5,7	-	-	-	-	-	-
PAA33	4,0	0,675	-	3	-	5	-	1	-	-	-	-
PAA34	4,4	0,66	-	0,3	-	4	1	0,1	-	-	-	-
PAA35	4,3	0,66	0,2	2,3	-	2,3	-	-	-	-	-	-
PAA36	4,2	0,77	-	-	-	5	2	-	-	-	-	-
PAA37	5,3	0,63	0,3	0,2	-	1,7	-	-	-	-	-	-
PAA38	4,8	0,69	-	5	1	15	11	-	-	-	-	1
PAA39	4,1	0,62	-	1	-	8	-	-	-	-	-	-
PAA40	4,2	0,61	0,4	0,6	-	4,7	-	-	-	-	-	-
PAA41	4,2	0,65	-	0,6	-	3,3	-	0,1	0,1	-	-	-
PAA42	3,8	0,78	-	0,3	0,7	0,8	-	-	-	-	-	-
PAA43	4,1	0,59	-	2,5	-	0,4	-	0,1	-	-	-	-
PAA44	5,5	0,67	-	0,3	0,2	1,3	-	0,4	-	-	-	-
PAA45	4,0	0,61	-	0,4	-	3	2	-	-	-	-	-
PAA46	4,1	0,78	0,1	0,9	0,1	3,3	1	-	-	-	-	-
PAA47	4,5	0,73	0,1	0,1	-	2,3	-	1,4	-	-	-	-
PAA48	3,5	0,66	-	0,1	0,3	5,2	-	-	-	-	-	-
PAA49	3,9	0,61	-	1	-	27	4	1	3	-	-	-
PAA50	3,4	0,58	-	0,3	-	3,2	-	-	-	-	-	-
Média	4,2	0,64	0,2	4,0	0,2	5,9	1,4	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0

\*Tu: Teor de umidade

\*\*Aa: Atividade de água

\*\*\*FNE: Fungo não-esporulado

Limite de detecção: 50 UFC/g.

**Tabela A.8-** Níveis de umidade (teor de umidade e atividade de água) e número de unidades formadoras de colônias por grama ( $10^3$  UFC/g) em 50 amostras de cascas de castanha-do-Brasil (PAC1 a PAC50), provenientes do Estado do Pará-PA

Amostras	Tu*	Aa**	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Phialemonium</i> spp.	<i>Pheacremonium</i> spp.	<i>Trichoderma</i> spp.	FNE***	<i>Rhizopus</i> spp.	<i>Verticillium</i> spp.	<i>Curvularia</i> spp.
PAC1	13,0	0,62	-	60	-	184	46	-	-	-	-	-
PAC2	13,9	0,61	3	9	5	13	4	-	-	-	-	-
PAC3	13,3	0,58	10	30	-	548	182	-	-	-	-	-
PAC4	14,2	0,63	1	8	10	40	17	-	-	-	-	-
PAC5	15,2	0,67	0,5	2,7	0,7	3,8	-	-	-	-	-	-
PAC6	12,7	0,64	-	5	-	18	9	6	-	-	-	-
PAC7	13,3	0,60	1	7	-	29	8	-	-	-	-	-
PAC8	14,3	0,59	2	10	-	51	32	1	-	-	-	-
PAC9	14,1	0,64	-	6	-	25	5	-	1	-	-	-
PAC10	13,3	0,61	10	-	-	302	38	40	-	-	-	-
PAC11	13,2	0,61	0,2	-	0,3	7,8	-	-	-	-	-	-
PAC12	13,1	0,56	0,1	1,3	1,2	5,3	-	-	-	-	-	-
PAC13	12,3	0,61	-	8	-	19	5	1	1	-	-	-
PAC14	12,9	0,59	1	5	-	102	11	-	-	-	-	-
PAC15	12,6	0,58	0,9	1,2	0,4	3,2	-	-	-	-	-	-
PAC16	15,4	0,59	-	1	1	111	42	-	-	-	-	-
PAC17	12,8	0,59	0,4	2,3	1	5,2	-	-	-	-	-	-
PAC18	12,2	0,61	0,5	2	0,6	-	-	0,1	0,1	-	-	-
PAC19	16,3	0,69	0,4	-	0,6	1,2	-	0,2	0,1	-	-	-
PAC20	14,3	0,61	10	30	20	52	28	-	-	-	-	-
PAC21	14,8	0,59	-	3	3	14	3	2	-	-	-	-
PAC22	15,4	0,62	0,5	0,3	2,1	3,4	-	-	-	-	-	-
PAC23	12,9	0,63	1	6	-	59	33	1	-	-	-	-
PAC24	12,8	0,54	0,4	-	0,3	7,8	-	-	-	-	-	-
PAC25	12,3	0,63	2	8	3	89	35	-	-	-	-	-

Amostras	Tu*	Aa**	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Phialemonium</i> spp.	<i>Pheacremonium</i> spp.	<i>Trichoderma</i> spp.	FNE***	<i>Rhizopus</i> spp.	<i>Verticillium</i> spp.	<i>Curvularia</i> spp.
PAC26	15,5	0,65	10	10	-	488	42	-	-	-	-	-
PAC27	16,6	0,64	1	2	-	37	6	-	-	-	-	-
PAC28	15,6	0,61	-	13	-	79	9	3	-	-	-	-
PAC29	16,3	0,64	0,5	1	0,8	3,3	-	0,4	-	-	-	-
PAC30	16,9	0,71	1	2	2	41	4	3	-	-	-	-
PAC31	14,9	0,61	0,1	1,5	0,6	7,6	-	0,1	-	-	-	-
PAC32	16,1	0,61	0,3	1,4	-	6,3	-	-	0,1	-	-	-
PAC33	15,0	0,68	0,3	1,2	-	6	-	-	-	-	-	-
PAC34	16,1	0,66	1	3	1	45	8	-	-	-	-	-
PAC35	15,4	0,67	2	5	-	26	5	1	-	-	-	-
PAC36	17,1	0,67	-	0,4	-	1,6	-	-	-	-	-	-
PAC37	14,6	0,61	0,1	-	-	5,3	-	-	-	-	-	-
PAC38	16,0	0,66	1	3	3	52	39	-	-	-	-	1
PAC39	15,3	0,63	1	1	-	68	35	-	-	-	-	-
PAC40	16,2	0,64	0,2	-	-	3	1	-	-	-	-	-
PAC41	15,7	0,62	-	50	9	-	-	1	-	-	-	-
PAC42	14,9	0,65	-	7	1	53	29	-	-	-	-	-
PAC43	15,4	0,59	-	27	2	35	22	-	-	-	-	-
PAC44	15,4	0,61	-	2,1	-	2,3	-	-	0,1	-	-	-
PAC45	16,1	0,62	0,2	0,9	1	1,7	-	0,1	-	-	-	-
PAC46	14,8	0,66	-	15	-	55	27	-	-	-	-	-
PAC47	13,8	0,64	-	3,2	-	6,3	-	-	-	-	-	-
PAC48	14,2	0,66	-	3	1	45	17	-	-	-	-	1
PAC49	13,9	0,61	0,8	2,8	1,1	3	-	-	-	-	-	-
PAC50	13,3	0,58	1	2	-	3	15	1	-	-	-	1
Média	14,5	0,62	1,3	7,3	1,4	55,3	15,1	1,2	0,0	0,0	0,0	0,1

\*Tu: Teor de umidade

\*\*Aa: Atividade de água

\*\*\*FNE: Fungo não-esporulado

Limite de detecção: 50 UFC/g

**Tabela A.9** - Potencial aflatoxigênico, potencial de produção de ácido ciclopiazônico, produção de ácido aspergílico e identificação molecular das cepas de *Aspergillus*

Amostra	Aflatoxina	ACP	AFPA	Espécie de <i>Aspergillus</i>
AC A 01	BG	-	+	<i>A. nomius</i>
AC A 01	BG	-	++	<i>A. nomius</i>
AC A 03	BG	-	++	<i>A. nomius</i>
AC A 07	BG	-	+	<i>A. nomius</i>
AC A 07	BG	-	+	<i>A. parasiticus</i>
AC A 08	BG	-	--	<i>A. nomius</i>
AC A 09	B	-	++	<i>A. flavus</i>
AC A 09	NP	-	+++	<i>A. tamarii</i>
AC A 11	BG	-	--	<i>A. nomius</i>
AC A 12	BG	-	+++	<i>A. nomius</i>
AC A 13	NP	-	+++	<i>A. sclerotium</i>
AC A 16	NP	-	-	<i>A. versicolor</i>
AC A 18	BG	-	-	<i>A. nomius</i>
AC A 20	BG	-	-	<i>A. nomius</i>
AC A 23	BG	-	-	<i>A. nomius</i>
AC A 27	NP	-	-	<i>A. versicolor</i>
AC A 28	NP	-	+	<i>A. sydowii</i>
AC A 28	NP	+	+	<i>A. flavus</i>
AC A 29	BG	-	+++	<i>A. nomius</i>
AC A 29	NP	-	+	<i>A. tamarii</i>
AC A 31	BG	-	++	<i>A. nomius</i>
AC A 33	NP	-	--	<i>A. tamarii</i>
AC A 33	BG	-	+	<i>A. nomius</i>
AC A 35	B	+	-	<i>A. flavus</i>
AC A 35	NP	-	-	<i>A. flavus</i>
AC A 36	NP	-	--	<i>A. tamarii</i>
AC A 37	BG	-	+++	<i>A. nomius</i>
AC A 37	NP	-	-	<i>A. tamarii</i>
AC A 38	BG	-	++	<i>A. nomius</i>
AC A 39	BG	-	--	<i>A. nomius</i>
AC A 40	BG	-	+++	<i>A. nomius</i>
AC A 40	NP	-	--	<i>A. tamarii</i>
AC A 42	B	-	++	<i>A. flavus</i>
AC A 43	BG	-	++	<i>A. nomius</i>
AC A 45	B	-	-	<i>A. flavus</i>
AC A 46	BG	-	+++	<i>A. nomius</i>
AC A 47	BG	-	++	<i>A. nomius</i>
AC A 48	BG	-	-	<i>A. nomius</i>
AC A 49	B	+	+	<i>A. flavus</i>
AC A 49	NP	+	-	<i>A. versicolor</i>
AC C 01	BG	-	+++	<i>A. nomius</i>
AC C 03	B	-	+++	<i>A. flavus</i>
AC C 04	NP	-		<i>A. nomius</i>
AC C 05	BG	-	+++	<i>A. parasiticus</i>
AC C 06	BG	-	++	<i>A. nomius</i>
AC C 07	BG	-	-	<i>A. nomius</i>

ACC 07	NP	-	+	<i>A. flavus</i>
ACC 08	NP	+	-	<i>A. versicolor</i>
ACC 09	BG	-	+	<i>A. nomius</i>
ACC 12	BG	-	-	<i>A. nomius</i>
ACC 13	BG	-	++	<i>A. nomius</i>
ACC 13	BG	-	--	<i>A. nomius</i>
ACC 14	B	+	+++	<i>A. flavus</i>
ACC 15	BG	-	++	<i>A. nomius</i>
ACC 16	BG	-	+	<i>A. nomius</i>
ACC 16	BG	-	+	<i>A. nomius</i>
ACC 17	B	+	+++	<i>A. flavus</i>
ACC 18	B	+	+++	<i>A. flavus</i>
ACC 19	BG	-	+	<i>A. nomius</i>
ACC 20	BG	-	+	<i>A. nomius</i>
ACC 20	B	+	+	<i>A. flavus</i>
ACC 21	B	+	+	<i>A. flavus</i>
ACC 22	BG	-	+++	<i>A. nomius</i>
ACC 23	BG	-	-	<i>A. nomius</i>
ACC 24	BG	-	-	<i>A. pseudotamarii</i>
ACC 24	NP	-	-	<i>A. flavus</i>
ACC 25	BG	-	-	<i>A. nomius</i>
ACC 26	BG	-	-	<i>A. nomius</i>
ACC 26	B	+	+	<i>A. flavus</i>
ACC 27	NP	-	+++	<i>A. flavus</i>
ACC 28	B	+	-	<i>A. flavus</i>
ACC 28	BG	-	+++	<i>A. nomius</i>
ACC 28	NP	-	-	<i>A. flavus</i>
ACC 30	B	+	+	<i>A. flavus</i>
ACC 31	BG	-	-	<i>A. nomius</i>
ACC 33	BG	-	++	<i>A. nomius</i>
ACC 34	B	+	+++	<i>A. flavus</i>
ACC 35	BG	-	-	<i>A. nomius</i>
ACC 35	BG	-	-	<i>A. pseudotamarii</i>
ACC 35	NP	-	-	<i>A. versicolor</i>
ACC 36	BG	-	+	<i>A. nomius</i>
ACC 37	B	+	+++	<i>A. flavus</i>
ACC 38	BG	-	+	<i>A. nomius</i>
ACC 38	B	-	++	<i>A. flavus</i>
ACC 39	BG	-	+	<i>A. nomius</i>
ACC 39	BG	-	+	<i>A. nomius</i>
ACC 39	B	-	+	<i>A. flavus</i>
ACC 40	BG	-	--	<i>A. nomius</i>
ACC 41	BG	-	++	<i>A. nomius</i>
ACC 41	B	+	-	<i>A. flavus</i>
ACC 42	B	+	+++	<i>A. flavus</i>
ACC 43	B	-	+	<i>A. flavus</i>
ACC 46	BG	-	-	<i>A. nomius</i>
ACC 46	BG	-	+++	<i>A. nomius</i>
ACC 48	B	-	+++	<i>A. flavus</i>
ACC 49	NP	-	-	<i>A. sydowii</i>
ACC 49	B	+	+	<i>A. flavus</i>

AC C 50	B	-	+	<i>A. flavus</i>
AM A 06	BG	-	-	<i>A. nomius</i>
AM A 06	NP	+	++	<i>A. flavus</i>
AM A 13	NP	-	-	<i>A. versicolor</i>
AM A 16	BG	-	--	<i>A. nomius</i>
AM A 19	BG	-	+++	<i>A. nomius</i>
AM A 29	BG	-	--	<i>A. nomius</i>
AM A 30	BG	-	-	<i>A. nomius</i>
AM A 33	BG	-	-	<i>A. nomius</i>
AM A 33	BG	-	-	<i>A. nomius</i>
AM A 34	BG	-	-	<i>A. nomius</i>
AM A 36	BG	-	+	<i>A. nomius</i>
AM A 41	BG	-	+++	<i>A. nomius</i>
AM A 44	B	-	+	<i>A. flavus</i>
AM A 46	BG	-	+	<i>A. nomius</i>
AM A 50	BG	-	-	<i>A. nomius</i>
AM C 02	BG	-	-	<i>A. nomius</i>
AM C 05	B	-	++	<i>A. flavus</i>
AM C 08	BG	-	+++	<i>A. nomius</i>
AM C 09	BG	-	++	<i>A. nomius</i>
AM C 13	BG	-	-	<i>A. nomius</i>
AM C 15	BG	-	++	<i>A. nomius</i>
AM C 17	BG	-	-	<i>A. nomius</i>
AM C 21	NP	-	-	<i>A. caelatus</i>
AM C 21	NP	-	-	<i>A. tamaritii</i>
AM C 25	BG	-	++	<i>A. nomius</i>
AM C 28	BG	-	--	<i>A. nomius</i>
AM C 29	NP	-	+	<i>A. flavus</i>
AM C 30	BG	-	+	<i>A. nomius</i>
AM C 31	BG	-	-	<i>A. nomius</i>
AM C 41	BG	-	+	<i>A. nomius</i>
AM C 42	BG	-	++	<i>A. nomius</i>
AP A 01	B	+	+	<i>A. flavus</i>
AP A 01	NP	-	+++	<i>A. flavus</i>
AP A 03	BG	-	+++	<i>A. nomius</i>
AP A 04	BG	-	-	<i>A. nomius</i>
AP A 05	BG	-	-	<i>A. nomius</i>
AP A 09	B	+	-	<i>A. flavus</i>
AP A 11	BG	-	+++	<i>A. nomius</i>
AP A 15	BG	-	++	<i>A. nomius</i>
AP A 17	BG	-	-	<i>A. nomius</i>
AP A 20	BG	-	++	<i>A. nomius</i>
AP A 21	BG	-	+	<i>A. nomius</i>
AP A 22	BG	-	++	<i>A. nomius</i>
AP A 23	BG	-	+++	<i>A. nomius</i>
AP A 23	B	+	+++	<i>A. flavus</i>
AP A 25	BG	-	+++	<i>A. parasiticus</i>
AP A 28	BG	-	-	<i>A. nomius</i>
AP A 28	NP	+	++	<i>A. versicolor</i>
AP A 30	BG	-	-	<i>A. nomius</i>
AP A 35	BG	-	+	<i>A. nomius</i>

AP A 36	BG	-	++	<i>A. parasiticus</i>
AP A 38	BG	-	++	<i>A. nomius</i>
AP A 39	BG	-	++	<i>A. nomius</i>
AP A 41	NP	-	+++	<i>A. persii</i>
AP A 41	BG	-	-	<i>A. nomius</i>
AP A 43	BG	-	-	<i>A. nomius</i>
AP A 43	B	-	++	<i>A. flavus</i>
AP A 44	BG	-	-	<i>A. nomius</i>
AP A 45	BG	-	+	<i>A. nomius</i>
AP A 46	BG	-	++	<i>A. nomius</i>
AP A 50	B	+	++	<i>A. flavus</i>
AP A 50	BG	-	-	<i>A. nomius</i>
AP C 01	BG	-	+	<i>A. nomius</i>
AP C 01	B	-	+++	<i>A. flavus</i>
AP C 02	BG	-	++	<i>A. nomius</i>
AP C 04	BG	-	+++	<i>A. nomius</i>
AP C 04	B	-	+	<i>A. flavus</i>
AP C 05	BG	-	-	<i>A. nomius</i>
AP C 05	NP	+	-	<i>A. flavus</i>
AP C 08	B	-	+++	<i>A. flavus</i>
AP C 09	BG	-	+	<i>A. nomius</i>
AP C 10	B	+	+++	<i>A. flavus</i>
AP C 13	BG	-	-	<i>A. nomius</i>
AP C 14	BG	-	+	<i>A. nomius</i>
AP C 14	BG	-	+	<i>A. nomius</i>
AP C 15	BG	-	+	<i>A. nomius</i>
AP C 15	NP	+	+++	<i>A. flavus</i>
AP C 16	NP	+	+++	<i>A. flavus</i>
AP C 17	BG	-	++	<i>A. nomius</i>
AP C 17	B	-	+++	<i>A. flavus</i>
AP C 19	NP	+	+++	<i>A. flavus</i>
AP C 20	BG	-	+++	<i>A. nomius</i>
AP C 21	BG	-	-	<i>A. nomius</i>
AP C 22	BG	-	+	<i>A. nomius</i>
AP C 22	NP	+	+++	<i>A. flavus</i>
AP C 23	BG	-	+	<i>A. nomius</i>
AP C 29	BG	-	--	<i>A. nomius</i>
AP C 30	BG	-	+	<i>A. nomius</i>
AP C 31	BG	-	+++	<i>A. nomius</i>
AP C 32	B	-	--	<i>A. flavus</i>
AP C 33	BG	-	+++	<i>A. nomius</i>
AP C 33	NP	-	++	<i>A. flavus</i>
AP C 34	BG	-	-	<i>A. nomius</i>
AP C 35	BG	-	++	<i>A. nomius</i>
AP C 37	BG	-	+	<i>A. nomius</i>
AP C 38	BG	-	+++	<i>A. nomius</i>
AP C 40	NP	-	+++	<i>A. flavus</i>
AP C 40	BG	-	+++	<i>A. nomius</i>
AP C 41	BG	-	-	<i>A. nomius</i>
AP C 42	NP	+	++	<i>A. flavus</i>
AP C 43	B	+	++	<i>A. flavus</i>

AP C 43	BG	-	+	<i>A. nomius</i>
AP C 44	BG	-	+	<i>A. nomius</i>
AP C 44	BG	-	-	<i>A. nomius</i>
AP C 45	BG	-	+++	<i>A. nomius</i>
AP C 46	BG	-	-	<i>A. nomius</i>
AP C 46	BG	-	-	<i>A. nomius</i>
AP C 47	BG	-	-	<i>A. nomius</i>
AP C 47	B	-	+++	<i>A. flavus</i>
AP C 48	BG	-	-	<i>A. nomius</i>
AP C 49	BG	-	+	<i>A. nomius</i>
AP C 49	NP	+	+++	<i>A. flavus</i>
PA A 01	NP	+	+	<i>A. flavus</i>
PA A 05	B	+	+++	<i>A. flavus</i>
PA A 06	NP	-	-	<i>A. sydowii</i>
PA A 08	B	+	+	<i>A. flavus</i>
PA A 10	B	+	+++	<i>A. flavus</i>
PA A 17	B	+	+	<i>A. flavus</i>
PA A 24	B	+	+	<i>A. flavus</i>
PA A 35	NP	-	-	<i>A. versicolor</i>
PA A 37	B	+	++	<i>A. flavus</i>
PA A 38	NP	-	-	<i>A. sydowii</i>
PA A 40	NP	+	++	<i>A. flavus</i>
PA A 46	B	+	++	<i>A. flavus</i>
PA A 47	BG	-	+	<i>A. nomius</i>
PA C 02	BG	-	++	<i>A. nomius</i>
PA C 03	B	+	+	<i>A. flavus</i>
PA C 04	BG	-	+++	<i>A. nomius</i>
PA C 05	BG	-	-	<i>A. nomius</i>
PA C 07	BG	-	++	<i>A. nomius</i>
PA C 08	BG	-	+++	<i>A. nomius</i>
PA C 10	BG	-	-	<i>A. nomius</i>
PA C 11	BG	-	-	<i>A. nomius</i>
PA C 12	BG	-	-	<i>A. nomius</i>
PA C 15	BG	-	++	<i>A. nomius</i>
PA C 17	BG	-	--	<i>A. nomius</i>
PA C 18	B	+	+++	<i>A. flavus</i>
PA C 20	BG	-	+++	<i>A. nomius</i>
PA C 22	BG	-	+	<i>A. nomius</i>
PA C 23	BG	-	-	<i>A. nomius</i>
PA C 24	BG	-	+++	<i>A. nomius</i>
PA C 25	BG	-	+++	<i>A. nomius</i>
PA C 26	BG	-	-	<i>A. nomius</i>
PA C 27	NP	-	--	<i>A. flavus</i>
PA C 29	BG	-	+++	<i>A. nomius</i>
PA C 31	BG	-	-	<i>A. nomius</i>
PA C 32	BG	-	+	<i>A. nomius</i>
PA C 34	BG	-	+++	<i>A. nomius</i>
PA C 35	BG	-	+++	<i>A. nomius</i>
PA C 38	BG	-	+	<i>A. nomius</i>
PA C 40	NP	+	+	<i>A. flavus</i>
PA C 40	NP	-	-	<i>A. caelatus</i>

