



**UNICAMP**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**THAIANE ORTOLAN CALDERARI**

**BIODIVERSIDADE DE FUNGOS AFLATOXIGÊNICOS E  
AFLATOXINAS EM CASTANHA DO BRASIL**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA À  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS DA  
UNICAMP PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE  
EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS.**

**Prof. Dr. José Luiz Pereira**

**ORIENTADOR**

**Dra. Marta Hiromi Taniwaki**

**CO-ORIENTADORA**

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida por Thaianne Ortolan Calderari, aprovada pela comissão julgadora em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ e orientada pelo Prof. Dr. José Luiz Pereira.

---

**Assinatura do Orientador**

**CAMPINAS, 2011**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR

CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE

ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

Calderari, Thaianne Ortolan, 1986 - C127b  
Biodiversidade de fungos aflatoxigênicos e aflatoxinas em  
castanha do Brasil / Thaianne Ortolan Calderari. --  
Campinas, SP: [s.n], 2011.

Orientador: José Luiz Pereira.

Coorientador: Marta Hiromi Taniwaki.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de  
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Aflatoxinas. 2. Castanha do brasil. 3.  
*Aspergillus* section *Flavi*. 4. *Aspergillus nomius*. 5.  
*Aspergillus flavus*. I. Pereira, José Luiz. II. Taniwaki,  
Marta Hiromi. III. Universidade Estadual de  
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV.  
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Biodiversity of aflatoxigenic fungi and aflatoxins in Brazil nuts

Palavras-chave em inglês (Keywords):

Aflatoxin

Brazil nuts

*Aspergillus* section *Flavi*

*Aspergillus nomius*

*Aspergillus flavus*

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

José Luiz Pereira [Orientador]

Dirce Yorika Kabuki

Maria Antonia Calori Domingues

Data da defesa: 19/12/2011

Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos

**Campinas, 19 de dezembro de 2011**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**JOSÉ LUIZ PEREIRA**

TITULAR

---

**DIRCE YORIKA KABUKI**

TITULAR

---

**MARIA ANTÔNIA CALORI DOMINGUES**

TITULAR

---

**BEATRIZ THIE IAMANAKA**

SUPLENTE

---

**MARTA CRISTINA TEIXEIRA DUARTE**

SUPLENTE

Agradeço a Deus por me dar luz e dedico este trabalho aos meus pais, exemplos de vida e perseverança, por sempre estarem presentes e me darem forças para vencer.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. José Luiz Pereira, pela oportunidade e orientação.

À Dra. Marta Taniwaki, por me oferecer a oportunidade de trabalhar em seu laboratório e confiar na realização do meu trabalho.

À Dra. Beatriz Thie Iamanaka, pelas orientações, paciência nos ensinamentos, e principalmente pela confiança e amizade.

Ao Programa de pós-graduação de Ciência dos alimentos da Universidade Estadual de Campinas pela oportunidade de ingresso no curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

À Dra. Marina Venturini Copetti, Dra. Maristela Nascimento, aos estudantes Felipe Nakano, Carolina Albers e Daniel Ponciano Lemes, pela amizade, apoio e ajuda na realização dos experimentos.

Aos funcionários e colegas dos laboratórios no setor de Microbiologia do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) pelo apoio técnico.

Agradecimentos em especial aos meus pais José Roberto Calderari e Maria Regina Ortolan Calderari por serem exemplos de honestidade e garra, pelas oportunidades oferecidas e pelo amor a mim dedicado.

Às amigas Luciana Mecatti Elias e Larissa de Souza Ferranti, aos familiares Thalita Calderari, Cristina Calderari e Evandro Calderari e ao namorado Thiago Pivetta pelas conversas e por sempre estarem ao meu lado me apoiando e dando forças para chegar até aqui.

A todas as pessoas que participaram, contribuindo para a realização deste trabalho, direta ou indiretamente, os meus agradecimentos.

“Temos de nos tornar a mudança que  
queremos ver no mundo.”  
(Mahatma Gandhi)

## RESUMO

A castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*) é uma das mais importantes espécies de exploração extrativista da floresta Amazônica, sendo exportada para diversos países devido ao seu alto valor nutritivo. No entanto, os baixos níveis tecnológicos característicos de sua cadeia produtiva, considerada ainda extrativista e as condições inadequadas de manejo da matéria prima, favorecem o aparecimento de contaminação por fungos produtores de aflatoxinas, compostos tóxicos considerados cancerígenos para humanos. Este problema é um entrave para a comercialização do produto, principalmente no mercado externo, dado ao rigoroso controle de países europeus e Estados Unidos em relação aos níveis de toxinas presentes nos alimentos. Nestas condições, o presente trabalho teve por objetivo investigar a incidência de fungos em castanhas do Brasil e avaliar o potencial toxigênico dos isolados *Aspergillus* section *flavi* para a produção de aflatoxinas, bem como analisar a presença de aflatoxinas nesta matriz. Um total de 143 amostras provenientes dos Estados do Pará, Amazonas e São Paulo em diferentes etapas da cadeia produtiva da castanha foi analisado. A técnica utilizada para análise da infecção fúngica foi o plaqueamento direto em meio Dicloran 18% Glicerol. Os resultados foram expressos em porcentagem de infecção fúngica. Os isolados suspeitos foram purificados em meio Czapek extrato de levedura ágar e incubados a 25°C/7 dias em diferentes temperaturas para a identificação das espécies. Para a análise do potencial toxigênico de cada isolado da seção *flavi* foi utilizada a técnica do ágar plug. Para a análise de aflatoxinas foi utilizada coluna de imunoafinidade para extração e limpeza das amostras e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e detector de fluorescência acoplado ao sistema de derivatização Kobracell para detecção e quantificação das aflatoxinas. Dentre o total de amostras coletadas, aquelas provenientes das florestas foram as que apresentaram maior valor médio de atividade de água, assim como maior porcentagem de infecção fúngica quantificada e biodiversidade de espécies.

Considerando todas as amostras avaliadas, foram no total 13.421 isolados de fungos filamentosos, sendo que as espécies mais incidentes foram *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nomius*, *Penicillium citrinum*, *Aspergillus tamarii*, *Syncephalastrum racemosum* e *Penicillium sp.* Dentre as espécies encontradas, 450 isolados de *Aspergillus nomius* e 9 de *Aspergillus parasiticus* foram identificados e 100% apresentaram capacidade de produção de aflatoxinas AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>. Dos de 703 isolados de *Aspergillus flavus*, 63,5% apresentaram a capacidade de produzir aflatoxinas AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub>. A média de contaminação por aflatoxinas totais obtida foi de 7,17 µg/kg (ND-104,2 µg/kg), 1,13µg/kg (ND-7,44µg/kg) e 0,47 µg/kg (ND-0,2 µg/kg) para as amostras dos Estados do Pará, Amazonas e de São Paulo, respectivamente. Das 143 amostras coletadas, apenas 5 amostras excederam o limite máximo de aflatoxinas totais estabelecido pela União Européia e pela ANVISA (10,0µg/kg para castanhas do Brasil sem casca destinadas ao consumo direto para humanos).

Palavras chave: aflatoxinas, castanha do Brasil, *Aspergillus section flavi*, *Aspergillus nomius*, *Aspergillus flavus*.

## ABSTRACT

The Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) is one of the most important species extracted from the Amazon forest, and is exported to several countries due to its high nutritional value. However, the low technological level of its productive chain and inadequate raw material handling favour contamination points for aflatoxin fungi producers aflatoxins. The presence of aflatoxins in Brazil nuts has been a barrier for its marketing, mainly for the export market, due to rigorous control of European countries and the United States. Therefore, the present work had the objective of investigating the incidence of fungi in Brazil nuts and evaluate the toxigenic potential of *Aspergillus* section *flavi* isolates to produce aflatoxins, as well as analyzing the presence of aflatoxins in this product. A total of 143 samples from three different states, at different stages of the Brazil nut chain was analyzed. The technique used for fungi infection analyzed was direct plating in DG18. The results were expressed in percentage of fungal infection. The suspected isolates were purified on Czapek yeast extract agar (CYA) and incubated at different temperature for species identification. For toxin production analysis of each isolatec *Aspergillus* section *flavi* the agar plug technique was used. For aflatoxin analysis an immunoafinity column was used for extraction and cleaning of the sample, high performance liquid for aflatoxin detection and quantification in Brazil nuts, chromatography (HPLC) with a fluorescence detector was used, coupled with the Kobracell derivatization system. Among the analyzed samples, the ones collected directly from the forests had the highest water activity, the highest fungal infection and greatest biodiversity of species. A total of 13,421 filamentous fungi were quantificated from all the samples with the most common isolated species were: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nomius*, *Penicillium citrinum*, *Aspergillus tamarii*, *Syncephalastrum racemosum* e *Penicillium spp.* All the 450 strains of *Aspergillus nomius* and 9 strains of *Aspergillus parasiticus*, showed 100% capacity of aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> production. Out of 703 species of *Aspergillus flavus* isolated, 63.5%

showed capacity of aflatoxin B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> production. The average of total aflatoxin contamination was: 7.17µg/kg (ND-104.2 µg/kg), 1.13µg/kg (ND-7.44µg/kg) and 0.47 µg/kg (ND-0.2 µg/kg) for samples from Pará, Amazon and São Paulo, respectively. Out of 143 analyzed samples, only 5 samples exceeded the maximum level for total aflatoxins established by the European Union and ANVISA of 10 µg/kg for shelled Brazil nuts intended for direct human consumption.

Key words: aflatoxins, Brazil nuts, *Aspergillus section flavi*, *Aspergillus nomius*, *Aspergillus flavus*.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	02
2.1 A castanha do Brasil.....	03
2.1.1 Produtos derivados .....	08
2.1.2 Localização geográfica .....	10
2.1.3 Importância Econômica .....	12
2.1.4 Composição nutricional .....	16
2.2. Cadeia produtiva da castanha do Brasil.....	21
2.2.1 Etapas de pré-colheita .....	21
2.2.2 Etapas de colheita e pós colheita .....	23
2.2.3 Etapas na unidade de beneficiamento .....	28
2.3 Micologia dos alimentos .....	35
2.4 Micotoxinas .....	37
2.4.1 Características gerais das aflatoxinas .....	38
2.4.2 Aspectos toxicocinéticos e toxicodinâmicos .....	40
2.5 Fatores que favorecem o crescimento fúngico e a produção de aflatoxinas .....	43
2.5.1 Umidade .....	43

2.5.2 Atividade de água .....	44
2.5.3 Potencial hidrogeniônico (pH) .....	45
2.5.4 Composição nutricional .....	45
2.5.5 Temperatura .....	46
2.5.6 Tensão de gás .....	47
2.6 Prevenção, inibição e detoxificação .....	47
2.7 Ocorrência de fungos e aflatoxinas na castanha do Brasil.....	50
2.8 Legislação sobre a qualidade da castanha do Brasil.....	55
3. OBJETIVOS .....	57
3.1 Objetivos gerais .....	57
3.2 Objetivos específicos .....	57
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	58
4.1 Coleta de amostras de castanha do Brasil.....	58
4.2 Medição da atividade de água .....	61
4.3 Plaqueamento das castanhas .....	61
4.4 Isolamento dos fungos .....	61
4.5 Avaliação do potencial de produção de aflatoxinas pelos fungos <i>Aspergillus section flavi</i> isolados.....	62

4.6 Análise de aflatoxinas nas amêndoas de castanha do Brasil.....	63
4.6.1 Preparo de amostras .....	63
4.6.2 Condições cromatográficas.....	64
4.6.3 Otimização e quantificação de aflatoxinas .....	64
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	66
5.1 Amostras de castanha do Brasil.....	66
5.2 Valores de atividade de água .....	67
5.2.1 Estado do Pará .....	67
5.2.2 Estado do Amazonas .....	68
5.2.3 Estado de São Paulo .....	69
5.3 Análise da micobiota da castanha do Brasil.....	71
5.3.1 Amostras coletadas no Estado do Pará .....	73
5.3.2 Amostras coletadas no Estado do Amazonas .....	86
5.3.3 Amostras coletadas no Estado de São Paulo .....	97
5.4 Avaliação do potencial de produção de aflatoxinas pelos fungos <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> isolados das amêndoas de castanhas .....	96
5.4.1 Amêndoas de amostras coletadas no Estado do Pará .....	104
5.4.2 Amêndoas de amostras coletadas no Estado do Amazonas .....	105

5.4.3 Amêndoas de amostras coletadas no Estado de São Paulo .....	106
5.5 Análise de aflatoxinas em amêndoas de castanha do Brasil.....	107
5.5.1 Otimização da metodologia para análise de aflatoxinas .....	107
5.5.2 Ocorrência de aflatoxinas totais nas amostras coletadas no Estado do Pará .....	110
5.5.3 Ocorrência de aflatoxinas totais nas amostras coletadas no Estado do Amazonas .....	111
5.5.4 Ocorrência de aflatoxinas totais nas amostras coletadas no Estado de São Paulo .....	113
6. CONCLUSÃO .....	116
7. BIBLIOGRAFIA .....	118
8. ANEXOS .....	130

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	<i>Bertholletia excelsa</i> .....	04
Figura 2.	Ouriços contendo as sementes .....	05
Figura 3.	Extrativismo comunitário .....	07
Figura 4.	Ouriços utilizados no artesanato .....	10
Figura 5.	Uso da castanha em confeitarias .....	10
Figura 6.	Óleo de castanha .....	10
Figura 7.	Regiões brasileiras produtoras de castanha do Brasil.....	11
Figura 8.	Mapeamento das áreas que serão exploradas .....	22
Figura 9.	Corte dos cipós .....	22
Figura 10.	Ouriços empilhados próximos às castanheiras .....	23
Figura 11.	Coleta dos ouriços .....	24
Figura 12.	Quebra dos ouriços .....	25
Figura 13.	Lavagem das castanhas .....	26
Figura 14.	Transporte das castanhas para as unidades de produção .....	27
Figura 15.	Secagem das castanhas .....	27
Figura 16.	Local de armazenamento das castanhas .....	28
Figura 17.	Seleção das castanhas .....	29

Figura 18.	Quebra das castanhas na usina de beneficiamento .....	30
Figura 19.	Embalagem das castanhas sem casca .....	33
Figura 20.	Embalagem das castanhas com casca .....	33
Figura 21.	Estrutura química das aflatoxinas B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> e G <sub>2</sub> .....	40
Figura 22.	Regiões de coleta da castanha do Brasil (Amazonas, Pará e São Paulo). .....	58
Figura 23.	Regiões de coleta de amostras de castanha do Brasil no estado do Pará, em destaque as regiões de floresta, processadora e mercado .....	59
Figura 24.	Regiões de coleta de amostras de castanha do Brasil no estado do Amazonas, em destaque as regiões de floresta, processadora e mercado .....	60
Figura 25.	Regiões de coleta de amostras de castanha do Brasil no estado de São Paulo, em destaque a região de coleta em mercado .....	60
Figura 26.	Plaqueamento da castanha do Brasil no meio DG18 .....	61
Figura 27.	Plaqueamento das amostras de amêndoas (A e B) e cascas (C e D) de castanha do Brasil em meio DG18 após 5 dias a 25°C .....	71
Figura 28.	Espécies de fungos filamentosos <i>Aspergillus</i> section <i>flavi</i> isolados. Em A, B e C: <i>Aspergillus flavus</i> com esclerócios; D: <i>Aspergillus flavus</i> sem esclerócios; E: <i>Aspergillus theobromus</i> ; F: <i>Aspergillus tamaritii</i> ; G, H e I: <i>Aspergillus nomius</i> .....	72
Figura 29.	A: Crescimento de <i>Aspergillus</i> nos meios: CYA e MEA em diferentes temperaturas, B: medição do tamanho das colônias e C: reverso da colônia no meio AFPA .....	73

Figura 30.	Micobiota (em porcentagem de infecção) de amêndoas das amostras de castanha do Brasil coletadas na floresta do Pará .....	74
Figura 31.	Micobiota (em porcentagem de infecção) de cascas das amostras de castanha do Brasil coletadas na floresta do Pará .....	75
Figura 32.	Porcentagem média de infecção das espécies de fungos isoladas de amêndoas e cascas das amostras de castanha do Brasil coletadas de floresta do Pará .....	76
Figura 33.	Micobiota (em porcentagem de infecção) de ouriços das amostras de castanha do Brasil coletadas na floresta do Pará .....	77
Figura 34.	Micobiota (em porcentagem de infecção) de amêndoas das amostras de castanha do Brasil coletadas nas processadoras do Pará .....	78
Figura 35.	Micobiota (em porcentagem de infecção) de cascas das amostras de castanha do Brasil coletadas nas processadoras do Pará .....	80
Figura 36.	Porcentagem média de infecção das espécies de fungos isoladas de amêndoas e cascas das amostras de castanha do Brasil coletadas de processadoras do Estado do Pará .....	81
Figura 37.	Micobiota (em porcentagem de infecção) de amêndoas das amostras de castanha do Brasil coletadas nos mercados do Pará .....	82
Figura 38.	Micobiota (em porcentagem de infecção) de cascas das amostras de castanha do Brasil coletadas nos mercados do Pará .....	83
Figura 39.	Porcentagem média de infecção das espécies de fungos isoladas de amêndoas e cascas das amostras	

	de castanha do Brasil coletadas nos mercados do Pará..	84
Figura 40.	Número de isolados das amostras (cascas e amêndoas) de castanha do Brasil coletadas no estado do Pará , em destaque as espécies pertencentes ao grupo <i>Aspergillus</i> section Flavi .....	85
Figura 41.	Micobiota (em porcentagem de infecção) de amêndoas das amostras de castanha do Brasil coletadas na floresta do Amazonas .....	87
Figura 42.	Micobiota (em porcentagem de infecção) de cascas das amostras de castanha do Brasil coletadas na floresta do Amazonas .....	88
Figura 43.	Porcentagem média de infecção das espécies de fungos isoladas de amêndoas e cascas das amostras de castanha do Brasil coletadas da floresta do Amazonas .....	89
Figura 44.	Micobiota (em porcentagem de infecção) de amêndoas das amostras de castanha do Brasil coletadas nas processadoras do Amazonas .....	90
Figura 45.	Micobiota (em porcentagem de infecção) de cascas das amostras de castanha do Brasil coletadas nas processadoras do Amazonas .....	91
Figura 46.	Porcentagem média de infecção das espécies de fungos isoladas de amêndoas e cascas das amostras de castanha do Brasil coletadas das processadoras do Amazonas .....	92
Figura 47.	Micobiota (em porcentagem de infecção) de amêndoas das amostras de castanha do Brasil coletadas nos mercados no Estado do Amazonas .....	93
Figura 48.	Micobiota (em porcentagem de infecção) de cascas das amostras de castanha do Brasil coletadas nos mercados do Amazonas .....	94

Figura 49.	Porcentagem média de infecção das espécies de fungos isoladas de amêndoas e cascas das amostras de castanha do Brasil coletadas dos mercados do Estado do Amazonas.....	95
Figura 50.	Número de isolados das amostras (cascas e amêndoas) de castanha do Brasil coletadas no estado do Amazonas , em destaque as espécies pertencentes ao grupo <i>Aspergillus</i> section Flavi .....	96
Figura 51.	Micobiota (em porcentagem de infecção) de amêndoas das amostras de castanha do Brasil coletadas nos mercados de São Paulo .....	98
Figura 52.	Micobiota (em porcentagem de infecção) de cascas das amostras de castanha do Brasil coletadas nos mercados de São Paulo .....	99
Figura 53.	Porcentagem média de infecção das espécies de fungos isoladas de amêndoas e cascas das amostras de castanha do Brasil coletadas nos mercados de São Paulo .....	99
Figura 54.	Número de isolados das amostras (cascas e amêndoas) de castanha do Brasil coletadas no estado de São Paulo, em destaque as espécies pertencentes ao grupo <i>Aspergillus</i> section Flavi .....	100
Figura 55.	<i>Aspergillus nomius</i> em placa de CYA 25°C (à esquerda) e em placa de YESA 25°C (à direita).....	103
Figura 56.	Produção de aflatoxinas do grupo B e G por isolados de <i>A. nomius</i> .....	104
Figura 57.	Curva padrão de aflatoxina B <sub>1</sub> .....	109
Figura 58.	Curva padrão de aflatoxina B <sub>2</sub> .....	109

Figura 59.	Curva padrão de aflatoxina G <sub>1</sub> .....	109
Figura 60.	Curva padrão de aflatoxina G <sub>2</sub> .....	110
Figura 61.	Valores médios de aflatoxinas totais obtidos no total de amostras de castanha do Brasil analisadas .....	115

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Descrição e preço da castanha do Brasil.....	16
Tabela 2.	Informações nutricionais dos componentes presentes na castanha do Brasil.....	20
Tabela 3.	Valores de temperatura favoráveis para o desenvolvimento de determinadas espécies .....	46
Tabela 4.	Origem e total de amostras de castanha do Brasil coletadas.....	62
Tabela 5.	Atividade de água das amostras de castanha do Brasil (amêndoas e cascas), em diferentes etapas da cadeia produtiva no Estado do Pará.....	67
Tabela 6.	Valores de atividade de água das amostras coletadas em diferentes etapas nas processadoras do estado do Pará.....	68
Tabela 7.	Atividade de água das amostras de castanha do Brasil (amêndoa e casca), em diferentes etapas da cadeia produtiva no Estado do Amazonas.....	69
Tabela 8.	Atividade de água das amostras de castanha do Brasil (amêndoa e casca), nos mercados no Estado de São Paulo .....	70
Tabela 9.	Valores de atividade de água e média de infecção fúngica (%) amêndoas das das amostras de castanha do Brasil coletadas em diferentes etapas de processamento .....	79
Tabela 10.	Relação dos valores de atividade de água e porcentagem média de infecção por fungos nas amostras do Estado do Pará .....	86
Tabela 11.	Relação de atividade de água com a porcentagem média de infecção por fungos nas amostras do Estado do	

	Amazonas.....	97
Tabela 12.	Relação de atividade de água com a porcentagem média de infecção por fungos nas amostras de mercados de São Paulo.....	101
Tabela 13.	Número de isolados nas diferentes etapas da cadeia produtiva nos Estados do Pará, Amazonas e São Paulo ...	102
Tabela 14.	Relação das espécies isoladas em diferentes etapas da cadeia produtiva no Pará e sua capacidade de produção de aflatoxinas.....	104
Tabela 15.	Relação das espécies isoladas em diferentes etapas da cadeia produtiva no Amazonas e sua capacidade de produção de aflatoxinas.....	105
Tabela 16.	Relação das espécies isoladas em São Paulo e sua capacidade de produção de aflatoxinas.....	106
Tabela 17.	Limite de detecção e quantificação das aflatoxinas B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> e G <sub>2</sub> .....	100
Tabela 18.	Otimização da metodologia de detecção e quantificação de aflatoxinas em castanha do Brasil.....	108
Tabela 19.	Relação da atividade de água e aflatoxinas totais em diferentes etapas da cadeia produtiva de amostras de castanhas coletadas no Pará.....	110
Tabela 20.	Relação da atividade de água e aflatoxinas totais em diferentes etapas da cadeia produtiva de amostras de castanhas coletadas no Amazonas.....	112
Tabela 21.	Relação da atividade de água e aflatoxinas totais em diferentes etapas da cadeia produtiva de amostras de castanhas coletadas em São Paulo.....	113

## 1. INTRODUÇÃO

A castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*) é o principal produto extrativista não madeireiro da floresta amazônica e está ligado a cultura das populações tradicionais na qual seus produtos e subprodutos são utilizados como fonte de alimentação e renda há várias gerações. Existe no país cerca de 778.150 castanheiras, distribuídas em 14 milhões de hectares. Sua cultura é caracterizada pelo extrativismo comunitário, atividade de simples coleta de um recurso vegetal, cujas práticas de cultivo e beneficiamento não ocorrem (TAVARES et al., 2010).

De acordo com levantamento do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a safra brasileira de 2007 alcançou 30.406 toneladas. Essa produção gerou no mesmo período receita bruta de mais de 12 milhões de reais para o Estado do Acre (KERN; GONÇALVES, 2008). Em 2008 teve uma pequena queda, totalizando em 29.500 toneladas. O Estado do Acre contribuiu com a maior parcela da produção, 10.378 toneladas, seguido pelo Amazonas com 8.871, o Pará com 7.639, e Rondônia 2.165 toneladas (SOBER, 2010). Segundo dados da FAO (2010), em 2008, a Bolívia foi responsável por cerca de 65% das exportações seguidas do Brasil, com 25%, e Peru com cerca de 10%. Desta forma, a castanha do Brasil é um produto de elevada importância para a economia da região Amazônica brasileira sendo, em alguns destes, o principal produto extrativista de exportação (CONAB, 2008).

A amêndoa da castanha cuja gordura é do tipo saturada, de baixo colesterol, possui sabor e aroma agradáveis, é cada vez mais conhecida pelo seu alto valor nutritivo, pois é rica em vitaminas A, B1, B2 e C, cálcio, fósforo, magnésio, potássio, selênio e cobre. A amêndoa da castanha é considerada fonte de lipídios, proteínas, carboidratos e fibras, portanto o valor energético é bastante elevado (MOODLEY et al., 2007; TONINI et al., 2008).

Por ser um produto extrativista, a produção de castanha do Brasil é considerada orgânica e sua extração ambientalmente correta, uma vez que não

são utilizados defensivos químicos para controle de pragas, plantas daninhas ou adubação, reduzindo os perigos químicos comuns aos produtos cultivados. No entanto, os baixos níveis tecnológicos característicos de sua cadeia produtiva bem como as condições inadequadas de manejo da matéria prima favorecem a constituição de pontos de contaminação com conseqüente risco à saúde do consumidor e perdas econômicas comuns em todas as etapas.

Dentre os principais problemas identificados na produção da castanha do Brasil está a frequente contaminação por aflatoxinas. Este problema tem se constituído um forte entrave para comercialização do produto, principalmente no mercado externo, devido ao rigoroso controle dos níveis de toxinas presentes nos alimentos pelos países europeus e Estados Unidos.

Em 2010 a “European Comission” (EC) por meio da Diretiva 165/2010 estabeleceu limites máximos para aflatoxinas, sendo os limites para as castanhas que são submetidas a processo de triagem ou tratamento físico antes do consumo humano  $8\mu\text{g}/\text{kg}$  para  $\text{AFB}_1$  e  $15\mu\text{g}/\text{kg}$  para as aflatoxinas totais; e para castanhas destinadas diretamente ao consumo humano os limites foram de  $5,0\mu\text{g}/\text{kg}$   $\text{AFB}_1$  e  $10,0\mu\text{g}/\text{kg}$  AFs totais.

Esses limites restringiram as exportações desse produto para a União Européia (EU), com a devolução de lotes contaminados. Nos últimos anos cerca de 10% da castanha do Brasil exportada para o mercado Europeu, foi devolvida aos portos de origem, devido ao elevado índice de contaminação por aflatoxinas. Ferreira (2010), afirma que barreiras sanitárias impostas por países europeus têm dificultado as exportações brasileiras, especialmente de castanha com casca que não passam por etapas de processamento.

A contaminação dos produtos consumidos no Brasil traz uma grande preocupação com relação à segurança alimentar e a saúde do consumidor. Constituindo um grande risco para a saúde da população brasileira que consome a castanha e seus produtos derivados.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 A castanha do Brasil

A região amazônica é dotada de uma riqueza incalculável de frutos com elevados valores nutritivos e importância econômica, que reivindicam a pesquisa tecnológica, de modo a transformá-los em produtos estáveis, e motivar o aproveitamento de suas matérias primas, quer pelo consumo *in natura*, quer pela transformação industrial, gerando novos produtos para o mercado consumidor (SOUZA, 2003).

A castanha do Pará, que o Ministério da Agricultura classificou como castanha do Brasil para efeito de comércio exterior foi regulamentada pelo Decreto nº51. 209 de 18/08/61 (BRASIL, 1961). Foi descrita pela primeira vez em 1808, quando Humboldt, Bonpland e Kunth, denominaram a árvore majestosa, vindo daí o seu nome científico *Bertholletia excelsa* H.B.K. (NYBG, 2011). Única espécie do gênero *Bertholletia*, foi incluída na lista de espécies brasileiras ameaçadas de extinção em (VIEIRA et al., 2008).

De acordo com a classificação botânica, a castanha do Brasil pertence à Divisão: *Angiospermae*; Classe: Dicotiledônea; Família: *Lecythidaceae*; Gênero: *Bertholletia*; Espécie: *excelsa* (Figura 1). É uma espécie arbórea de grande porte, nativa da Amazônia (SIMÕES, 2004). É considerada a “rainha” da Floresta Amazônica pela beleza e esplendor que apresenta, podendo medir até 50 m de altura e 2 m de diâmetro na base (BRASIL, 2002). De acordo com Wadt; Silva (2008), por ser uma espécie de vida longa, pode chegar até 1.000 anos.



Figura 1. *Bertholletia excelsa*.  
Fonte: APIZ (2009).

Muitos pesquisadores acreditam que os índios foram os principais responsáveis pela propagação dos castanhais pela floresta, quando ao coletar e transportar as castanhas, teriam espalhado naturalmente as sementes em clareiras. (GLOBO RURAL, 2009). Os plantios de castanheiras são relativamente novos, tendo sido iniciados na década de 80 (CAMPO/PAS, 2004), recebendo notável incremento meio século depois, com a abertura dos portos do rio Amazonas à navegação estrangeira (CONAB, 2008).

As castanheiras muitas vezes formam grupos mais ou menos extensos, conhecidos como castanhais, onde se encontram associadas a outras espécies de árvores de grande porte (GREENPEACE, 2011). A espécie se desenvolve bem em terras firmes, solos argilosos ou argilo-arenosos, com umidade relativa variando entre 79 a 86% e precipitação total anual entre 1.400 a 2.800mm. A temperatura média anual da floresta varia entre 24,3 e 27,2°C, com máxima de 30-32°C e mínima de 19-23°C (CAMPO/PAS, 2004). A dispersão de suas sementes, crescimento e capacidade de produção de frutos parecem ser afetados por diversos fatores, como ação de cipós e animais (PERES et al., 2003).

A castanheira é considerada uma árvore de grande importância para o ecossistema, pois fornece alimento e remédios para as comunidades tradicionais, povos indígenas e animais silvestres (APIZ, 2009), apresenta interações com a fauna, como as abelhas do gênero *Xylocopa*, *Centris* e *Bombus* que a polinizam, assim como pássaros, pacas, macacos, e cutia (*Dasyprocta* spp.) que ajudam a disseminá-las pela mata (WADT et al., 2005; MORI; PRANCE, 1990).

O fruto da castanheira é chamado de ouriço, constituindo-se de uma camada esférica de substância lenhosa, extremamente dura. Podem pesar de 0,5 a 5 kg e conter de 10 a 25 sementes (Figura 2), agudas, triangulares, envoltas em polpa amarela (BRASIL, 2002). Os ouriços são coletados nas estações de chuvas mais intensas nas regiões tropicais, durante 5 a 6 meses quando caem das árvores. A castanheira produz frutos anualmente, porém a quantidade de fruto produzida por uma árvore varia ano a ano (TONINI et al., 2008). Castanheiras novas produzem de 30 a 50 ouriços ao ano, enquanto que castanheiras maduras de 200 a 400 anos, podem chegar a produzir até 1.000 ouriços em apenas um ano (APIZ, 2009). Por ser um produto de extrativismo com práticas de manejo precárias, os ouriços são abertos na floresta, para a retirada de suas sementes, sob condições que favorecem a contaminação por fungos e coliformes (FIGUEIREDO et al., 2001).



Figura 2. Ouriço contendo as sementes.  
Fonte: APIZ (2009).

A semente, comumente chamada de amêndoa, é encontrada em diversos tamanhos, e comercializada de acordo com a classificação do Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento (BRASIL, 1976) em: com casca e sem casca.

O período de floração inicia em setembro e se estende até fevereiro. Os frutos levam 15 meses para amadurecer, começando a cair em novembro, no início da estação chuvosa, prolongando-se até o mês de março. Uma árvore pode produzir de 100 a 150 quilos na época da safra (APIZ, 2009).

É uma árvore ligada à cultura das populações tradicionais da Amazônia e do estado do Amazonas, seus produtos e subprodutos são utilizados como fonte de alimentação e renda há várias gerações (MENEZES et al., 2005). Existe no país, cerca de 778.150 castanheiras, distribuídas em 14 milhões de hectares, e sua cultura é caracterizada pelo extrativismo comunitário (Figura 3), atividade de simples coleta de um recurso vegetal, com ausência de práticas de cultivo e beneficiamento (TAVARES et al., 2010). Para as populações indígenas da Amazônia, antes da presença do colonizador europeu, o extrativismo se fazia sobre produtos da fauna e da flora no objetivo do atendimento apenas de suas necessidades alimentares (SOUZA; FERREIRA, 2006).



Figura 3. Extrativismo comunitário  
Fonte: APIZ (2009).

Apesar de o extrativismo ser uma atividade importante para as populações amazônicas, constitui uma base de desenvolvimento bastante frágil, realizada mais pelo nível de pobreza de seus habitantes com mão de obra marginal, que como alternativa de produção, sendo a única atividade por falta de opções para a realização de uma agricultura rentável (HOMMA, 1996).

O extrativismo é uma etapa da história humana caracterizada pela baixa densidade demográfica e baixo padrão tecnológico, isto é, apenas uma etapa do desenvolvimento humano que será substituído quando tiver disponibilidade tecnológica para a domesticação e preços favoráveis que criem condições para o plantio (SIMÕES, 2004).

Apesar de o extrativismo ser uma atividade importante para as populações amazônicas, constitui uma base de desenvolvimento bastante frágil, realizada mais pelo nível de pobreza de seus habitantes com mão de obra marginal, que como alternativa de produção, sendo a única atividade por falta de opções para a realização de uma agricultura rentável (HOMMA, 1996).

Por ser um produto extrativista, a castanha do Brasil é considerada orgânica, e sua extração ambientalmente correta, uma vez que não são utilizados defensivos químicos para controle de pragas e plantas daninhas, reduzindo assim os perigos químicos comuns a produtos cultivados. O baixo nível tecnológico associado às condições inadequadas de manejo e manuseio da matéria prima favorece pontos de contaminação, ocasionando riscos à saúde do consumidor e perdas econômicas. As bactérias do grupo coliformes e os fungos produtores ou não de toxinas, que tem seu crescimento favorecido devido às más condições de manipulação na indústria e a prolongada exposição a fatores ambientais que favorecem o desenvolvimento destes microrganismos (CAMPO/PAS, 2004).

### **2.1.1 Produtos derivados**

A castanha do Brasil por possuir tronco cilíndrico e muito reto, sem galhos até a copa, desperta o interesse de madeireiros que, fazem o uso da castanheira para o comércio clandestino da madeira, a qual apresenta excelente qualidade para construção civil, naval (CAMPO/PAS, 2004). Estas características levaram à exploração, depredação e destruição de castanhais nativos e até à sua extinção em algumas localidades da Amazônia (GREENPEACE, 2011; LOCATELLI et al., 2010).

O ouriço é muito utilizado como carvão vegetal em fornos para a produção de farinha e pães, assim como no artesanato para a confecção de porta-jóias (Figura 4), cinzeiro e até mesmo instrumentos musicais. As cascas das amêndoas, para a produção de biocombustíveis (CAMPO/PAS, 2004), tapetes, peças de artesanato e composição de tintas (BRASIL, 2002).

A amêndoa da castanha é consumida *in natura* ou cozida e cristalizada, processando-as em estufas elas se tornam desidratadas ou semi-desidratadas (CONAB, 2008). É o produto economicamente mais importante da castanha do Brasil, presente no mercado nacional e internacional, e vem sendo muito utilizada na indústria alimentícia e de cosméticos (VIEIRA et al., 2008).

Devido ao formato irregular, há uma grande porcentagem que se quebra (aproximadamente 10%), reduzindo seu valor comercial a apenas 60% de castanhas perfeitas (COSLOVSKY, 2005). Dentre os produtos alimentícios de maior uso estão as amêndoas descascadas, utilizadas como snacks, coberturas de sorvetes, doces, cereais, produtos de panificação (Figura 5), produção de biscoitos e bombons. Souza; Menezes (2004), utilizaram a farinha de castanha como ingrediente em alimentos extrusados, de forma a enriquecer o teor protéico deles, obtendo cereais matinais e barras energéticas ricas em minerais.

O óleo da castanha obtido pela prensagem das sementes tem sido utilizado para o enriquecimento de alimentos industrializados (SOLIS, 2001) e para fabricação de cosméticos e fitoterápicos (Figura 6) (BRASIL, 2002). De acordo com Costa et al. (2006), o óleo também pode ser utilizado como fonte de carbono para microrganismos em meio específicos, como por exemplo para produção de biosurfactantes, e, como lubrificante na aviação e em componentes eletrônicos pelas suas propriedades antioxidantes. Do resíduo da extração do óleo também se obtém torta ou farelo utilizados como misturas em farinhas e rações (PACHECO; SCUSSEL, 2006; LOCATELLI et al., 2005).

Campos et al. (2005) descobriram a ação fitoterápica de extratos da castanha para a redução do *Trypanossoma cruzi* (causador da doença de Chagas). O chá preparado a partir do caule das árvores de castanheiras é considerado um agente antimalárico, pois possui atividade tripanocida, eliminando os parasitas de sangue infectados sem afetar as células sanguíneas.



castanhais se encontram nas proximidades do rio Trombeta no município de Oriximiná e localidades dos rios Tocantins e Xingú (AKATSU, 2005).



Figura 7. Regiões brasileiras produtoras de castanha do Brasil.  
Fonte: Google (2011).

Algumas destas áreas possuem usinas de beneficiamento, áreas extrativistas com certificação orgânica e áreas com implantação de programas de boas práticas (PACHECO, 2007). O Acre é o maior produtor e sua cadeia produtiva envolve mais de 15.000 famílias que dependem desta atividade extrativista (TAVARES et al., 2010). O Estado chega a colher cerca de 30 mil toneladas de sementes por ano (ÁLVARES, 2010). Uma das razões para o aumento da produção no Estado do Acre é devido ao deslocamento da produção para esta região, já que a castanha está sendo cada vez mais exportada pela Bolívia, devido aos menores controles de exportação e barreiras fitossanitárias em relação ao Brasil (ENRIQUEZ, 2009).

### **2.1.3. Importância Econômica**

Após a decadência da borracha, a castanha do Brasil passou a constituir o principal produto extrativista de exportação da região (APIZ, 2009). Sendo considerado um produto florestal não madeireiro da floresta amazônica (PFNMs), o agronegócio da castanha é relevante, sobretudo pela coleta da castanha ser a mais importante atividade econômica para as comunidades extrativistas (SOUZA; FERREIRA, 2006; PERES et al., 2003). Ao mesmo tempo em que as etapas de transporte, comercialização e processamento, aumentam a renda e geração de empregos (MACIEL; REYDON, 2008).

A participação dos produtos florestais não madeireiros tem sido parte essencial no manejo florestal sustentado, sendo uma fonte de renda para as populações residentes nas florestas e arredores. Em 2005, os produtos florestais não madeireiros somaram 4,7 bilhões de dólares no mercado internacional, sendo os produtos de origem vegetal responsáveis por três quartos deste valor (TONINI et al., 2008; WADT et al., 2005). No ano de 2006, o valor da produção primária florestal foi de 10,9 bilhões, sendo que a castanha representou cerca que 43,9 milhões (TAVARES et al., 2010).

A castanha do Brasil é um dos produtos de comércio internacional, originários de países não desenvolvidos e consumidos por países desenvolvidos. Os principais países importadores são: Estados Unidos, Hong Kong (China), Áustria, França, Itália, Alemanha e Inglaterra (TAVARES et al., 2010).

Existe certa dificuldade em padronizar a produção brasileira, tanto em qualidade como em quantidade, pois a oferta depende dos ciclos da natureza e tem influência das condições climáticas (ENRÍQUEZ, 2009). A falta de incentivos governamentais aos produtores extrativistas, o desmatamento da região Amazônica, assim como a falta de organização das cooperativas (responsáveis pela extração das castanhas) que não agregam os devidos valores para concorrer com o mercado externo, e a ausência de mão-de-obra especializada, vêm

causando uma significativa queda da produção da castanha do Brasil pelos Estados produtores (EMBRAPA, 2009).

A castanha constitui um dos mais importantes produtos exportados, mas em função de ser facilmente substituída por outras amêndoas, devido variações de preço, sua demanda no comércio internacional é muito elástica (MENEZES et al., 2005). A exportação média vem decrescendo, em 1990 o Brasil exportou 51.195 toneladas, já no ano de 1996, foram 19.301 toneladas exportadas (EU, 2003). Esta queda na exportação segundo ENRIQUEZ (2009), se dá parte pela queda da sua produção interna (devido a redução dos castanhais produtivos, deficiência nas etapas de transporte e armazenamento durante a cadeia produtiva e ausência de políticas de incentivos aos extrativistas) e pela competição com outros países produtores. Em parte pelo surgimento de barreiras não tarifárias impostas por padrões fitossanitários mais rígidos, como a União Européia (principal importador), que restringiu sua comercialização devido aos estudos realizados a respeito de altos níveis de aflatoxinas encontrados nos produtos (HOMMA et al., 2000). Problemas com a exportação e a perda de participação no mercado mostram a necessidade de avaliar a competitividade e a eficiência da cadeia produtiva brasileira da castanha (SANTOS et al., 2010).

Em 1990, o Brasil representava 80% do comércio internacional, e era considerado líder na produção de castanhas. Atualmente a produção declinou cerca de 30 mil toneladas (TAVARES et al., 2010). A Bolívia, aproveitando-se da crise da produção de castanha no Brasil, tomou o seu lugar no mercado internacional, exportando em 2008 cerca de 50 mil toneladas (CONAB, 2010; FAO, 2010).

De acordo com levantamento do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a safra brasileira de 2007 alcançou 30.406 toneladas. Essa produção gerou no mesmo período receita bruta de mais de 12 milhões de reais para o Estado do Acre (KERN; GONÇALVES, 2008). Em 2008 teve uma pequena

queda, totalizando em 29.500 toneladas. O Estado do Acre contribuiu com a maior parcela da produção, 10.378 toneladas, seguido pelo Amazonas com 8.871, o Pará com 7.639, e Rondônia 2.165 toneladas (SOBER, 2010).

Em 2009, a produção total em toneladas do Amazonas foi de 8.840, o que rendeu uma média de R\$11.423.100, beneficiando mais de 7 mil famílias com o extrativismo da castanha (ADS, 2010).

Coslovsky (2005), afirma que o fato de a Bolívia dominar o mercado não se trata apenas da quantidade exportada, mas da tecnologia, dos níveis sanitários e do valor agregado do produto boliviano, além de que a Bolívia não conta com as exigências sanitárias que o Brasil exige para os seus produtos. A exportação da Bolívia teve maior aumento a partir de 1998, segundo dados da FAO (2010). Em 2008 a Bolívia foi responsável por cerca de 70% das exportações, seguidas do Brasil com 25%, e Peru com cerca de 10%. A Bolívia concentrou-se na exportação de castanhas sem casca, importando assim produtos com casca do Brasil, processando e exportando o produto descascado. Isto teve início depois que a União Européia impôs limite para a importação de produtos contaminados por aflatoxinas. Verificou-se que as indústrias bolivianas tiveram maior capacidade de se ajustar as novas exigências do que a indústria brasileira (SANTOS et al., 2010).

Ferreira (2010) afirmou que barreiras sanitárias impostas por países europeus têm dificultado as exportações brasileiras, especialmente de castanha com casca que não passam por etapas de processamento.

Outra explicação para a entrada da Bolívia no mercado é o financiamento do Banco Mundial para a instalação de agroindústrias na Amazônia Boliviana, a fim de deslocar boa parte da população camponesa envolvida no plantio de coca, para o extrativismo da castanha, com salários mínimos inferiores ao brasileiro, e baixos encargos sociais, oferecendo para os países importadores uma oferta de produtos com preços inferiores (FERREIRA, 2010).

Tendo em vista a queda das exportações, melhorias e iniciativas públicas têm sido discutidas para elevar a qualidade da castanha do Brasil. A “Cooperacre”, fundada em 2001, é uma central que congrega 20 cooperativas que representa e garante a sustentabilidade dos extrativistas, agregando valor aos produtos. É responsável também pela implantação do “Programa de compra antecipada da produção de extrativistas familiares” dentro do “Programa de Aquisição de Alimentos” (PAA) que incentiva a produção e processamento de alimentos por pequenos empreendedores rurais. “Plano nacional de segurança e qualidade de produtos de origem vegetal” – PNSQV; “Projeto de monitoramento e controle de micotoxinas na castanha do Brasil”; Implantação de “Boas práticas de manejo na cadeia produtiva da castanha do Brasil”, junto com os extrativistas, visando melhorar a qualidade do produto em especial no Estado do Amazonas; “Certificação orgânica da castanha”, entre outros (ENRIQUEZ, 2009; PACHECO, 2007).

Estas ações de apoio à produção geraram resultados positivos, fazendo com que o preço médio pago nos últimos seis anos se elevasse, passando de R\$ 0,35/kg em 2000, para R\$ 1,16/kg em 2008 (SOBER, 2010), chegando em 2010, a quase R\$ 15,00 por lata (equivalente a 10 kg de castanha) (ÁLVARES, 2010).

De acordo com a Portaria MAPA N.º 507, de 10/07/2009, novos preços mínimos foram estabelecidos para a exportação da castanha do Brasil, sendo R\$ 52,49/hectolitro de castanhas com casca, e as castanhas beneficiadas (descascadas) com ou sem película, tem o preço variado de acordo com o seu tamanho, na tabela que se segue:

Tabela 1. Descrição e preço da castanha do Brasil.

<b>Descrição</b>	<b>Preço</b>
miudinha	3,4362/kg
miúda	3,0627/kg
pequena	2,6817/kg
média	2,4900/kg
extramédia	2,4519/kg
grande	2,3944/kg
ferida	1,4940/kg
quebrada	1,3850/kg

(CONAB, 2010).

#### **2.1.4 Composição nutricional**

O consumo mundial de alimentos saudáveis e com baixos teores de gordura tem aumentado à medida que as pessoas estão reconhecendo a necessidade de ter um estilo de vida saudável. A busca por estes alimentos saudáveis e que ajudam na prevenção de doenças, fez com que aumentassem o consumo de alimentos integrais e naturais, como grãos, nozes e castanhas (MOODLEY et al., 2007).

A amêndoa da castanha é conhecida pelo seu alto valor nutritivo, pois é rica em vitamina A, B1, B2 e C, cálcio, fósforo, magnésio, potássio, selênio e cobre (PACHECO, 2007). Os níveis de nutrientes diferem com o tamanho da castanha, sua variedade e origem, e os componentes mais abundantes são os lipídios, seguidos pelas proteínas, carboidratos e fibras, de forma que o valor energético é bastante elevado (MOODLEY et al., 2007).

Quando desidratada possui alto teor de proteína, cerca de cinco vezes mais do que o conteúdo calórico do leite de vaca *in natura* (DREW; FUJIWARA, 2010). A amêndoa apresenta proteína completa, em que os valores dos escores químicos dos aminoácidos essenciais são superiores aos do padrão teórico da

*Food and Agriculture Organization* (FAO, 1970). É chamada popularmente de “Carne Vegetal”, podendo ser comparada com a carne bovina pela quantidade de aminoácidos que apresenta (GLÓRIA; D´ARCE, 2000).