PA C 40	BG	-	++	<i>A. parasiticus</i>
PA C 45	B	+	+++	<i>A. flavus</i>
PA C 49	BG	-	+	<i>A. nomius</i>
PA C 50	BG	-	-	<i>A. nomius</i>

B → cepas produtoras de aflatoxinas do grupo B (AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub>)

BG → cepas produtoras de aflatoxinas dos grupos B e G (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>)

NP → cepas não produtoras de aflatoxinas

ACP (+) → cepas produtoras de ACP

ACP (-) → cepas não produtoras de ACP

AFPA (+++ , ++ , +) → cepas produtoras de ácido aspergílico os sinais (+) indicam a intensidade do reverso laranja

AFPA (-) → cepas não produtoras de ácido aspergílico

**Tabela A.10** - Incidência de aflatoxinas ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) e ácido ciclopiazônico ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) em 50 amostras de amêndoas de castanha-do-Brasil (ACA1 a ACA50), provenientes do Estado do Acre – AC

Amostra	Concentração de aflatoxinas em $\mu\text{g}/\text{kg}$				Concentração de ACP em $\mu\text{g}/\text{kg}$
	AFB <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	AFG <sub>1</sub>	AFG <sub>2</sub>	
ACA1	ND	ND	ND	ND	ND
ACA2	ND	ND	ND	ND	ND
ACA3	ND	ND	ND	ND	ND
ACA4	ND	ND	ND	ND	ND
ACA5	ND	ND	ND	ND	ND
ACA6	ND	ND	ND	ND	ND
ACA7	ND	ND	ND	ND	ND
ACA8	ND	ND	ND	ND	ND
ACA9	ND	ND	ND	ND	ND
ACA10	ND	ND	ND	ND	ND
ACA11	ND	ND	ND	ND	ND
ACA12	ND	ND	ND	ND	ND
ACA13	11,97	ND	17,04	ND	ND
ACA14	ND	ND	ND	ND	ND
ACA15	ND	ND	ND	ND	ND
ACA16	ND	ND	ND	ND	ND
ACA17	ND	ND	ND	ND	ND
ACA18	ND	ND	ND	ND	ND
ACA19	ND	ND	ND	ND	ND
ACA20	ND	ND	ND	ND	ND
ACA21	ND	ND	ND	ND	ND
ACA22	83,31	13,76	ND	ND	ND
ACA23	ND	ND	ND	ND	ND
ACA24	ND	ND	ND	ND	ND
ACA25	ND	ND	ND	ND	ND

Amostra	Concentração de aflatoxinas em $\mu\text{g}/\text{kg}$				Concentração de ACP em $\mu\text{g}/\text{kg}$
	AFB <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	AFG <sub>1</sub>	AFG <sub>2</sub>	
ACA26	ND	ND	ND	ND	ND
ACA27	ND	ND	ND	ND	ND
ACA28	ND	ND	ND	ND	151,33
ACA29	ND	ND	ND	ND	ND
ACA30	ND	ND	ND	ND	ND
ACA31	ND	ND	ND	ND	ND
ACA32	ND	ND	ND	ND	ND
ACA33	ND	ND	ND	ND	ND
ACA34	ND	ND	ND	ND	ND
ACA35	ND	ND	ND	ND	143,56
ACA36	ND	ND	ND	ND	ND
ACA37	ND	ND	ND	ND	ND
ACA38	ND	ND	ND	ND	ND
ACA39	ND	ND	ND	ND	ND
ACA40	ND	ND	ND	ND	ND
ACA41	ND	ND	ND	ND	ND
ACA42	ND	ND	ND	ND	ND
ACA43	ND	ND	ND	ND	ND
ACA44	141,72	7,86	98,39	14,74	ND
ACA45	ND	ND	ND	ND	ND
ACA46	ND	ND	ND	ND	ND
ACA47	ND	ND	ND	ND	ND
ACA48	ND	ND	ND	ND	ND
ACA49	ND	ND	ND	ND	124,67
ACA50	1058,00	130,4	243,04	223,6	ND

ND: Não detectado.

Limite de detecção para aflatoxinas 1,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$

Limite de detecção para ácido ciclopiazônico: 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$

**Tabela A.11** - Incidência de aflatoxinas ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ácido ciclopiazônico ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) em 50 amostras de cascas de castanha-do-Brasil (ACC1 a ACC50), provenientes do Estado do Acre – AC

Amostra	Concentração de aflatoxinas em $\mu\text{g}/\text{kg}$				Concentração de
	AFB <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	AFG <sub>1</sub>	AFG <sub>2</sub>	ACP em $\mu\text{g}/\text{kg}$
ACC1	ND	ND	ND	ND	ND
ACC2	ND	ND	ND	ND	ND
ACC3	ND	ND	ND	ND	ND
ACC4	ND	ND	ND	ND	ND
ACC5	ND	ND	ND	ND	ND
ACC6	ND	ND	ND	ND	ND
ACC7	ND	ND	ND	ND	ND
ACC8	ND	ND	ND	ND	ND
ACC9	ND	ND	ND	ND	ND
ACC10	ND	ND	ND	ND	ND
ACC11	ND	ND	ND	ND	ND
ACC12	7,82	1,12	4,97	ND	ND
ACC13	ND	ND	ND	ND	ND
ACC14	ND	ND	ND	ND	128,31
ACC15	ND	ND	ND	ND	ND
ACC16	ND	ND	ND	ND	ND
ACC17	ND	ND	ND	ND	ND
ACC18	ND	ND	ND	ND	ND
ACC19	6,87	ND	4,37	ND	ND
ACC20	ND	ND	ND	ND	133,56
ACC21	ND	ND	ND	ND	ND
ACC22	ND	ND	ND	ND	ND
ACC23	ND	ND	ND	ND	ND
ACC24	ND	ND	ND	ND	ND
ACC25	ND	ND	ND	ND	ND

Amostra	Concentração de aflatoxinas em µg/kg				Concentração de
	AFB <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	AFG <sub>1</sub>	AFG <sub>2</sub>	ACP em µg/kg
ACC26	ND	ND	ND	ND	ND
ACC27	ND	ND	ND	ND	ND
ACC28	ND	ND	ND	ND	ND
ACC29	ND	ND	ND	ND	ND
ACC30	ND	ND	ND	ND	118,76
ACC31	ND	ND	ND	ND	ND
ACC32	ND	ND	ND	ND	ND
ACC33	ND	ND	ND	ND	ND
ACC34	ND	ND	ND	ND	ND
ACC35	ND	ND	ND	ND	ND
ACC36	ND	ND	ND	ND	ND
ACC37	ND	ND	ND	ND	ND
ACC38	9,84	ND	7,87	ND	ND
ACC39	ND	ND	ND	ND	103,24
ACC40	ND	ND	ND	ND	ND
ACC41	ND	ND	ND	ND	101,28
ACC42	3,12	ND	ND	ND	ND
ACC43	ND	ND	ND	ND	ND
ACC44	ND	ND	ND	ND	ND
ACC45	ND	ND	ND	ND	ND
ACC46	ND	ND	ND	ND	ND
ACC47	ND	ND	ND	ND	ND
ACC48	16,12	ND	ND	ND	ND
ACC49	ND	ND	ND	ND	ND
ACC50	61,84	3,07	46,30	6,01	ND

ND: Não detectado.

Limite de detecção para aflatoxinas: 1,5 µg/kg

Limite de detecção para ácido ciclopiazônico: 50 µg/kg

**Tabela A.12** - Incidência de aflatoxinas ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ácido ciclopiazônico ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) em 50 amostras de amêndoas de castanha-do-Brasil (AMA1 a AMA50), provenientes do Estado do Amazonas – AM

Amostra	Concentração de aflatoxinas em $\mu\text{g}/\text{kg}$				Concentração de
	AFB <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	AFG <sub>1</sub>	AFG <sub>2</sub>	ACP em $\mu\text{g}/\text{kg}$
AMA1	ND	ND	ND	ND	ND
AMA2	ND	ND	ND	ND	ND
AMA3	ND	ND	ND	ND	ND
AMA4	ND	ND	ND	ND	ND
AMA5	ND	ND	ND	ND	ND
AMA6	ND	ND	ND	ND	132,86
AMA7	ND	ND	ND	ND	ND
AMA8	ND	ND	ND	ND	ND
AMA9	ND	ND	ND	ND	ND
AMA10	ND	ND	ND	ND	ND
AMA11	ND	ND	ND	ND	ND
AMA12	36,60	1,61	12,63	ND	ND
AMA13	ND	ND	ND	ND	ND
AMA14	ND	ND	ND	ND	ND
AMA15	ND	ND	ND	ND	ND
AMA16	ND	ND	ND	ND	ND
AMA17	27,98	1,05	10,03	ND	ND
AMA18	ND	ND	ND	ND	ND
AMA19	ND	ND	ND	ND	ND
AMA20	ND	ND	ND	ND	ND
AMA21	20,83	ND	5,87	ND	ND
AMA22	ND	ND	ND	ND	ND
AMA23	ND	ND	ND	ND	ND
AMA24	ND	ND	ND	ND	ND
AMA25	ND	ND	ND	ND	ND

Amostra	Concentração de aflatoxinas em µg/kg				Concentração de
	AFB <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	AFG <sub>1</sub>	AFG <sub>2</sub>	ACP em µg/kg
AMA26	ND	ND	ND	ND	ND
AMA27	22,06	ND	ND	ND	ND
AMA28	ND	ND	ND	ND	ND
AMA29	6,81	ND	2,68	ND	ND
AMA30	ND	ND	ND	ND	ND
AMA31	ND	ND	ND	ND	ND
AMA32	ND	ND	ND	ND	ND
AMA33	24,58	ND	9,61	ND	ND
AMA34	22,70	ND	7,59	ND	ND
AMA35	ND	ND	ND	ND	ND
AMA36	32,79	ND	14,80	1,79	ND
AMA37	ND	ND	ND	ND	ND
AMA38	ND	ND	ND	ND	ND
AMA39	ND	ND	ND	ND	ND
AMA40	ND	ND	ND	ND	ND
AMA41	ND	ND	ND	ND	ND
AMA42	ND	ND	ND	ND	ND
AMA43	ND	ND	ND	ND	ND
AMA44	26,74	ND	ND	ND	ND
AMA45	ND	ND	ND	ND	ND
AMA46	ND	ND	ND	ND	ND
AMA47	ND	ND	ND	ND	ND
AMA48	ND	ND	ND	ND	ND
AMA49	ND	ND	ND	ND	ND
AMA50	ND	ND	ND	ND	ND

ND: Não detectado.

Limite de detecção para aflatoxinas: 1,5 µg/kg

Limite de detecção para ácido ciclopiazônico: 50 µg/kg

**Tabela A.13** - Incidência de aflatoxinas ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ácido ciclopiazônico ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) em 50 amostras de cascas de castanha-do-Brasil (AMC1 a AMC50), provenientes do Estado do Amazonas – AM

Amostra	Concentração de aflatoxinas em $\mu\text{g}/\text{kg}$				Concentração de
	AFB <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	AFG <sub>1</sub>	AFG <sub>2</sub>	ACP em $\mu\text{g}/\text{kg}$
AMC1	ND	ND	ND	ND	ND
AMC2	9,48	ND	3,09	ND	ND
AMC3	ND	ND	ND	ND	ND
AMC4	ND	ND	ND	ND	ND
AMC5	ND	ND	11,50	ND	ND
AMC6	ND	ND	ND	ND	ND
AMC7	ND	ND	ND	ND	ND
AMC8	6,70	ND	2,67	ND	ND
AMC9	7,75	ND	2,82	ND	ND
AMC10	ND	ND	ND	ND	ND
AMC11	ND	ND	ND	ND	ND
AMC12	9,46	ND	3,07	ND	ND
AMC13	7,58	ND	3,20	ND	ND
AMC14	ND	ND	ND	ND	ND
AMC15	ND	ND	ND	ND	ND
AMC16	ND	ND	ND	ND	ND
AMC17	2,98	ND	1,61	ND	ND
AMC18	ND	ND	ND	ND	ND
AMC19	ND	ND	ND	ND	ND
AMC20	ND	ND	ND	ND	ND
AMC21	4,02	ND	2,82	ND	ND
AMC22	ND	ND	ND	ND	ND
AMC23	ND	ND	ND	ND	ND
AMC24	ND	ND	ND	ND	ND
AMC25	ND	ND	ND	ND	ND

Amostra	Concentração de aflatoxinas em $\mu\text{g/kg}$				Concentração de
	AFB <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	AFG <sub>1</sub>	AFG <sub>2</sub>	ACP em $\mu\text{g/kg}$
AMC26	ND	ND	ND	ND	ND
AMC27	ND	ND	ND	ND	ND
AMC28	ND	ND	ND	ND	ND
AMC29	ND	ND	ND	ND	ND
AMC30	ND	ND	ND	ND	ND
AMC31	ND	ND	ND	ND	ND
AMC32	ND	ND	ND	ND	ND
AMC33	ND	ND	ND	ND	ND
AMC34	ND	ND	ND	ND	ND
AMC35	ND	ND	ND	ND	ND
AMC36	ND	ND	ND	ND	ND
AMC37	ND	ND	ND	ND	ND
AMC38	ND	ND	ND	ND	ND
AMC39	ND	ND	ND	ND	ND
AMC40	ND	ND	ND	ND	ND
AMC41	ND	ND	ND	ND	ND
AMC42	ND	ND	ND	ND	ND
AMC43	ND	ND	ND	ND	ND
AMC44	ND	ND	ND	ND	ND
AMC45	ND	ND	ND	ND	ND
AMC46	ND	ND	ND	ND	ND
AMC47	ND	ND	ND	ND	ND
AMC48	ND	ND	ND	ND	ND
AMC49	ND	ND	ND	ND	ND
AMC50	ND	ND	ND	ND	ND

ND: Não detectado.

Limite de detecção para aflatoxinas: 1,5  $\mu\text{g/kg}$

Limite de detecção para ácido ciclopiazônico: 50  $\mu\text{g/kg}$

**Tabela A.14** - Incidência de aflatoxinas ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ácido ciclopiazônico ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) em 50 amostras de amêndoas de castanha-do-Brasil (APA1 a APA50), provenientes do Estado do AMAPÁ - AP

Amostra	Concentração de aflatoxinas em $\mu\text{g}/\text{kg}$				Concentração de ACP em $\mu\text{g}/\text{kg}$
	AFB <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	AFG <sub>1</sub>	AFG <sub>2</sub>	
APA1	ND	ND	ND	ND	74,69
APA2	ND	ND	ND	ND	ND
APA3	ND	ND	ND	ND	ND
APA4	ND	ND	ND	ND	ND
APA5	ND	ND	ND	ND	ND
APA6	ND	ND	ND	ND	ND
APA7	ND	ND	ND	ND	ND
APA8	ND	ND	ND	ND	ND
APA9	ND	ND	ND	ND	143,26
APA10	ND	ND	ND	ND	ND
APA11	ND	ND	ND	ND	ND
APA12	ND	ND	ND	ND	ND
APA13	ND	ND	ND	ND	ND
APA14	ND	ND	ND	ND	ND
APA15	ND	ND	ND	ND	ND
APA16	ND	ND	ND	ND	ND
APA17	ND	ND	ND	ND	ND
APA18	ND	ND	ND	ND	ND
APA19	ND	ND	ND	ND	ND
APA20	38,73	7,68	ND	ND	ND
APA21	2,60	ND	ND	ND	ND
APA22	ND	ND	ND	ND	ND
APA23	1,64	ND	ND	ND	161,2
APA24	ND	ND	ND	ND	ND
APA25	ND	ND	ND	ND	ND

Amostra	Concentração de aflatoxinas em $\mu\text{g}/\text{kg}$				Concentração de
	AFB <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	AFG <sub>1</sub>	AFG <sub>2</sub>	ACP em $\mu\text{g}/\text{kg}$
APA26	ND	ND	ND	ND	ND
APA27	ND	ND	ND	ND	ND
APA28	ND	ND	ND	ND	ND
APA29	ND	ND	ND	ND	ND
APA30	ND	ND	ND	ND	ND
APA31	ND	ND	ND	ND	ND
APA32	ND	ND	ND	ND	ND
APA33	ND	ND	ND	ND	ND
APA34	ND	ND	ND	ND	ND
APA35	3,14	0,56	2,93	0,86	ND
APA36	ND	ND	ND	ND	ND
APA37	ND	ND	ND	ND	ND
APA38	ND	ND	ND	ND	ND
APA39	ND	ND	ND	ND	ND
APA40	2,50	ND	ND	ND	ND
APA41	ND	ND	ND	ND	ND
APA42	ND	ND	ND	ND	ND
APA43	ND	ND	ND	ND	ND
APA44	ND	ND	ND	ND	ND
APA45	ND	ND	ND	ND	ND
APA46	ND	ND	ND	ND	ND
APA47	ND	ND	ND	ND	ND
APA48	ND	ND	ND	ND	ND
APA49	ND	ND	ND	ND	ND
APA50	ND	ND	ND	ND	ND

ND: Não detectado.

Limite de detecção para aflatoxinas: 1,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$

Limite de detecção para ácido ciclopiazônico: 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$

**Tabela A.15** - Incidência de aflatoxinas ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ácido ciclopiazônico ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) em 50 amostras de cascas de castanha-do-Brasil (APC1 a APC50), provenientes do Estado do AMAPÁ - AP

Amostra	Concentração de aflatoxinas em $\mu\text{g}/\text{kg}$				Concentração de
	AFB <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	AFG <sub>1</sub>	AFG <sub>2</sub>	ACP em $\mu\text{g}/\text{kg}$
APC1	3,73	ND	ND	ND	ND
APC2	ND	ND	ND	ND	ND
APC3	ND	ND	ND	ND	ND
APC4	ND	ND	ND	ND	ND
APC5	ND	ND	ND	ND	140,24
APC6	ND	ND	ND	ND	ND
APC7	ND	ND	ND	ND	ND
APC8	ND	ND	ND	ND	ND
APC9	ND	ND	ND	ND	ND
APC10	ND	ND	ND	ND	ND
APC11	ND	ND	ND	ND	ND
APC12	ND	ND	ND	ND	ND
APC13	ND	ND	ND	ND	ND
APC14	ND	ND	ND	ND	ND
APC15	ND	ND	ND	ND	134,15
APC16	ND	ND	ND	ND	ND
APC17	3,66	ND	ND	ND	ND
APC18	ND	ND	ND	ND	ND
APC19	ND	ND	ND	ND	ND
APC20	15,11	ND	1,99	ND	ND
APC21	ND	ND	ND	ND	ND
APC22	ND	ND	ND	ND	108,76
APC23	ND	ND	ND	ND	ND
APC24	ND	ND	ND	ND	ND
APC25	ND	ND	ND	ND	ND

Amostra	Concentração de aflatoxinas em µg/kg				Concentração de
	AFB <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	AFG <sub>1</sub>	AFG <sub>2</sub>	ACP em µg/kg
APC26	ND	ND	ND	ND	ND
APC27	ND	ND	ND	ND	ND
APC28	ND	ND	ND	ND	ND
APC29	ND	ND	ND	ND	ND
APC30	ND	ND	ND	ND	ND
APC31	ND	ND	ND	ND	ND
APC32	ND	ND	ND	ND	ND
APC33	ND	ND	ND	ND	ND
APC34	ND	ND	ND	ND	ND
APC35	ND	ND	ND	ND	ND
APC36	ND	ND	ND	ND	ND
APC37	ND	ND	ND	ND	ND
APC38	ND	ND	ND	ND	ND
APC39	ND	ND	ND	ND	ND
APC40	ND	ND	ND	ND	ND
APC41	ND	ND	ND	ND	ND
APC42	ND	ND	ND	ND	158,36
APC43	3,95	ND	ND	ND	128,61
APC44	ND	ND	ND	ND	ND
APC45	ND	ND	ND	ND	ND
APC46	ND	ND	ND	ND	ND
APC47	5,09	ND	ND	ND	ND
APC48	ND	ND	ND	ND	ND
APC49	ND	ND	ND	ND	105,77
APC50	ND	ND	ND	ND	ND

ND: Não detectado.

Limite de detecção para aflatoxinas: 1,5 µg/kg

Limite de detecção para ácido ciclopiazônico: 50 µg/kg

**Tabela A.16** - Incidência de aflatoxinas ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ácido ciclopiazônico ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de 50 amostras de amêndoas de castanha-do-Brasil (PAA1 a PAA50), provenientes do Estado do Pará – PA

Amostra	Concentração de aflatoxinas em $\mu\text{g}/\text{kg}$				Concentração de
	AFB <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	AFG <sub>1</sub>	AFG <sub>2</sub>	ACP em $\mu\text{g}/\text{kg}$
PAA1	1,81	ND	ND	ND	ND
PAA2	ND	ND	ND	ND	ND
PAA3	ND	ND	ND	ND	ND
PAA4	ND	ND	ND	ND	ND
PAA5	ND	ND	ND	ND	123,31
PAA6	ND	ND	ND	ND	ND
PAA7	ND	ND	ND	ND	ND
PAA8	ND	ND	ND	ND	ND
PAA9	ND	ND	ND	ND	ND
PAA10	ND	ND	ND	ND	98,65
PAA11	ND	ND	ND	ND	ND
PAA12	ND	ND	ND	ND	ND
PAA13	ND	ND	ND	ND	ND
PAA14	2,77	ND	ND	ND	ND
PAA15	ND	ND	ND	ND	ND
PAA16	ND	ND	ND	ND	ND
PAA17	ND	ND	ND	ND	100,32
PAA18	ND	ND	ND	ND	ND
PAA19	ND	ND	ND	ND	ND
PAA20	6,91	ND	ND	ND	ND
PAA21	ND	ND	ND	ND	ND
PAA22	ND	ND	ND	ND	ND
PAA23	ND	ND	ND	ND	ND
PAA24	ND	ND	ND	ND	ND
PAA25	ND	ND	ND	ND	ND

Amostra	Concentração de aflatoxinas em µg/kg				Concentração de
	AFB <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	AFG <sub>1</sub>	AFG <sub>2</sub>	ACP em µg/kg
PAA26	ND	ND	ND	ND	ND
PAA27	ND	ND	ND	ND	ND
PAA28	ND	ND	ND	ND	ND
PAA29	ND	ND	ND	ND	ND
PAA30	ND	ND	ND	ND	ND
PAA31	ND	ND	ND	ND	ND
PAA32	ND	ND	ND	ND	ND
PAA33	ND	ND	ND	ND	ND
PAA34	ND	ND	ND	ND	ND
PAA35	ND	ND	ND	ND	ND
PAA36	ND	ND	ND	ND	ND
PAA37	ND	ND	ND	ND	ND
PAA38	ND	ND	ND	ND	ND
PAA39	1,72	ND	ND	ND	ND
PAA40	ND	ND	ND	ND	118,45
PAA41	ND	ND	ND	ND	ND
PAA42	ND	ND	ND	ND	ND
PAA43	ND	ND	ND	ND	ND
PAA44	ND	ND	ND	ND	ND
PAA45	ND	ND	ND	ND	ND
PAA46	ND	ND	ND	ND	107,62
PAA47	ND	ND	ND	ND	ND
PAA48	ND	ND	ND	ND	ND
PAA49	ND	ND	ND	ND	ND
PAA50	ND	ND	ND	ND	ND

ND: Não detectado.