É considerada fonte de arginina, a qual é precursora do óxido nítrico, essencial para a função endotelial (CRISHOLM et al., 2005). As amêndoas contêm de 15 a 17% de proteína em matéria fresca e cerca de 50% de proteína em matéria seca desengordurada. É rica nos aminoácidos essenciais metionina (18%) e cisteína (8%), e em menores quantidades, arginina e leucina (SUN, 1987). A fração proteica da castanha do Brasil é rica nestes aminoácidos sulfurados, e tem sido utilizada em processos de modificação de alimentos, para enriquecimento de características nutricionais, como por exemplo, do feijão (NORDLEE et al., 1996).

Estudos realizados por Glória; D´arce (2000), concluíram que é possível a obtenção de concentrados e isolados proteicos da torta de castanha do Brasil desengordurada com níveis de 59 e 81% de proteína respectivamente. Os autores também afirmam que proteínas de oleaginosas apresentam funções nas características organolépticas, físicas (solubilidade), capacidade de emulsificação, formação de espumas e óleos e viscosidade (propriedades reológicas).

Os lipídeos são compostos importantes, pois conferem características sensoriais aos alimentos, como odor e cor. De acordo com Gutierrez et al. (1997), a amêndoa da castanha contém boa quantidade de óleo de alto valor alimentar, e o teor de lipídeos atinge 60-70%. O teor de ácidos graxos saturados (mirístico e palmitoléico) e insaturados, superior a outras sementes oleaginosas. Em sua composição possui 85% de ácidos graxos insaturados, sendo que 51% são o ácido graxo monoinsaturado oléico e 34% são o poliinsaturado linoleico (COOPERACRE, 2011).

Os teores de açúcares no alimento favorece o metabolismo de microrganismos, podendo ser um fator determinante na presença de fungos deteriorantes (ANDRADE et al., 1999; PACHECO, 2007). A respeito do teor de

fibras, Souza; Menezes (2004), encontraram valores relevantes de fibras solúveis e insolúveis.

Chunhieng et al. (2004), estudando os teores de alguns minerais em diferentes amostras de castanhas, verificaram a presença de elevados teores de ferro (Fe), magnésio (Mg) e manganês (Mn), e não foram detectados valores relevantes de metais pesados, como arsênio (As), chumbo (Pb) e mercúrio (Hg). A amêndoa também contém quantidades significativas de Ba, Br, Ca, Co, Cs, Rb, Sr e Ni (SILVA; MASSAIOLI, 2003).

Em relação aos teores de vitaminas, as amêndoas possuem elevados teores de vitamina E, que exercem efeito cardioprotetor, reduzindo a oxidação do colesterol LDL (CRISHOLM et al., 2005).

Ryan et al. (2006); Kornsteiner et al. (2006), encontraram elevados teores de tocoferóis, predominando  $\beta$ -tocoferol e  $\gamma$ -tocoferol. Os tocoferóis associados aos compostos fenólicos agem como compostos funcionais, com efeito preventivo contra câncer e doenças coronárias. Os compostos fenólicos, também considerados funcionais devido às suas propriedades benéficas a saúde, foram encontrados em altos níveis em castanhas. (KORNSTEINER et al., 2006).

De acordo com Philips et al. (2005), os fitosteróis que são compostos naturais dos alimentos com estruturas semelhantes ao colesterol e que apresentam propriedades que aumentam a função imune do organismo, reduzem os níveis de colesterol ruim, diminuindo o risco de desenvolvimento de certos tipos de câncer, foram encontrados em castanha do Brasil, com níveis de 95% de fitosteróis totais.

A amêndoa da castanha é considerada uma grande fonte natural de selênio, sendo mais rica quando comparada com outras amêndoas, é a única que excede a dose de ingestão diária recomendada pela National Research Council, dos Estados Unidos (TONINI et al., 2008). Este mineral tem um papel importante

como antioxidante, reforça a ação dos tocoferóis, atua no metabolismo da tireóide, ajuda na prevenção de câncer e regula o potencial redox da vitamina C e de outras moléculas (FREITAS et al., 2008; ANDRADE et al., 1999). Sendo considerado um micronutriente essencial para o corpo humano, especialmente na prevenção de câncer de próstata (BRASIL, 2002), há fortes indícios que ele também atue como elemento protetor no caso de doenças crônicas como aterosclerose, cirrose, artrite e enfisema (SOUZA, 2003; MOODLEY et al., 2007).

Sua atividade antioxidante pode ser esclarecida por ser um elemento fundamental ao funcionamento da enzima glutationa peroxidase, mecanismo de defesa antioxidante e seqüestrante de radicais livres no organismo. No entanto, o selênio só tem atividade antioxidante em baixas concentrações, pois quando consumido em excesso tem ação pró-oxidante, isto é, tóxica, podendo causar doenças como depressão, distúrbios gastrointestinais, perda de cabelo, unhas brancas manchadas, fadiga e irritabilidade (MOODLEY et al., 2007; FRAGA, 2005).

O consumo de nozes em geral tem aumentado em atletas e idosos, que buscam o efeito antioxidante dos alimentos, com recomendações médicas de consumo de 30 gramas por dia, o equivalente a três amêndoas. Entretanto os teores heterogêneos de selênio por amêndoa dificultam a definição da quantidade exata de ingestão para se aproveitar das propriedades antioxidantes, sem ter os efeitos tóxicos do selênio (CRISHOLM et al., 2005).

A concentração deste elemento nos alimentos varia de acordo com o solo que a planta vegeta (SOUZA, 2003), isto é, a concentração de selênio depende da eficiência com que esse elemento é absorvido pelas raízes das árvores. Este fenômeno é dependente da maturidade e variedade da planta, da forma química do Se e do pH. Sendo assim lotes de mesma procedência podem ter heterogeneidade nos teores de selênio (PACHECO, 2007).

A ingestão diária de selênio varia entre diferentes países. Na Nova Zelândia a recomendação é 6mg/dia, no Canadá 224 mg/dia, e para países europeus o recomendado é de 32,3-70mg/dia (PACHECO; SCUSSEL, 2007). A “Nacional Research Council” em 2.000 estabeleceu como ingestão recomendada na dieta o valor de 55mg/dia para homens e mulheres adultos, na intenção de maximizar os efeitos da glutathiona peroxidase, enquanto o valor do Limite Superior Tolerável de Ingestão (UL) estabelecido foi 400mg/dia para evitar selenose (NAS, 2000; COZZOLINO, 2001). Freitas et al. (2008), fizeram uma meta-análise dos teores de selênio encontrados em amostras de castanhas, e em 5,24% das castanhas os níveis de selênio foram superiores a 400ug Se/castanha, e em 25,53% os níveis foram inferiores que 55ug, mostrando-se necessários estudos a respeito dos valores recomendados de ingestão diária de castanhas.

Os componentes nutricionais pertencentes a castanha do Brasil e a porcentagem de ingestão diária recomendada estão descritos na tabela abaixo.

Tabela 2. Informações nutricionais dos componentes presentes na castanha.

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

(COOPERACRE, 2011).

## **2.2 Cadeia produtiva da castanha do Brasil**

O sistema de produção tradicional da castanha do Brasil é baseado na unidade familiar e não envolve investimentos tecnológicos, sendo para isto utilizadas técnicas simples de coleta. As condições higiênicas, muitas vezes são precárias e a coleta e quebra dos ouriços são realizadas ainda na floresta, seguida as etapas de transporte, armazenamento e beneficiamento.

### **2.2.1. Etapa de pré-colheita**

Esta etapa tem sido cada vez mais adotada pelos extrativistas, seguindo as Boas Práticas de Manejo (BPM) e inclui desde a fase pré-exploratória até a colheita da castanha. Segundo Álvares (2010), as boas práticas de manejo são cuidados simples, que devem ser seguidos desde a coleta do produto até o empacotamento e a industrialização. Diversos fatores interferem na qualidade do produto final, mas o modo como são realizadas as etapas, principalmente as críticas, de transporte, secagem e armazenamento, determinam como o produto chegará ao mercado.

Antes de começar a coleta das castanhas, é necessário investir tempo e trabalho em práticas que vão facilitar a coleta e armazenamento das castanhas, ações planejadas podem ajudar a evitar perdas, conseguir melhores preços, fiscalizar territórios e assim melhorar a qualidade das castanhas produzidas (APIZ, 2009).

Segundo Campo/pas (2004), esta etapa inclui as fases:

- *Mapeamento e marcação das árvores*: elaboração de mapas com a localização exata das castanheiras que serão manejadas, informações sobre o acesso à área de manejo, e localização das árvores que são marcadas com fitas ou plaquetas. Após esta marcação, o extrativista seleciona as árvores que serão manejadas (Figura 8).

É considerada uma importante ferramenta, pois ajuda no planejamento da exploração de áreas muito grandes, como os castanhais, onde é feito um levantamento das principais informações da área, como localização dos castanhais, das aldeias e dos barracões de armazenamento, rios e igarapés próximos e quantidade de árvores existente (APIZ, 2009).



Figura 8. Mapeamento das áreas que serão exploradas  
Fonte: APIZ (2009).

- *Corte dos cipós*: a presença dos cipós pode comprometer o desenvolvimento da copa das árvores e limitar a produção dos ouriços, esta fase consiste no corte desta espécie visando melhorar a produtividade das castanheiras (Figura 9).



Figura 9. Corte dos cipós.  
Fonte: APIZ (2009).

- *Limpeza da base das castanheiras*: esta etapa consiste na retirada dos frutos que caíram nas safras anteriores e ficaram amontoados na base das castanheiras, ela é realizada antes do início da nova safra, esta limpeza poderá ser feita entre os meses de setembro a outubro. Esta etapa é muito crítica, pois é comum encontrar ouriços que não foram coletados durante a safra anterior, estando amontoados durante o ano todo, expostos a condições de alta temperatura e umidade, favorecendo assim o desenvolvimento de microrganismos, por exemplo, o fungo *Aspergillus flavus*, espécie produtora de aflatoxinas. Na próxima safra, esses ouriços que não foram coletados e estão contaminados podem ser coletados juntos com os novos, favorecendo a contaminação de castanhas novas por fungos e aflatoxinas (CAMPO/PAS, 2004).

### **2.2.2. Etapa de colheita e pós-colheita**

- *Coleta e amontoa dos ouriços*: A queda dos ouriços ocorre nas estações chuvosas, e eles vão sendo empilhados próximos às castanheiras (Figura 10), onde permanecem por algum tempo até o procedimento de “cata” dos frutos (ouriços). O extrativista recolhe em um cesto pendurado nas costas (Figura 11), quando o cesto está carregado, os transporta para as “regiões de quebramento”, barracões destinados à extração das sementes (PACHECO; SCUSSEL, 2006).



Figura 10. Ouriços empilhados próximo às castanheiras.  
Fonte:APIZ (2009).



Figura 11. Coleta dos ouriços.  
Fonte: Portal extrativista (2011).

De acordo com as Boas Práticas de Manejo, a coleta dos ouriços deve ser semanal e logo após a queda, coletando apenas os da safra atual, para evitar exposição ao solo por muito tempo, degradação ou perda na qualidade dos frutos. Mas a coleta é demorada e justificada pelos extrativistas devido ao fato de estarem coletando enquanto ainda há risco de queda de mais ouriços das árvores. A amontoa dos ouriços que não são quebrados no mesmo dia deve ser feita em jirais com galhos, a uma certa altura do chão (SIMÕES, 2004; FIGUEIREDO et al., 2001). Os coletores devem fazer uso de capacete no momento da coleta dos ouriços, retirando e amontoando os ouriços fora da área da copa das árvores (APIZ, 2009).

- *Seleção dos ouriços*: durante a etapa de coleta, deve-se descartar os ouriços que apresentam contaminação microbiológica visível (ÁLVARES, 2010).

- *Quebra dos ouriços*: feita manualmente com o auxílio de facões ou martelos (Figura 12), para a retirada das castanhas. E estas são selecionadas, descartando-se as que apresentam contaminação visível. Segundo o MAPA (BRASIL, 2002), o descarte é um ponto crítico e pode contaminar safras futuras, sendo assim, estes descartes devem ser enterrados ou levados para longe do ponto de coleta.



Figura 12. Quebra dos ouriços.  
Fonte: SIMÕES (2004).

De acordo com as BPM, os ouriços devem ser quebrados com utensílios limpos e exclusivos para essa finalidade, o local de quebra deve ser uma base limpa, evitando o excesso de umidade e ataque de animais silvestres (ÁLVARES, 2010), e as castanhas devem ser colocadas em cima de lonas ou folhas de palmeira, evitando assim o contato com o solo (APIZ, 2009).

Depois de extraídas, as castanhas são lavadas para a eliminação das impurezas (Figura 13) e armazenadas a granel até o transporte e beneficiamento. Nesta etapa, cerca de duas a três pessoas lavam, secam e ensacam as castanhas, em aproximadamente 20 dias, para depois serem vendidas no mercado local (castanhas com casca) (BRASIL, 2002). A lavagem é feita para retirada de impurezas e castanhas chochas, que durante a lavagem flutuam, e as castanhas boas tendem a afundar. Essa lavagem é realizada na maioria das vezes em rios ou igarapés (TONINI et al., 2008).



Figura 13. Lavagem das castanhas.  
Fonte: APIZ (2009).

Segundo recomendações do MAPA, esta lavagem deveria ser evitada, tendo em vista um maior desenvolvimento fúngico e difícil secagem, caso seja inevitável, deve se fazer em menor tempo possível, fazendo o uso de secadores solares, os quais possibilitam controlar umidade e temperatura (BRASIL, 2002). Em estudos realizados por Tonini et al. (2008), mais da metade dos extrativistas de Rondônia entrevistados, fazem a lavagem de maneira inadequada, em água parada, utilizando pneus e vasilhas e apenas 55% dos entrevistados alegam secar as castanhas ao sol. O restante armazena as castanhas ainda molhadas em sacos, o que oferece um risco para a contaminação fúngica, uma vez que estas condições de umidade e temperatura são favoráveis.

O ideal, segundo o MAPA, seria construir paióis coletores para o armazenamento, utilizando materiais provenientes da própria mata, quando a coleta é realizada em castanhais mais distantes (BRASIL, 2002), evitando o ensacamento das castanhas, contribuindo assim para uma melhor secagem e conservação das castanhas (APIZ, 2009).

- *Transporte primário para as unidades de produção*: O transporte da área de coleta até as unidades produtoras ocorre ou por embarcações de pequeno porte, ou via terrestre pelos extrativistas (Figura 14) ou utilizando animais de carga (PACHECO; SCUSSEL, 2006).



Figura 14. Transporte das castanhas para as unidades de produção.

Fonte: APIZ (2009).

- *Lavagem, secagem e armazenamento nas unidades de produção:* quando as castanhas chegam são lavadas, secas (Figura 15) e armazenadas até o segundo transporte para as unidades de beneficiamento.



Figura 15. Secagem das castanhas.

Fonte: APIZ (2009).

De acordo com as BPM, o armazenamento deve ser feito em galpões de madeira (Figura 16), a uma altura média de um metro do chão, permitindo a circulação de ar e evitando o contato com o solo, a alta umidade e o contato com animais. As castanhas devem ser armazenadas em sacos, sendo empilhadas com no mínimo 15 cm entre as pilhas para favorecer a circulação de ar, ou armazenadas a granel. Recomenda-se a instalação de exaustores para promover uma melhor ventilação entre as amostras. O armazém deve ser mantido sempre

limpo, livre de restos de castanhas de safras anteriores, produtos químicos ou produtos de outra natureza (ÁLVARES, 2010).



Figura 16. Local de armazenamento das castanhas.  
Fonte: APIZ (2009).

- *Transporte secundário para as unidades de beneficiamento*: o transporte é feito dependendo da localidade em cada estado, podendo ser transportados em caminhões abertos ou carretas transportadas por tratores; ou através do transporte fluvial (PACHECO; SCUSSEL, 2006; ÁLVARES, 2010).

Para o transporte fluvial, seguindo as BPM, devem-se utilizar estrados no fundo da embarcação para evitar o contato das castanhas embaladas com o piso e áreas molhadas (ÁLVARES, 2010).

- *Armazenamento nas unidades de beneficiamento*: após o desembarque, ficarão armazenadas em “montanhas” ou seguirão direto para as etapas de beneficiamento (PACHECO; SCUSSEL, 2006).

As usinas de beneficiamento procuram realizar uma seleção e secagem rápida das castanhas, resultando em uma melhor qualidade do produto final.

### **2.2.3. Etapas na unidade de beneficiamento**

O beneficiamento da castanha é feito em usinas com equipamentos para a produção em larga escala e segue as seguintes etapas:

- *Recepção e seleção das castanhas:* é feita uma inspeção visual quantitativa e qualitativa, eliminando as castanhas quebradas, com coloração diferente e contaminação visível por fungos (Figura 17) (PACHECO; SCUSSEL, 2006).



Figura 17. Seleção das castanhas.  
Fonte: APIZ (2009).

De acordo com as BPM, as castanhas devem estar limpas, secas, e isentas de matérias estranhas, descartando assim os carregamentos com mais de 10% de castanhas estragadas. Os lotes são separados e contem informações sobre a safra, fornecedor, local de produção, condições de transporte e quantidade (ÁLVARES, 2010).

- *Armazenamento das castanhas:* é realizada em silos de madeira com aeração por 1 ou 2 dias antes do beneficiamento (PACHECO; SCUSSEL, 2006). É recomendado o uso de telas para proteger as amostras, de exaustores se possível com ventilação de ar, e monitoramento diário da temperatura e umidade (ÁLVARES, 2010).

- *Lavagem das castanhas:* é realizada para remoção de matéria orgânica e restos de terra (PACHECO; SCUSSEL, 2006).

Seguindo as BPM, a lavagem das castanhas com casca é feita por imersão em água tratada e temperatura ambiente, a qualidade da água é importante ser monitorada devido a grande quantidade de matéria orgânica depositada nas castanhas. A troca da água tem que ser feita com controle do teor

do cloro (0,5 ppm – 0,8 ppm) para maximizar a lavagem, assim como os utensílios utilizados tem que ser lavados depois de cada turno (ÁLVARES, 2010).

- *Secagem*: é realizado em secador rotativo, por um período de 8 a 12 horas a temperatura de 50º - 60ºC (PACHECO; SCUSSEL, 2006).

- *Resfriamento*: das castanhas que serão embaladas com casca, depois desta etapa elas passam para a etapa de classificação, polimento, pesagem e embalagem (PACHECO; SCUSSEL, 2006).

As castanhas que tem como finalidade serem comercializadas sem casca seguem para as seguintes etapas:

- *Tratamento térmico*: as castanhas são tratadas por imersão em água em ebulição por 1 a 2 minutos a 100ºC, ou autoclavadas (o processo mais utilizado) acima de 250ºC. Esta etapa além de favorecer a diminuição da carga microbiana, facilita a retirada da casca (PACHECO; SCUSSEL, 2006; ÁLVARES, 2010).

- *Quebra*: é feita com as castanhas ainda quentes, e o processo é realizado mecanicamente, com o auxílio de uma prensa manual (Figura 18). A casca é descartada (PACHECO; SCUSSEL, 2006).



Figura 18. Quebra das castanhas na usina de beneficiamento.  
Fonte: APIZ (2009).

Seguindo as BPM, as mesas de quebra e equipamentos devem ser constituídas de material impermeável, de fácil sanitização, sendo realizada a limpeza ao final de cada turno. A sala onde é realizada a quebra deve ser afastada da área de armazenamento, deve apresentar portas e janelas, sendo protegidas também da possível entrada de animais e insetos (ÁLVARES, 2010).

- *Seleção visual*: é realizada para eliminação das castanhas deterioradas ou danificadas fisicamente (PACHECO; SCUSSEL, 2006).

De acordo com as BPM, a higiene dos manipuladores e o tipo de material utilizado na seleção são de extrema importância para a qualidade final do produto (ÁLVARES, 2010).

- *Segunda secagem*: as amêndoas sofrem processo de desidratação em estufas a 60°C por 24 horas para atingir umidade entre 11 e 15% (ÁLVARES, 2010).

- *Classificação*: as castanhas com casca e as descascadas são classificadas de acordo com o tamanho, conforme as especificações abaixo definidas pelo Ministério da Agricultura (BRASIL, 1976).

***Castanha com casca:***

- pequena: mais que 68 castanhas por 453 g;
- média: 57 a 68 castanhas por 453 g;
- extra média: 56 a 62 castanhas por 453 g;
- semigrande: 51 a 55 castanhas por 453 g;
- grande: 46 a 50 castanhas por 453 g;
- extra grande: menos de 46 castanhas por 453 g.

### ***Castanha descascada:***

- miudinha: acima de 180 amêndoas por 453 g;
- miúda: 160 a 180 amêndoas por 453 g;
- pequena: 140 a 159 amêndoas por 453 g;
- média: 110 a 139 amêndoas por 453 g;
- extra média: 102 a 114 amêndoas por 453 g;
- grande: menos de 102 amêndoas por 453 g;
- ferida: amêndoas lascadas e/ou mutiladas por escoriações, provocadas por agente físico, mantendo mais de 50% do tamanho;
- quebrada: amêndoas fragmentadas, partidas e/ou quebradas, com menos de 50% do tamanho.

- *Polimento:* As amêndoas são polidas mecanicamente através de rolos com espumas para retirada de resíduos, como a película. E as castanhas com casca são polidas mecanicamente em polidores ásperos para a retirada das arestas (ÁLVARES, 2010).

- *Pesagem e Embalagem:* as castanhas descascadas são pesadas e embaladas a vácuo seladas quente, em sacos com baixa permeabilidade a oxigênio, e depois podem ser armazenadas em caixas de papel cartonado.

De acordo com Apiz (2009), é recomendado que as castanhas sem casca sejam embaladas a vácuo em sacos aluminizados para evitar que ocorra rancificação, e sabor e odor indesejáveis (Figura 20).



Figura 19. Embalagem das castanhas sem casca.  
Fonte: COOPERACRE (2011).

As castanhas com cascas são embaladas em sacos de polipropileno de 60 kg (Figura 19) (ÁLVARES, 2010).



Figura 20. Embalagem das castanhas com casca.  
Fonte: APIZ (2009).

- *Armazenamento*: o produto final fica armazenado por 2 a 30 dias antes de serem transportados para o comércio (PACHECO; SCUSSEL, 2006).

Seguindo sempre as BPM para o armazenamento, os sacos devem ser armazenados sobre estrados de madeira em locais arejados e limpos (ÁLVARES, 2010).

Além de ser comercializada para ser consumida, a castanha do Brasil sem casca pode ser ainda processada para a obtenção de produtos e subprodutos

como: óleos, tortas, farelos, farinha, leite, biscoito, etc. E as castanhas com casca são transportadas através de containers em navios para o mercado internacional. (PACHECO; SCUSSEL, 2006).

A coleta, secagem, armazenamento, e o transporte da castanha do Brasil são consideradas etapas críticas, pois dependendo de como forem conduzidas, há maior ou menor contaminação por fungos e possíveis toxinas (VALOIS, 2003). As Boas Práticas de Manejo (BPM) na fase de pré-colheita até a pós-colheita dos ouriços devem ser incorporadas (PACHECO; SCUSSEL, 2006), pois além de evitar a proliferação fúngica e conseqüente contaminação por aflatoxina, pode ser importante incentivo para apoiar as ações de manejo florestal comunitário como uma estratégia de uso e conservação da floresta. Além de gerar possibilidades de aumento da renda das populações extrativistas devido a melhoria da qualidade do produto final (SIMÕES, 2004).

### **2.3. Micologia dos alimentos**

A partir de 1960 os fungos passaram a ser classificados como o Reino Fungi. Compreendem os seres vivos eucarióticos, unicelulares como as leveduras, e pluricelulares como os fungos filamentosos (TRABULSI, 1999). Seus esporos são abundantes e amplamente encontrados na natureza, germinam rapidamente em plantas, solos e alimentos. Os alimentos são alvos para a proliferação destes microrganismos, principalmente quando as condições de secagem e armazenagem forem propícias (PITT; HOCKING, 2009).

Há muitos anos os fungos vêm sendo utilizados na indústria de alimentos para a produção de produtos fermentados como cervejas, vinhos e pães e na indústria farmacêutica para obtenção de compostos ativos como penicilina, estatinas e ciclosporinas (PITT; HOCKING, 2009; KELLER et al., 2005). Diferenças no sabor e na qualidade do alimento têm sido observadas devido ao crescimento de fungos. Cereais e amêndoas estão sempre expostos a uma grande variedade de microrganismos, provenientes de insetos, água, solo, poeira e animais. A quantidade e o tipo de microrganismos encontrados dependem da resistência de cada alimento, assim como das condições climáticas (GONÇALEZ et al., 2008). Muitos alimentos apresentam um grupo específico de fungos deterioradores, composta por não mais de 20 espécies, chamada microbiota associada (FILTEGORG et al., 1996).

Os impactos econômicos causados pela deterioração fúngica incluem a diminuição do poder germinativo, alterações no sabor e no aroma, descoloração e mudanças químicas e nutricionais (PASTER; BULLERMAN, 1988). A deterioração das propriedades sensoriais é frequentemente devido à produção de exoenzimas durante o crescimento fúngico. Os fungos podem produzir um grande número de enzimas (lipase, proteases, carboidrases). Uma vez no interior do alimento estas enzimas podem continuar suas atividades independentes da destruição ou remoção do micélio (FILTENBORG et al., 1996). Durante a multiplicação dos

fungos, além destas alterações relatadas previamente, muitas espécies são capazes de produzir substâncias voláteis, as quais afetam a qualidade sensorial de alimentos e bebidas, e metabolitos tóxicos tanto para os animais como para os homens. A descoberta destas substâncias tóxicas, chamadas micotoxinas, aumentou sensivelmente o número de pesquisas sobre este tema (PITT; HOCKING, 2009; SAMSON et al., 2002).

A contaminação dos alimentos pode acontecer no campo, antes ou após a colheita, durante o transporte e o armazenamento do produto. A exposição humana às micotoxinas por alimentos contaminados é questão de saúde pública no mundo todo (CALDAS et al., 2002).

O conhecimento da microbiota associada a um determinado produto ajuda a prevenir os riscos de contaminação e facilita o foco da pesquisa para as micotoxinas presentes. As micotoxinas que contaminam um determinado alimento é dependente de fatores intrínsecos e parâmetros de processamento e armazenamento do alimento (FILTENBORG et al., 1996). Mais de 25% da produção mundial de grãos estão contaminados com micotoxinas. Existem mais de 300 tipos diferentes de micotoxinas, mas as técnicas de análise existentes detectam não mais que cerca de 30 principais toxinas. Além disso a amostragem para análise é uma etapa extremamente delicada, e é a fonte de possíveis erros. Um outro ponto, são as possíveis sinergias entre as micotoxinas, pois várias micotoxinas em baixas concentrações podem causar danos mais sérios que uma determinada toxina em dose mais elevada (SURAI et al., 2008).

Muitas espécies de fungos filamentosos são encontradas em alimentos, e dentre elas são as espécies de *Aspergillus section flavi*. Os aspergilos são pertencentes à classe dos hifomicetos, apresentam colônias com diferentes colorações, possuem grandes hifas com paredes espessas das quais emergem os conidióforos, vesículas esféricas com estruturas chamadas de métulas e fiáides que originam os conídios (esporos fúngicos assexuais). Muitas espécies são

xerofílicas e capazes de deteriorar alimentos que estejam com atividade de água acima dos limites seguros. O gênero *Aspergillus* foi descoberto há quase 300 anos e é considerado um dos mais importantes e conhecidos gêneros, pois neste se encontram as espécies mais comuns relacionadas com a deterioração de alimentos nos países localizados nos trópicos, com caráter tóxico patogênico ao homem e aos animais (KLICH; PITT, 1988; PITT, 1989).

Os *Aspergillus* sp., são capazes de crescer em temperaturas mais elevadas e atividade de água mais baixas que outras espécies, requerem maior tempo para esporular e produzem esporos mais resistentes a luz e aos compostos químicos. Dentro deste gênero encontram-se as seções *Flavi*, *Nigri* e *Circumdati*, as quais possuem as espécies produtoras de aflatoxinas, ocratoxinas e as fumonisinas, além de diversos outros metabólitos tóxicos. As principais espécies pertencentes ao grupo *Aspergillus* section *flavi* são: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. oryzae* e *A. sojae* (FRISVAD et al., 2008; FEIBELMAN et al., 1998).

## **2.4 Micotoxinas**

Micotoxinas são substâncias tóxicas produzidas durante o metabolismo secundário de fungos filamentosos que contaminam os alimentos, muito variadas no modo de ação, estrutura química e propriedades toxicológicas. São sintetizadas sob determinadas condições, algumas delas permanecem no micélio fungico, ao passo que a maior parte é secretada no substrato. A maioria das micotoxinas são resistentes à tratamentos físicos e químicos, sendo que uma vez formadas sofrem poucas alterações no processamento e estocagem (FILTENBORG et al., 1996).

Os metabólitos secundários são compostos frequentemente bioativos, de baixo peso molecular e relacionados a partes do ciclo de vida do fungo. Os microrganismos se desenvolvem bem sem a síntese destes metabólitos, ao contrário dos metabólitos primários que são essenciais para os mesmos, os metabólitos secundários podem inibir o crescimento de bactérias, fungos,

parasitas e insetos, assim como causar malefícios aos humanos, desenvolvendo células tumorais, imunossuprimindo as enzimas e causando efeitos mutagênicos e teratogênicos (KELLER et al., 2005; BENNETT; KLICH, 2003).

O termo micotoxina deriva do termo grego *mikes* (fungo) e do latim *toxicum* (veneno), ou seja, toxina produzida por fungos em condições específicas. Atualmente cerca de 300 micotoxinas já foram relatadas, sendo que as mais estudadas são: aflatoxinas e ocratoxinas, resultantes do metabolismo de espécies do gênero *Aspergillus* (PITT; HOCKING, 2009). Além disso têm sido estudadas: a zearalenona, fumonisinas e deoxinivalenol, resultantes do metabolismo de espécies de *Fusarium* (CAVALIERE et al., 2007b); o ácido ciclopiazônico, produzido por *Aspergillus flavus* (PITT; HOCKING, 2009), o ergot produzidas pelo gênero *Claviceps* (MOHAMED et al., 2006), entre outras.

#### **2.4.1. Características gerais das aflatoxinas**

As pesquisas tiveram início no ano de 1960, na Inglaterra, quando aves alimentadas com rações a base de amendoim, provenientes do Brasil e da África, foram intoxicadas, causando a morte de milhares de perus e patos. Este surto ficou conhecido como “Turkey X Disease” (HUSSEIN; BRASEL, 2001). Em 1961 *Aspergillus flavus* foi isolado destas amostras de ração e por técnicas cromatográficas as aflatoxinas foram detectadas (KELLER et al., 2005).

As aflatoxinas representam o grupo de micotoxinas com mais relatos em alimentos e com maior risco de toxicidez à saúde humana e do animal, com potentes efeitos carcinogênicos (WOOD, 1992). Estas toxinas afetam a saúde pública e a agro-economia, sendo responsáveis pela perda de milhões de dólares ao ano (HUSSEIN; BRASEL, 2001).

Já foram isolados de 15 a 20 compostos denominados aflatoxinas, mas apenas 6 são estudados do ponto de vista toxicológico. Esses compostos são denominados AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> (Figura 21) e aflatoxinas M<sub>1</sub> e M<sub>2</sub> A

aflatoxina M<sub>1</sub> é um metabólito da aflatoxina B<sub>1</sub> em humanos e animais. A exposição humana à aflatoxina M<sub>1</sub> ocorre principalmente através do consumo de leite contaminado, incluindo leite materno. As letras referem-se à cor que emitem (blue ou green) e os valores 1 e 2 se referem a distancia em relação a migração dos compostos observados após cromatografia em camada delgada sob luz ultra violeta de comprimento de onda de 365 nanômetros (nm) (KLISCH, 2007; KELLER et al., 2005). De acordo com IARC (2002), há evidencias suficientes para concluir que a AFB<sub>1</sub> causa câncer em humanos, justificando-se assim o status Grupo 1 – potencialmente carcinogênica.

As aflatoxinas são moléculas de dihidrofuranos unidas a anéis cumarínicos, instáveis à luz, e degradáveis em elevadas temperaturas. E apresentam intensa fluorescência em determinados comprimentos de onda (KLISCH, 2007). São substancias apolares solúveis em clorofórmio, metanol e acetoneitrila (YU et al., 2004).

São compostos heterocíclicos, do metabolismo secundário das espécies de *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, e *A. nomius* (FEIBELMAN et al., 1998; Klish; Pitt, 1988). Mais recentemente *A. pseudotamarii* também foi descrito como produtor de aflatoxina B<sub>1</sub> (ITO et al., 2001). Há relatos também da produção de aflatoxinas por *A. toxicarius*, *A. parvisclerotigenus*, *A. bombycis*, *A. rambellii* e *E. venezuelensis* (FRISVAD et al., 2005). Estudos feitos por Cary et al. (2005), mostraram a produção de aflatoxinas por *A. ochraceocephalus* e *Emericella astellata*.

*A. flavus* produz somente duas aflatoxinas: AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub>. Existem isolados de *A. flavus* que não produzem aflatoxinas, outras que produzem também ácido ciclopiazônico (CPA) (KLICH; PITT, 1988). *A. parasiticus* e *A. nomius* são produtores das quatro aflatoxinas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>), mas não produzem CPA. *A. parasiticus* é geralmente maior produtor de aflatoxinas do que *A. flavus* (PITT; HOCKING, 2009).

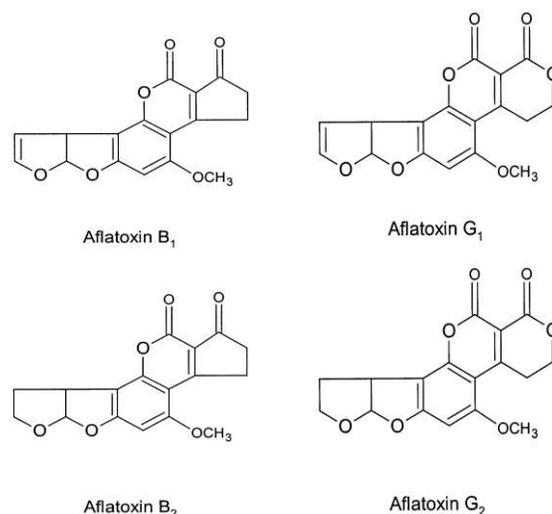


Figura 21. Estrutura química das aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>.

#### 2.4.2. Aspectos toxicocinéticos e toxicodinâmicos

Aflatoxinas são toxinas hepatotóxicas, que possuem caráter carcinogênico, mutagênico e teratogênico e constitui um dos grandes problemas na agricultura, principalmente nas regiões tropicais, causando sérios efeitos nocivos em animais e humanos (IARC, 2002; BINDER et al., 2007). Esses sintomas dependem da dose e frequência de exposição, da espécie, sexo, idade, genética, dieta e estado nutricional do animal. A gravidade da intoxicação por micotoxinas pode ser agravada também por fatores como deficiência de vitamina A, alcoolismo, doenças infecciosas e desnutrição (BENNETT; KLICH, 2003).

A intoxicação pode ser aguda ou crônica, dependendo da concentração ingerida. As enzimas hepáticas fazem a ativação metabólica das moléculas da toxina surtindo os efeitos toxicológicos (HUSSEIN; BRASEL, 2001). O efeito agudo ocorre devido à ingestão de doses elevadas, sendo irreversível, de percepção rápida dos sintomas e pode levar o animal ou humano á morte. Os efeitos crônicos são resultados na ingestão de menores doses durante um longo período de tempo e causa distúrbio em órgãos, geralmente o fígado (IARC, 2002; BENNETT; KLICH, 2003).

São facilmente absorvidas no trato gastrointestinal, sendo então distribuídas pelo organismo após caírem na corrente sanguínea, seguindo para diferentes órgãos, como rins, músculos, tecidos adiposos e fígado, onde passam por biotransformação. Os sintomas clínicos da aflatoxicose incluem diarreia sanguinolenta, cirrose, síndrome de Reye (encefalopatia com degeneração gordurosa do cérebro), hemorragia nos rins, diminuição do sistema imunológico (OLIVEIRA; GERMANO, 1997; MOSS, 2002), perda de apetite e peso, anormalidades neurológicas, palidez, convulsões, necrose e aumento do tamanho do fígado. Exposições prolongadas a baixas doses resultam em tumores no fígado, prejudicam o sistema nervoso central, causam doenças de pele e defeitos hormonais (PITT 1989). A alta concentração de compostos no fígado se dá devido à alta permeabilidade da membrana do hepatócito, nos primeiros momentos da biotransformação. Já na circulação sistêmica as aflatoxinas se ligam a componentes sanguíneos, como eritrócitos e proteínas plasmáticas (PACHECO; SCUSSEL, 2006).

A ação tóxica e carcinogênica da AFB<sub>1</sub> está relacionada com sua conversão metabólica em vários tecidos, produzindo compostos altamente reativos, chamados de AFB<sub>1</sub>-8-9-epóxido. A toxina é biotransformada pela citocromo P450 presente no fígado e em outros tecidos e também pode ser convertida via reações de co-oxidação pela prostaglandina H sintetase. É considerada um pró-carcinógeno, que requer ativação metabólica para manifestar seus efeitos tóxicos (GONÇALEZ, 2008; MURPHY et al., 2006). Na primeira fase da biotransformação ocorrem reações de oxidação, hidrólise e redução, tornando as moléculas mais hidrofílicas, depois numa segunda fase os compostos são conjugados à substâncias endógenas como sulfatos, glutatona e grupos metil, e em seguida são excretadas. A biotransformação da AFB<sub>1</sub> consiste em alterações moleculares reversíveis e irreversíveis. As reversíveis são mediadas por enzimas citosólicas NADPH-dependentes, formando aflatoxicol, uma forma de

armazenamento da AFB<sub>1</sub>. As reações irreversíveis formam o AFB<sub>1</sub>-8-9-epóxido (SANTOS, 2004).

AFB<sub>1</sub>-8-9-epóxido é altamente reativa, um composto eletrofílico capaz de reagir através de ligações covalentes, com moléculas de DNA (ácido desoxiribonucléico), RNA (ácido ribonucléico) e proteínas. (AMARAL; JÚNIOR, 2006). A reação com o DNA ocorre através da ligação com guaninas, formando ductos de DNA (aflatoxina-N7-guanina) no gene supressor de tumores p53, ao nível do códon 249. A AFB<sub>1</sub> se liga a estes resíduos de guanina de sequências alternadas G-C do DNA, formando ligações extra-DNA, podendo levar a mutações pela alteração da estrutura e gerar transversões de G:C para A:T (YU et al., 1990; GONÇALEZ et al., 2001; MOSS, 2002), além da formação dos ductos aflatoxinas-N7-guanina, que geram mutações e desenvolvimento de câncer. O produto reativo 8-9-epóxido também pode se ligar à albumina sérica, formando o composto aflatoxinas-N-lisina, que podem interagir sinergicamente com o vírus da hepatite B, causando carcinoma hepatocelular (OLIVEIRA; GERMANO, 1997; AMARAL; JÚNIOR, 2006; MURPHY et al., 2006).

Biomonitoramentos podem ser feitos através de sangue, leite e urina de pessoas infectadas com aflatoxinas. Ductos de DNA e proteínas podem ser monitorados pelo sangue, e o AFB<sub>1</sub>-N7-guanina representa o mais confiável biomarcador em urina, servindo como indício que a pessoa tem o caminho bioquímico necessário para a carcinogênese. A AFB<sub>1</sub>-8-9-epóxido é conjugada com a glutathione e pode formar o composto AFB<sub>1</sub>-8-9-epóxido-glutathione, metabólito altamente solúvel e de fácil excreção, que não apresenta caráter carcinogênico. A ação da enzima glutathione-transferase que faz esta ligação, assim como a inibição da formação de epóxidos de aflatoxinas, pela ruptura do citocromo P450 ou dos ductos de DNA formados, são estratégias para a prevenção das mutações prejudiciais e carcinogênese (MURPHY et al., 2006; SANTOS, 2004).

## **2.5 Fatores que afetam o crescimento fúngico e a produção de aflatoxinas**

As aflatoxinas podem infectar vários produtos vegetais como milho, cereais, castanhas, amendoins, frutas secas e especiarias. A incidência destas toxinas é dependente de vários fatores, tais como: stress ou danos à cultura, presença de insetos, tipos de solo e fatores intrínsecos e extrínsecos (CAVALIERE et al., 2007a).

Os principais fatores intrínsecos que afetam o crescimento de fungos e a produção de aflatoxinas nos alimentos são: umidade, atividade de água, pH e a composição nutricional. Como fatores extrínsecos, encontram-se a temperatura do processamento e de estocagem, umidade relativa do ar, tempo de armazenagem, microclima, competição entre espécies, entre outros. Esses fatores não atuam isoladamente sobre os microrganismos, mas sim de forma combinada (KLISCH, 2007).

### **2.5.1. Umidade**

A água é um dos principais constituintes de todos os organismos vivos, encontra-se em quantidade muito elevada na maioria dos alimentos, afetando todas as suas propriedades físicas. Ela pode agir como solvente, componente absorvido (reduzindo à oxidação), plastificante (dando textura aos produtos) e como reagente (JARDIM, 1997; QUAST, 1968).

Umidade é a água total contida num produto. Pode ser encontrada na forma ligada e não-ligada. A água ligada é comprometida com ligações químicas, dissolução de solutos, e outros. A água não ligada é a quantidade de água livre disponível, e está relacionado com o termo atividade de água (JARDIM, 1997).

Quando um material biológico é exposto a um ambiente com uma determinada umidade relativa do ar, ele perde ou ganha água para ajustar sua própria umidade a uma condição de equilíbrio com o ambiente. Isto ocorre quando

a pressão de vapor d'água na superfície do material se iguala à pressão de vapor d'água do ar que o envolve (FADINI et al., 2006).

### 2.5.2 Atividade de água

É possível estabelecer uma relação estreita entre o teor de água livre no alimento e sua conservação. O teor de água livre é expresso pela atividade de água ( $a_w$ ) que é dada pela relação entre a pressão do vapor de água em equilíbrio sobre o alimento e a pressão de vapor de água pura a uma mesma temperatura (NETO; QUAST, 1975; PARK et al., 2001). Como a atividade de água nos alimentos está relacionada ao crescimento microbiológico e as reações bioquímicas, a retirada de água reduz a carga microbiana e impede reações bioquímicas que dependem da umidade, sendo esta desidratação uma forma de conservação dos alimentos (PARK et al., 2001).

A atividade de água é o fator ambiental dominante que governa a estabilidade ou a deterioração. O conhecimento desta relação permite o conhecimento tanto da vida de prateleira quanto do potencial de deterioração fúngica. Sua medida é feita em escala de 0 a 1 (PITT; HOCKING, 2009).

A armazenagem é uma das etapas críticas, pois nesta fase poderá ocorrer o desenvolvimento do fungo e a produção de aflatoxinas dependendo das condições aplicadas (CAMPO/PAS, 2004). Para uma armazenagem segura quanto à produção de aflatoxinas, a atividade de água do alimento deve estar abaixo de 0,70 pois poucos fungos têm a capacidade de crescer em atividade de água abaixo deste valor. As espécies de *Aspergillus flavus*, requerem uma atividade de água mínima em torno de 0,78 a 33°C e 0,84 a 25°C para crescer e acima de 0,87 para a produção de aflatoxinas. As espécies de *Aspergillus parasiticus* requerem uma atividade de água mínima em torno de 0,80 a 37°C e 0,82 a 25°C para crescer e 0,86 para produzir toxinas (PITT; HOCKING, 2009). As espécies de *Aspergillus nomius*, ligeiramente menos xerofílicas, requerem valores

mínimos de atividade de água para germinação e crescimento de 0,83 a 25-30°C e 0,81 a 37°C, respectivamente.

### **2.5.3. Potencial hidrogeniônico (pH)**

Em altas atividades de água os fungos competem com as bactérias como deteriorantes de alimentos, assim o pH tem um papel decisivo nesta competição, pois há microrganismos menos tolerantes aos meios ácidos. As espécies de *Aspergillus flavus* por exemplo crescem em pH de 2,1 a 11,2, com máximo em 7,5, as espécies de *Aspergillus parasiticus* nas faixa de pH de 2,4 a 10,5, com ótimo para a produção de aflatoxinas entre 3,5 a 8,0 (PITT; HOCKING, 2009).

### **2.5.4. A composição nutricional**

O estado nutricional da maioria dos alimentos é adequado ao crescimento de microrganismos deteriorantes. Para o metabolismo dos fungos o substrato mais adequado é o rico em carboidratos enquanto as bactérias preferem alimentos com altos teores de proteínas (PITT; HOCKING, 2009). Glicose e sacarose são fontes de carbono que favorecem a produção de aflatoxinas, ao passo que a frutose, o manitol e a galactose conferem a produção de níveis mais baixos de aflatoxinas. Fontes de nitrogênio como extrato de levedura e peptona são os que mais favorecem a produção da toxina (KLICH, 2007).

A castanha do Brasil que inclui proteínas, carboidratos e lipídeos em sua composição, apresenta as condições necessárias para o crescimento dos microrganismos, assim como a possível produção de aflatoxinas. As características genéticas de algumas nozes podem influenciar na resistência dos processos de contaminação e produção de aflatoxinas (PACHECO; SCUSSEL, 2007).

### 2.5.5. Temperatura

A temperatura é menos restritiva que a umidade, mas é um fator que interfere diretamente no desenvolvimento fúngico. O processo de armazenagem a temperatura ambiente, com média de 25-30°C nas regiões tropicais favorece o crescimento de várias espécies (ARRUS, 2005a).

A temperatura relatada como mais baixa para crescimento fungico é - 7°C a 0°C para espécies como *Fusarium*, *Cladosporium*, *Penicillium*. Alimentos não esterilizados e estocados a 5°C em refrigeradores domésticos, onde prevalecem condições de alta umidade, são eventualmente deteriorados por fungos destes gêneros. *Aspergillus flavus* e *Aspergillus Níger* crescem em temperaturas de 8° a 45°C (PITT; HOCKING, 2009).

A influência da temperatura na preservação e degradação de fungos tem duas vertentes, a temperatura durante o processamento e a temperatura de armazenamento. Várias espécies crescem em condições de armazenagem com temperatura média de 30°C em regiões tropicais (PACHECO; SCUSSEL, 2007). Os valores de temperatura mínima, ótima e máxima para crescimento de bolores varia para cada espécie (Tabela 3).

Tabela 3. Valores de temperatura favoráveis para o desenvolvimento de determinadas espécies fúngicas.

<b>Fungos</b>	<b>Mínima (T°C)</b>	<b>Ótima (T°C)</b>	<b>Máxima (T°C)</b>
<i>A. restrictus</i>	5 - 10	10 - 35	40 – 45
<i>A. candidus</i>	10 -15	45 - 50	50 – 55
<i>Penicillium spp.</i>	-5 - 0	20 - 25	35 – 40
<i>A. glaucus</i>	0 – 5	30 - 35	40 – 45
<i>A. parasiticus</i>	12	32	42
<i>A. flavus</i>	10 - 12	33	43 – 48

(CAMPO/PAS, 2004; PITT; HOCKING, 2009).