Limite de detecção para aflatoxinas: 1,5 µg/kg

Limite de detecção para ácido ciclopiazônico: 50 µg/kg

**Tabela A.17** - Incidência de aflatoxinas ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ácido ciclopiazônico ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de 50 amostras de cascas de castanha-do-Brasil (PAC1 a PAC50), provenientes do Estado do Pará – PA

Amostra	Concentração de aflatoxinas em $\mu\text{g}/\text{kg}$				Concentração de
	AFB <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	AFG <sub>1</sub>	AFG <sub>2</sub>	ACP em $\mu\text{g}/\text{kg}$
PAC1	2,87	ND	ND	ND	ND
PAC2	ND	ND	ND	ND	ND
PAC3	ND	ND	ND	ND	132,21
PAC4	ND	ND	ND	ND	ND
PAC5	3,29	ND	ND	ND	ND
PAC6	ND	ND	ND	ND	ND
PAC7	ND	ND	ND	ND	ND
PAC8	ND	ND	ND	ND	ND
PAC9	ND	ND	ND	ND	ND
PAC10	ND	ND	ND	ND	ND
PAC11	ND	ND	ND	ND	ND
PAC12	ND	ND	ND	ND	ND
PAC13	ND	ND	ND	ND	ND
PAC14	ND	ND	ND	ND	ND
PAC15	ND	ND	ND	ND	ND
PAC16	ND	ND	ND	ND	ND
PAC17	ND	ND	ND	ND	ND
PAC18	ND	ND	ND	ND	151,12
PAC19	ND	ND	ND	ND	ND
PAC20	ND	ND	ND	ND	ND
PAC21	ND	ND	ND	ND	ND
PAC22	ND	ND	ND	ND	ND
PAC23	ND	ND	ND	ND	ND
PAC24	ND	ND	ND	ND	ND
PAC25	ND	ND	ND	ND	ND

Amostra	Concentração de aflatoxinas em $\mu\text{g}/\text{kg}$				Concentração de ACP em $\mu\text{g}/\text{kg}$
	AFB <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	AFG <sub>1</sub>	AFG <sub>2</sub>	
PAC26	ND	ND	ND	ND	ND
PAC27	ND	ND	ND	ND	ND
PAC28	ND	ND	ND	ND	ND
PAC29	ND	ND	ND	ND	ND
PAC30	ND	ND	ND	ND	ND
PAC31	ND	ND	ND	ND	ND
PAC32	ND	ND	ND	ND	ND
PAC33	ND	ND	ND	ND	ND
PAC34	ND	ND	ND	ND	ND
PAC35	ND	ND	ND	ND	ND
PAC36	ND	ND	ND	ND	ND
PAC37	ND	ND	ND	ND	ND
PAC38	ND	ND	ND	ND	ND
PAC39	ND	ND	ND	ND	ND
PAC40	ND	ND	ND	ND	101,90
PAC41	ND	ND	ND	ND	ND
PAC42	ND	ND	ND	ND	ND
PAC43	ND	ND	ND	ND	ND
PAC44	ND	ND	ND	ND	ND
PAC45	ND	ND	ND	ND	ND
PAC46	ND	ND	ND	ND	ND
PAC47	ND	ND	ND	ND	ND
PAC48	ND	ND	ND	ND	ND
PAC49	ND	ND	ND	ND	ND
PAC50	ND	ND	ND	ND	ND

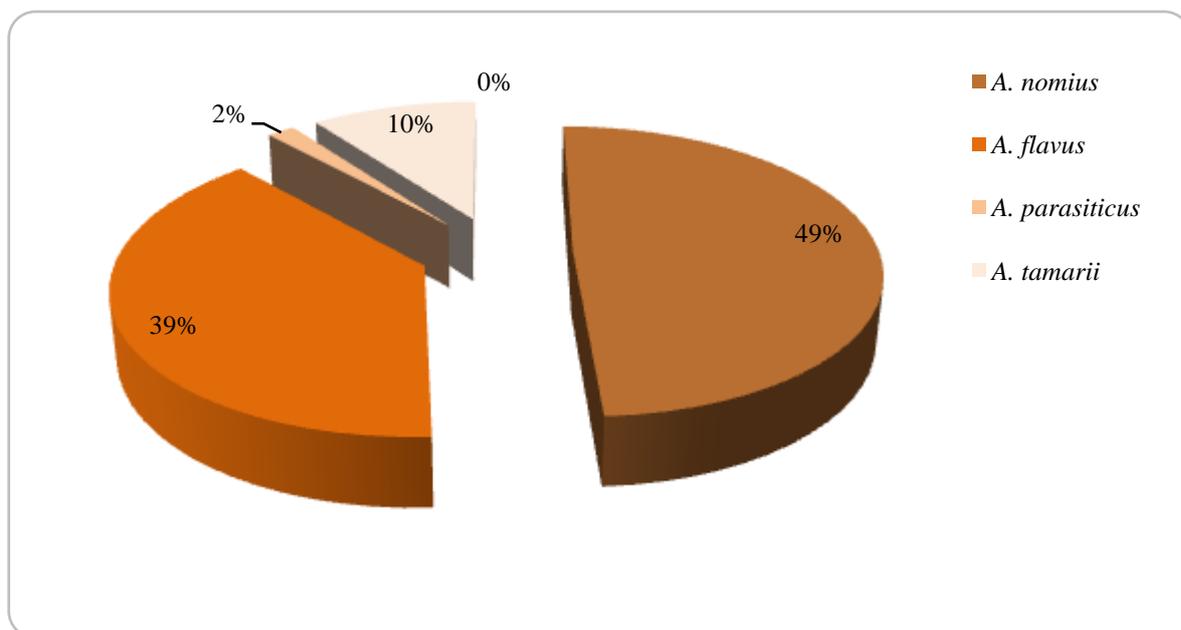
ND: Não detectado.

Limite de detecção para aflatoxinas: 1,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

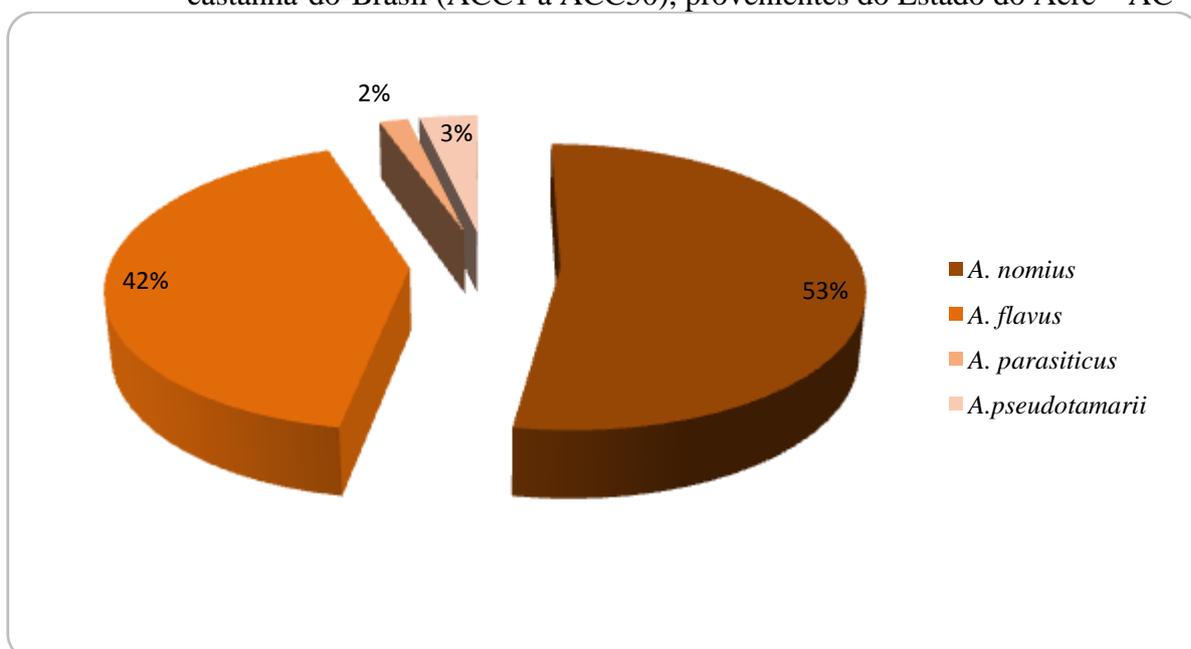
Limite de detecção para ácido ciclopiazônico: 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$

## Apêndice B – Representações gráficas

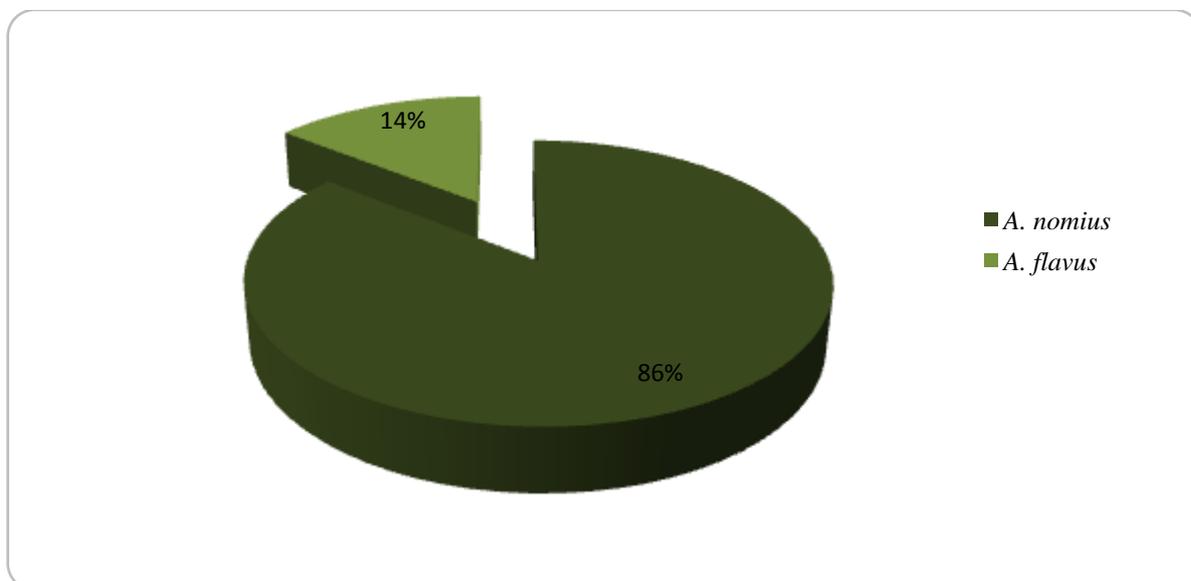
**Gráfico B.1** – Porcentagem de cepas de *Aspergillus* Seção *Flavi* de 50 amostras de amêndoas de castanha-do-Brasil (ACA1 a ACA50), provenientes do Estado do Acre – AC



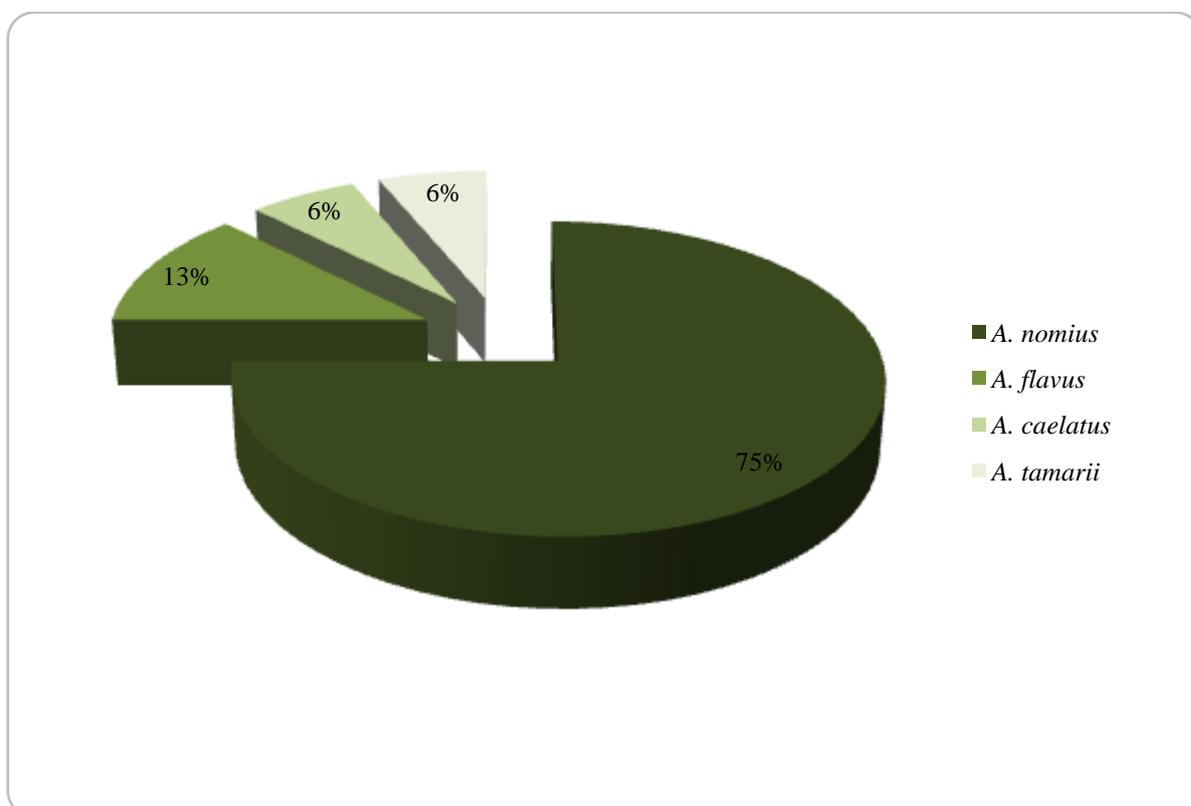
**Gráfico B.2** – Porcentagem de cepas de *Aspergillus* Seção *Flavi* de 50 amostras de cascas de castanha-do-Brasil (ACC1 a ACC50), provenientes do Estado do Acre – AC



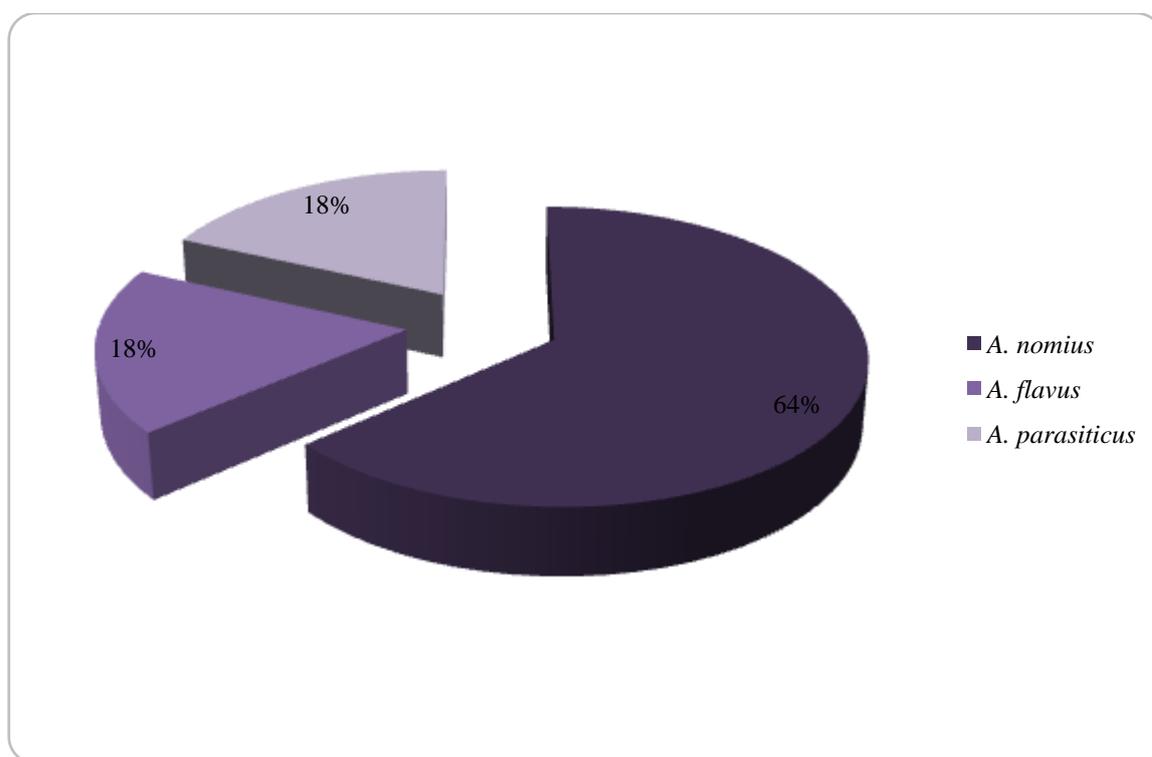
**Gráfico B.3** – Porcentagem dos *Aspergillus* Seção *Flavi* de 50 amostras de amêndoas de castanha-do-Brasil (AMA1 a AMA50), provenientes do Estado do Amazonas – AM



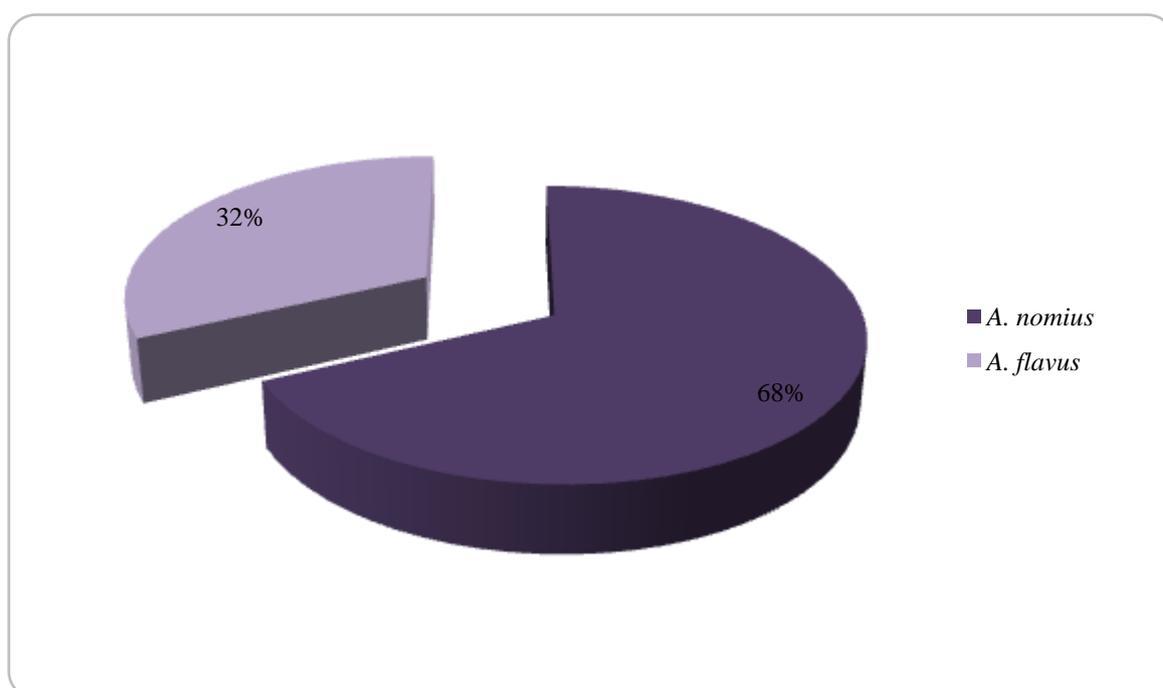
**Gráfico B.4** – Porcentagem dos *Aspergillus* Seção *Flavi* de 50 amostras de amêndoas de castanha-do-Brasil (AMA1 a AMA50), provenientes do Estado do Amazonas – AM



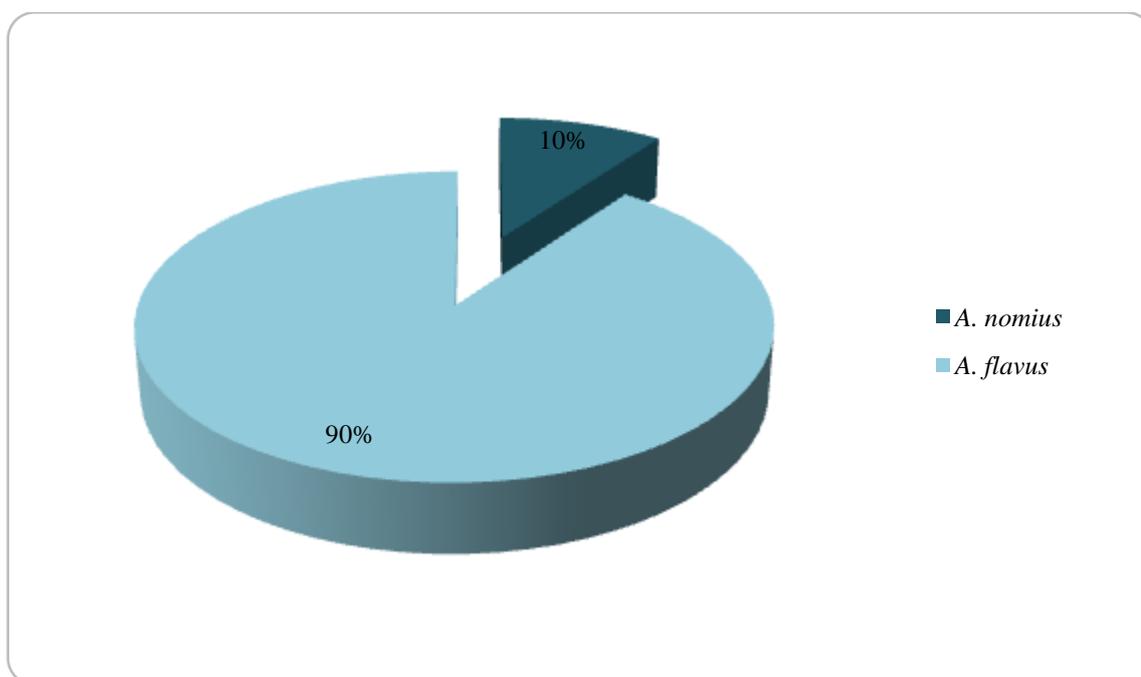
**Gráfico B.5** – Porcentagem dos *Aspergillus* Seção *Flavi* de 50 amostras de amêndoas de castanha-do-Brasil (APA1 a APA50), provenientes do Estado do Amapá - AP