De acordo com Pitt; Hocking (2009), as espécies de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, têm como temperatura ótima para a produção de aflatoxinas a faixa de 30° a 40°C.

#### **2.5.6. Tensão de gás**

Fungos deteriorantes, como todos os outros fungos filamentosos exigem certa concentração de oxigênio absoluto. A quantidade de oxigênio disponível e a tensão de oxigênio determinam o crescimento microbiano (PITT; HOCKING, 2009).

Alguns fungos conseguem crescer em baixas concentrações de oxigênio, não sendo estas menores que 0,2%. A maioria dos fungos deteriorantes parece ser sensível aos altos níveis de dióxido de carbono e nitrogênio. Misturas de gases têm sido eficientes para a redução do oxigênio, formando ambientes com atmosfera controlada, as quais podem ser eficientes para o transporte e armazenamento de alimentos, prevenindo a contaminação por microrganismos e possíveis toxinas (PASTER; BULLERMAN, 1988; PITT; HOCKING, 2009).

#### **2.6. Prevenção, inibição e detoxificação**

Abordagens para prevenir estas micotoxinas incluem estratégias de controle dos fatores intrínsecos e extrínsecos para evitar a contaminação fúngica na pré-colheita e pós-colheita. Através da melhoria nas condições de secagem e armazenamento, cuidados com manejo do campo, rotação de culturas e agentes naturais e químicos, como a aplicação de fungicidas no momento certo e irradiação. Estas práticas têm sido eficientes na prevenção e controle do crescimento de fungos toxigênicos e micotoxinas (KABAK et al., 2006). Alguns métodos com substâncias químicas e processos tecnológicos têm sido testados, por exemplo, o uso de materiais adsorventes nos alimentos, adição de enzimas ou microrganismos capazes de desintoxicar alguns tipos de toxinas (BINDER et al., 2007).

Estudos realizados por Elis et al. (1993), comprovaram que a sinergia de condições específicas de atividade de água, temperatura e pH associadas a redução dos níveis de oxigênio e elevação dos níveis de dióxido de carbono, tiveram efeito inibitório na produção de aflatoxinas.

Yin et al. (2008), estudaram diversas espécies bacterianas como *Lactobacillus* spp., *Pseudomonas* spp., e *Bacillus subtilis* com capacidade de inibir o crescimento de *A. flavus* e produção de aflatoxinas em laboratório. Embora esses isolados tenham sido altamente eficazes no laboratório, no campo a condição foi diferente.

A interação com outros fungos filamentosos também diminui a capacidade de produção de aflatoxinas por *A. flavus* e *A. parasiticus*. Vários estudos têm sido realizados com *A. niger* que inibe a produção de aflatoxinas em amostras de mandioca, milho e em meio ágar extrato de malte (MEA). *A. niger* foi capaz de diminuir o pH do meio, suficientemente para inibir a produção de aflatoxinas (KLICH, 2007), porém têm se mostrado que estas espécies podem produzir a ocratoxina A e fumonisina B<sub>2</sub>. Maiores sucessos no controle biológico foram obtidos utilizando bioinseticidas produzidos a partir de *A. flavus* não toxigênicas em experimentos no campo com amendoim e milho, havendo uma redução de 70-90% nos valores de aflatoxinas. As cepas não aflatoxigênicas excluem naturalmente as cepas toxigênicas por competição com o substrato, mas para esta competição ser eficiente, as não toxigênicas precisam ser predominantes no ambiente agrícola (YIN et al., 2008).

De acordo com Kabak et al. (2006), vários extratos naturais de plantas e óleos de especiarias como orégano, cebola, canela, erva-cidreira e hortelã são tóxicos aos fungos e podem inibir o crescimento fúngico durante a colheita. Estudos realizados por Matan et al. (2006) mostraram que vapor de óleo essencial de plantas como cravo e canela, em embalagens com baixas concentrações de oxigênio e elevadas concentrações de dióxido de carbono, inibiram o crescimento

de *A. flavus* e outras espécies. Ao passo que Costa et al. (2008), utilizando extrato do Nim (*Azadirachta indica*) verificaram a inibição da produção de AFB<sub>1</sub> a partir de concentração de 2,0% mas não inibiram o crescimento micelial de *A. flavus* e *A. parasiticus*.

Substâncias isoladas de plantas como flavonóides, isoflavonóides e biflavonóides se mostraram biologicamente ativas contra *A. flavus* e *A. parasiticus* (GONÇALEZ et al., 2001). Lee et al. (2001) testaram 77 compostos naturais, dentre eles, antraquinonas, cumarinas e flavonóides tipo flavona, e estes mostraram-se potentes inibidores da formação de AFB<sub>1</sub>-8-9-epóxido (produto mutagênico metabolicamente ativado).

Em relação a radiação, Klich (2007) estudou os efeitos de radiação Gama. Valores entre 2kGy a 4kGy inibiram o crescimento fúngico e inativaram a produção de aflatoxinas em amostras de milho, amendoim e meio ágar YESA.

Diversas indústrias vêm fazendo o uso de radiação até 10kGy para a conservação dos alimentos, pois esta parece ter efeito sobre os conídios fungicos. Contudo os resultados dos estudos realizados parecem ser contraditórios. Paster; Bullerman (1988) conseguiram uma diminuição nos teores de aflatoxinas em cevada e milho, mas nos grãos de trigo, a produção de aflatoxinas foi maior nos grãos irradiados. Aziz; Moussa (2002) analisaram os efeitos da radiação gama em diversas frutas contaminadas com fungos filamentosos e micotoxinas (aflatoxinas, ocratoxinas, citrinina, ácido ciclopiazônico e ácido penicílico) por diferentes períodos de tempo e doses de irradiação, obtendo sucesso na diminuição do número de unidades formadoras de colônias a 1,5kGy e todas as micotoxinas analisadas foram significativamente degradadas de 3,5kGy a 5kGy.

Lee; Jun-ho (2006), estudaram os efeitos do aquecimento em amostras de trigo contaminadas com aflatoxina B<sub>1</sub>, e os níveis desta toxina foram reduzidos em 50% a 150°C e 90% a 200°C. Raters; Matissek (2008) conseguiram degradar quase totalmente as aflatoxinas expostas a 160°C. Contudo alimentos ricos

nutricionalmente, ao receberem tais processos (aquecimento e radiação) como alternativa para a detoxificação, podem ter suas qualidades nutricionais e sensoriais alteradas.

A eficiência de um método na detoxificação de micotoxinas depende da natureza do alimento, das condições ambientais, como umidade e temperatura, e do tipo de micotoxina e sua concentração no alimento. Kabak et al. (2006) estudaram compostos químicos como ácido clorídrico, amônia, peróxido de hidrogênio, bissulfito de sódio e cloro e obtiveram bons resultados na detoxificação de aflatoxinas, mas embora pareça ser eficiente, sua utilização diminui o valor nutricional dos alimentos e produz derivados tóxicos nos mesmos. Alimentos também podem ser detoxificados com produtos a base de hidróxido de amônio e peróxido de hidrogênio ( $\text{NH}_4\text{OH}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) em taxas de 1% (SALEEMULLAH et al., 2006).

Abordagens mais recentes têm demonstrado o uso de substâncias adsorventes de micotoxinas na dieta. Estes vão sequestrar e diminuir a biodisponibilidade das micotoxinas no trato gastrointestinal, sendo os mais eficientes, carbono ativado, hidróxido de aluminossilicato e polímeros especiais. A eficiência do adsorvente depende da micotoxina (KABAK et al., 2006).

## **2.7. Ocorrência de fungos e aflatoxinas em castanhas do Brasil**

Tem sido freqüente estudos que associam diversos fungos filamentosos, inclusive os aflatoxigênicos, com amostras de “nozes de árvores”, incluindo a castanha do Brasil (BAYMAN et al., 2002). Os primeiros relatos de contaminação fúngica em castanha do Brasil ocorreram na década de 60, nas quais foram isoladas espécies do gênero *Aspergillus* que causaram podridão em castanhas (PACHECO; SCUSSEL, 2007).

A floresta Amazônica é dotada de fatores que favorecem o desenvolvimento de fungos filamentosos e a produção de toxinas, mostrando-se

necessárias as boas práticas, que vão desde o manejo dos ouriços na floresta até as etapas de beneficiamento, para evitar a produção de aflatoxinas, uma vez que as cepas aflatoxigênicas já contaminaram o produto (CAMPO/PAS, 2004).

A castanha pode estar susceptível a danos mecânicos que podem ocorrer na floresta, durante o corte dos ouriços ou pela ação de roedores e insetos, durante o transporte e até nas usinas de beneficiamento. Estes danos mecânicos favorecem a absorção de umidade, facilitando a infecção dos fungos no interior do alimento, que é altamente nutritivo (PACHECO; SCUSSEL, 2006).

Outro fator importante na castanha que favorece o desenvolvimento fúngico é a distribuição heterogênea de calor no interior da castanha durante a secagem. Esta diferença pode causar variação na temperatura e na umidade podendo posteriormente ser misturados lotes de umidade diferente durante a armazenagem, e favorecer a atividade dos microrganismos. A estabilidade da castanha em relação a sua umidade é considerada segura abaixo de 13% (CAMPO/PAS, 2004).

Arrus et al. (2005a) em seu estudo mostraram que as condições ótimas de crescimento para *Aspergillus flavus* em castanhas eram atividade de água em torno de 0,91, umidade do alimento 8,6%, umidade relativa 97% e temperatura 25-30°C, após 30 dias de armazenamento. Sob essas condições estes autores encontraram valores máximos de aflatoxina B<sub>1</sub> (4483µg/kg). De acordo com Campo/Pas (2004) o armazenamento superior a 45 dias em condições favoráveis é preocupante.

Arrus et al. (2005a) recomendaram que as castanhas descascadas devem ser mantidas em umidade em torno de 4,5% e 0,68 de atividade de água e as castanhas com casca em torno de 5,0% de umidade e 0,75 de a<sub>w</sub> em todas as etapas da cadeia produtiva para evitar alta contaminação por aflatoxinas. As amêndoas desidratadas (com umidade em torno de 3%) e com atividade de água abaixo de 0,70, preferencialmente embaladas à vácuo com baixa permeabilidade

de oxigênio, permaneceram estáveis durante o armazenamento por até 180 dias (SILVA; MASSAIOLI, 2003).

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

Bayman et al. (2002) encontraram uma grande variedade de fungos em castanhas com cascas vendidas no mercado na Califórnia, dentre elas, os gêneros mais frequentes foram: *Aspergillus*, *Rhizopus* e *Penicillium*. As espécies mais comuns de *Aspergillus*, *A. niger* (42%), *A. flavus* (21%) *A. nidulans* (9%) e *A. tamarii* (7%). Neste estudo os autores concluíram que a colonização interna dos fungos na castanha do Brasil estava em níveis maiores que as nozes, pistaches e outras amêndoas.

No Brasil, Souza (2003) encontrou as espécies de *Aspergillus* em várias unidades de beneficiamento. Da mesma forma Pacheco; scussel (2006) verificaram que os fungos mais frequentes foram do gênero *Penicillium* e *Aspergillus*. Contudo estes autores (SOUZA, 2003; PACHECO; SCUSSEL, 2006) não identificaram as espécies presentes e a capacidade destes fungos produzirem aflatoxinas.

Freire et al. (2000) analisaram amostras de Belém e isolaram diversas espécies de fungos nas amêndoas de castanha do Brasil, sendo as mais frequentes, *A. flavus* (27,5%), *A. niger* (12,0%), *Penicillium citrinum* (16,0%) e *Penicillium glabrum* (21,5%), e em menores quantidades *Rhizopus oryzae*, *Fusarium oxysporum*, *Acremonium curvulum*, *Exophiala* sp., *Scopulariopsis* sp., *Thielavia terricola*, *Trichoderma citrinoviride* e *Pseudoallescheria boydii*. Já em outro estudo, Freire; Offord (2002), além de bolores, isolaram leveduras como *Pichia* sp. e *Rhodotorula*.

Pinheiro (2004) estudou a variabilidade genética de castanhas e isolou espécies de *Aspergillus flavus* em castanhas coletadas no estado do Amazonas. Arrus (2005b), analisaram 15 ouriços da floresta amazônica do Peru, ouriços de apenas um lote continham *A. flavus* e estes eram potencialmente aflatoxigênicos.

Olsen et al. (2008) analisando amostras de castanha do Brasil comercializadas em Nápoles na Itália, encontraram 22 isolados de *Aspergillus section flavi*, dos quais 19 eram *Aspergillus flavus* e 3 eram *Aspergillus nomius*. Em seu estudo analisaram também o potencial de produção de toxina pelos isolados e 10 *A. flavus* eram potencialmente produtoras de aflatoxina do tipo B, e dentre os isolados de *A. nomius* todos eram potencialmente produtores de aflatoxinas B e G.

Simões (2004) analisou amostras do Estado do Amazonas nos municípios de Democracia e Capanã Grande antes e depois da aplicação das Boas Práticas de Manejo (BPM). Antes das BPM 98% das amostras estavam contaminadas com fungos filamentosos. Da totalidade de isolados (130) constatou-se que os fungos de maior frequência foram *Aspergillus pulverulentus* (21%), *Aspergillus niger* (18%), *Aspergillus flavo-furcatis* (15%) e *Micelia sterilia* (15%). Com relação aos níveis de aflatoxinas, 10 amostras do município de Democracia estavam contaminadas com média de 41,4 µg/kg e no município de Capanã Grande, quatro amostras estavam contaminadas, com média de 3,9 µg/kg. O autor verificou que a região de Democracia havia maior risco de contaminação por fungos produtores de aflatoxinas, principalmente pelos frutos permanecerem maior tempo em contato com o chão da floresta na fase de coleta. Após as boas práticas os isolados de fungos diminuíram e só uma amostra apresentou nível de aflatoxina de 1,1 µg/kg.

Estudos realizados por Pacheco; Scussel (2007) avaliaram duas safras diferentes de amostras de castanha do Brasil processadas, coletadas em diferentes locais da Floresta Amazônica (Pará, Maranhão, Amazonas, Acre,

Rondônia, Roraima e Amapá) em 2006 e 2007. A contaminação de aflatoxinas totais variou de 1,2 – 11,5µg/kg em castanhas com casca. Em comparação com as amostras descascadas, apenas 3 amostras estavam contaminadas (4,2; 7,4 e 11,2µg/kg de aflatoxinas totais). Segundo os autores, a vantagem do descascamento é que as castanhas passam por três etapas de seleção no beneficiamento, permitindo o descarte das deterioradas.

Caldas et al. (2002) analisaram apenas 9 amostras de castanha do Brasil, e 3 estavam positivas, com níveis de 48 a 294µg/kg e média de 27 µg/kg de aflatoxina totais. Freire et al. (2000) analisaram 4 amostras classificando-as como de boa e baixa qualidade. Estes autores detectaram aflatoxinas por Cromatografia em Camada Delgada e depois quantitativamente por HPLC. Somente nas amostras de baixa qualidade foram detectadas aflatoxinas totais em níveis de 29,2µg/kg.

Após verificar a coloração amarela em amostras de castanha sob luz ultravioleta de 360nm, Steiner et al. (1992) analisaram 8kg de castanha e encontraram níveis de 4µg/kg para aflatoxina B<sub>1</sub> e 1,2 µg/kg para aflatoxina G<sub>1</sub>. Thuvander et al. (2001) analisaram 17 amostras de castanha obtidas na Suécia, utilizando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com LOD (Limite de detecção) de 0,01µg/kg, nas quais 7 amostras estavam contaminadas com níveis de até 2500µg/kg.

De Mello; Scussel (2007), analisaram 65kg de amostras de castanha coletadas no Amazonas, a partir de dois diferentes métodos, Cromatografia em Camada Delgada (CCD) com LOD de 0,21, 0,26, 0,23, 0,25µg/kg para AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> e Cromatografia Líquida associada ao Detector de Massas (LC-MS/MS), com LOD de 0,08, 0,09, 0,10 e 0,12µg/kg, para AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> respectivamente. Neste estudo foram detectados níveis médios de 5,2 µg/kg de aflatoxina B<sub>1</sub>.

Em outro estudo analisando matéria prima para a fabricação de rações, Nagashiro et al. (2001) avaliaram bolos brancos feitos a partir de castanhas de boa aparência e bolos pretos feitos a partir de castanhas com aspecto “podre” e encontrou níveis que variaram de 248-746 µg/kg em bolos pretos e 56-88 µg/kg nos bolos brancos. Os autores afirmaram que apesar da casca ser rígida e conferir proteção à amêndoa, a principal causa de elevadas contaminações podem estar relacionadas com os danos na casca.

Arrus et al. (2005b) analisaram diversas amostras de ouriços, e apesar de terem isolado *Aspergillus flavus* e este ter mostrado ser potencialmente toxigênico, não encontraram aflatoxinas nas amostras. A metodologia utilizada pelos autores foi ELISA, com limite de detecção de 1,75µg/kg para aflatoxinas totais. Candlish et al. (2001) analisando 1kg de amostras de castanha do Brasil comercializadas em mercados de Glasgow na Escócia, e Souza (2003) amostras comercializadas em Campinas também não detectaram aflatoxinas.

## **2.8 Legislações sobre a qualidade da castanha do Brasil**

De acordo com a portaria da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), novos limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos foram publicados pelo Diário Oficial da União na Resolução RDC N°7 de 18 de fevereiro de 2011. O LMT de aflatoxinas totais para castanha do Brasil com casca para consumo direto é de 20µg/kg, castanha do Brasil sem casca para consumo direto de 10µg/kg e castanha do Brasil sem casca para processamento posterior de 15µg/kg (ANVISA, 2011).

O limite máximo aceitável de aflatoxinas em alimentos difere entre os países. Mais de 50 países estabeleceram limites máximos para aflatoxinas em alimentos que variam de 0 a 50µg/kg, o que atua como barreira para exportação de inúmeros produtos (TEIXEIRA et al., 2008). No Peru, o LMT de aflatoxinas é de 10 µg/kg para todos os alimentos, na Austrália o limite é 5 µg/kg, nos Estados Unidos é 20 µg/kg e a União Européia, maior importador de castanhas brasileiras,

em 2002 havia estabelecido o limite máximo de 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para a aflatoxina B<sub>1</sub> e 4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para as aflatoxinas totais (EU, 2010).

Esses limites referem-se à parte comestível da castanha, no entanto, estudos recentes têm demonstrado que uma parte da contaminação das aflatoxinas está na casca, portanto foi indicada uma modificação, sendo estabelecidos novos limites de aceitação (EU, 2010). Para proteger a saúde dos consumidores, em 2010 a Comissão Europeia (EC) por meio da Diretiva 165/2010 estabeleceu novos limites máximos para aflatoxinas, sendo para avelãs e castanhas do Brasil, que são submetidas a processo de triagem ou tratamento físico antes do consumo humano, o limite de 8 $\mu\text{g}/\text{kg}$  para AFB<sub>1</sub> e 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$  para as AFs totais. Para avelãs e castanhas do Brasil destinadas diretamente ao consumo humano os limites foram de 5,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$  e 10,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectivamente.

### **3. OBJETIVOS**

As informações sobre a contaminação da produção brasileira de castanha por fungos produtores de toxinas, como aflatoxinas são insuficientes. No contexto atual em que a globalização da economia é uma realidade, aspectos de qualidade e principalmente higiênico-sanitários são fundamentais na aceitação de qualquer produto, especialmente aqueles destinados à alimentação humana.

#### **3.1 Objetivos gerais**

- Fazer um levantamento da microbiota da castanha do Brasil provenientes do Brasil.
- Verificar a presença de aflatoxinas nestas amostras de castanhas do Brasil.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Identificar as espécies aflatoxigênicas presentes na castanha do Brasil nas amostras provenientes da floresta do Estado do Pará e Amazonas, em diferentes etapas do processamento e de amostras provenientes do comércio do Estado de São Paulo;
- Testar a capacidade toxigênica do grupo *Aspergillus section flavi* isolados, quanto à produção de aflatoxinas;
- Quantificar os níveis de aflatoxinas encontradas nas amostras de castanha do Brasil.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Coleta de amostras de castanha do Brasil

As amostras de castanha do Brasil (analisadas separadamente amêndoa e casca) foram coletadas da floresta, de processadoras e mercados do Estado do Amazonas e Pará, e mercados e supermercados do Estado de São Paulo, entre os anos de 2008 – 2011, totalizando 143 amostras (Figura 22).



Figura 22. Regiões de coleta das amostras de castanha do Brasil (Amazonas, Pará e São Paulo).

Foram coletadas aproximadamente de 1 a 2 kg de cada amostra conforme disponível, para análise micológica e de aflatoxinas. As amostras foram transportadas até o laboratório de Micologia e Micotoxinas do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) em bolsas estéreis e armazenadas congeladas até o momento da análise.

No Estado do Pará um total de 88 amostras foram coletadas na floresta da cidade de Belém, em diferentes castanhais na região de Oriximiná, Juari e Obidos. As castanhas eram provenientes de ouriços recém colhidos e colhidos a mais de uma semana, assim como amostras visivelmente emboloradas e de boa

aparência. Nas processadoras Mauro Mutran, Benedito Mutran, Caiba e Exportadora Mundial, em diferentes etapas no beneficiamento, antes da autoclavagem, após a autoclavagem, com seleção manual, sem seleção manual, visivelmente emboloradas, após secagem em estufa e antes do processo de embalagem. No mercado Verupeso amostras vendidas a granel com casca e descascadas (Figura 23).



Figura 23. Regiões de coleta de amostras de castanha do Brasil no estado do Pará, em destaque as regiões de florestas, processadoras e mercados.

No Estado do Amazonas um total de 34 amostras foram coletadas na cidade de Manaus, na floresta de Carreiro da Várzea, Manacapuru e Fazenda Aruanã. Na processadora IBB Sabba, foram coletadas castanhas processadas e sem processamento. No mercado de Manaus e no Mercado de Cororodo foram coletadas amostras com casca e descascadas providas dos castanhais de Itacoatiara, Humaitá, Coari, Jari e Amazonas (Figura 24).



Figura 24. Regiões de coleta de amostras de castanha do Brasil no estado do Amazonas, em destaque as regiões de florestas, processadoras e mercados.

No Estado de São Paulo as 21 amostras foram coletadas em supermercados e no Mercado Municipal de Campinas e de Limeira, vendidas a granel com casca e descascadas inteiras e quebradas (Figura 25).



Figura 25. Regiões de coleta de amostras de castanha do Brasil no estado de São Paulo, em destaque a região de coleta em mercados.

#### 4.2 Análise da atividade de água

Assim que foram descascadas (empregando descascador manual específico para castanha do Brasil), as amostras foram cortadas em pedaços menores e foram realizadas medidas de atividade de água em todas as amostras coletadas, nas cascas e amêndoas, com a utilização do aparelho Aqualab, modelo 3T (Decagon,USA). As leituras foram realizadas em triplicata à  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.3 Plaqueamento das castanhas

Para a análise da micobiota, 50 diferentes castanhas representativas de cada amostra foram analisadas. As amêndoas e as cascas foram cortadas e desinfetadas superficialmente pela imersão em solução de hipoclorito de sódio 0,4% por 2 minutos, sob agitação. (PITT; HOCKING, 2009). Em seguida a solução foi descartada e 50 pedaços de amêndoas e de cascas foram dispostas em 10 placas Petri, contendo o meio de cultura Ágar Dicloran 18% Glicerol (DG18) com cloranfenicol para o isolamento dos fungos (Figura 23). As placas foram incubadas a  $25^{\circ}\text{C}$  por 5 dias e os resultados expressos em porcentagem de amêndoas e cascas infectadas, conforme a metodologia de Pitt; Hocking (2009).

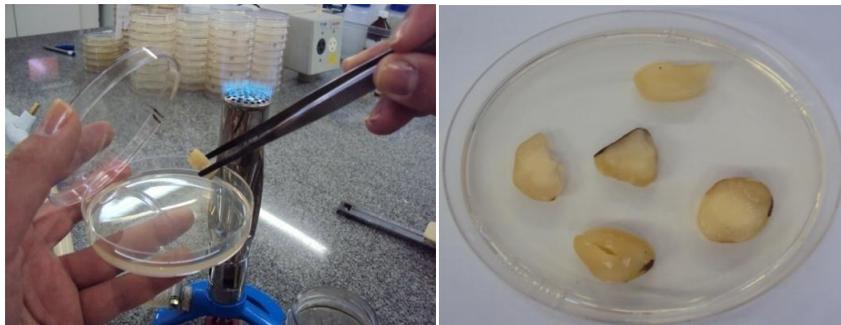


Figura 26. Plaqueamento da castanha do Brasil no meio DG18.

#### 4.4 Isolamento dos fungos

Após o período de incubação, a micobiota geral foi avaliada e as espécies de *Aspergillus* da seção *flavi*, *nigri* e outras de interesse foram

enumeradas e isoladas em placas Petri contendo meio Czapek Extrato de Levedura (CYA). As placas foram incubadas a 25°C por 7 dias, para posterior identificação através de protocolos específicos para cada grupo.

Após os 7 dias de incubação, os gêneros macroscopicamente identificados como *Aspergillus* section *flavi* foram inoculados com três pontos eqüidistantes no meio CYA a 25°C, 37°C e 42°C por 7 dias. Além deste meio, foram também inoculados no meio Ágar Extrato de Malte (MEA) a 25°C por 7 dias, e no meio ágar *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* (AFPA) a 30°C por 48 horas.

As espécies de *Eurotium* foram cultivadas no meio ágar Czapek Extrato de Levedura 20% Sacarose (CY20S) durante 14 dias a 25°C. As espécies de *Penicillium* foram cultivadas com três pontos eqüidistantes no meio CYA a 5°C, 25°C e 37°C por 7 dias e nos meios MEA, Creatina Sacarose (CSN) e Ágar Glicerol Nitrato (G25N) a 25°C por 7 dias.

Decorrido o período de cultivo, foi realizada a medição dos diâmetros das colônias e as análises das características macro e microscópicas em todos os meios de cultura e temperaturas, sendo as espécies identificadas de acordo com a chave de identificação para *Aspergillus* e *Eurotium* proposta por Klich; Pitt (1988), as espécies de *Penicillium* foram identificadas de acordo com Pitt (2000) e as demais espécies de acordo com Pitt; Hocking (2009). A confirmação da identidade de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* foi verificada através da coloração laranja no reverso da colônia no meio AFPA (*Aspergillus flavus parasiticus* Ágar).

#### **4.5 Avaliação do potencial de produção de aflatoxinas pelos fungos *Aspergillus* section *flavi* isolados.**

Os isolados que foram classificados como pertencentes à seção *Flavi*, foram inoculados no meio Ágar Extrato de Levedura Sacarose (YESA), (meio com alta concentração de sacarose que favorece o desenvolvimento fúngico e a

produção de micotoxinas) e incubados a 25°C por 7 dias, para avaliação do potencial de produção de aflatoxinas.

Decorrido o período de incubação as aflatoxinas foram extraídas aplicando-se a técnica de ágar plug associada à Cromatografia em Camada Delgada (TLC), de acordo com a metodologia proposta por Filtenborg et al., 1983. Pequeno pedaço da colônia foi cortado com auxílio de um bisturi e aplicado nas placas de cromatografia de silicagel-G de 500  $\mu\text{m}$  de espessura. Ao plug foram adicionadas 3 gotas da solução Clorofórmio:Metanol (1:1) para a extração da toxina. Na mesma placa em paralelo foi aplicado 2  $\mu\text{L}$  do padrão de aflatoxinas. A placa foi levada até a cuba contendo a fase móvel, constituída dos seguintes solventes: Tolueno, Acetato de Etila, Ácido Fórmico 90% e Clorofórmio, na proporção (7:5:2:5 v/v/v/v). Após a finalização da corrida e secagem dos solventes, a placa seguiu para a leitura dos resultados na câmara UV utilizando os comprimentos de onda de 365nm e 254nm.

A confirmação da capacidade de produção de aflatoxinas de cada isolado foi avaliada através do tempo de retenção e coloração da fluorescência, comparando qualitativamente com padrões de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>.

## **4.6 Análise de aflatoxinas nas amêndoas de castanha do Brasil**

### **4.6.1 Preparo de amostras**

De cada amostra coletada, aproximadamente 300 g de amêndoa foram moídos e 25 g desta amostra foi utilizada para análise de aflatoxinas. A extração foi realizada com 100mL de solução de metanol:água (8:2, v/v), adicionadas 2,5 g de NaCl e homogeneização em ultra-Turrax (Polytron, Suíça) a 10.000rpm por 3 minutos. A solução foi duplamente filtrada utilizando filtros whatman n° 2 e whatman A-H de microfibra de vidro. Em seguida foram coletados 10mL do filtrado e diluído em 60mL de solução tampão fosfato PBS. Todo o conteúdo foi passado na coluna de imunoafinidade específica para aflatoxinas (Aflatest WB-Vicam) com

fluxo de 2-3 mL/ min. Após a passagem da solução foi realizada uma lavagem da coluna com 30mL de água destilada. As aflatoxinas foram eluídas com 1250µL de metanol em frasco âmbar e em seguida diluídas com mais 1750µL de água milli Q. (STROKA et al., 2000). Não foi realizada a análise de aflatoxinas na casca.

#### **4.6.2 Condições cromatográficas**

Para a detecção e quantificação das aflatoxinas foi utilizada Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), com detector de fluorescência e sistema de derivatização Kobracell. O equipamento foi Shimadzu modelo LC-10ATVP HPLC system (Shimadzu, Japão). O comprimento de onda de excitação e emissão foram 362nm e 455nm, respectivamente. Uma coluna guarda de aflatoxinas Shimadzu CLC G-ODS (5µm,4x10mm) e uma coluna Shimadzu Shimpack ODS (5µm, 4,6x250mm) foram empregadas para separação dos compostos. O sistema foi associado a um reator eletroquímico kobracell (R-Biopharm) para derivatização pós-coluna das aflatoxinas B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub>, ligado a uma corrente de 100µA.

A fase móvel utilizada foi água:acetonitrila:metanol (6:2:3, v/v/v), adicionada de 119mg de KBr e 350µL de ácido nítrico 4M por litro, em um fluxo de 1mL/min., com volume de injeção de 100µL em injetor automático.

#### **4.6.3. Quantificação de aflatoxinas e otimização da metodologia**

Diluições do padrão de aflatoxinas (Sigma) foram preparados para a construção da curva padrão a ser utilizada para a quantificação das aflatoxinas. Somente valor de  $r^2$  maior que 0,99 foram utilizados. A concentração das aflatoxinas no extrato da amostra foi determinada pela interpolação da área do pico resultante na curva padrão.

Para a otimização do método foram realizados testes de recuperação e calculados os limites de detecção e quantificação. Para a recuperação das aflatoxinas utilizou-se a metodologia descrita acima, realizando a contaminação de uma amostra de castanha com nível não detectado das aflatoxinas nos níveis de

aflatoxinas totais 0,5; 5,0; e 15,0 µg/Kg, em triplicata.

Para determinação do limite de detecção (LOD) foram realizadas 8 extrações paralelas de amostras com níveis baixos de aflatoxinas e foi calculado o desvio padrão entre as mesmas. O limite de detecção foi determinado multiplicando-se o desvio padrão obtido pelo valor  $t$  da tabela t-student para 7 graus de liberdade e com 99% de confiança, de acordo com as recomendações do Eurochim Guide (1998). O limite de quantificação foi calculado multiplicando o valor do desvio padrão por 10.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Amostras de castanha do Brasil

O total de 143 amostras (142 amêndoas e 98 cascas) coletadas e analisadas por etapas de processamento e regiões estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 – Origem e total de amostras de castanha do Brasil coletadas.

<b>Origem</b>	<b>Nº de amostras coletadas</b>	<b>Amêndoas analisadas</b>	<b>Cascas analisadas</b>
<b>PARÁ</b>			
Floresta	42	42	42
Processadoras	35	35	19
Mercados	11	11	6
<b>AMAZONAS</b>			
Floresta	12	12	12
Processadoras	3	3	3
Mercados	19	18	12
<b>SÃO PAULO</b>			
Mercados	21	21	4
<b>TOTAL</b>	<b>143</b>	<b>142</b>	<b>98</b>

## 5.2 Valores de atividade de água

### 5.2.1 Estado do Pará

Os valores de atividade de água (em triplicata) das amostras (amêndoas e cascas), coletadas no Estado do Pará e sua origem estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Atividade de água\* das amostras de castanha do Brasil (amêndoas e cascas), em diferentes etapas da cadeia produtiva no Estado do Pará.

Origem		Média da atividade de água	Variação da atividade de água
Floresta	amêndoas	0,955	0,699 – 0,997
	cascas	0,948	0,622– 0,999
Processadoras	amêndoas	0,661	0,316 – 0,929
	cascas	0,680	0,499 – 0,848
Mercados	amêndoas	0,716	0,490 – 0,981
	cascas	0,847	0,622 – 0,984

\*Valores de triplicatas

Foi verificada uma grande heterogeneidade nos valores de atividade de água nas amostras analisadas. Elevados valores de atividade de água foram encontrados em amostras coletadas nas florestas. Algumas amostras estavam úmidas com aspecto leitoso e visivelmente emboloradas, com média de Aw de 0,95 e variação de 0,622 até 0,999, apenas duas amostras coletadas na florestas estavam com valores de atividade de água baixo da média. Na casca foi verificado o mesmo comportamento. Da mesma forma nas amostras coletadas nos mercados da região, apresentaram variação entre 0,490 até 0,984.

Com relação as amostras coletadas nas processadoras de castanha do Brasil, a maioria apresentou aspecto seco e boa aparência. As amostras foram coletadas em diferentes etapas do processamento. A Tabela 6 apresenta os valores de atividade de água de algumas amostras em diferentes etapas do processamento. É possível observar que houve uma redução na atividade de água das amostras, principalmente nas etapas de secagem em estufa.

Tabela 6. Valores de atividade de água das amostras coletadas em diferentes etapas nas processadoras do estado do Pará.

<b>Descrição das etapas de processamento</b>	<b>Aw</b>
Amostra com casca embolorada, sem processamento	0,912
Amostra com casca, sem seleção e 18% de umidade	0,845
Amostra com casca, após autoclavagem	0,843
Descascadas, separadas por densidade, tamanho médio	0,678
descascadas, após seleção, antes da secagem	0,787
Descascadas após secagem em estufa por 13 horas (46-50°C)	0,503
Descascadas após secagem em estufa por 3-4 dias (40-50°C)	0,379
Amostras com casca após secagem em estufa por 15 horas (55°C)	0,613
Amostras com casca, produto final	0,599
Descascadas, produto final	0,505

### 5.2.2. Estado do Amazonas

Os valores de atividade de água das cascas e amêndoas das amostras coletadas no Estado do Amazonas, são apresentados na Tabela 7.

As amostras coletadas nas florestas do Estado do Amazonas apresentaram valores altos de atividade de água, com média de 0,9 e com pouca variação (0,810 – 0,995).

Assim como as amostras do Estado do Pará, a atividade de água das amostras coletadas no mercado do Amazonas variaram desde 0,552 até 0,979, com valores inferiores aos da floresta.

Tabela 7. Atividade de água das amostras de castanha do Brasil (amêndoa e casca), em diferentes etapas da cadeia produtiva no Estado do Amazonas.

Origem		Média da atividade de água	Varição da atividade de água
Floresta	amêndoas	0,949	0,871 – 0,986
	cascas	0,933	0,810– 0,995
Mercados	amêndoas	0,798	0,583 – 0,979
	cascas	0,735	0,552 – 0,968

### 5.2.3. Estado de São Paulo

As amostras coletadas nos mercados e supermercados do Estado de São Paulo, apresentaram baixos valores de atividade de água, com média em torno de 0,50 (Tabela 8). As amostras em geral, apresentaram boa aparência, pois estas amostras já haviam sido submetidas a uma seleção prévia e secagem.

Tabela 8. Atividade de água das amostras de castanha do Brasil (amêndoa e casca), nos mercados no Estado de São Paulo.

Origem		Média da atividade de água	Varição da atividade de água
Mercados	amêndoas	0,491	0,273 – 0,597
	casca	0,519	0,418 – 0,649

A maioria das amostras coletadas nas florestas apresentou valores de atividade de água acima de 0,90. As amostras das processadoras se diferiram entre si em relação ao teor de água livre, devido às etapas do processo, responsável pela redução da atividade de água de 0,90 a menor que 0,60 após as etapas de secagem.

Já nas amostras dos mercados do Pará e do Amazonas as castanhas apresentaram variação de 0,490 a 0,981. Estas amostras estavam prontas para o consumo. Em São Paulo as amostras estavam com atividade de água inferior a 0,60.

Os dados de atividade de água indicam se os fungos poderão se desenvolver ou não durante a comercialização das castanhas. A presença de amostras com alto teor de água (maior que 0,8) pode favorecer o crescimento dos fungos toxigênicos na castanha e a subsequente formação de aflatoxinas, tornando um risco para a saúde do consumidor. Uma atividade de água segura para este tipo de produto seria abaixo de 0,60, pois acima de 0,80 os fungos toxigênicos produtores de aflatoxinas, como *A. flavus* e *A. parasiticus*, podem se desenvolver e entre 0,70 e 0,60 fungos extremamente xerofílicos podem crescer e deteriorar o produto (PITT; HOCKING, 2009).

### 5.3 Análise da micobiota da castanha do Brasil

A Figura 27 apresenta a infecção fúngica nas amostras de amêndoas e cascas após 5 dias a 25°C no meio DG18.

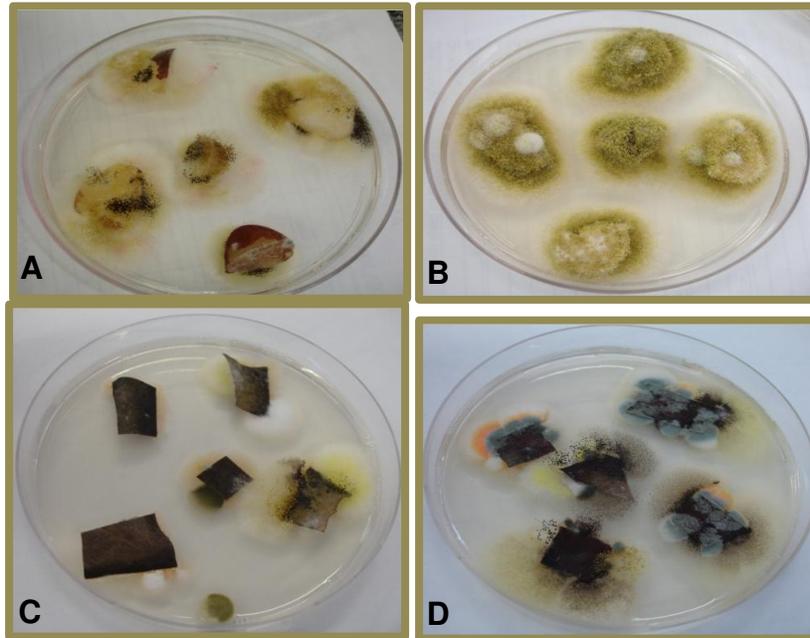


Figura 27. Plaqueamento das amostras de amêndoas (A e B) e cascas (C e D) de castanha do Brasil em meio DG18 após 5 dias à 25°C.

Dentre os isolados de *Aspergillus* section *flavi*, encontraram-se *Aspergillus nomius* e *Aspergillus parasiticus*, espécies produtoras das quatro aflatoxinas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>); *Aspergillus caelatus* e *Aspergillus tamarii*, não produtoras de aflatoxinas; *Aspergillus pseudotamarii*, produtora de B<sub>1</sub>; e *Aspergillus flavus*, produtora ou não de aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>. A Figura 28 apresenta a diversidade de *Aspergillus* pertencentes à seção Flavi, isolados das amostras.

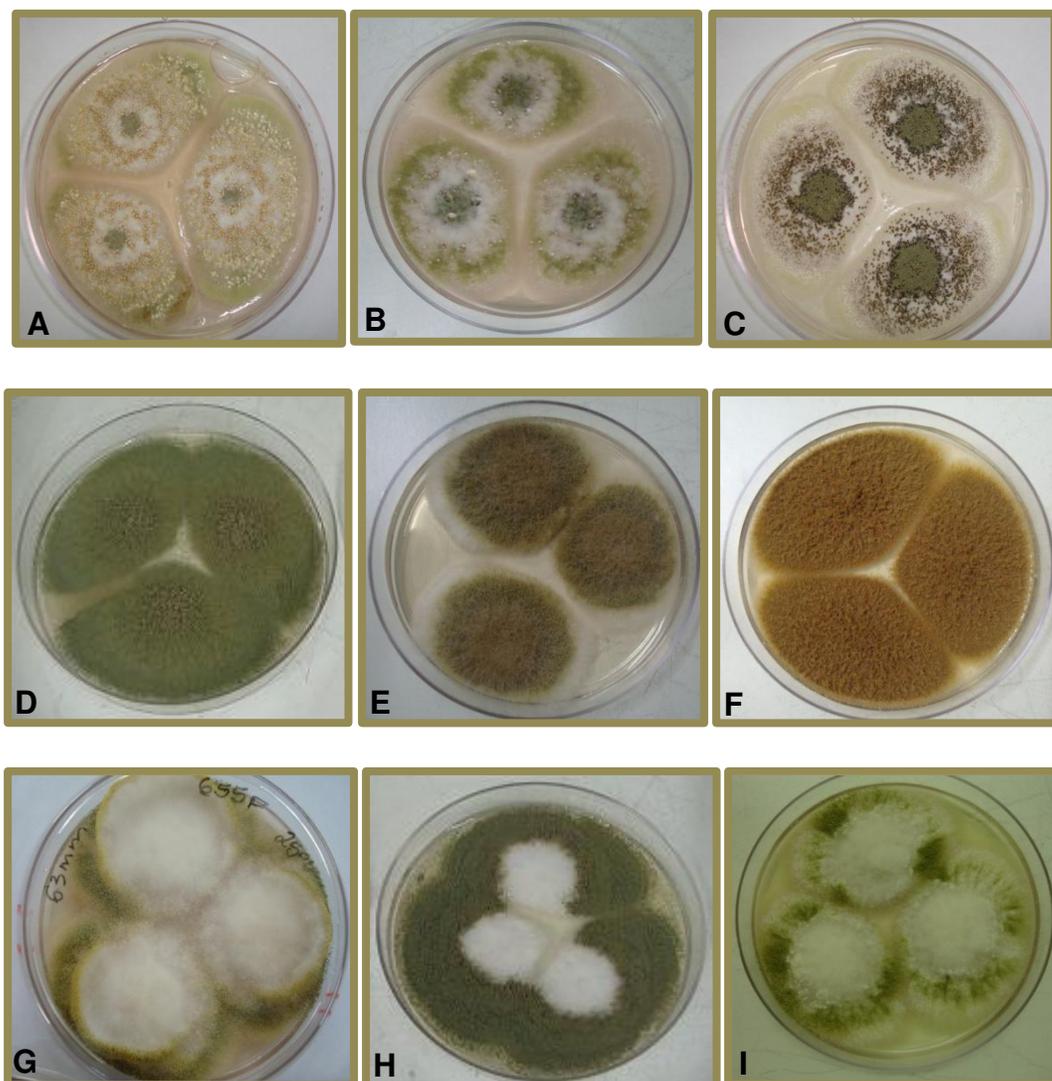


Figura 28. Espécies de fungos filamentosos *Aspergillus* section *flavi* isolados. Em A, B e C: *Aspergillus flavus* com esclerócios; D: *Aspergillus flavus* sem esclerócios; E: *Aspergillus theobromus*; F: *Aspergillus tamarii*; G, H e I: *Aspergillus nomius*.

A Figura 29 apresenta o crescimento dos isolados de *Aspergillus* section *flavi* nos meios de cultura: MEA 25°C, CYA 25°C, 37°C e 42°C e AFPA. As respostas nestes meios como: coloração da colônia e do reverso e diâmetro da colônia, auxiliaram na identificação das espécies de *Aspergillus*.



Figura 29. A: Crescimento de *Aspergillus* nos meios CYA e MEA em diferentes temperaturas, B: medição do tamanho das colônias, C: reverso da colônia no meio AFPA.

### 5.3.1 Amostras coletadas no estado do Pará.

#### a. Amostras coletadas na floresta

Nas 42 amostras de amêndoas de castanha do Brasil coletadas nas florestas do Estado do Pará, foram identificadas 2.597 isolados de fungos filamentosos, com média de infecção total de 90%. Os fungos mais abundantes foram: *Penicillium citrinum*, *Penicillium bertholletium*, *Mucor sp.*, *Acremonium sp.*, *Absidia corymbifera*, *Penicillium sp.*, *Syncephalastrum racemosum*, fungos dematiáceos, *Aspergillus* section *Nigri* e *Aspergillus* section *Flavi* (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus nomius*, *Aspergillus pseudotamarii* e *Aspergillus caelatus*). Das amostras coletadas 186 isolados de *A. flavus*, 189 de *A. nomius* (potencialmente produtores das quatro aflatoxinas) e um de *Aspergillus parasiticus* foram isolados destas amostras (Figura 30). Informações mais detalhadas sobre estas amostras estão descritas no Anexo 1.

Freire et al. (2000), analisaram amostras de amêndoas de castanha do Brasil da floresta de Belém e por técnica de diluição em placas isolaram *A. flavus*, *Penicillium glabrum*, *P. citrinum*, *Rhizopus sp.*, *Aspergillus niger* e *Fusarium oxysporum*. Os resultados obtidos não diferem dos encontrados por Freire et al. (2000), no entanto uma diversidade maior de espécies foram encontradas em neste trabalho.

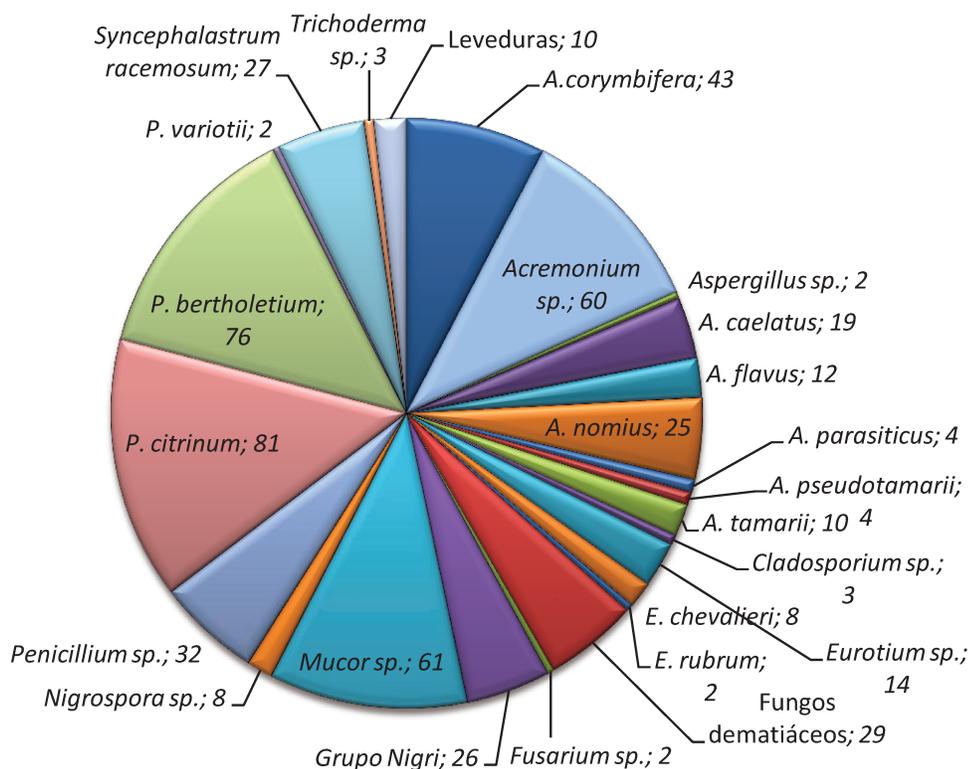


Figura 30. Micobiota (em porcentagem média de infecção) de amêndoas das amostras de castanha do Brasil coletadas nas florestas do Pará.