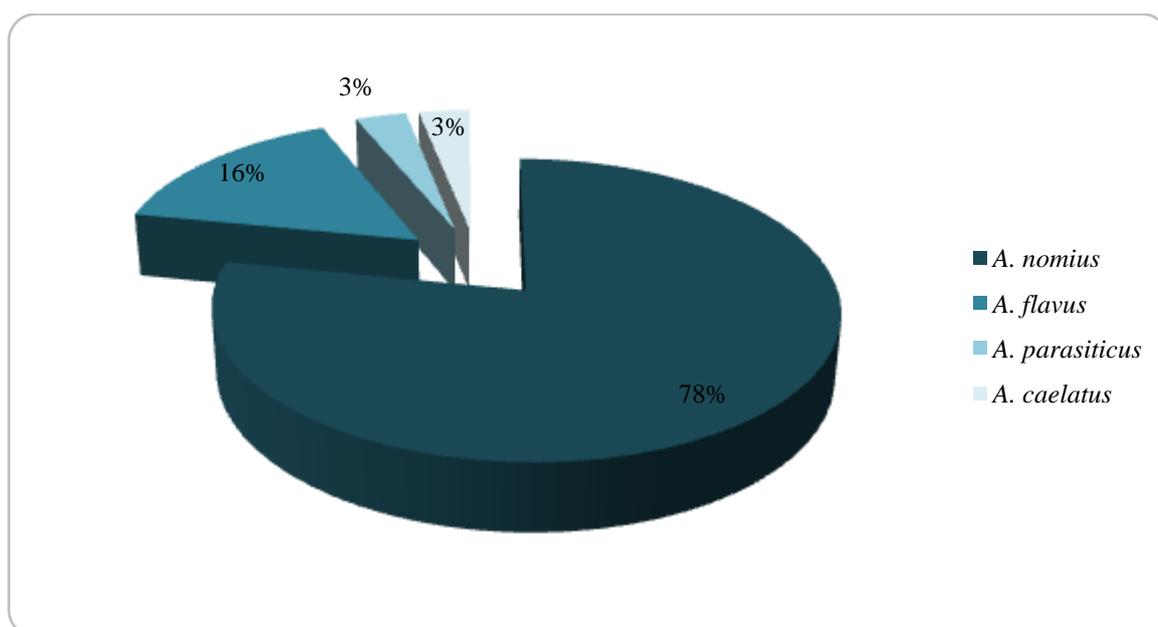
**Gráfico B.6** - Porcentagem do potencial aflatoxigênico dos *Aspergillus* Seção *Flavi* de 50 amostras de cascas de castanha-do-Brasil (APC1 a APC50), provenientes do Estado do Amapá - AP



**Gráfico B.7** - Porcentagem dos *Aspergillus* Seção *Flavi* de 50 amostras de amêndoas de castanha-do-Brasil (PAA1 a PAA50), provenientes do Estado do Pará-PA



**Gráfico B.8** - Porcentagem dos *Aspergillus* Seção *Flavi* de 50 amostras de cascas de castanha-do-Brasil (PAC1 a PAC50), provenientes do Estado do Pará-PA



## APÊNDICE C – Curvas de calibração para aflatoxinas

### - Curva de calibração para AFG<sub>1</sub>

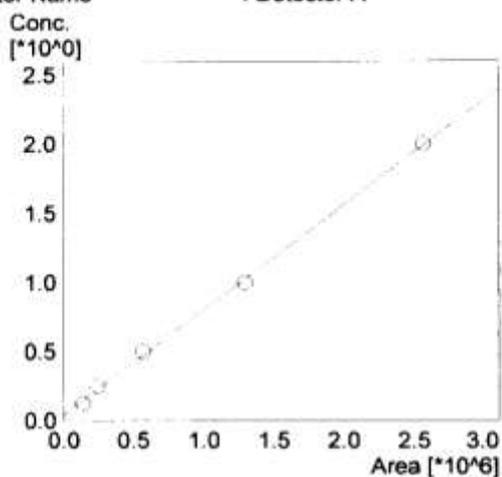
8/6/2010 19:24:02 1 / 4

### ==== Shimadzu LCsolution Calibration Curve ====

#### <Calibration Curve>

ID# : 1  
 Name : AFG1  
 Quantitative Method : External Standard  
 Function :  $f(x)=7.5996e-007*x+0.0447929$   
 Rr1=0.9994600 Rr2=0.9989204  
 MeanRF:8.72143e-007 RFSD:9.50765e-008 RFRSD:10.9015

FitType : Linear  
 ZeroThrough : Not Through  
 WeightedRegression : None  
 Detector Name : Detector A

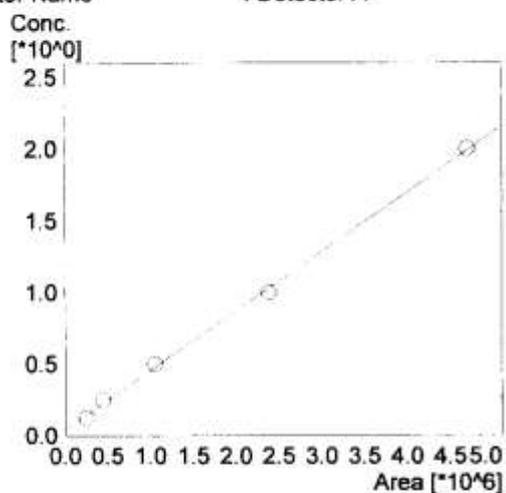


#	Conc (Ratio)	Area	Area
1	0.125	142693.0	142693
		141429.3	141429
		138943.4	138943
		138436.0	138436
		136738.8	136739
2	0.250	244999.6	245000
		244414.5	244415
		244703.4	244703
		241479.1	241479
		240822.5	240823
3	0.500	554086.9	554087
		563189.5	563189
		570207.6	570208
		571412.7	571413
		570828.6	570829
4	1.000	1293656.5	1293657
		1295888.7	1295889
		1292295.8	1292296
		1289431.6	1289432
		1291876.7	1291877
5	2.000	2620363.6	2620364
		2560870.8	2560871
		2549041.8	2549042
		2541860.4	2541860
		2541568.9	2541569

- Curva de calibração para AFB<sub>1</sub>

8/6/2010 19:24:02 2 / 4

ID# : 2  
 Name : AFB1  
 Quantitative Method : External Standard  
 Function :  $f(x)=4.13737e-007*x+0.044493$   
 Rr1=0.9994781 Rr2=0.9989565  
 MeanRF:4.7745e-007 RFSD:5.47108e-008 RFRSD:11.459  
 FitType : Linear  
 ZeroThrough : Not Through  
 WeightedRegression : None  
 Detector Name : Detector A

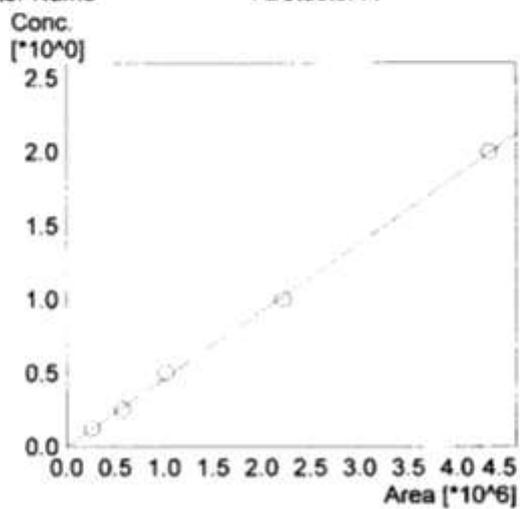


#	Conc (Ratio)	Area	Area
1	0.125	253929.9	253930
		250432.4	250432
		248172.7	248173
		246885.8	246886
		246809.6	246810
2	0.250	445914.9	445915
		444420.0	444420
		444692.4	444692
		440278.8	440279
		437091.2	437091
3	0.500	1035916.2	1035916
		1044810.4	1044810
		1058686.4	1058686
		1059379.4	1059379
		1058729.4	1058729
4	1.000	2399790.7	2399791
		2387951.7	2387952
		2378018.2	2378018
		2374394.2	2374394
		2369372.5	2369372
5	2.000	4686729.9	4686730
		4712163.4	4712163
		4710085.4	4710085
		4702351.0	4702351
		4703726.8	4703727

- Curva de calibração para AFG<sub>2</sub>

8/6/2010 19:24:02 3 / 4

ID# : 3  
 Name : AFG2  
 Quantitative Method : External Standard  
 Function :  $f(x)=4.60609e-007*x-0.000555893$   
 Rr1=0.9996299 Rr2=0.9992600  
 MeanRF:4.60843e-007 RFSD:2.04048e-008 RFRSD:4.42771  
 FitType : Linear  
 ZeroThrough : Not Through  
 WeightedRegression : None  
 Detector Name : Detector A

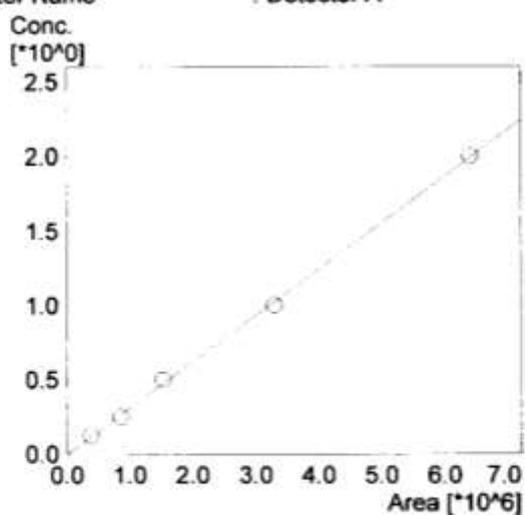


#	Conc (Ratio)	Area	Area
1	0.125	263457.6	263458
		264089.2	264089
		263976.3	263976
		263726.7	263727
		264745.6	264746
2	0.250	580152.7	580153
		579249.5	579250
		581219.4	581219
		583528.5	583528
3	0.500	583056.8	583057
		1022829.3	1022829
		1023263.1	1023263
		1022373.5	1022373
4	1.000	1023486.0	1023486
		1025440.8	1025441
		2220236.6	2220237
		2222038.1	2222038
		2216931.9	2216932
5	2.000	2217819.0	2217819
		2229833.8	2229834
		4322159.2	4322159
		4332871.4	4332871
		4323400.9	4323401
		4327240.0	4327240
		4336908.2	4336908

- Curva de calibração para AFB<sub>2</sub>

8/6/2010 19:24:02 4 / 4

ID# : 4  
 Name : AFB2  
 Quantitative Method : External Standard  
 Function :  $f(x)=3.11108e-007*x-0.000838502$   
 Rr1=0.9996422 Rr2=0.9992846  
 MeanRF:3.12679e-007 RFSD:1.43197e-008 RFRSD:4.57966  
 FitType : Linear  
 ZeroThrough : Not Through  
 WeightedRegression : None  
 Detector Name : Detector A



#	Conc (Ratio)	Area	Area
1	0.125	378397.5	378397
		379833.5	379834
		379289.8	379290
		379954.8	379955
		380808.3	380808
2	0.250	853107.6	853108
		852428.2	852428
		856655.5	856656
		856817.2	856817
3	0.500	858839.1	858839
		1529154.0	1529154
		1530107.4	1530107
		1531056.7	1531057
4	1.000	1531796.9	1531797
		1532813.7	1532814
		3320637.5	3320638
		3303110.8	3303111
5	2.000	3294708.5	3294708
		3292013.7	3292014
		3294313.5	3294314
		6390262.3	6390262
		6400121.3	6400121
		6396296.7	6396297
		6405068.1	6405068
		6417258.7	6417259

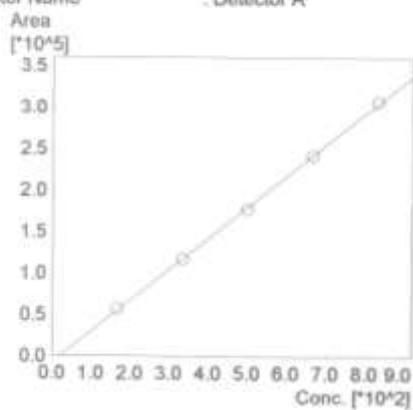
## APÊNDICE D – Curva de calibração para ACP

26/3/2011 15:07:40 1 / 1

### ==== Shimadzu LCsolution Calibration Curve ====

<Calibration Curve>

ID# : 1  
 Name : ACP  
 Quantitative Method : External Standard  
 Function :  $f(x) = 375.173 \cdot x - 7500.89$   
 $Rr1 = 0.9997922$   $Rr2 = 0.9995844$   
 MeanRF:355.3 RFSD:10.9159 RFRSD:3.0723  
 FitType : Linear  
 ZeroThrough : Not Through  
 WeightedRegression : None  
 Detector Name : Detector A



#	Conc (Ratio)	Area	Area
1	166.000	56917.3	56917
		56515.8	56516
		56837.5	56837
		57289.6	57290
		56826.9	56829
		55343.9	55344
2	333.400	117302.9	117303
		117400.4	117400
		117328.0	117328
		117494.5	117494
		117361.0	117361
		116415.1	116415
3	500.000	178196.8	178197
		178043.7	178044
		179346.5	179346
		176195.5	176195
		175570.5	175570
		177320.2	177320
4	666.600	243137.9	243138
		241017.8	241018
		240564.0	240564
		240271.6	240272
		243404.4	243404
		241046.1	241046
5	833.000	304126.6	304129
		300511.0	300511
		301705.7	301706

## APÊNDICE E - Trabalho publicado na International Journal Food Microbiology

International Journal of Food Microbiology 159 (2012) 61–68



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

International Journal of Food Microbiology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro](http://www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro)



### Mycobiota and mycotoxins in Brazil nut samples from different states of the Brazilian Amazon region

T.A. Reis <sup>a,\*</sup>, T.D. Oliveira <sup>a</sup>, A.C. Baquião <sup>a</sup>, S.S. Gonçalves <sup>b</sup>, P. Zorzete <sup>a</sup>, B. Corrêa <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Micotoxinas, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 1374, CEP 05508-000, São Paulo, SP, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório Especial de Micologia, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, R. Diogo de Faria 822, CEP: 04037-002, São Paulo, SP, Brazil

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 3 April 2012

Received in revised form 14 July 2012

Accepted 6 August 2012

Available online 11 August 2012

##### Keywords:

Brazil nut

Mycoflora

*Aspergillus*

Aflatoxin

Cyclopiazonic acid

#### ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the presence of fungi and mycotoxins (aflatoxins and cyclopiazonic acid) in Brazil nut samples collected in different states of the Brazilian Amazon region: Acre, Amazonas, Amapá, and Pará. A total of 200 husk samples and 200 almond samples were inoculated onto *Aspergillus flavus*–parasiticus agar for the detection of fungi. Mycotoxins were analyzed by high-performance liquid chromatography. The mycobiota comprised the following fungi, in decreasing order of frequency: almonds – *Phialemonium* spp. (54%), *Penicillium* spp. (16%), *Fusarium* spp. (13%), *Phaeoacremonium* spp. (11%), and *Aspergillus* spp. (4%), husks – *Phialemonium* spp. (62%), *Phaeoacremonium* spp. (11%), *Penicillium* spp. (10%), *Fusarium* spp. (9%), and *Aspergillus* spp. A polyphasic approach was used for identification of *Aspergillus* species. Aflatoxins were detected in 22 (11%) of the 200 almond samples, with 21 samples presenting aflatoxin B<sub>1</sub> levels above 8 µg/kg, the limit established by the European Commission for Brazil nuts for further processing. Nineteen (9.5%) of the 200 husk samples contained aflatoxins, but at levels lower than those seen in almonds. Cyclopiazonic acid (CPA) was detected in 44 (22%) almond samples, with levels ranging from 98.65 to 161.2 µg/kg. *Aspergillus nomius* and *A. flavus* were the most frequent *Aspergillus* species. The presence of fungi does not necessarily imply mycotoxin contamination, but almonds of the Brazil nut seem to be a good substrate for fungal growth.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

#### 1. Introduction

The Brazil nut tree (*Bertholletia excelsa*) is a plant native to the Amazon region. Nuts, especially Brazil nuts, are among the most nutritious human foods because of their high content of proteins, carbohydrates, unsaturated lipids, vitamins, and essential minerals (USDA, 2010). The production and extraction of the Brazil nut occurs only in the Amazonian biome (Freitas-Silva and Venancio, 2011).

The Brazilian Amazon region is divided into Western and Eastern regions. The Western Amazon region comprises part of Amazonas (starting from Manaus city to the West), and the Eastern Amazon region comprises the states of Para, Amapá, the Northern part of Maranhão, and the Eastern part of Amazonas (starting from Manaus city to the East) (Brazil, 1968).

Fungal infection of Brazil nuts has been studied since the beginning of the last century (Spencer, 1921; Castrillón and Purchio, 1988). Contamination with aflatoxigenic *Aspergillus* species is directly related to the climatic conditions in the Amazon rainforest (hot and humid climate) during the period of harvest (Pacheco and Scussel, 2006; Olsen et al., 2008). *Aspergillus* section *Flavi* comprises a closely related group of fungi, which are widely distributed in soil, air, organic matter, and

plant parts all over the world (Raper and Fennell, 1965; Cotty and Cardwell, 1999). Three species of this group (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus nomius*) have received considerable attention because of their ability to produce aflatoxins.

Aflatoxins are the most potent natural carcinogens affecting animals and humans (JECFA, 1997). Contamination with aflatoxins is a matter of serious concern for exporters of Brazil nuts as the Commission Regulation of European Union no. 165/2010 of 26 February 2010 has established maximum aflatoxin levels for Brazil nuts. In nuts for further processing and ready to eat nuts, respectively, the limits are 8.0 µg/kg and 5.0 µg/kg for AFB<sub>1</sub> and 15.0 µg/kg and 10.0 µg/kg for total aflatoxins AFB<sub>1</sub> + AFB<sub>2</sub> + AFG<sub>1</sub> + AFG<sub>2</sub> (EC, 2010). Cyclopiazonic acid (CPA) is an indole tetramic acid that is toxic to animals and has been implicated in human poisoning (Rao and Husain, 1985). This toxin is produced by a variety of fungi, including some *Penicillium* species (Le Bars, 1979), and some *A. flavus* strains (Yokota et al., 1981).

The taxonomy of *Aspergillus* is in a transition phase and there is currently no consensus regarding the definition of taxa within groups. The discussion continues about which molecular tools are most appropriate for the characterization of taxa, since the identification of some species is difficult due to variations and overlapping morphological and biochemical characteristics of the isolates. Sequencing of the internal transcribed spacer (ITS) region of ribosomal DNA (rDNA) is recommended

\* Corresponding author. Tel.: +55 11 30917295.

E-mail address: tareis@usp.br (T.A. Reis).

for the identification of species of the genus *Aspergillus* (Samson et al., 2006). Lately there has been a trend in the sequencing of more than one gene for the purpose of increasing the reliability of results. Besides the use of ITS region, the  $\beta$ -tubulin (Glass and Donaldson, 1995) and calmodulin (Carbone and Kohn, 1999) genes have been used for sequencing of fungi. In this respect, the study of DNA sequences may provide important information for the definition of species and their appropriate identification (Hinrikson et al., 2005).

The objective of the present investigation was to identify the mycobiota and occurrence of aflatoxins and CPA in Brazil nut samples (husks and almonds) collected in different states of the Brazilian Amazon region (Amazonas, Acre, Amapá, and Pará).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study area – geographic and climatic characterization

Brazil nuts from storage were collected in different states of the Brazilian Amazon region: Amazonia, at latitude 5° 48'S, longitude: 61° 18'O, and altitude 45 m, Acre at latitude: 9° 58'S, longitude: 67° 48'O, altitude: 153 m, Amapá, at latitude: 1° 07'S, at longitude: 52° 00'O, altitude: 20 m and Pará at latitude: 1° 57'S, at longitude: 48° 11'O, altitude: 10 m (Fig. 1).

### 2.2. Samples

The samples were collected in March 2009 from cooperatives in northern Brazil: Amazonas, Acre, Amapá, and Pará. Fifty samples of 400 g each were collected per state, corresponding to 20 kg Brazil

nuts per cooperative warehouse. The husks of each nut were carefully and aseptically removed by cracking it with a breaker nut. After the nut samples were dehusked, they were divided into 200 husk and 200 almond samples. These samples were subsequently analyzed for moisture content, presence of fungi, aflatoxins, and CPA.

### 2.3. Moisture content and $a_w$

The moisture content was performed in duplicate by the classical method, according to ISO 712. The husks and almonds of Brazil nuts were triturated and 5  $\pm$  1 mg of each were placed on a metal plate in a ventilated oven at constant temperature (130–133 °C) for 3 h and the samples were weighed again. The percentage of difference between the initial and final weight of the samples was moisture content.

A few pieces of the samples (almonds and husks) were placed in a disposable cup and the water activity ( $a_w$ ) was determined in duplicate by the dew point method with an Aqualab CX-2 apparatus (Decagon Devices, Inc., Pullman, WA, USA).

### 2.4. Isolation and identification of mycobiota

Ten grams of each husk and almond sample was mechanically triturated and diluted in 90 mL sterile distilled water. Successive decimal dilutions were prepared to  $10^{-4}$ , and 0.1 mL of each dilution was inoculated into *A. flavus-parasiticus* agar supplemented with chloramphenicol (Pitt et al., 1983). The plates were incubated at 25 °C for until 7 days in the dark. The results are reported as colony-forming units per gram of substrate (CFU/g).



Fig. 1. Geographical location of the study area (Acre, Amazonas, Amapá, and Pará).

All colonies were subcultured on potato dextrose agar (Oxoid, Basingstoke, UK) at 25 °C for 7 days. Colonies were identified to genus level according to Barron (1972) and Pitt and Hocking (2009). A poly-phasic approach consisted of the following steps for the identification of *Aspergillus* strains: investigation of morphological features according to the textbooks of Pitt and Hocking (2009) and Raper and Fennell (1965), growth and examination of cultures in Czapek agar and Blakeslee's malt agar at 25 °C and 42 °C for 7 days (Kurtzman et al., 1987; Peterson et al., 2001), observation of colony reverse color in AFPA at 25 °C for 3 days (Pitt et al., 1983), aflatoxins production (Lin and Dianese, 1976; Pitt and Hocking, 2009) and sequencing of rDNA regions: (i) internal transition spacer (ITS) as described by White et al. (1990), (ii)  $\beta$ -tubulin as described by Glass and Donaldson (1995) and (iii) calmodulin according to Carbone and Kohn (1999).