Freire; Offord (2002) além de fungos filamentosos também isolaram leveduras de amostras de amêndoas de castanha do Brasil coletadas nas florestas do Estado do Pará. As leveduras isoladas por eles foram identificadas como *Pichia* e *Rhodotorula*.

Nas cascas das amostras de castanhas coletadas na floresta no Pará, foram identificadas 2.756 isolados de fungos, com média de infecção de 99%. Os fungos mais abundantes assim como nas amêndoas foram: *Penicillium bertholetium*, *Penicillium citrinum*, fungos dematiáceos, *Rhizopus sp.*, *Syncephalastrum racemosum*, *Eurotium sp.*, *Acremonium*, *Absidia corymbifera* e *Penicillium sp.* Um isolado de *Aspergillus parasiticus* e 181 de *Aspergillus nomius*

foram isoladas destas amostras. (Figura 31). Informações mais detalhadas sobre estas amostras estão descritas no Anexo 2.

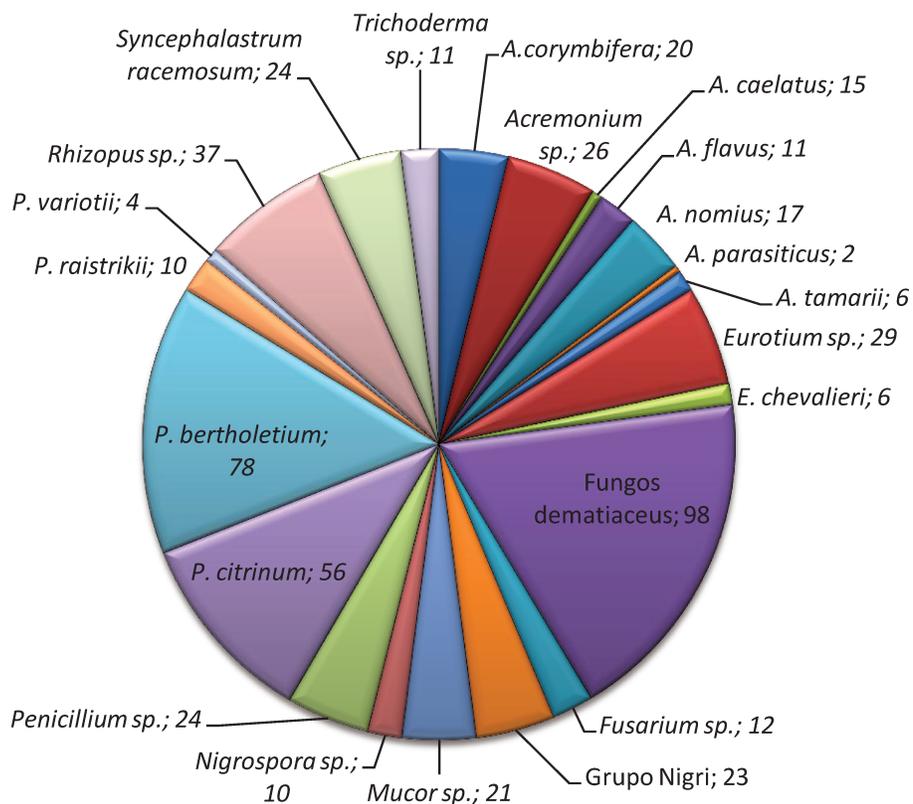


Figura 31. Micobiota (em porcentagem média de infecção) de cascas das amostras de castanha do Brasil coletadas nas florestas do Pará.

Nas cascas não foram encontradas espécies como *Aspergillus pseudotamarii*, *Eutotium rubrum*, outras espécies de *Aspergillus*, *Cladosporium sp.* e leveduras. Espécies como *Rhizopus* e *Penicillium raistrickii* que não foram isoladas nas amêndoas apareceram nas cascas. Espécies aflatoxigênicas como *Aspergillus nomius*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* apresentaram elevada incidência nas amêndoas (Figura 32).

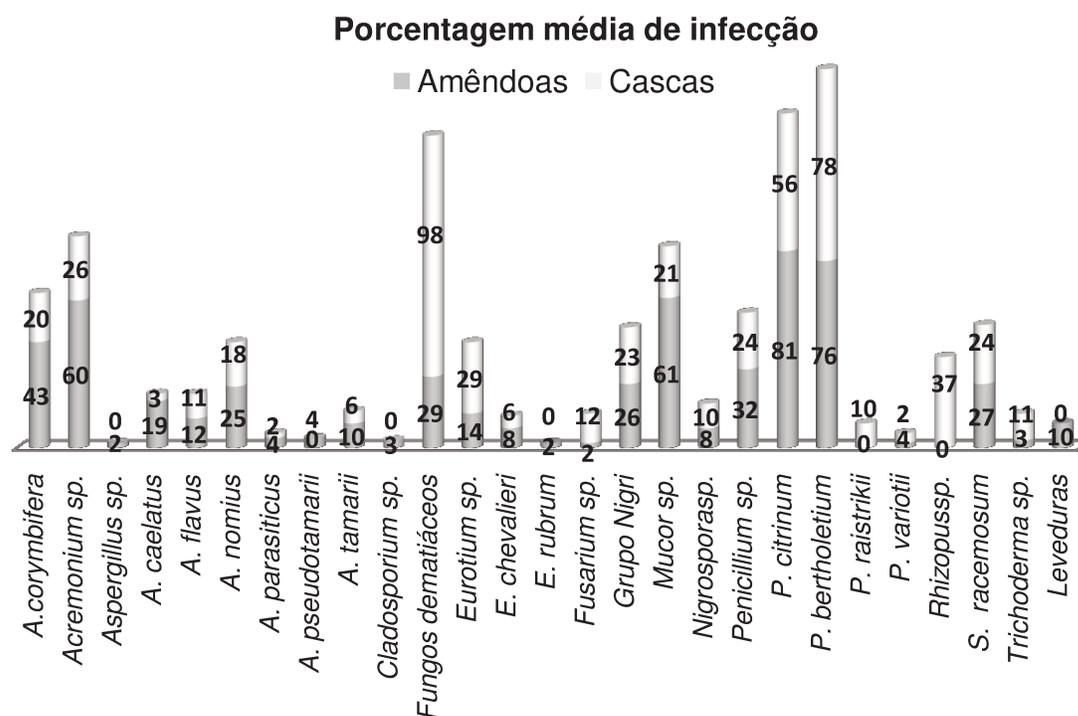


Figura 32. Porcentagem média de infecção das espécies de fungos isoladas de amêndoas e cascas das amostras de castanha do Brasil coletadas de florestas do Pará.

Três amostras de ouriços coletados na floresta do Pará também foram coletados. As amostras encontraram-se 100% infectadas, das quais 263 culturas foram isoladas. As espécies predominantes foram: *Penicillium citrinum*, fungos dematiáceos e *Penicillium bertholletium*. Cinco isolados de *Aspergillus nomius* foram identificados (Figura 33). Informações mais detalhadas sobre estas amostras estão descritas no Anexo 3.

Arrus et al. (2005b) analisaram 15 amostras de ouriços coletados na floresta amazônica do Peru e apenas 1 amostra estava infectada com *A. flavus*, potencialmente aflatoxigênicos, no entanto não foi encontrado *A. parasiticus*.

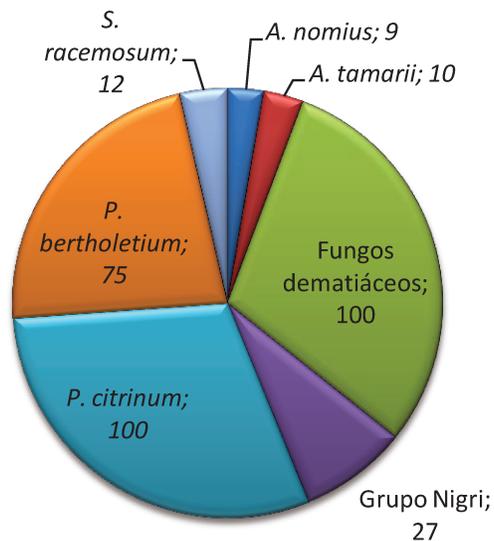


Figura 33. Micobiota (em porcentagem média de infecção) de ouriços das amostras de castanha do Brasil coletadas na floresta do Pará.

#### b. Amostras coletadas nas processadoras

Nas 35 amostras de amêndoas de castanha do Brasil coletadas nas diferentes etapas das processadoras, 2.005 culturas foram identificadas, apresentando uma variação de infecção de 0 a 100% e média de infecção de 74,2%. Os fungos mais incidentes foram *Rhizopus sp.*, *Eurotium sp.*, *Eurotium chevalieri*, *Eurotium amstelodami*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium citrinum*, *Syncephalastrum racemosum* e *Aspergillus flavus*. Nestas amostras três isolados de *Aspergillus parasiticus* e 130 *Aspergillus nomius* foram identificados (Figura 34). Informações mais detalhadas sobre estas amostras estão descritas no Anexo 4.

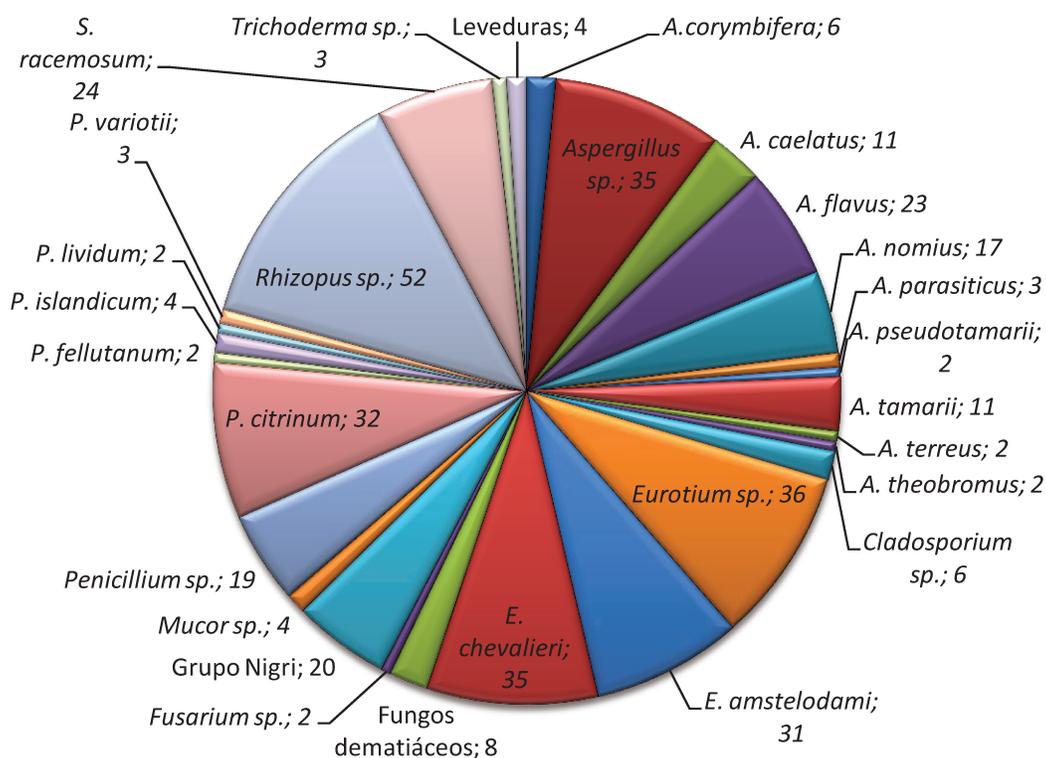


Figura 34. Micobiota (em porcentagem média de infecção) de amêndoas das amostras de castanha do Brasil coletadas nas processadoras do Pará.

A porcentagem média de infecção fúngica foi alta (100%) nas amostras não beneficiadas das processadoras devido ao fato de estarem com valores de atividade de água maior que 0,9. Estas apresentaram maior biodiversidade de espécies. Já as amostras que foram analisadas após beneficiamento não apresentaram valores relevantes de infecção fúngica (6%), devido aos baixos valores de atividade de água (0,5). A Tabela 9 apresenta os valores de atividade de água e a média de infecção fúngica de algumas amostras coletadas nas processadoras.

Tabela 9. Valores de atividade de água e média de infecção fúngica (%) das amêndoas de amostras de castanha do Brasil coletadas em diferentes etapas de processamento.

<b>Descrição das etapas de processamento</b>	<b>Atividade de água (Aw)</b>	<b>Média total de infecção (%)</b>
Amostra com casca embolorada, sem processamento	0,912	100
Amostra com casca, sem seleção e 18% de umidade	0,845	100
Amostra com casca, após autoclavagem	0,843	98
Amêndoas descascadas, separadas por densidade, tamanho médio	0,678	22
Amêndoas descascadas após secagem em estufa por 13 horas (46-50°C)	0,503	2
Castanhas com casca, produto final	0,599	56
Amêndoas descascadas, produto final	0,505	6

Com o resultado do plaqueamento das cascas 1320 isolados foram identificados, apresentando média de infecção de 92%. As espécies mais incidentes foram os fungos demateáceos, *Aspergillus* section *Nigri*, *A.nomius*, *Eurotium* sp., *A. flavus* e *P. bertholetium*. Dois isolados de *A. parasiticus*, 219 de *A.*

*nomius* foram detectados nas cascas (Figura 35). Informações mais detalhadas sobre estas amostras encontram-se descritas no Anexo 5.

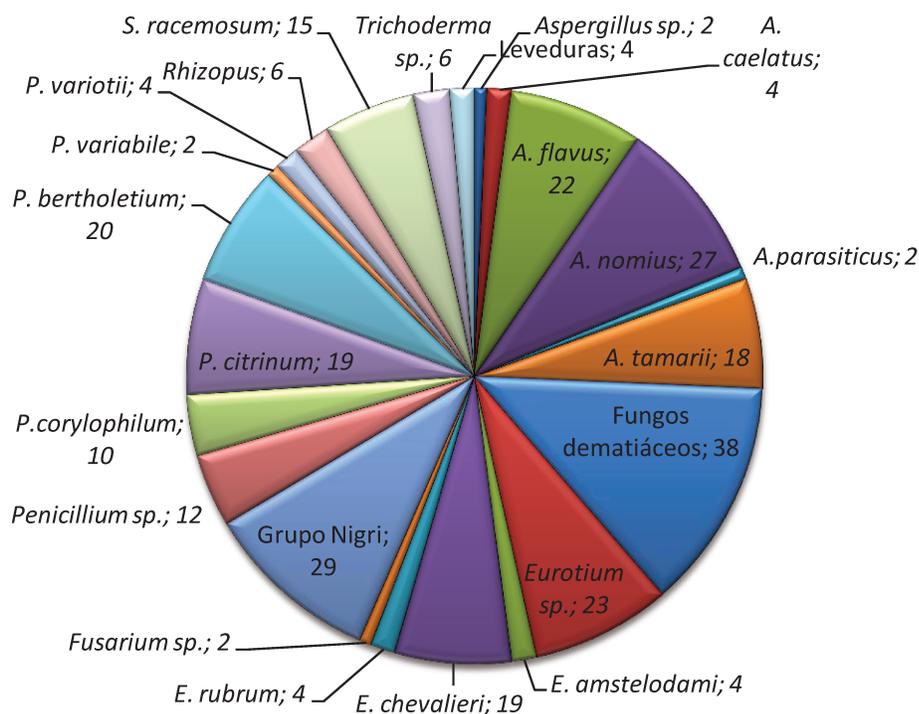


Figura 35. Micobiota (em porcentagem média de infecção) de cascas das amostras de castanha do Brasil coletadas nas processadoras do Pará.

Observou-se que nas amostras de cascas houve a ocorrência das mesmas espécies encontradas nas amêndoas, com porcentagens inferiores de infecção. *Aspergillus pseudotamarii*, *A. terreus*, *A. theobromus*, *Penicillium fellutanum*, *Penicillium islandicum* e *Mucor spp.* foram isolados apenas nas amostras de amêndoas, ao passo que espécies como *P. corylophilum*, *P. bertholletium*, *Penicillium variabile* e *E. rubrum* foram isolados somente das amostras de cascas. A incidência de *A. nomius* foi maior nas cascas (Figura 36).

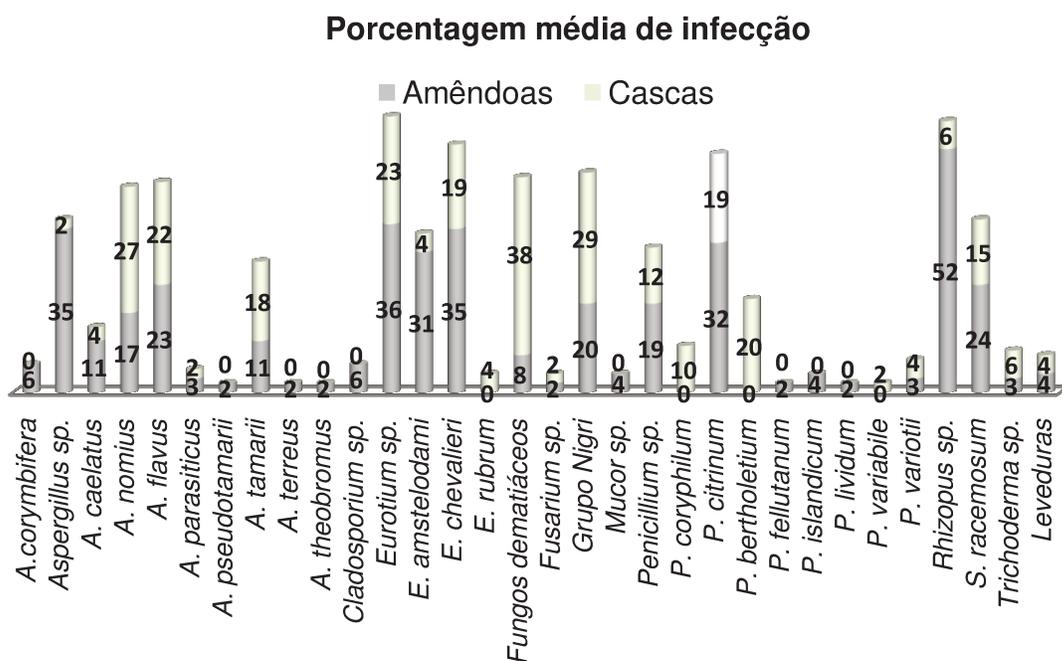


Figura 36. Porcentagem média de infecção das espécies de fungos isoladas de amêndoas e cascas das amostras de castanha do Brasil coletadas das processadoras do Estado do Pará.

c. Amostras coletadas nos mercados

Através do plaqueamento das 11 amostras de amêndoas de castanha do Brasil compradas nos mercados do Pará 643 isolados foram identificados, apresentando 87% de infecção média. Os fungos filamentosos mais freqüentes foram: *Eurotium chevalieri*, *Eurotium spp.*, *Absidia corymbifera*, *Syncephalastrum racemosum*, *Penicillium sp.* e *Aspergillus flavus*. Nestas amostras, foram isolados espécies de *Aspergillus* section *Flavi*, porém houve baixa incidência de *Aspergillus nomius*. (Figura 37). Informações mais detalhadas sobre estas amostras estão descritas no Anexo 6.

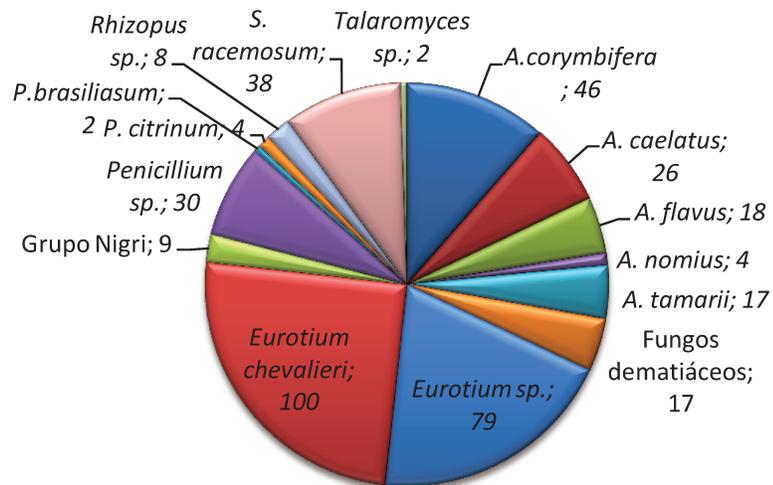


Figura 37. Micobiota (em porcentagem média de infecção) de amêndoas das amostras de castanha do Brasil coletadas nos mercados do Pará

Nas cascas coletadas provenientes das amostras de castanha do Brasil coletadas dos mercados do Estado do Pará, 423 isolados foram identificadas, apresentando uma média de infecção de 97%. As espécies de maior ocorrência foram: *Trichoderma sp.*, fungos dematiáceos, *S. racemosum*, *A. tamarii* e *Penicillium spp.* Nestas amostras, apenas 8 isolados de *A. nomius* foram identificados (Figura 38).

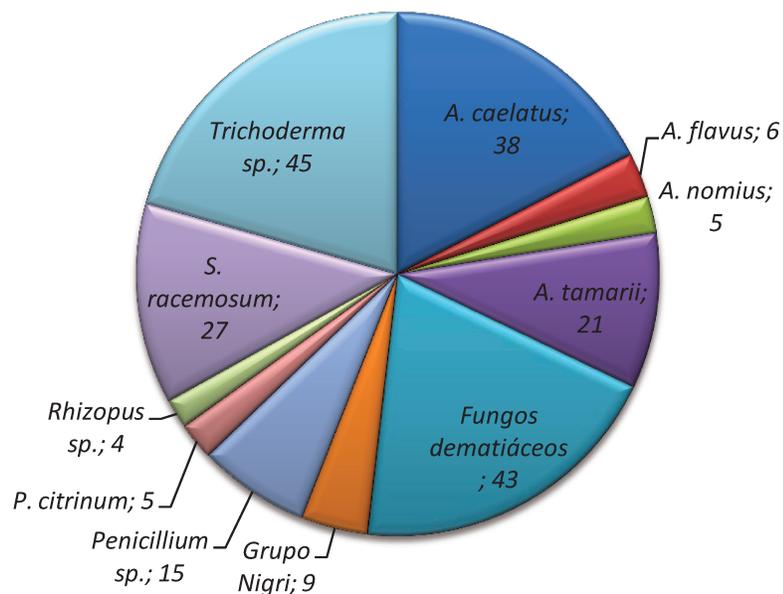


Figura 38. Micobiota (em porcentagem média de infecção) de cascas das amostras de castanha do Brasil coletadas dos mercados do Pará.

As amostras de amêndoas apresentaram maior biodiversidade de espécies, sendo que as espécies *A. corymbifera*, *Eurotium sp.*, *Eurotium chevalieri* e *Talaromyces sp.* só foram encontradas nas amêndoas. *Trichoderma sp.* que é uma espécie característica do solo, foi isolada apenas nas amostras de cascas (Figura 39).