## 2.5. Chemicals and reagents

AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub> and CPA standards were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Stock solutions were prepared in methanol and kept at –20 °C. All solvents used were of liquid chromatography grade and were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Milli-Q water was produced in our laboratory using the Millipore Academic System.

## 2.6. Determination of aflatoxins

For extraction, 25 g of each sample was triturated and homogenized. Next, 12.5 mL of an acetonitrile:water (85:15, v/v) solution was added to 2.5 g of almonds and to 5 g of husks. The mixture was shaken for 60 min. After centrifugation, 5 mL of the supernatant containing almonds was mixed with 45 mL acidified water (0.5% glacial acetic acid), and 2.5 mL of the supernatant containing husks was mixed with 47.5 mL acidified water. The solutions were cleaned on a Strata C18-E cartridge (500 mg/3 mL) (Phenomenex, Santa Clara, CA, USA) at a flow rate of 1 drop/s. The cartridges were washed with 12 mL acidified water. Aflatoxins were eluted with 1 mL methanol and the eluent was evaporated to residue (Tanaka et al., 2002; Lebret et al., 2004). The residues were derivatized with trifluoroacetic acid (TFA) and hexane, again evaporated, and resuspended in 400  $\mu$ L of a methanol:water (1:1, v/v) solution. The mixture (40  $\mu$ L – almonds and 20  $\mu$ L – husks extracts) was injected into the Shimadzu Prominence HPLC system (Kyoto, Japan) equipped with an RF 10AXL fluorescence detector (excitation: 365 nm, emission: 450 nm) and an autosampler system. The analytical column (Shimadzu, Shim-Pack VP ODS, 150  $\times$  4.6 mm) was coupled to a pre-column cartridge (Shim-Pack GVP-ODS, 10 mm  $\times$  4.6 mm) maintained at 40 °C in an oven. The isocratic mobile phase consisted of acetonitrile:methanol:water (1.5:1.5:8, v/v/v) + 0.1% TFA and was eluted at a flow rate of 1 mL/min.

## 2.7. Determination of CPA

CPA was analyzed according to the method of Urano et al. (1992), with modifications. Twenty-five grams of each previously triturated and homogenized sample was divided into aliquots of 2.5 g and mixed with 20 mL methanol; 2% sodium bicarbonate in water (7:3, v/v). After shaking for 45 min, the samples were centrifuged and 8 mL of the supernatant was transferred to a separating funnel. Then, 10 mL hexane was added and the mixture was gently shaken. After separation of the phases, the hexane fraction was discarded and 8 mL 10% KCl was added to the aqueous fraction. The latter was acidified with 6 N HCl until pH 3.0 was obtained.

CPA was extracted with two partitions of 10 mL chloroform. The chloroform phase was collected and evaporated to residue. The residue was then resuspended in 1000  $\mu$ L methanol and injected 10  $\mu$ L into the Shimadzu Prominence HPLC system equipped with a Shimadzu SPD-10A UV-vis detector set at 282 nm, an autosampler

system, and a Luna C8 column (4.6  $\times$  250 mm, 5- $\mu$ m particle size, Phenomenex, Torrance, CA, USA) maintained at 40 °C in an oven. The isocratic mobile phase consisted of 4 mM ZnSO<sub>4</sub> in methanol:water (6:4, v/v) and was eluted at a flow rate of 1 mL/min.

## 2.8. DNA extraction, amplification and sequencing

The strains were confirmed by sequencing of the ITS (White et al., 1990),  $\beta$ -tubulina (Glass and Donaldson, 1995) and calmodulin (Carbone and Kohn, 1999) gene regions of rDNA. DNA was extracted and purified directly from fungal colonies grown on yeast extract sucrose agar at 25 °C in the dark for 3 days using the PrepMan Ultra® kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). DNA was quantified with the GeneQuant pro Calculator (Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, UK). A fragment of ITS region was amplified with the ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCG 3') and ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATAT 3') primer pairs. Part of the gene  $\beta$ -tubulin was amplified using primers T22 (5' TCTGGATGTTGGGAATCC 3') and TUB-F (5' CTGTCCAACCCCTTTAGGGCGACT 3'). Part of the calmodulin gene was amplified using primers CMD 42 (5' GGCCTTCTCCCTATTGTA 3') and CMD 637 (5' CTCGGGATCATCTCATC 3'). The PCR mixture contained 12.5  $\mu$ L 2  $\times$  PCR Master Mix (Promega, San Luis Obispo, CA, USA), 6.5  $\mu$ L Milli-Q water, 2  $\mu$ L DNA (40 ng), and 2  $\mu$ L (20 pmol) of each primer (Prodinol Biotecnologia, Minas Gerais, Brazil) in a final volume of 25  $\mu$ L. The amplification program included an initial denaturation at 94 °C for 3 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 57 °C (ITS), 49 °C ( $\beta$ -tubulin), or 54 °C (calmodulin) for 1 min, and extension at 72 °C for 1 min. A final extension step at 72 °C for 5 min was included at the end of the amplification.

After PCR, the products were purified with the QIAquick PCR Purification kit (Qiagen, Hilden, Germany) and stored at –20 °C until the time of sequencing. The PCR products were sequenced using the same primers as those employed for amplification. The Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) was used. The reactions were run on a 3100 DNA sequencer (Applied Biosystems). Consensus sequences were obtained using the AutoAssembler program (Perkin Elmer-Applied Biosystems) and SeqMan software (Lasergene, Madison, WI, USA). The sequences were used in BLASTn searches ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) in order to confirm preliminary identifications.

## 2.9. Aflatoxigenic potential of *Aspergillus* section *Flavi* strains

A fragment of each colony was inoculated into a plate containing coconut agar (Lin and Dianese, 1976) and incubated at 25 °C for 14 days. After growth, the whole content of each plate was removed and chloroform (30 mL per 10 g of culture) was added. After shaking, the sample was filtered through Whatman No. 1 filter paper. The content was evaporated to residue and the extracts were resuspended in 2 mL chloroform. Next, 100  $\mu$ L of this solution was evaporated and resuspended in 3 mL acetonitrile:water (85:15, v/v), and diluted in 27 mL acidified water. The cleanup steps and injection into the HPLC system were the same as those described in item 2.6.

## 3. Results

### 3.1. Moisture content, $a_w$ , and microbiota in almonds and husks

The mean moisture content of almond samples was 4.37, with the highest value (10.30) being observed in sample from the State of Amapá and the lowest value (2.50) in sample from Pará. The mean moisture content of husks samples was 14.96, with the highest value (22.00) being observed in sample from the State of Amapá and the lowest activity (12.2) in the State of Pará (Table 1).

The mean  $a_w$  of almond samples was 0.76, with the highest value (0.96) being observed in sample from the State of Acre and the lowest

**Table 1**  
Water activity and moisture content (mean, maximum and minimum levels, and standard deviation) in Brazil nut samples (200 almonds and 200 husks) in four states of Brazil.

State	Sample	Water activity				Moisture content			
		Mean <sup>a</sup>	SD <sup>b</sup>	Max. <sup>c</sup>	Min. <sup>d</sup>	Mean	SD	Max.	Min.
Acre	Almond	0.85	0.08	0.96	0.69	3.70	0.36	5.30	3.20
	Husk	0.77	0.10	0.94	0.51	14.30	0.50	15.30	13.40
Amazonas	Almond	0.81	0.05	0.93	0.68	3.83	0.25	4.50	3.40
	Husk	0.75	0.06	0.87	0.58	14.1	0.66	16.30	13.10
Amapá	Almond	0.76	0.11	0.95	0.55	5.82	1.59	10.30	3.80
	Husk	0.68	0.08	0.85	0.56	16.73	2.44	22.00	12.90
Pará	Almond	0.64	0.06	0.79	0.56	4.15	0.85	8.30	2.50
	Husk	0.62	0.03	0.71	0.55	14.51	1.36	17.10	12.20

<sup>a</sup> Mean level.

<sup>b</sup> Standard deviation.

<sup>c</sup> Maximum level.

<sup>d</sup> Minimum level.

value (0.55) in sample from Amapá. The mean water activity of husk samples was 0.70, with the highest value (0.94) being observed in sample from the State of Acre and the lowest activity (0.51) in the same State (Table 1).

Identification of mycobiota from Brazil nut samples (200 husk and 200 almond samples) revealed the presence of the following fungi, in decreasing order of frequency: almonds – *Phialemonium* spp. (54%), *Penicillium* spp. (16%), *Fusarium* spp. (13%), *Phaeoacremonium* spp. (11%), and *Aspergillus* spp. (4%), husks – *Phialemonium* spp. (62%), *Phaeoacremonium* spp. (11%), *Penicillium* spp. (10%), *Fusarium* spp. (9%), and *Aspergillus* spp. (5%) (Table 2).

*Phialemonium dimorphosporum* (= *P. curvatum*) was the most frequent species of this genus in the samples analyzed and could only be identified by sequencing of the ITS region. Species of the genus *Aspergillus*, which are important from the mycotoxicological point of view, were detected in husks (5%) and almonds (4%). The level of contamination (CFU/g) with *Aspergillus* was 307 (Amazonas), 910 (Acre), 377 (Amapá) and 91 CFU/g (Pará) in almonds, and 1948 (Amazonas), 9000 (Acre), 1521 (Amapá) and 687 CFU/g (Pará) in husks. *A. nomius* and *A. flavus* were the most frequent *Aspergillus* species (Table 3).

### 3.2. Limits of detection, limits of quantification, and recoveries tests for mycotoxins

Limit of detection (LOD) was the lowest concentration that could be determined to be different from a blank. The estimated values of the LOD were based on the relationship of five times of baseline noise and determined by analysis of standard solutions of each analyte, decreasing the concentrations until the lowest detectable level (IUPAC and Currie, 1999).

Limit of quantitation (LOQ) was the level above which quantitative results could be obtained with a specified degree of confidence

(IUPAC and Currie, 1999). The LOQ was determined by analysis of standard solutions of each mycotoxin, decreasing the concentrations until the lowest quantified level with acceptable precision and accuracy.

To test for recoveries of mycotoxins, each 5 g Brazil nut flour samples (almonds and husks) was spiked with a mixture of four aflatoxins or CPA standards. The samples were allowed to stand overnight and then extracted by using the described procedures, according to Sections 2.6. and 2.7.

### 3.3. Determination of aflatoxins

The calibration curves were constructed using five concentrations of each aflatoxin standards: 0.625, 1.25, 2.5, 5.0, and 10 ng/mL corresponding to 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, and 4 µg/kg, respectively. Quantification of aflatoxins was performed by measuring peak area at each aflatoxin retention time and comparing it with the relevant standard curve. If test solution area response was outside (higher than) the standard range, the test extract was diluted with methanol:water (1:1, v/v) solution and reinjected into the LC column (Bao et al., 2010). The coefficients of the calibration curves were 0.999 for all aflatoxins. The detection and quantification limits in almonds and husks were 0.75 and 0.5 µg/kg for each aflatoxin, respectively.

Almond and husk samples were spiked with a mixture of four aflatoxin standards to obtain a level of 10 µg/kg. The samples were allowed to stand overnight and then extracted using the procedure described in Section 2.5. Average recoveries of aflatoxins from samples spiked (determined in quintuplicate) were 80.4% for AFB<sub>1</sub>, 81.1% for AFB<sub>2</sub>, 83.3% for AFG<sub>1</sub>, and 84.3% for AFG<sub>2</sub>, and the coefficients of variation of recovery in quintuplicate samples were: 6.4%, 3.5%, 4.7%, and 6.7% for AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, and AFG<sub>2</sub>, respectively. Retention times were about 5.0, 7.5, 11.0, 17.0 min (±5%) for AFG<sub>1</sub>, AFB<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, and AFB<sub>2</sub>, respectively (Fig. 2).

Among the 200 almond samples analyzed, aflatoxins were detected in 4 (8%) samples from Acre, in 9 (18%) from Amazonas, in 5 (10%) from Amapá, and in 4 (8%) from Pará. The aflatoxin levels in samples from the State of Acre exceeded 15 µg/kg. According to the Brazilian Health Surveillance Agency (ANVISA, Resolution RDC No. 7 of February 18, 2011, published February 22, 2011) and Commission Regulation of European Union (EC, 2010), the maximum tolerance limit of aflatoxins in shelled Brazil nuts destined for subsequent processing is 15 µg/kg. The highest concentrations of aflatoxins were detected in a sample from the Acre region (1058.00 µg/kg AFB<sub>1</sub> and 1655.04 µg/kg total aflatoxins). Eight of the 9 positive samples from Amazonas presented total aflatoxin levels higher than 15 µg/kg. In contrast, only one of the contaminated samples from Amapá had levels higher than 15 µg/kg (46.41 µg/kg total aflatoxins). The maximum level detected in positive samples from Pará was 7.12 µg/kg total aflatoxins (Table 4).

**Table 2**  
Mean relative frequency of the main fungi isolated from 400 Brazil nut samples (200 almonds and 200 husks) in four states of Brazil.

State	Sample	Frequency of the main isolated fungi (%)					
		<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Phialemonium</i> spp.	<i>Phaeoacremonium</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	Others <sup>a</sup>
Acre	Almond	10	61	10	11	5	3
	Husk	16	57	5	16	2	4
Amazonas	Almond	1	50	12	14	22	1
	Husk	1	68	9	11	10	1
Amapá	Almond	3	54	12	6	23	2
	Husk	3	55	12	6	24	0
Pará	Almond	2	50	12	34	2	0
	Husk	2	68	19	9	2	0
Mean	Almond	4	54	12	16	13	1
	Husk	6	62	11	11	10	0

<sup>a</sup> Other isolated fungi: *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp., *Curvularia* spp., *Drechslera* spp., *Rhizopus* spp., *Trichoderma* spp., and *Verticillium* spp.

**Table 3**  
Relative frequency of 254 *Aspergillus* strains isolated from Brazil nut samples.

State	Sample	Frequency of <i>Aspergillus</i> species (%)									
		<i>A. nomius</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. parasiticus</i>	<i>A. pseudotamarii</i>	<i>A. caelatus</i>	<i>A. tamarii</i>	<i>A. sclerotium</i>	<i>A. sydowii</i>	<i>A. persii</i>	<i>A. versicolor</i>
Acre	Almond	52.5	17.5	2.5	0	0	15.0	2.5	2.5	0	7.5
	Husk	50.0	39.6	1.7	3.5	0	0	0	1.7	0	3.5
Amazonas	Almond	80.0	13.3	0	0	0	0	0	0	0	6.7
	Husk	75.0	12.5	0	0	6.25	6.25	0	0	0	0
Amapá	Almond	67.7	19.4	6.5	0	0	0	0	0	3.2	3.2
	Husk	66.0	34.0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pará	Almond	7.7	69.2	0	0	0	0	0	15.4	0	7.7
	Husk	77.4	16.2	3.2	0	3.2	0	0	0	0	0
Mean	Almond	56.0	24.5	2.85	0	0	6.1	0.8	2.85	0.8	6.1
	Husk	63.8	30.5	1.3	1.3	1.3	0.5	0	0	0	1.3

The frequency of aflatoxins among the 200 husk samples was lower than that seen among almond samples: Acre (10%), Amazonas (14%), Amapá (10%), and Pará (4%) (Table 2).

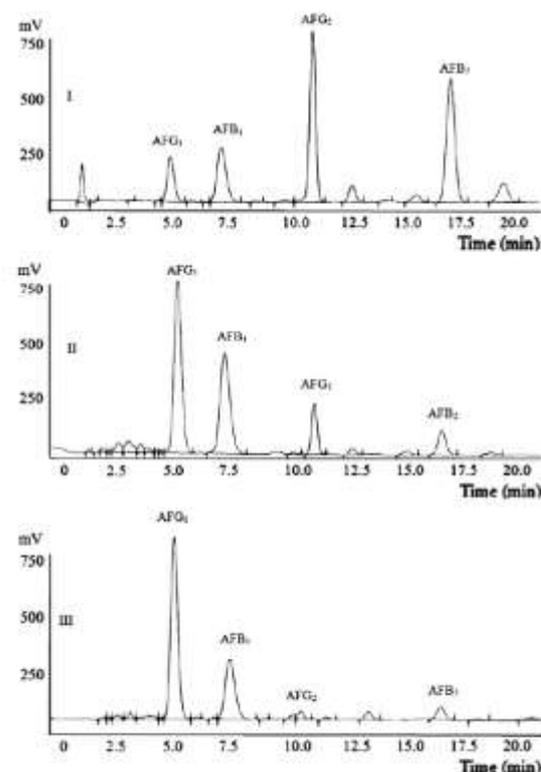
### 3.4. Determination of CPA

The calibration curve was constructed using five concentrations of CPA standards: 66.6, 100, 133.4, 166.7, and 333.2 µg/mL corresponding to 66.6, 100, 133.4, 166.7, and 333.2 µg/kg, respectively. Quantification of CPA was performed by measuring peak area at CPA retention time and comparing it with relevant standard curve. The coefficient of the

calibration curve was 0.997 for CPA. The detection and quantification limits of CPA in both husks and almonds samples were 50 and 100 µg/kg, respectively.

Almond and husk samples were spiked with a CPA standard to obtain a level of 500 µg/kg. The samples were allowed to stand overnight and then extracted using the procedure described in Section 2.6. Average recovery of CPA from samples spiked (determined in quintuplicate) was 76.4%. The coefficient of variation of recovery in quintuplicate samples was 7.3%. Retention time was about 10.0 min ( $\pm 5\%$ ) for CPA (Fig. 3). Among the 200 almond samples analyzed, CPA was detected in 6% of samples from Acre, in 2% from Amazonas, in 4% from Amapá, and in 10% from Pará. In almond samples, the levels of CPA ranged from 124.67 to 151.33 µg/kg in the three positive samples from the State of Acre, and from 98.65 to 123.31 µg/kg in the five positive samples from Pará. The concentration of CPA was 132.86 µg/kg in the positive sample from the State of Amazonas, and 143.26 and 161.2 µg/kg in the two contaminated samples from Amapá.

In husk samples, the levels of CPA ranged from 101.30 to 133.5 µg/kg, being detected in 10% of husk samples from Acre, in 10% of samples from Amapá, and in 10% of samples from Pará. However, this mycotoxin was not detected in samples from Amazonas.



**Fig. 2.** Chromatographic representations of aflatoxins: (I) standards, (II) almond sample, and (III) husk sample.

### 3.5. Identification of *Aspergillus* section *Flavi*

Among the 254 *Aspergillus* strains isolated from almonds and husks, 98 strains were from Acre, 31 from Amazonas, 81 from Amapá, and 44 from Pará.

*Aspergillus* section *Flavi* strains isolated were identified by polyphasic approach as *A. nomius* (Acre: 56%, Amazonas: 81%, Amapá: 68%, and Pará: 62%), *A. flavus* was isolated at a lower frequency in all regions (Acre: 33%, Amazonas: 13%, Amapá: 29%, and Pará: 35%). Other species isolated at low frequency were *A. parasiticus* (Acre: 2%, Amapá and Pará: 3%), *Aspergillus tamarii* (Acre: 7% and Amazonas: 3%), *Aspergillus pseudotamarii* (isolated only in Acre: 2%), and *Aspergillus caelatus* (Amazonas: 3% and Pará: 2%). Other *Aspergillus* species were also identified: one *Aspergillus sclerotium* strain in a sample from Acre and five *Aspergillus versicolor* strains in samples from Acre and one strain each in samples from Amazonas, Amapá and Pará. Two *Aspergillus sydowii* strains (Acre and Pará) and one *Aspergillus persii* (Amapá) were also isolated.

Analysis of aflatoxigenic potential of the *A. flavus* revealed aflatoxin production (AFB<sub>1</sub> and AFB<sub>2</sub>) by 52% of the strains, with levels ranging from 67.83 to 187,098.86 µg/kg (AFB<sub>1</sub>). However, all of the *A. nomius*, *A. parasiticus*, and *A. pseudotamarii* strains produced AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, and AFG<sub>2</sub>, with levels ranging from 2313.68 to 285,901.89; 2102.64 to 44,722.00, and 1137.83 to 235,388.80 µg/kg for AFB<sub>1</sub>, respectively. The maximum level of AFB<sub>1</sub> was observed in the strain of *A. nomius* isolated from state of Amazonas.

#### 4. Discussion

Contamination by fungi and aflatoxins is a problem for Brazil nuts. Industry and producers have made considerable efforts over the last 15 years to minimize fungal growth and aflatoxin production, particularly in the case of Brazil nuts. Due to climatic conditions in the Amazon region, with an average temperature of 26 °C and relative humidity of 80–95%, favor the production of mycotoxins. Because Brazil nuts are harvested from the wild, it is hard to control these factors (Freitas-Silva and Venancio, 2011).

The main stages in Brazil nut production are: collection in the forest (cleaning paths between trees, gathering the fruit, opening the fruit and transporting them to the camp), processing (cleaning, drying and soaking, peeling the nuts, drying the peeled nuts) and packaging in the packing house (Freitas-Silva and Venancio, 2011). In the Amazon forest, after the fruit pods fall, they stay in direct contact with the soil for several days prior to harvest and during this time, the fruit pods can be contaminated with fungi species (Arrus et al., 2005). Baquião et al. (2012) nominated soil as the main route of fungal contamination in Brazil nuts. Fungal infection in Brazil nuts may occur by the porosity of the husks (Spencer, 1921), through the action of insects, birds and other mechanical damage, and these factors, in association with the climatic conditions of the region, may favor the penetration and propagation of fungi from fruit pod to husks and from husks to almonds (Castrillón and Purchio, 1988; Arrus et al., 2005).

In our study, the frequency of fungal isolation was higher in husks than almonds of Brazil nuts. Husks of Brazil nuts are mainly composed of lignin and cellulose (Bonelli et al., 2001). Cellulose endows the husk with hygroscopic characteristics, that linked to climatic conditions of the Amazon region, influence on their moisture content. There is a tendency for the moisture content of the husk to balance with air relative humidity. However, the moisture content of the husks is not fully transferred to almonds due to their high lipid content (hydrophobic characteristic). This would explain the different values of moisture content in husk (mean: 14.96) and almond (mean: 4.37) samples shown in our study (Table 1). While the moisture content refers to total amount of water determined in a substrate, the water activity measures the amount of free water. In the present study, the means of water activity were 0.70 and 0.76 for husks and almonds, respectively (Table 1), which were below the minimum range of 0.78–0.80 established for the growth of *Aspergillus* (Lacey et al., 1991) and mycotoxin production (higher than 0.85) (Schmidt-Heydt et al., 2009). Moreover, the husks of Brazil nuts can be a protective barrier against oxidizing agents in almonds, and also maintain their quality (Ribeiro et al., 1993).

In the present study *Phialemonium* spp. was the main isolated fungal species. According to Guarro et al. (1999a, 1999b), *Phialemonium* spp. is

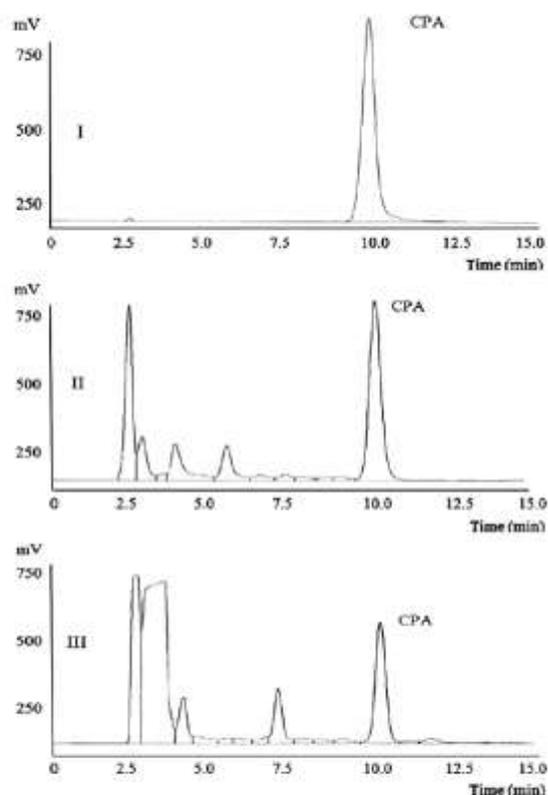


Fig. 3. Chromatographic representations of CPA: (I) standard, (II) almond sample, and (III) husk sample.

characterized by its morphological similarity with the genera *Fusarium* and *Acremonium*. *Phialemonium* spp., a dematiaceous fungus, has no evident dark pigments. These species were initially described as an intermediate genus between *Acremonium* spp. and *Phialophora* spp. (Gams and McGinnis, 1983). The genus *Phialemonium* includes the species *Phialemonium curvatum*, *Phialemonium dimorphosporum* and *Phialemonium obovatum*. However, *P. dimorphosporum*, which is considered a synonym of *P. curvatum*, is the most frequent species (Guarro et al., 1999a, 1999b). These fungi are widely distributed in

Table 4  
Mycotoxin (aflatoxins and cyclopiiazonic acid) contamination of Brazil nut samples.

State	Sample	Aflatoxins								Cyclopiiazonic acid	
		AFB <sub>1</sub>		AFB <sub>2</sub>		AFG <sub>1</sub>		AFG <sub>2</sub>		Positive samples (%)	Range (µg/kg)
		Positive samples (%)	Range (µg/kg)								
Acre	Almond	8	11.9–1058.0	6	13.7–130.4	6	17.9–243.0	4	14.7–223.6	6	124.7–151.3
	Husk	12	6.8–61.8	4	1.1–3.1	8	4.4–46.3	2	6.0	10	101.3–133.5
Amazonas	Almond	18	6.8–36.6	4	1.1–1.6	14	2.7–12.6	2	1.8	2	132.8
	Husk	14	2.9–9.5	ND*	–	14	1.6–3.2	ND	–	ND	ND
Amapá	Almond	10	2.5–38.7	4	0.5–7.7	2	2.9	2	0.8	4	143.1–161.2
	Husk	10	3.6–15.1	ND	–	2	1.9	ND	–	10	105.8–133.5
Pará	Almond	8	1.7–6.9	ND	–	ND	–	ND	–	10	98.65–123.31
	Husk	4	2.8–3.3	ND	–	ND	–	ND	–	10	101.9–151.1

Limits of detection were 0.5 µg/kg for each aflatoxin and 50 µg/kg for cyclopiiazonic acid. Limits of quantification were 0.75 µg/kg for each aflatoxin and 100 µg/kg for cyclopiiazonic acid.

\* Not detected.

nature and can be isolated from air, soil, industrial effluent, and sewage (Gams and McGinnis, 1983; Perdomo et al., 2011).

In a previous study, Castrillón and Purchio (1988) identified *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. and *Acremonium* spp. as the predominant genera in samples of Brazil nuts from Amazonia. Freire et al. (2000) detected *Aspergillus* spp. as the predominant species in husks of the Brazil nut. *Penicillium*, *Cunninghamella*, *Rhizopus*, *Fusarium* and *Acremonium*, among others, were also isolated in that study.

Morphological differentiation is insufficient to distinguish many *Aspergillus* species, due to interspecific similarities, and intraspecific variability (Rodrigues et al., 2009). Samson and Varga (2009) showed that no single method is flawless in recognizing species and recommend a polyphasic approach, where morphological examination, extrolite analysis and DNA sequence data are considered together. In the present study, *Aspergillus* isolates were identified by a polyphasic approach. Distinguishing between *A. flavus* and *A. nomius* has been difficult, because these species share many characteristics (Kurtzman et al., 1987). In addition to their toxigenic profile, these species are distinct with many nucleotide substitutions present in comparisons of their genes. In addition, growth rate at 42 °C, stipe roughness and DNA sequences differ between *A. nomius* and *A. bombycis* (Peterson et al., 2001).

The isolation of *A. nomius* from Brazil nuts agrees with the findings of Olsen et al. (2008) who studied two batches of Brazil nuts (60 and 20 kg). Twenty-two of the fungal isolates belonged to the *Aspergillus* section *Fluvi*. Three isolates were producers of aflatoxins B and G and were identified as *A. nomius* according to Kurtzman et al. (1987). Two of these isolates were sent to the Centraalbureau voor Schimmekultures (Utrecht, The Netherlands) for confirmation. Nineteen isolates were identified as *A. flavus*, including 10 producers of aflatoxins B and nine non-producers. *A. parasiticus* was not isolated in that study and *A. nomius* was found to produce large amounts of aflatoxins.

*A. nomius* has been isolated from Brazil nuts (Olsen et al., 2008; Baquião et al., 2012; Gonçalves et al., 2012), pistachio (Feibelman et al., 1998), wheat (Kurtzman et al., 1987), corn, and peanut (Pitt et al., 1993), as well as from agricultural soil in the United States (Kurtzman et al., 1987; Egel et al., 1994), Iran (Razzaghi-Abyaneh et al., 2006), and Thailand (Ehrlich et al., 2007). The last authors concluded that *A. nomius* may be more widespread than commonly thought. This species is a major aflatoxin producer in Brazil nuts (STDF, 2009). In addition, *A. nomius* might be particularly important because of its ability to produce larger amounts of aflatoxins than *A. flavus* isolates.

It should be highlighted that the presence of aflatoxins is a matter of serious concern for exporters of Brazil nuts since the maximum tolerance limit established by the European Commission to Brazil nuts for further processing is 15 µg/kg for the sum of aflatoxins AFB<sub>1</sub> + AFB<sub>2</sub> + AFG<sub>1</sub> + AFG<sub>2</sub>, and 8 µg/kg for AFB<sub>1</sub> (EC, 2010). In our study, Brazilian states that had the most samples with aflatoxins levels higher than the maximum tolerance limit were Amazonas (8/9) and Acre (4/4). On the other hand, only one sample from Amapá (1/5) and none from Pará (0/4) had levels higher than 15 µg/kg (Table 4). Regarding to CPA, 5.5% of the almonds samples were positives. The minimum and the maximum levels were 98.65 µg/kg and 161.2 µg/kg, respectively (Table 4). Baquião et al. (2012) did not detect CPA in Brazil nuts.

The production chain of Brazil nuts has many peculiarities, which require a holistic approach to prevent decaying of these nuts. Their production begins in the forest, when the fruits containing the seeds fall to the ground; they are collected and stored by gatherers who are responsible for the initial handling and processing still in the forest. This system does not allow pests and diseases to reach damaging levels characteristically observed in monocultures, because of the forest ecosystem equilibrium (Freitas-Silva and Venancio, 2011). In fact, the most influential parameters that affect fungal growth and mycotoxin production are storage conditions, particularly as high moisture

and temperatures directly affect the  $a_w$ . Drying should take place soon after harvest and as rapidly as feasible, followed by controlled atmospheres in terms of relative humidity, temperature, ozone treated, and oxygen reduction in warehouses. High levels of temperature and  $a_w$  create conditions favorable for the growth of fungi, particularly aflatoxigenic strains. In the present study, the presence of aflatoxigenic strains also indicates the need for good storage practices to prevent the occurrence of aflatoxins in Brazil nuts.

## 5. Conclusion

The frequency of fungal isolation was higher for husks than almonds of Brazil nuts, showing that contamination occurred from the husk to the almond. *Phialemonium* spp. was the main fungal genus isolated. Aflatoxin production was higher in the almonds than in the husks. The presence of the fungus did not necessarily imply aflatoxin contamination, but the high frequency of aflatoxigenic *Aspergillus* strains showed that the almond of Brazil nuts was a potential substrate for aflatoxin production. Therefore, increased attention is necessary since the climatic conditions (high temperature and humidity) of the Amazon region favor the growth of fungi, particularly aflatoxin-producing *Aspergillus* species. Multiple approaches will be needed to prevent the negative economic impact of the aflatoxins and their harmful effects on human and animal health.

## Acknowledgments

This study was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

Thanks to Fernando Lucas Melo for help in sequencing of strains.

## References

- ANVISA, Brazilian Health Surveillance Agency, 2011. Brazil Resolution RDC no 07 of February 18th, 2011. Provides maximum permissible levels for mycotoxin in food. Official Gazette, Brasília, DF, Executive, February, 22nd 2011.
- Arris, K., Blank, G., Clear, R., Holley, R.A., Abramson, D., 2005. Microbiological and aflatoxin evaluation of Brazil nut pods and the effects of unit processing operations. *Journal of Food Protection* 68, 1060–1065.
- Bao, L., Trucksess, M.W., White, K.D., 2010. Determination of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, and G<sub>2</sub> in olive oil, peanut oil, and sesame oil. *Journal of the Association of Official Agricultural Chemists International* 93, 936–942.
- Baquião, A.C., Zorzete, P., Reis, T.A., Assunção, E., Vergueiro, S., Correa, B., 2012. Mycoflora and mycotoxins in field samples of Brazil nuts. *Food Control* 28, 224–229.
- Barnon, G.L., 1972. The Genera of Hyphomycetes from Soil. Robert E. Krieger Publishing, New York, 364 pp.
- Bonelli, P.R., Della Rocca, P.A., Cerreia, E.G., Cukierman, A.L., 2001. Effect of pyrolysis temperature on composition, surface properties and thermal degradation rates of Brazil nuts shells. *Bioresour. Technol.* 76, 15–22.
- Brazil, 1968. Ministry of Development, Industry and Commerce, Brazil, Dec. L. number 356, August 15, 1968.
- Carbone, I., Kohn, L.M., 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91, 553–556.
- Castrillón, A.L., Purchio, A., 1988. Ocorrência de fungos contaminantes e produtores de aflatoxinas em castanha do Pará (*Bertholletia excelsa*, Humb. and Bonpl., 1808). *Acta Amazônica* 18, 173–183.
- Cotty, P.J., Cardwell, K.F., 1999. Divergence of West African and North American communities of *Aspergillus* section *Fluvi*. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 2264–2266.
- EC, European Commission, Commission Regulation, 2010. No. 165/2010 of 26 February 2010, amending Regulation (EC) No. 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. *Official Journal of the European Union* L50, 8–12.
- Egel, D.S., Cotty, P.J., Elias, K.S., 1994. Relationships among isolates of *Aspergillus* sect. *Fluvi* that vary in aflatoxin production. *Phytopathology* 84, 906–912.
- Ehrlich, K.C., Kobbeman, K., Montalbano, B.G., Cotty, P.J., 2007. Aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Thailand. *International Journal of Food Microbiology* 114, 153–159.
- Feibelman, T.P., Cotty, P.J., Doster, M.A., Michailides, T.J., 1998. A morphologically distinct strain of *Aspergillus nomius*. *Mycologia* 90, 618–623.
- Freire, F.C.D., Kozakiewicz, Z., Paterson, R.R.M., 2000. Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. *Mycopathologia* 149, 13–19.
- Freitas-Silva, O., Venancio, A., 2011. Brazil nuts: benefits and risks associated with the contamination by fungi and mycotoxins. *Food Research International* 44, 1434–1440.
- Gams, W., McGinnis, M.R., 1983. *Phialemonium*, a new anamorph genus intermediate between *Phialophora* and *Acremonium*. *Mycologia* 75, 977–987.

- Glass, N.L., Donaldson, G.C., 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1323–1330.
- Gonçalves, J.S., Ferracin, L.M., Vieira, M.L.C., Iamanaka, B.T., Taniwaki, M.H., Fungaro, M.H.P., 2012. Molecular analysis of *Aspergillus section flavi* isolated from Brazil nuts. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28, 1817–1825.
- Guarro, J., Gené, J., Stchigel, A.M., 1999a. Developments in fungal taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews* 12, 454–500.
- Guarro, J., Nucci, M., Aklii, T., Gené, J., Cano, J., da Glocia, M., Barreiro, C., Aguilar, C., 1999b. *Phlebotomum iternum*: two documented nosocomial cases. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 2493–2497.
- Hinrikson, H.P., Hurst, S.F., De Aguirre, L., Morrison, C.J., 2005. Molecular methods for identification of *Aspergillus* species. *Medical Mycology* 43 (Supplement 1), 129–137.
- IUPAC, International Union of Pure and Applied Chemistry, Currie, L.A., 1999. Commission on analytical nomenclature, recommendations in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities. *Pure and Applied Chemistry* 57, 1699–1723.
- JECFA, Joint Expert Committee on Food Additives, 1997. Evaluation of certain food additives and contaminants. Forty-sixth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives 1996. WHO Technical Report Series 868. World Health Organization, Geneva.
- Kurtzman, C.P., Horn, B.W., Hesselein, C.W., 1987. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus ramarii*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 53, 147–158.
- Lacey, J., Ramakrishna, N., Harner, A., Magan, N., Marfleet, C., 1991. Grain fungi. In: Arora, D.K., et al. (Ed.), *Handbook of Applied Mycology: Foods and Feeds*. Marcel Dekker, New York, pp. 12–77.
- Le Bars, J., 1979. Cyclopiiazonic acid production by *Penicillium camemberti* Thom and natural occurrence of this mycotoxin in cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 38, 1052–1055.
- Lebrete, D.T., Martins Jr., H.D.A., Wang, A., Bustillos, O.V., 2004. Rapid method to determination of mycotoxins compounds in food samples using high-performance liquid chromatography with APCI ionization tandem mass spectrometry (LC-APCI-MS/MS) in simultaneous positive and negative ion mode. 10th Latin American Congress on Chromatography and Related Techniques – COLACRO X, Campos de Jordão, São Paulo, Brazil.
- Lin, M.T., Dianese, J.C., 1976. A coconut-agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. *Phytopathology* 66, 1466–1468.
- Olsen, M., Johnsson, P., Möller, T., Paladino, R., Lindblad, M., 2008. *Aspergillus nomius*, an important aflatoxin producer in Brazil nuts? *World Mycotoxin Journal* 1, 123–126.
- Pacheco, A.M., Scussel, V.M., 2006. *Castanha-do-brasil da floresta tropical ao consumidor*. 1st ed. Editora, Florianópolis, 173 pp.
- Pendomo, H., Sutton, D.A., Garcia, D., Fothergill, A.W., Gene, J., Cano, J., Summerbell, R.C., Rinaldi, M.G., Guarro, J., 2011. Molecular and phenotypic characterization of *Phlebotomum* and *Lecythophora* isolates from clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology* 49, 1209–1216.
- Peterson, S.W., Ito, Y., Horn, B.W., Goto, T., 2001. *Aspergillus humlysis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. *Mycologia* 93, 689–703.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D., 2009. *Fungi and Food Spoilage*. Blackie Academic and Professional, London, 519 pp.
- Pitt, J.I., Glenn, D.R., Hocking, A.D., 1983. An improved medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Food Protection* 56, 265–269.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D., Bhudhasamai, K., Miscamble, B.F., Wheeler, K.A., Tanboon-Ek, P., 1993. The normal mycoflora of commodities from Thailand. 1. Nuts and oilseeds. *International Journal of Food Microbiology* 20, 211–226.
- Rao, B.L., Husain, A., 1985. Presence of cyclopiiazonic acid in kodo millet (*Paspalum scrobiculatum*) causing “koda poisoning” in man and its production by associated fungi. *Mycopathologia* 89, 177–180.
- Raper, K.B., Fennell, D.I., 1965. *The Genus Aspergillus*. Williams and Wilkins, Baltimore, MD, 686 pp.
- Razzaghi-Abyaneh, M., Shams-Ghahfarokhi, M., Alameh, A., Kazerooni-Shiri, A., Ranjbar-Bahadori, S., Mirzajoseini, H., Rezaee, M.B., 2006. A survey on distribution of *Aspergillus section flavi* in corn field soils in Iran: population patterns based on aflatoxins, cyclopiiazonic acid and sclerotia production. *Mycopathologia* 161, 183–192.
- Ribeiro, M.A.A., Regitano-D’Arce, M.A.B., Lima, U.A., Baggio, C.E., 1993. Armazenamento da castanha do para com e sem casca: efeito da temperatura na resistência ao ranço. *Scientia Agricola* 50, 343–348.
- Rodrigues, P., Venancio, A., Kozakiewicz, Z., Lima, N., 2009. A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus section flavi* isolated from Portuguese almonds. *International Journal of Food Microbiology* 129, 187–193.
- Samson, R.A., Varga, J., 2009. What is a species in *Aspergillus*? *Medical Mycology* 47, 13–20.
- Samson, R.A., Hung, S.B., Frisvad, J.C., 2006. Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Medical Mycology* 44, 133–148.
- Schmidt-Heydt, M., Abdel-Hadi, A., Magan, N., Geisen, G., 2009. Complex regulation of the aflatoxin biosynthesis gene cluster of *Aspergillus flavus* in relation to various combinations of water activity and temperature. *International Journal of Food Microbiology* 135, 231–237.
- Spencer, E.R., 1921. Decay of Brazil nuts. *Botanical Gazette* 72, 265–288.
- STDF, Standard and Trade Development Facility, 2009. Project 114. Validation and transfer to the key stakeholders of a sustainable and effective aflatoxin management system in the Brazil nuts production chain for recovering and consolidating export markets, particularly in Europe. Final report: Covering Period from 1 June 2006 to 30 November 2008. Project coordinator: Brabet, C., Olsen, M. Last version: May 2009.
- Tanaka, T., Yoneda, A., Sugitara, Y., Inoue, S., Takino, M., Tanaka, A., Shinoda, A., Suzuki, H., Akiyama, H., Toyoda, M., 2002. An application of liquid chromatography and mass spectrometry for determination of aflatoxins. *Journal of the Japanese Association of Mycotoxicology* 52, 107–113.
- Urano, T., Trucksess, M.W., Matusik, J., 1992. Liquid chromatographic determination of cyclopiiazonic acid in corn and peanuts. *Journal of Association of Official Analytical Chemists International* 75, 319–322.
- USDA, United States Department of Agriculture, 2010. National Nutrient Database for Standard Reference, Food Group: 12 nut and seed products. (Retrieved 15th November, 2010).
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), *PCR Protocols a Guide to Methods and Applications*. Academic Press, New York, pp. 315–322.
- Yokota, T., Sakurai, A., Inouchi, S., Takahashi, N., 1981. Isolation and <sup>13</sup>C NMR study of cyclopiiazonic acid, a toxic alkaloid produced by muscardine fungi *Aspergillus flavus* and *A. oryzae*. *Agricultural and Biological Chemistry* 45, 53–56.

## APÊNDICE F- Trabalho em vias de publicação na Food Microbiology

\*Manuscript

[Click here to view linked References](#)

1 **Profile of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from organic Brazil nuts using a**  
2 **polyphasic approach**

3

4 T. A. Reis<sup>\*</sup>, A. C. Baquião, D. D. Atayde, F. Grabraz, B. Corrêa

5

6 Laboratório de Micotoxinas, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências  
7 Biomédicas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, CEP 05508-  
8 000, São Paulo, São Paulo, Brazil

9

10 \*Corresponding author. Tel: +55 11 30917295; fax: +55 11 3091-7354.

11

12 **Abstract**

13

14 The Brazil nut (*Bertholletia excelsa*), the most important non-timber forest product  
15 extracted from Amazonia, is commercialized in national and international markets. The  
16 main importers of these nuts are North America and European countries, where the  
17 demand for organic products has grown to meet consumers concerned about food  
18 safety. In this context, the precise identification of toxigenic fungi is important because  
19 the Brazil nut is susceptible to colonization by these microorganisms. The present study  
20 aimed to characterize 47 strains of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from organic  
21 Brazil nuts collected in the Municipality of Manicoré, Amazonas. We profiled the  
22 isolates using a polyphasic approach (morphological identification, extrolites analysis  
23 and multi-gene sequencing). The results showed *Aspergillus flavus* as the main species  
24 found in organic Brazil nuts (74.4%), followed by *A. nomius* (12.7%), *A. caelatus*  
25 (10.6%) and *A. tamarii* (2.1%). Our analysis of the potential mycotoxigenic revealed  
26 that 80.0% of strains of *A. flavus* were toxin producers, 14.3% of which produced only

27 aflatoxin B (AFB), 20.0% of which produced only cyclopiazonic acid (CPA), and  
28 45.7% produced both. *A. flavus* isolates produced AFB at levels between 0.8 ng/g and  
29 493.7 ng/g, and CPA levels ranged from 34.9 ng/g to 7627.5 ng/g. All strains of *A.*  
30 *nomius* were AFB and AFG producers with total aflatoxin levels between 13.14 ng/g  
31 and 267.94 ng/g; these strains did not produce CPA. *A. caelatus* and *A. tamaritii* isolates  
32 were not mycotoxigenic. The profile of *Aspergillus* section *Flavi* strains from organic  
33 Brazil nuts obtained using a polyphasic approach allowed the reliable identification of  
34 these species. There is no consensus about what *Aspergillus* species predominates on  
35 this substrate. Apparently, the origin, processing, transport and storage conditions of the  
36 Brazil nut samples influence the species that are found. This study is relevant because  
37 the *Aspergillus* section *Flavi* species are very similar morphologically and molecularly;  
38 however, *A. nomius* strains are capable of producing larger quantities of aflatoxins than  
39 *A. flavus*. Thus, understanding the population of fungi is essential for the development  
40 of viable strategies to control aflatoxins in organic Brazil nuts.

41

42 **Keywords:** fungi, molecular, sequencing, aflatoxin, mycotoxin, seed.

43

#### 44 **1. Introduction**

45 The Brazil nut (*Bertholletia excelsa* HBK), one of the most important non-  
46 timber forest products of extractive exploitation, is a plant native of the Amazon region  
47 (Freitas-Silva and Venancio, 2011). The production and extraction of the Brazil nut is  
48 an activity of low environmental impact (Wadt et al., 2005). Its nuts are considered a  
49 highly nutritious food and an excellent supplement to the diet of children and adults  
50 because they are rich in lipids, vitamins, minerals and proteins. The oil, extracted from

51 almonds, has good digestibility, and the residue of this extraction can be used in food  
52 and feed (Pacheco and Scussel, 2006).

53         In addition to the national market, Brazil nuts are usually exported as high-value  
54 products to North America and European countries, where a special market of organic  
55 foods was created to meet the needs of consumers concerned about the safety of their  
56 diet and the impacts of their buying decisions on people and the environment. The  
57 demand for this type of food in North America and the European Union, the two main  
58 organic food markets, has nearly doubled over the last decade (Willer and Kilcher,  
59 2011). Those consumers agree to pay more for products certified as sustainable; thus,  
60 Brazilian producers saw a good opportunity for better economic gains when joining  
61 organic certification programs.

62         Organic foods are produced through approved cultural, biological and  
63 mechanical practices (USDA, 2012). Because Brazil nuts are grown only in the Amazon  
64 Forest, sustainable farming is a consideration in this distinct and unique ecosystem. This  
65 issue is relevant because the contamination of seeds by cosmopolitan fungi, such as  
66 *Aspergillus* section *Flavi*, mainly *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* and  
67 *Aspergillus nomius*, is a recurring problem in Brazil nuts (Johnsson et al., 2008; Olsen  
68 et al., 2008; Baquião et al., 2012; Reis et al., 2012). These fungi may produce  
69 aflatoxins, which are toxic metabolites that potentially carcinogenic and may be present  
70 in Brazil nuts (Reis et al., 2012). Moreover, some *A. flavus* strains are also reported to  
71 produce another mycotoxin, cyclopiazonic acid (CPA), a potent neurotoxin with a rigid  
72 pentacyclic indole tetramate scaffold that acts as a nanomolar inhibitor of the  
73 sarcoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase (Seidler et al., 1989).

74         The presence of aflatoxins is a matter of serious concern for exporters of Brazil  
75 nuts. Due to the significant health risks associated with the presence of mycotoxins in

76 Brazil nuts, added to the increasing demand for organic products, the precise  
77 identification of *Aspergillus* section *Flavi* is an essential point for understanding how to  
78 control fungi and mycotoxins in this commodity. Thus, the main objective of this study  
79 was to obtain detailed information on the profile of the *Aspergillus* section *Flavi*  
80 population in organic Brazil nuts by a polyphasic approach.

81

## 82 **2. Materials and Methods**

83

### 84 *2.1. Fungal isolates*

85 A total of 47 isolated *Aspergillus* section *Flavi* strains were examined in this  
86 study. These strains were obtained from 50 samples of 400 g each collected from a  
87 cooperative in 2009, in the municipality of Manicoré, State of Amazonas, Brazil. The  
88 husks of each nut were carefully and aseptically removed by cracking them with a nut  
89 cracker. After the nut samples were dehusked, they were divided into 50 husk and 50  
90 almond samples. Ten grams of each sample was plated in Petri dishes with *Aspergillus*  
91 *flavus*-parasiticus agar and incubated at 25 °C for 5 days. The molds that developed  
92 were transferred to Petri dishes with potato dextrose agar and incubated at 25 °C for 7  
93 days, after which *Aspergillus* section *Flavi* strains were identified. These strains are  
94 kept in the fungal collection of the Laboratory of Toxigenic Fungi and Mycotoxins,  
95 Institute of Biomedical Science, University of São Paulo.

96

### 97 *2.2 Morphological characterization of the isolates*

98 All components used for the preparation of the culture media were obtained  
99 from Oxoid (Basingstoke, UK). Milli-Q water was produced in our laboratory using the  
100 Academic System (Millipore).

101

102 *2.2.1. Morphological analysis*

103           Strains were inoculated in the center of Petri dishes containing Czapek (CZ) agar  
104 and malt agar and then incubated at 25 °C for 7 days in the dark. After incubation, the  
105 dishes were examined for macroscopic (colony color, sclerotial production, morphology  
106 and size) and microscopic (conidia morphology and size) characteristics. Identification  
107 followed the taxonomic keys and guides available for the genus *Aspergillus* (Raper and  
108 Fennel, 1965; Pitt and Hocking, 2009; Varga et al., 2011). *Aspergillus* section *Flavi*  
109 strains were cultured on CZ and Blakeslee's malt agar at 25 °C, 37 °C and 42 °C, and  
110 colony diameter was then measured after 7 days of incubation to confirm the strain  
111 identification (Kurtzman et al., 1987; Peterson et al., 2001).

112

113 *2.2.2. Characterization of sclerotial production by the isolates*

114           Sclerotial size is a phenotypic characteristic of *A. flavus* strains (Abbas et al.,  
115 2005) that can be used to create two different groups: the large strains (L) having  
116 sclerotia > 400 µm in diameter and the small strains (S) with sclerotia < 400 µm (Horn,  
117 2003). Each strain was inoculated into Petri dishes containing CZ and then incubated at  
118 30 °C for 14 days. Petri dishes were observed macroscopically to verify the presence of  
119 sclerotia. Sclerotia were obtained by scraping the surface of the plate over Whatman  
120 No. 2 filter paper during irrigation with water containing Tween 20 (100 µL/L),  
121 followed by rinsing under running tap water. Sclerotia were further cleaned in a beaker  
122 by repeated rinsing and decanting, and they were then air dried (Novas and Cabral,  
123 2002). An isolate was defined as a non-producer of sclerotia if no sclerotial production  
124 was observed under the described culture conditions. Ten sclerotia were randomly  
125 selected from each isolate to determine their diameter (µm) under a light microscope

126 (Leica, Salzburg, Austria) using a millimeter blade (5+100/100 mm  $\pm$  0.2  $\mu$ m) and  
127 ocular grid (CRL W 10x/18) (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

128

### 129 *2.3. DNA extraction, amplification and sequencing*

130 The strains were studied by sequencing the ITS (White et al., 1990),  $\beta$ -tubulin  
131 (Glass and Donaldson, 1995) and calmodulin (Carbone and Kohn, 1999) gene regions  
132 of rDNA. DNA was extracted and purified directly from fungal colonies grown on yeast  
133 extract sucrose agar at 25 °C in the dark for 3 days using the PrepMan Ultra® Kit  
134 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). DNA was quantified with the NanoDrop®  
135 2000c spectrophotometer (Uniscience, Wilmington, DE). A fragment of the ITS region  
136 was amplified with the ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCG 3') and ITS4 (5'  
137 TCCTCCGCTTATTGATAT 3') primer pairs. Part of the  $\beta$ -tubulin gene was amplified  
138 using primers T22 (5' TCTGGATGTTGTGGGAATCC 3') and TUB-F (5'  
139 CTGTCCAACCCCTCTTAGGGCGACT 3'). Part of the calmodulin gene was  
140 amplified using primers CMD 42 (5' GGCCTTCTCCCTATTCGTAA 3') and CMD  
141 637 (5' CTCGCGGATCATCTCATC 3'). The PCR mixture contained 12.5  $\mu$ L 2 $\times$  PCR  
142 Master Mix (Promega, San Luis Obispo, CA, USA), 6.5  $\mu$ L Milli-Q water, 2  $\mu$ L DNA  
143 (40 ng) and 2  $\mu$ L (20 pmol) of each primer (Prodimol Biotecnologia, Minas Gerais,  
144 Brazil) in a final volume of 25  $\mu$ L. The amplification program included an initial  
145 denaturation at 94 °C for 3 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C for 1  
146 min, annealing at 57 °C (ITS), 49 °C ( $\beta$ -tubulin) or 54 °C (calmodulin) for 1 min and  
147 extension at 72 °C for 1 min. A final extension step at 72 °C for 5 min was included at  
148 the end of the amplification. After PCR, the products were purified with the QIAquick  
149 PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and stored at -20 °C until the time of  
150 sequencing. The PCR products were sequenced using the same primers as those

151 employed for amplification. The Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit  
152 (Applied Biosystems) was used for sequencing, and the reactions were run on a 3100  
153 DNA sequencer (Applied Biosystems). Consensus sequences were obtained using the  
154 AutoAssembler program (Perkin Elmer-Applied Biosystems) and SeqMan software  
155 (Lasergene, Madison, WI, USA). The sequences were then submitted to BLASTn  
156 searches ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) to confirm preliminary identifications.

157

#### 158 *2.4. Determination of extrolites*

159

##### 160 *2.4.1. Chemicals and reagents*

161 AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub> and CPA standards were purchased from Sigma-  
162 Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Stock solutions were prepared in methanol and kept at  
163 -20 °C. All solvents used were of liquid chromatography grade and were purchased  
164 from Merck (Darmstadt, Germany). Milli-Q water was produced in our laboratory using  
165 the Millipore Academic System.

166

##### 167 *2.4.2. Limits of detection and quantification*

168 The limit of detection (LOD) is defined as the lowest concentration that can be  
169 determined to differ from a blank. The estimated values of the LOD were based on the  
170 relationship of five-times the baseline noise and were determined by analyzing standard  
171 solutions of each mycotoxin. The concentrations were decreased until reaching the  
172 lowest detectable level (IUPAC and Currie, 1999). The limit of quantitation (LOQ) is  
173 defined as the level above which quantitative results could be obtained with a specified  
174 degree of confidence (IUPAC and Currie, 1999). The LOQ was determined by  
175 analyzing standard solutions of each mycotoxin and decreasing the concentrations until

176 reaching the lowest quantified level with acceptable precision and accuracy. To test for  
177 the recovery of aflatoxins and CPA, coconut agar and YES agar were used, respectively.  
178 Five grams of each medium was spiked with different concentrations of mixtures of  
179 four aflatoxins or CPA standards. The samples were allowed to stand overnight and  
180 were then extracted using the procedures described in the sections below (2.4.3. and  
181 2.4.4).

182 The quantification of mycotoxins was performed by measuring the peak area at  
183 each mycotoxin retention time and comparing it with the relevant standard curve. If the  
184 test solution area response was outside (higher than) the standard range, the test extract  
185 was diluted and reinjected into the LC column.

186

#### 187 2.4. 3. *Aflatoxigenic potential*

188 A fragment of each colony was inoculated into a plate containing coconut agar  
189 (Lin and Dianese, 1976) and incubated at 25 °C for 14 days. After growth, the whole  
190 content of each plate was removed and chloroform (30 mL per 10 g of culture) was  
191 added. After shaking, the sample was filtered through Whatman No. 1 filter paper. The  
192 content was then evaporated to residue and the extracts were resuspended in 2 mL  
193 chloroform. Next, 100 µL of this solution was evaporated and resuspended in 3 mL  
194 acetonitrile:water (85:15, v/v) and diluted in 27 mL acidified water. The solutions were  
195 cleaned on a Strata C18-E cartridge (500 mg/3 mL) (Phenomenex, Torrance, CA) at a  
196 flow rate of 1 drop/second. The cartridges were washed with 12 mL acidified water.  
197 Aflatoxins were eluted with 1 mL methanol, and the eluent was evaporated to residue.  
198 The residues were derivatized with trifluoroacetic acid (TFA) and hexane, evaporated  
199 once again and resuspended in 400 µL of a methanol:water (1:1, v/v) solution. The  
200 mixture was then injected into a Shimadzu Prominence HPLC system (Kyoto, Japan)

201 equipped with an RF 10 AXL fluorescence detector (excitation 365 nm, emission 450  
202 nm) and an autosampler system. The analytical column (Shimadzu, Shim-Pack VP  
203 ODS, 150 × 4.6 mm) was coupled to a pre-column cartridge (Shim-Pack GVP ODS, 10  
204 × 4.6 mm) maintained at 40 °C in an oven. The isocratic mobile phase consisted of  
205 acetonitrile:methanol:water (1.5:1.5:8, v/v/v) + 0.1% TFA and was eluted at a flow rate  
206 of 1 mL/min.

207 The calibration curves were constructed using five concentrations of each  
208 aflatoxin standard: 0.625, 1.25, 2.5, 5.0 and 10 ng/mL, corresponding to 0.25, 0.5, 1.0,  
209 2.0 and 4 µg/kg, respectively. The quantification of aflatoxins was performed by  
210 measuring the peak area at each aflatoxin retention time and comparing it with the  
211 relevant standard curve. If the test solution area response was outside (higher than) the  
212 standard range, the test extract was diluted with methanol:water (1:1, v/v) solution and  
213 reinjected into the LC column (Bao et al., 2010). Samples were defined as positive for  
214 each aflatoxin when yielding a peak at a retention time similar to that of each aflatoxin  
215 standard.

216

#### 217 2.4.4. CPA production

218 A fragment of each colony of the *Aspergillus* section *Flavi* isolates was  
219 inoculated into a plate containing YES agar and incubated at 25 °C for 14 days. After  
220 growth, the colonies together with the agar were submitted to the toxin extraction  
221 procedure with methanol (Bragulat et al., 2001). The analysis of CPA using HPLC was  
222 performed according to Urano et al. (1992). The residue was resuspended in 1 mL  
223 methanol and injected into the Shimadzu Prominence HPLC system equipped with a  
224 Shimadzu SPD-10A UV-Vis detector set at 282 nm, an autosampler system and a Luna  
225 C-8 column (4.6 × 250 mm, 5-µm particle size; Phenomenex) maintained at 40 °C in an

226 oven. The isocratic mobile phase consisted of 4 mM ZnSO<sub>4</sub> in methanol:water (6:4, v/v)  
227 and was eluted at a flow rate of 1 mL/min. The calibration curve was constructed using  
228 five concentrations of the CPA standard in quintuplicate: 66.6, 100, 133.4, 166.7 and  
229 333.2 µg/mL, corresponding to 66.6, 100, 133.4, 166.7 and 333.2 µg/kg, respectively.  
230 The quantification of CPA was performed by measuring the peak area at CPA retention  
231 time and comparing it with the relevant standard curve. Samples were defined as  
232 positive when yielding a peak at a retention time similar to that of the CPA standard.

233

#### 234 2.4.5. *Aspergillic acid production*

235 All isolates were cultured on AFPA at 30 °C for 48 h in the dark to confirm the  
236 production of aspergillic acid by analyzing the color of the reverse side of the colony  
237 (Pitt et al., 1983).

238

### 239 3. Results

240

#### 241 3.1. *Characterization of Aspergillus section Flavi isolates*

242 On the basis of morphological characteristics (colony color on Czapek agar and  
243 conidia morphology), the isolates were distinguished based on macro-microscopic  
244 characteristics: (i) isolates presenting yellow-green colonies, with smooth to finely  
245 rough and globose conidia with thin walls, and with a uni- or biseriate morphotype (*A.*  
246 *flavus* and *A. nomius*); (ii) isolates presenting olive colonies, with globose conidia, a  
247 uni- or biseriate conidial head, usually splitting into loose divergent columns, and finely  
248 roughened stipes hyaline (*A. caelatus*); and (iii) isolates presenting a yellowish brown  
249 color and double-walled conidia (*A. tamarii*) (Table 1).

250 Species identities based on morphological traits were consistent with those  
251 derived from ITS,  $\beta$ -tubulin and calmodulin nucleotide sequence information.

252 *A. flavus* was confirmed by its bright orange color on the reverse side of colonies  
253 grown on AFPA. *A. tamarii* produced a deep brown reverse coloration. *A. nomius* and  
254 *A. caelatus* isolates exhibited a cream color on this medium (Table 1).

255 Based on these criteria, from 47 isolates, 74.4% (35/47) were classified as *A.*  
256 *flavus*, followed by *A. nomius* (12.7%, 6/47), *A. caelatus* (10.6%, 5/47) and *A. tamarii*  
257 (2.1%, 1/47) (Table 1).

258

### 259 3.2. Mycotoxin potential

260 The coefficients of the calibration curves were 0.999 for all aflatoxins. The  
261 detection and quantification limits were 0.5 and 0.75 ng/g for each aflatoxin,  
262 respectively. The recovery rates of aflatoxins (determined in quintuplicate) were  
263 80.44% for AFB<sub>1</sub>, 81.06% for AFB<sub>2</sub>, 83.28% for AFG<sub>1</sub> and 84.26% for AFG<sub>2</sub>. For  
264 CPA, the coefficient of the calibration curve was 0.997. The quantification and  
265 detection limits were 100 and 50 ng/g, respectively, and the mean recovery rate of CPA  
266 determined in quintuplicate was 76.4%.

267 Of the 35 *A. flavus* isolates, 80% (28/35) were mycotoxigenic, 14.3% (5/35) of  
268 which produced only AFB; 20% (7/35) of which produced only CPA; and 45.7%  
269 (16/35) of which produced both AFB and CPA. *A. flavus* isolates produced AFB with  
270 levels ranging from 0.78 ng/g to 493.47 ng/g, and the isolates that produced CPA  
271 produced from 534.98 ng/g to 7,627.48 ng/g. All isolates of *A. nomius* were producers  
272 of AFB and AFG with aflatoxins levels total ranging from 13.14 ng/g to 9,267.94 ng/g,  
273 none of these isolates produced CPA. *A. caelatus* and *A. tamarii* strains were not  
274 mycotoxigenic (Table 1).

275

276 *3.3. Sclerotial production*

277           Only 5 isolates formed sclerotia under culture conditions, and all of them were  
278 L-type strains, including 4 *A. flavus* and 1 *A. nomius* strains. Among the *A. flavus*  
279 sclerotia producing strains, 1 was an AFB producer, 1 was a CPA producer and 2 were  
280 AFB and CPA producers (Table 1).

281

282 **4. Discussion**

283           Because of its economic impact, the genus *Aspergillus* has one of the better-  
284 described taxonomies among the filamentous fungi (Varga et al., 2004). However, the  
285 morphological differentiation of species belonging to the *Aspergillus* section *Flavi*  
286 group is difficult and subjective (Baquião et al., 2013a). Moreover, these species are  
287 closely related, so that no single phenotypic trait can be used to discriminate species  
288 from one another. However, the combination of a specific set of features can be a very  
289 good aid in species identification, whereas other features are not helpful (Rodrigues et  
290 al., 2011).

291           In the present investigation, the results obtained for the phenotypic features,  
292 based on morphological and biochemical data sets (colony color, conidia ornamentation  
293 and extrolites production) were in agreement with the molecular data. Similar results  
294 had already been reported by other authors (Ito et al., 2001; Rodrigues et al., 2011;  
295 Baquião et al., 2013a).

296           Thus, by using a polyphasic approach, we identified 47 isolates of *Aspergillus*  
297 section *Flavi* from organic Brazil nut samples. *A. flavus* was the predominant species,  
298 which corresponded to 74.4% of all isolates, followed by *A. nomius* (12.7%), *A.*  
299 *caelatus* (10.6%) and *A. tamaritii* (2.1%).

300 Characterization by morphological features is wearisome and very time-  
301 consuming, and dubious results make accurate identification difficult to attain,  
302 especially when identifying species that are closely related. According to Varga et al.  
303 (2011), *Aspergillus* section *Flavi* includes species with conidial heads in shades of  
304 yellow-green to brown with dark sclerotia. Moreover, differences among these species  
305 are minute, sometimes subjective, and the correct recognition in this section is relevant  
306 because some species can produce a large amount of mycotoxins (Kozakiewicz, 1994).  
307 Morphologically, *A. flavus* resembles *A. nomius*, but the conidia are more roughened.  
308 The limited growth of *A. nomius* at 42 °C on CZ agar is an additional characteristic that  
309 is able to distinguish it from the other related species (Kurtzman et al., 1987).

310 Some authors reported that dark sclerotia production is a feature of *Aspergillus*  
311 section *Flavi* (Varga et al., 2011). However, this description did not help us to identify  
312 isolated species of *Aspergillus* because in our study, only five strains formed L-type  
313 sclerotia. Furthermore, some authors reported a positive correlation between the  
314 presence of S-type sclerotia and high aflatoxin production (Cotty, 1989; Chang et al.,  
315 2001), and other studies showed no correlation between sclerotia and aflatoxigenicity  
316 (Razzaghi-Abyaneh et al., 2006; Giorni et al., 2007). We could not establish a  
317 correlation between the presence of L-type sclerotia and toxigenicity because only five  
318 strains were sclerotia producers and there was no pattern to their mycotoxins  
319 production.

320 The mycotoxin profile of the strains was also used for identification. *A. flavus*  
321 populations have been found to be extremely diverse in their toxigenic potential (Giorni  
322 et al., 2007). These isolates can produce type B aflatoxins, CPA, both or neither  
323 (Astoreca et al., 2011). The production of AFB<sub>1</sub> and CPA by *A. flavus* isolates could  
324 present particular risks to humans and animals, mainly in tropical and subtropical

325 countries (Astoreca et al., 2013) Of the 35 *A. flavus* isolates, 80.0% (28/35) were  
326 mycotoxigenic, with 14.3% (5/35) producing only AFB; 20.0% (7/35) producing only  
327 CPA; and 45.7% (16/35) producing both AFB and CPA. In the present study, 60.0% of  
328 *A. flavus* strains were aflatoxigenic, and these outcomes agreed with the findings of  
329 other authors (Calderari et al., 2013, Baquião et al., 2013a). The aflatoxigenic potential  
330 of *A. flavus* revealed AFB production (AFB<sub>1</sub> + AFB<sub>2</sub>), with levels ranging from 0.78 to  
331 479.11 ng/g.

332 With regard to *A. nomius*, all of the strains produced AFB and AFG, with levels  
333 ranging from 13.14 ng/g to 9,267.94 ng/g (AFB<sub>1</sub>+AFB<sub>2</sub>+AFG<sub>1</sub>+AFG<sub>2</sub>), but not CPA.  
334 Studies have concluded that *A. nomius* is a major aflatoxin producer in Brazil nuts. This  
335 fact might be particularly important because *A. nomius* strains were capable of  
336 producing larger amounts aflatoxins (AFB and AFG) than *A. flavus* (AFB) (Ehrlich et  
337 al., 2007; Reis et al., 2012).

338 *A. nomius* shares with *A. flavus* the ability to produce aflatoxin, but this  
339 mycotoxin is not a metabolite of *A. tamaritii* (Hesseltine et al., 1970). Although *A.*  
340 *tamaritii* can produce CPA, in our study, the only strain isolated from this species did not  
341 produce CPA. *A. caelatus* is closely related to *A. tamaritii* (Peterson et al., 2000);  
342 however, in our study, *A. caelatus* did not produce aflatoxins or CPA, and this finding  
343 was also reported by Horn et al. (1996).

344 The production of aspergillic acid by analyzing the color on the reverse side of  
345 colonies cultured on AFPA agar was also an important tool to identify species because  
346 *A. flavus* colonies present a bright orange color on the reverse side when grown on  
347 AFPA. *A. tamaritii* produced a deep brown reverse coloration. *A. nomius* and *A. caelatus*  
348 isolates showed a cream color on this medium. This finding was also reported by other  
349 investigators (Doster et al., 2009, Baquião et al., 2013a).

350 *A. nomius*, *A. flavus* and *A. tamarii* show greater DNA relatedness than is  
351 usually found between species, which suggests that these taxa only relatively recently  
352 evolved from a common ancestor (Kurtzman et al., 1987). Multi-gene sequencing of  
353 ITS, calmodulin and  $\beta$ -tubulin was used to enhance the reliability of *Aspergillus* section  
354 *Flavi* discrimination.

355 The predominance of *A. flavus* in our organic Brazil nut samples agrees with the  
356 findings of other authors (Freire et al., 2000; Arrus et al., 2005; De Mello and Scussel,  
357 2007; Pacheco et al., 2010; Baquião et al., 2012; Baquião et al., 2013b). Baquião et al.  
358 (2012) studied Brazil nut samples from the field, with a well-defined time of contact  
359 between the fruit pod samples and the soil (maximum 15 days), and they found that *A.*  
360 *flavus* was the only isolated species belonging to *Aspergillus* section *Flavi*. However,  
361 other studies have reported that *A. nomius* was the most prevalent species of *Aspergillus*  
362 section *Flavi* isolated from Brazil nuts (Olsen et al., 2008; Reis et al., 2012). Reis et al.  
363 (2012) analyzed Brazil nut samples from storage collected in different states of the  
364 Brazilian Amazon region, and they reported that *A. nomius* was the major isolated  
365 species of *Aspergillus*. In addition, Calderari et al. (2013) showed almost the same  
366 percentage of isolation of both *A. flavus* (30%) and *A. nomius* (29%) species from the  
367 rainforest and the market place in the Amazon region and the supermarket in São Paulo  
368 State.

369 Sustainable exploitation is widely advocated as a strategy for reconciling  
370 economic pressures on natural habitats by means of nature conservation (Silvertown,  
371 2004). The extraction of Brazil nuts has always been seen as an example of this strategy  
372 in the Amazon Forest (Freitas-Silva and Venancio, 2011), and the production chain  
373 exists within a web of ecological interactions. Brazil nut trees are difficult to cultivate,  
374 and their fruits are collected and stored by indigenous people who are responsible for

375 the initial handling and processing, which is still done in the forest (CAC, 2007).  
376 Thereafter, the collected fruits are taken to centers where they are opened. The nuts are  
377 then taken to cooperatives where they are dried and stored. Visual inspection results in  
378 the removal of nuts that are broken, show decay or are discolored, and then they are  
379 processed for commercialization (Pitt et al., 2013). The production chain of Brazil nuts  
380 has many peculiarities that require a broad approach to prevent aflatoxin contamination  
381 in these nuts (Reis et al., 2012). It is apparent that the origin, processing and storage  
382 conditions of Brazil nut samples all seem to have an important influence on the  
383 *Aspergillus* section *Flavi* population. The local knowledge linked with science can  
384 enhance the understanding of the factors that contribute to the predominance of *A.*  
385 *flavus* or *A. nomius* in the peculiar production chain of this nut.

386

## 387 **5. Conclusion**

388 The profile of *Aspergillus* section *Flavi* from organic Brazil nut samples by a  
389 polyphasic approach, combining morphological, chemical and molecular methods,  
390 permitted the reliable identification of the species. Different *Aspergillus* species  
391 belonging to section *Flavi* are morphologically and molecularly similar; however, *A.*  
392 *nomius* strains were capable of producing larger amounts of total aflatoxins than *A.*  
393 *flavus*. Due to the complexity of the production chain of Brazil nuts, local knowledge  
394 and science can clarify our understanding of the mycobiota of this commodity and can  
395 improve the development of viable strategies for aflatoxin control.

396

## 397 **Acknowledgments**

398 This study was supported by the National Council for Scientific and Technological  
399 Development (CNPq).

400

401 **References**

- 402 Abbas, H.K., Weaver, M.A., Zablotowicz, R.M., Horn, B.W., & Shier, W.T. (2005).  
 403 Relationships between aflatoxin production and sclerotia formation among isolates  
 404 of *Aspergillus* section *Flavi* from Mississippi Delta. *European Journal of Plant*  
 405 *Pathology*, 112, 283-287.
- 406 Arrus, K., Blank, G., Abramson, D., Clear, R., & Holley, R. A. (2005). Aflatoxin  
 407 production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. *Journal of Stored Products*  
 408 *Research*, 41, 513-527.
- 409 Astoreca, A. L., Dalcero, A. M., Pinto, V. F., & Vaamonde, G. (2011). A survey on  
 410 distribution and toxigenicity of *Aspergillus* section *Flavi* in poultry feeds.  
 411 *International Journal of Food Microbiology*, 146, 38-43.
- 412 Astoreca, A., Vaamonde, G., Dalcero, A. Sonia, M., & Ramos, A. (2013) Abiotic  
 413 factors and their interactions influence on the co-production of aflatoxin B<sub>1</sub> and  
 414 cyclopiazonic acid by *Aspergillus flavus* isolated from corn. *Food Microbiology*, in  
 415 press. doi: 10.1016/j.fm.2013.07.012.
- 416 Bao, L., Trucksess, M.W., & White, K.D. (2010). Determination of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>,  
 417 G<sub>1</sub>, and G<sub>2</sub> in olive oil, peanut oil, and sesame oil. *Journal of the Association of*  
 418 *Official Agricultural Chemists International*, 93, 936-942.
- 419 Baquião, A.C., Oliveira, M.M.M., Reis, T.A., Zorzete P., Atayde, D.D., & Correa, B.  
 420 (2013a). Polyphasic approach to the identification of *Aspergillus* section *Flavi*  
 421 isolated from Brazil nuts. *Food Chemistry*, 139, 1127-1132.
- 422 Baquião, A.C., Oliveira, M.M.M., Reis, T.A., Zorzete, P., Atayde, D.D., & Correa, B.  
 423 (2013b). Monitoring and determination of fungi and mycotoxins in stored Brazil  
 424 nuts. *Journal of Food Protection*, 76, 1414-1420.
- 425 Baquião, A.C., Zorzete, P., Reis, T.A., Assunção, E., Vergueiro, S., & Correa, B.  
 426 (2012). Mycoflora and mycotoxins in field samples of Brazil nuts. *Food Control*,  
 427 28, 224-229.
- 428 Bragulat, M. R., Abarca, M. S., & Cabañes, F. J. (2001). An easy screening method for  
 429 fungi producing ochratoxin A in pure culture. *International Journal of Food*  
 430 *Microbiology*, 71, 139-144.
- 431 CAC. Codex Alimentarius Commission. (2007). Principles and guidelines for the  
 432 conduct of microbiological risk management and its annex on guidance on  
 433 microbiological risk management metrics. CAC/G 63 2007  
 434 [http://www.ilri.org/safefood/files/Codex%20principles%20microbiological%20RM](http://www.ilri.org/safefood/files/Codex%20principles%20microbiological%20RM.pdf)  
 435 [.pdf](http://www.ilri.org/safefood/files/Codex%20principles%20microbiological%20RM.pdf). Last accessed 19.08.13
- 436 Calderari, T. O., Iamanaka, B., Frisvad, J. C., Pitt, J. I., Sartori, D., & Pereira, J. L.  
 437 (2011). The biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in brazil nuts: From rainforest  
 438 to consumer. *International Journal of Food Microbiology*, 160, 267-272.
- 439 Carbone, I., & Kohn, L.M. (1999). A method for designing primer sets for speciation  
 440 studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91, 553-556.
- 441 Chang, P.K., Bennett, J.W., & Cotty, P.J. (2001). Association of aflatoxin biosynthesis  
 442 and sclerotial development in *Aspergillus parasiticus*. *Mycopathologia*, 153, 41-48.
- 443 Cotty, P. J. (1989). Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus*  
 444 strains pathogenic on cotton. *Phytopathology*, 79, 808-814.
- 445 De Mello, F. R., & Scussel, V.M. (2007). Characteristics of in-shell Brazil nuts and their  
 446 relationship to aflatoxin contamination: criteria for sorting. *Journal of Agriculture*  
 447 *and Food Chemistry*, 55, 9305-9310.

- 448 Doster, M. A., Cotty, P. J., & Michailides, T. J. (2009). Description of a distinctive  
449 aflatoxin-producing strain of *Aspergillus nomius* that produces submerged sclerotia.  
450 Mycopathologia, 168, 193-201.
- 451 Ehrlich, K.C., Kobbeman, K., Montalbano, B.G., & Cotty, P.J. (2007). Aflatoxin-  
452 producing *Aspergillus* species from Thailand. International Journal of Food  
453 Microbiology, 114, 153-159.
- 454 Freire, F.C.O., Kozakiewicz, Z., & Paterson, R.R.M. (2000). Mycoflora and mycotoxins  
455 in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. Mycopathologia, 149, 13-  
456 19.
- 457 Freitas-Silva, O., & Venancio, A. (2011). Brazil nuts: benefits and risks associated with  
458 the contamination by fungi and mycotoxins. Food Research International, 44, 1434-  
459 1440.
- 460 Giormi, P., Magan, N., Pietri, A., Bertuzzi, T., & Battilani, P. (2007). Studies on  
461 *Aspergillus* section *Flavi* isolated from maize in northern Italy. International  
462 Journal of Food Microbiology, 113, 330-338.
- 463 Glass, N.L., Donaldson, & G.C. (1995). Development of primer sets designed for use  
464 with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. Applied  
465 and Environmental Microbiology, 61, 1323-1330.
- 466 Hesseltine, C.W., Shotwell, O.T., Smith, M., Ellis, I.I., Vandegrift, F., & Shannon, G.  
467 (1970). Production of various aflatoxins by strains of the *Aspergillus flavus* series.  
468 In Proceedings of the First US-Japan Conference on Toxic Microorganisms and the  
469 US Department of the Interior, Washington, DC, USA.
- 470 Horn, B.W., Greene, R.L., Sobolev, V.S., Dorner, J.W., & Powell, J.H. (1996).  
471 Association of morphology and mycotoxin production with vegetative  
472 compatibility groups in *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, and *A. tamarii*.  
473 Mycologia, 88, 574-587.
- 474 Ito Y., Peterson, S.W., Wicklow, D.T., & Goto, T. (2001). *Aspergillus pseudotamarii*, a  
475 new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*. Mycological  
476 Research, 103, 233-239.
- 477 IUPAC. International Union of Pure and Applied Chemistry, Currie, L.A. (1999).  
478 Commission on analytical nomenclature, recommendations in evaluation of  
479 analytical methods including detection and quantification capabilities. Pure and  
480 Applied Chemistry, 67, 1699-1723.
- 481 Johnsson, P., Lindblad, M., Thim, A.M., Jonsson, N., Vargas, E.A., Medeiros, N.L.,  
482 Brabet, C., Quaresma de Araujo, & M. Olsen, M. (2008). Growth of aflatoxigenic  
483 moulds and aflatoxin formation in Brazil nuts. World Mycotoxin Journal, 1, 127-  
484 137.
- 485 Kozakiewicz, Z. (1994). Taxonomy: the key to mycotoxin identification in food and  
486 feedstuffs. Proceedings of 6<sup>th</sup> International Working Conference on Stored-product  
487 Protection. National convention centre, Canberra. Highley, E., Wright, E.J., Banks,  
488 H.J., Champ, B.R. (Eds.). CAB International, Washington, Oxford 2, 999-1006.
- 489 Kurtzman, C.P., Horn, B.W., & Hesseltine, C.W. (1987). *Aspergillus nomius*, a new  
490 aflatoxin producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*.  
491 Antonie Van Leeuwenhoek, 53, 147-158.
- 492 Lin, M.T., & Dianese, J.C. (1976). A coconut-agar medium for rapid detection of  
493 aflatoxin production by *Aspergillus* spp. Phytopathology, 66, 1466-1469.
- 494 Novas, M. V., & Cabral, D. (2002). Association of mycotoxin and sclerotia production  
495 with compatibility groups in *Aspergillus flavus* from peanut in Argentina. Plant  
496 Disease, 86, 215-219.

- 497 Olsen, M., Johnsson, P., Möller, T., Paladino, R., & Lindblad, M. (2008). *Aspergillus*  
 498 *nomius*, an important aflatoxin producer in Brazil nuts? *World Mycotoxin Journal*  
 499 1, 123-126.
- 500 Pacheco, A.M., Lucas, A., Parente, R., & Pacheco, N. (2010). Association between  
 501 aflatoxin and aflatoxigenic fungi in Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.).  
 502 *Brazilian Journal of Food Science and Technology*, 30, 1-6.
- 503 Pacheco, A. M., & Scussel, V. M. (2006). *Castanha-do-Brasil: da floresta tropical ao*  
 504 *consumidor*. Florianópolis: Editorgraf, 176 p.
- 505 Peterson, S.W., Horn BW, Ito Y, & Goto T. (2000). Genetic variation and aflatoxin  
 506 production in *Aspergillus tamarii* and *A. caelatus*. In: Samson R.A., Pitt J.I., eds.  
 507 *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus*  
 508 *classification*. Australia: Harwood Academic Publishers, p 447-458
- 509 Peterson, S.W., Ito, Y., Horn, B.W., & Goto, T. (2001). *Aspergillus bombycis*, a new  
 510 aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*.  
 511 *Mycologia*, 93, 689-703.
- 512 Pitt, J.I., Glenn, D.R., & Hocking, A.D. (1983). An improved medium for the detection  
 513 of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Food Protection*, 56,  
 514 265-269.
- 515 Pitt, J.I., & Hocking, A.D. (2009). *Fungi and Food Spoilage*. Blackie Academic and  
 516 Professional, London. 519 pp.
- 517 Pitt, J.I, Taniwak, M.H., & Cole, M.B. (2013). Mycotoxin production in major crops as  
 518 influenced by growing, harvesting, storage and processing, with emphasis on the  
 519 achievement of Food Safety Objectives. *Food Control*, 32, 205-215.
- 520 Raper, K.B., & Fennell, D.I. (1965). *The Genus Aspergillus*. Williams and Wilkins,  
 521 Baltimore, MD. 686 pp.
- 522 Razzaghi-Abyaneh, M., Shams-Ghahfarokhi, M., Allameh, A., Kazeroon-Shiri, A.,  
 523 Ranjbar-Bahadori, S., Mirzahoseini, H., & Rezaee, M.B. (2006). A survey on  
 524 distribution of *Aspergillus* section *Flavi* in corn field soils in Iran: population  
 525 patterns based on aflatoxins, cyclopiazonic acid and sclerotia production.  
 526 *Mycopathologia*, 161, 183-192.
- 527 Reis, T. A., Oliveira, T.D., Baquião, A. C., Gonçalves, S. S., Zorzete, P., & Corrêa, B.  
 528 (2012). Mycobiota and mycotoxins in Brazil nut samples from different states of  
 529 the Brazilian Amazon region. *International Journal of Food Microbiology*, 159, 61-  
 530 68.
- 531 Rodrigues, P., Santos, C., Venâncio, A., & Lima, N. (2011). Species identification of  
 532 *Aspergillus* section *Flavi* isolates from Portuguese almonds using phenotypic,  
 533 including MALDI-TOF ICMS, and molecular approaches. *Journal of Applied*  
 534 *Microbiology*, 111, 877-892.
- 535 Seidler, N.W., Jana I, Vegh, M., & Martonosi, A. (1989). Cyclopiazonic acid is a  
 536 specific inhibitor of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Journal of Biology*  
 537 *Chemistry*, 264, 17816-17823.
- 538 Silvertown, J. (2004). Sustainability in a nutshell - Trends in ecology and evolution  
 539 (Personal edition), 19, 276-278
- 540 Urano, T., Trucksess, M.W., & Matusik, J. (1992). Liquid chromatographic  
 541 determination of cyclopiazonic acid in corn and peanuts. *Journal of Association of*  
 542 *Official Analytical Chemists International*, 75, 319-322.
- 543 USDA. United States Department of Agriculture. (2012). What is organic?  
 544 <http://www.ams.usda.gov> Last Modified Date:10/17/2012.
- 545 Varga, J., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2011). Two new aflatoxin producing species,  
 546 and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. In: *Studies in Mycology*, 69, 57-80.

- 547 Varga, J., Juhász, A., Kevei, F., & Kozakiewicz, Z. (2004). Molecular diversity of  
548 agriculturally important *Aspergillus* species. *European Journal of Plant*  
549 *Pathology*, 110, 627-640.
- 550 Wadt, L.H.O., Kainer, K.A., & Gomes-Silva, D.A.P. (2005). Population structure and  
551 nut yield of a *Bertholletia excelsa* stand in South Western Amazonia. *Forest*  
552 *Ecology and Management*, 211, 371-384.
- 553 White, T.J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing  
554 of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H.,  
555 Sninsky, J.J., & White, T.J. (Eds.), *PCR Protocols a Guide to Methods and*  
556 *Applications*. Academic Press, New York, pp. 315-322.
- 557 Willer, H., & Kilcher, L. (2011). *The World of Organic Agriculture: Statistics and*  
558 *Emerging Trends*. Bonn: International Federation of Organic Agriculture  
559 *Movements (IFOAM)*, Frick, Switzerland: Research Institute of Organic  
560 *Agriculture (FiBL)*.
- 561

Table 1

Table 1

*Aspergillus* Section *Flavi* isolated from Brazil nut samples - classification, aflatoxins, CPA, sclerotia, AFPA, and conidia.

Isolate code	Classification	Aflatoxin (ng/g)					CPA (ng/g)	Sclerotia	AFPA	Conidia
		AFB <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	AFG <sub>1</sub>	AFG <sub>2</sub>	AF total				
1	<i>A. flavus</i>	ND <sup>a</sup>	ND	ND	ND	0	ND	NP <sup>b</sup>	orange	smooth
2	<i>A. flavus</i>	1.39	ND	ND	ND	1.39	4,786.18	P <sup>c</sup>	orange	smooth
3	<i>A. flavus</i>	ND	ND	ND	ND	0	1,764.37	NP	orange	smooth
4	<i>A. flavus</i>	ND	ND	ND	ND	0	2,203.90	NP	orange	smooth
5	<i>A. flavus</i>	0.78	ND	ND	ND	0.78	5,912.67	NP	orange	smooth
6	<i>A. flavus</i>	ND	ND	ND	ND	0	ND	NP	orange	smooth
7	<i>A. flavus</i>	ND	ND	ND	ND	0	4,232.25	NP	orange	smooth
8	<i>A. flavus</i>	14.29	ND	ND	ND	14.29	2,578.86	NP	orange	smooth
9	<i>A. flavus</i>	ND	ND	ND	ND	0	3,258.85	P	orange	smooth
10	<i>A. flavus</i>	1.46	1.83	ND	ND	3.28	745.87	NP	orange	smooth
11	<i>A. flavus</i>	ND	ND	ND	ND	0	ND	NP	orange	smooth
12	<i>A. flavus</i>	0.20	ND	ND	ND	0.20	3,743.26	NP	orange	smooth
13	<i>A. caelatus</i>	ND	ND	ND	ND	0	ND	NP	cream	rough
14	<i>A. flavus</i>	1.35	ND	ND	ND	1.35	3,162.12	NP	orange	smooth
15	<i>A. flavus</i>	3.28	3.66	ND	ND	3.28	4,167.93	NP	orange	smooth
16	<i>A. flavus</i>	81.48	ND	ND	ND	85.15	ND	NP	orange	smooth
17	<i>A. flavus</i>	ND	ND	ND	ND	0	ND	NP	orange	smooth
18	<i>A. caelatus</i>	ND	ND	ND	ND	0	ND	NP	cream	rough
19	<i>A. flavus</i>	61.22	ND	ND	ND	61.22	ND	P	orange	smooth
20	<i>A. tamarii</i>	ND	ND	ND	ND	0	ND	NP	brown	rough
21	<i>A. caelatus</i>	ND	ND	ND	ND	0	ND	NP	cream	rough
22	<i>A. nomius</i>	132.65	ND	234.54	ND	0	ND	P	cream	rough
23	<i>A. flavus</i>	1.66	ND	ND	ND	1.66	534.98	NP	orange	smooth
24	<i>A. flavus</i>	6.11	1.71	ND	ND	7.82	ND	NP	orange	smooth
25	<i>A. flavus</i>	14.43	ND	ND	ND	14.43	ND	NP	orange	smooth
26	<i>A. flavus</i>	5.89	ND	ND	ND	5.89	3,411.54	NP	orange	smooth
27	<i>A. flavus</i>	158.29	ND	ND	ND	158.29	ND	NP	orange	smooth
28	<i>A. flavus</i>	ND	ND	ND	ND	0	ND	NP	orange	smooth
29	<i>A. flavus</i>	ND	ND	ND	ND	0	ND	NP	orange	smooth
30	<i>A. flavus</i>	ND	ND	ND	ND	0	6,560.24	NP	orange	smooth
31	<i>A. flavus</i>	368.95	4.10	ND	ND	373.05	3,800.21	P	orange	smooth
32	<i>A. flavus</i>	ND	ND	ND	ND	0	ND	NP	orange	smooth
33	<i>A. caelatus</i>	ND	ND	ND	ND	0	ND	NP	cream	rough
34	<i>A. nomius</i>	79.25	ND	664.53	0.27	744.06	ND	NP	cream	rough
35	<i>A. flavus</i>	479.11	14.36	ND	ND	493.47	5,560.21	NP	orange	smooth
36	<i>A. flavus</i>	ND	ND	ND	ND	0	2,814.74	NP	orange	smooth
37	<i>A. flavus</i>	41.80	0.83	ND	ND	42.63	2,211.77	NP	orange	smooth
38	<i>A. flavus</i>	19.93	ND	ND	ND	19.93	2,046.40	NP	orange	smooth
39	<i>A. nomius</i>	1,167.03	19.69	3,927.65	1.14	5,115.50	ND	NP	cream	rough
40	<i>A. flavus</i>	53.57	0.72	ND	ND	54.29	5,181.16	NP	orange	smooth
41	<i>A. nomius</i>	903.41	22.57	8,337.03	4.92	9,267.94	ND	NP	cream	rough
42	<i>A. caelatus</i>	ND	ND	ND	ND	0	ND	NP	cream	rough
43	<i>A. flavus</i>	ND	ND	ND	ND	0	3,943.42	NP	orange	smooth
44	<i>A. nomius</i>	23.54	1.85	108.93	0.15	134.46	ND	NP	cream	rough
45	<i>A. nomius</i>	2.02	ND	11.12	ND	13.14	ND	NP	cream	rough
46	<i>A. flavus</i>	52.43	1.15	ND	ND	53.57	5,754.07	NP	orange	smooth
47	<i>A. flavus</i>	3.68	ND	ND	ND	3.68	7,627.48	NP	orange	smooth

Limits of detection were 0.5 ng/g for each aflatoxin, and 50 ng/g for CPA. Limits of quantification were 0.75ng/g for each aflatoxins and 100 ng/g for CPA.

<sup>a</sup> ND: not detected.

<sup>b</sup> NP: not produced.

<sup>c</sup> P: produced.