### Porcentagem média de infecção

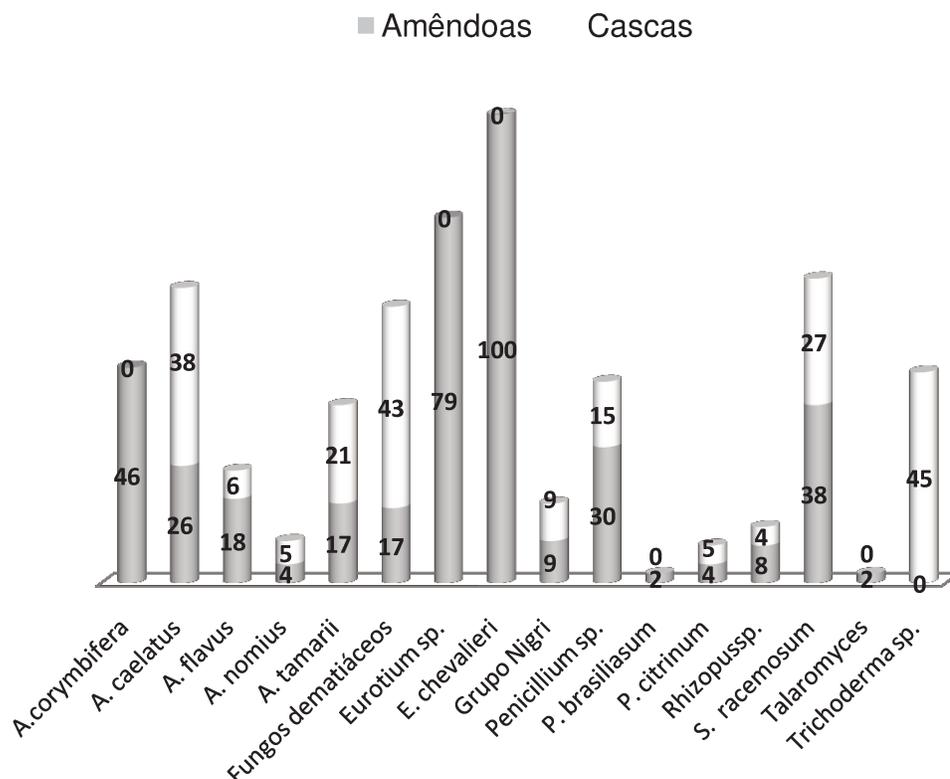


Figura 39. Porcentagem média de infecção das espécies de fungos isoladas de amêndoas e cascas das amostras de castanha do Brasil coletadas dos mercados do Pará.

A Figura 40 apresenta os fungos isolados, houve uma alta infecção e uma grande biodiversidade de espécies. Um total de 9.889 isolados foram identificados, dentre elas leveduras e 37 espécies diferentes de fungos filamentosos. As espécies mais comuns foram: *P. citrinum*, *Aspergillus* section *Nigri*, fungos dematiáceos, *A. flavus*, *S. racemosum*, *A. nomius*, *Penicillium sp.*, *A. caelatus* e *Eurotium spp.* Um total de 1.597 isolados de *Aspergillus* section *Flavi* (*A. flavus*, *A. nomius*, *A. parasiticus*, *A. pseudotamaritii*) foram identificadas e testadas quanto à produção de aflatoxinas, em destaque na Figura 40.

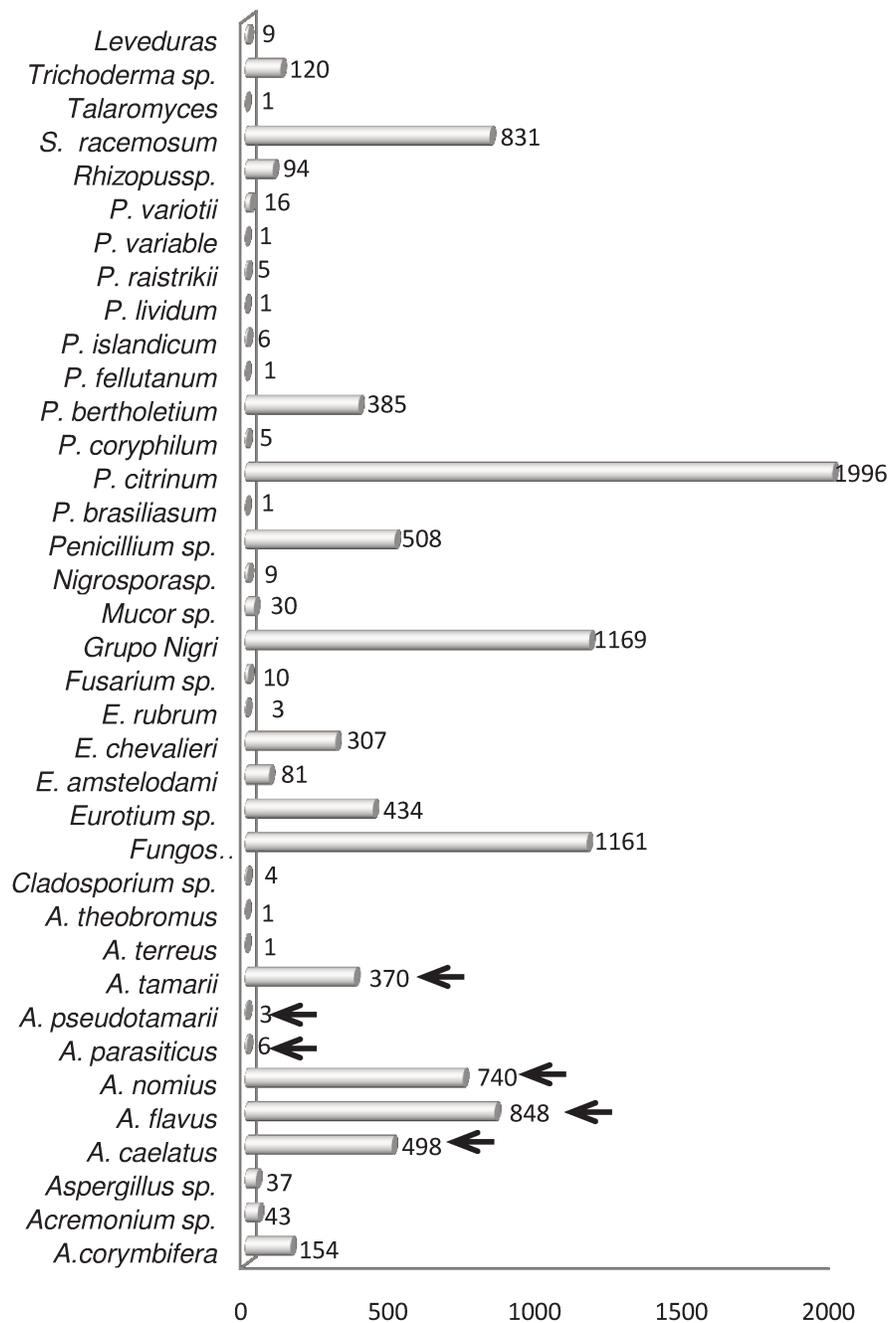


Figura 40. Número de isolados das amostras (cascas e amêndoas) de castanha do Brasil coletadas no Estado do Pará, em destaque as espécies pertencentes ao grupo *Aspergillus section flavi*.

Com base nos valores de atividade de água podemos concluir que a alta atividade de água (maior que 0,9) das amostras favoreceu o desenvolvimento de diversas espécies de fungos filamentosos, inclusive espécies aflatoxigênicas. Entretanto nas amostras coletadas das processadoras, cujos valores de atividade de água foram menores (0,6) devido as etapas de secagem, a média de infecção por bolores também foi alta (100%) (Tabela 10).

Tabela 10. Relação da atividade de água e porcentagem média de infecção por fungos nas amostras do Estado do Pará.

<b>Origem</b>		<b>Número de amostras</b>	<b>Média de Atividade de água (Aw)</b>	<b>Variação de infecção (%)</b>	<b>Média total de infecção (%)</b>
Floresta	amêndoas	42	0,955	0 – 100	90
	cascas	42	0,948	0 – 100	99
Processadoras	amêndoas	35	0,661	0 – 100	100
	cascas	19	0,680	0 – 100	92
Mercado	amêndoas	11	0,716	0 – 100	87
	cascas	6	0,847	0 – 100	97

### 5.3.2 Amostras do Estado do Amazonas

#### a. Amostras coletadas na floresta.

Como resultado do plaqueamento das amêndoas de amostras de castanhas coletadas na floresta do Estado do Amazonas, foram identificados 480 isolados de fungos filamentosos, apresentando média de infecção de 75%. Os fungos mais abundantes foram: *Penicillium variotii*, fungos demateáceos, *Eurotium spp.*, *Syncephalastrum racemosum*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus*

*nomius*, *Aspergillus parasiticus* e *Penicillium citrinum*. Das amostras analisadas 41 isolados foram *Aspergillus nomius* e 5 *Aspergillus parasiticus* (potencialmente produtores das quatro aflatoxinas). A Figura 41 apresenta a micobiota da castanha do Brasil. Informações mais detalhadas sobre estas amostras estão descritas no Anexo 8.

Pinheiro (2004), em seu estudo sobre variabilidade genética de castanha do Brasil também isolou espécies de *Aspergillus flavus* em amostras da floresta do Estado do Amazonas. Avaliando amostras de castanha dos municípios de Capanã Grande e Democracia, Simões (2004) isolou 130 fungos, 98% das amostras estavam contaminadas e do total de isolados constatou-se que as espécies que tiveram maior frequência foram *Aspergillus pulverulentus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavo-furcatis* e *Micelia sterilia*.

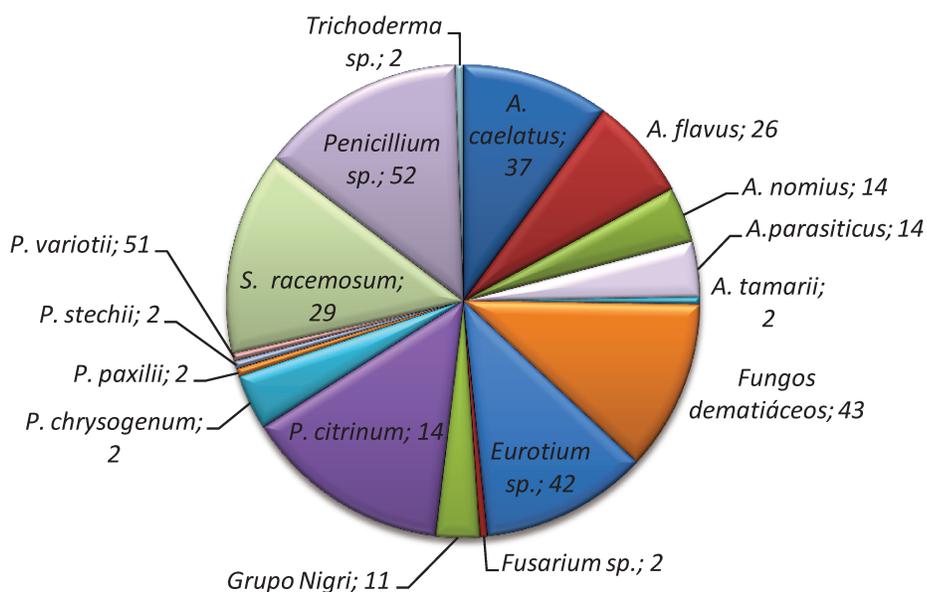


Figura 41. Micobiota (em porcentagem média de infecção) de amêndoas das amostras de castanha do Brasil coletadas na floresta do Amazonas.

Estes resultados estão de acordo com Pacheco; Scussel (2006) que identificaram os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* como os mais comumente presentes em amêndoas.

Nas amostras de cascas 100% estavam infectadas e 495 culturas foram isoladas. As espécies mais incidentes foram: fungos dematiáceos, *Penicillium* sp., *Aspergillus* section *Nigri*, *A. nomius* e *P.citrinum*. Foram isoladas 10 *A. parasiticus* e 55 *A. nomius* (Figura 42). As informações mais detalhadas destas amostras estão descritas no Anexo 9.

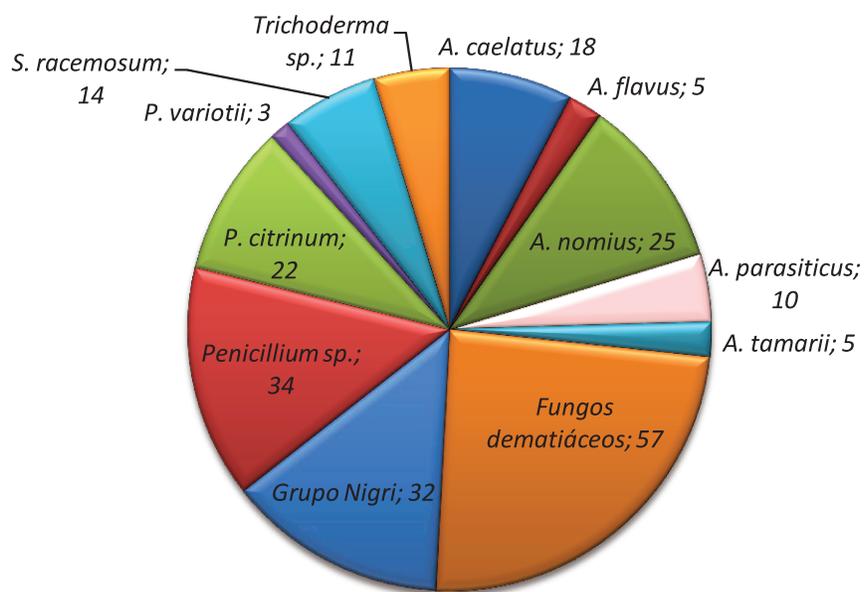


Figura 42. Micobiota (em porcentagem média de infecção) de cascas das amostras de castanha do Brasil coletadas na floresta do Amazonas.

De acordo com Simões (2004), entre os fungos encontrados nas cascas das castanhas, destaca-se o *Trichoderma* sp., que é uma espécie que atua na decomposição de diferentes substratos naturais como madeira e celulose.

Amêndoas de amostras de castanha do Brasil coletadas da floresta tiveram maior biodiversidade de espécies que as amostras de cascas. Apenas as espécies de *Aspergillus nomius*, *Aspergillus* section *Nigri*, *Trichoderma* sp. e *Penicillium citrinum* tiveram maior porcentagem média de infecção nas cascas (Figura 43).

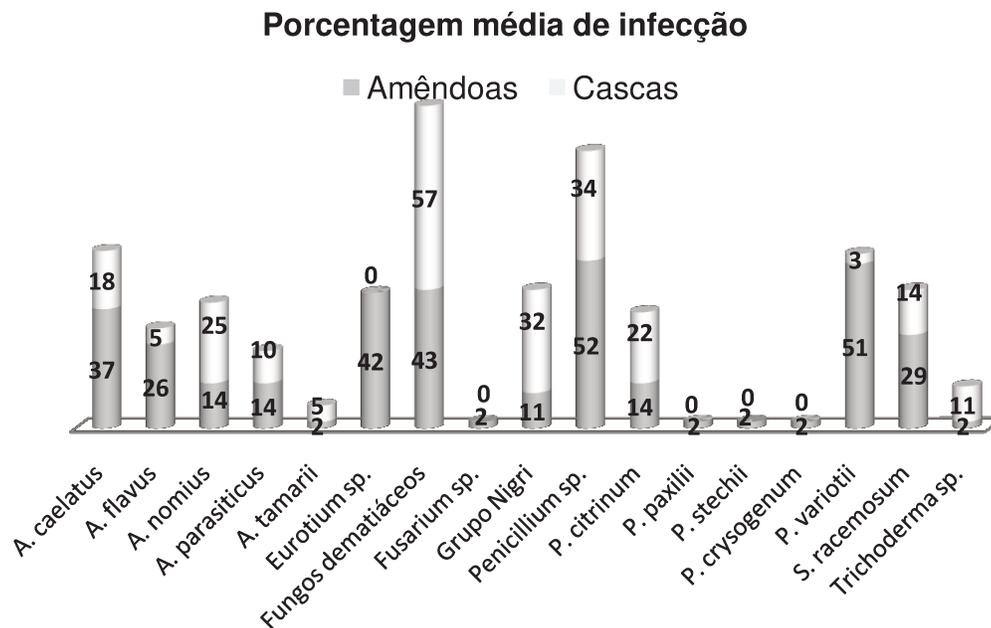


Figura 43. Porcentagem média de infecção das espécies de fungos isoladas de amêndoas e cascas das amostras de castanha do Brasil coletadas das florestas do Amazonas.

b. Amostras coletadas nas processadoras.

As amêndoas das amostras de castanha do Brasil coletadas em diferentes etapas das processadoras do Estado do Amazonas, apresentaram média de infecção de 41%, sendo identificados 55 isolados de fungos filamentosos. Diversas espécies de fungos filamentosos foram isoladas, com menores freqüências que nas amostras coletadas na floresta. As espécies mais

encontradas foram: *Penicillium citrinum*, *Mucor sp.*, *Aspergillus caelatus*, *Aspergillus tamarii* e *Syncephalastrum racemosum*. Também foram isoladas espécies aflatoxigênicas como *Aspergillus flavus* (3 isolados) e *Aspergillus nomius* (5 isolados). Informações mais detalhadas sobre estas amostras estão descritas no Anexo 10. A Figura 44 apresenta resultado da porcentagem de infecção por cada grupo ou espécie.

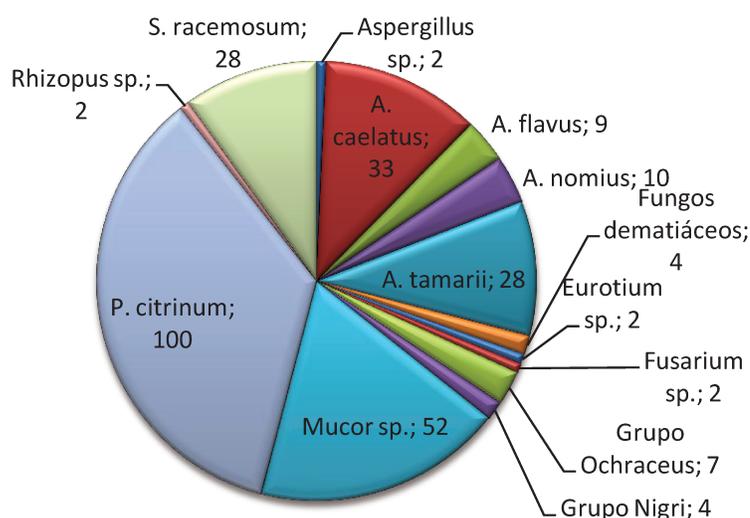


Figura 44. Micobiota (em porcentagem média de infecção) de cascas das amostras de castanha do Brasil coletadas nas processadoras do Amazonas.

Nas cascas de amostras de castanha do Brasil coletadas em diferentes etapas de processamento no Estado do Amazonas, 149 isolados foram identificados, apresentando média de 97% de infecção. A Figura 45 apresenta resultado da porcentagem de infecção por cada grupo ou espécie. As espécies mais incidentes foram: *A. tamarii*, *A. citrinum*, *S. racemosum*, *Eurotium spp.* e *Aspergillus section Nigri*. Apenas 7 isolados de *A. nomius* foram identificados. As informações mais detalhadas destas amostras estão descritas no Anexo 11.

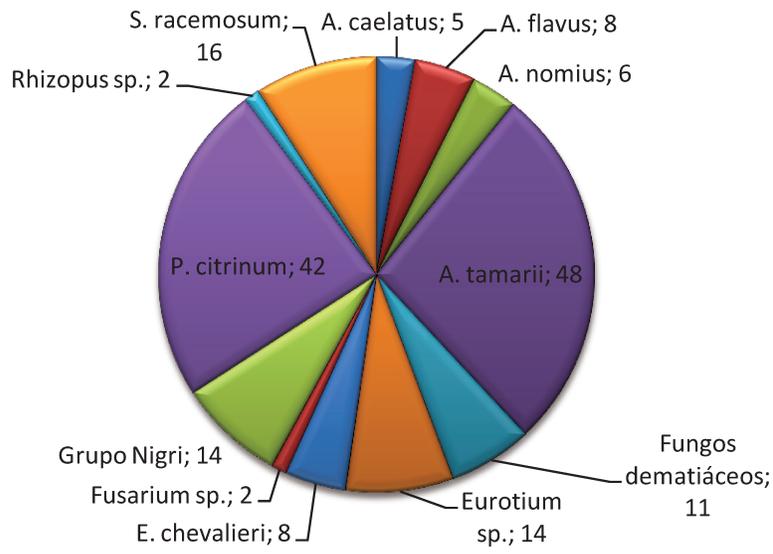


Figura 45. Micobiota (em porcentagem média de infecção) nas cascas de castanha do Brasil coletas nas processadoras do Amazonas.

Em ambas as amostras coletadas (amêndoas e cascas) as espécies mais freqüentes foram: *Penicillium citrinum*, *Aspergillus tamarii*, *Aspergillus* section Nigri e *Mucor sp.* nas amêndoas. Poucos isolados de *A. nomius* e nenhum de *A. parasiticus* foi identificado em ambas as amostras (Figura 46). Por outro lado poucas amostras de processadoras do Amazonas foram coletadas.

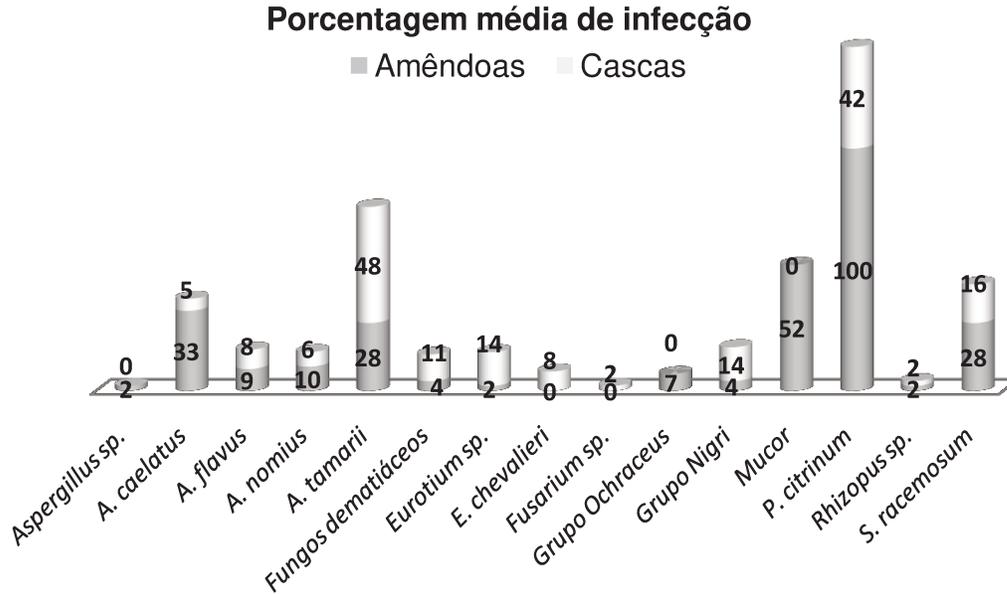


Figura 46. Porcentagem média de infecção das espécies de fungos isoladas de amêndoas e cascas das amostras de castanha do Brasil coletadas das processadoras do Amazonas

c. Amostras coletadas nos mercados.

Nas amostras de amêndoas coletadas no mercado do Amazonas, 1.057 isolados foram identificados. Foi verificada uma grande biodiversidade de espécies como mostra a Figura 47, sendo as mais freqüentes: leveduras, *Penicillium bertholetium*, *P.citrinum*, *Penicillium sp.*, *Mucor sp.*, *S. racemosum*, fungos demateáceos, *A. nomius* e *A. flavus*. Número significativo de isolados potencialmente aflatoxigênicos como *A.nomius* e *A. flavus* foram identificados. As informações mais detalhadas destas amostras estão descritas no Anexo 12.

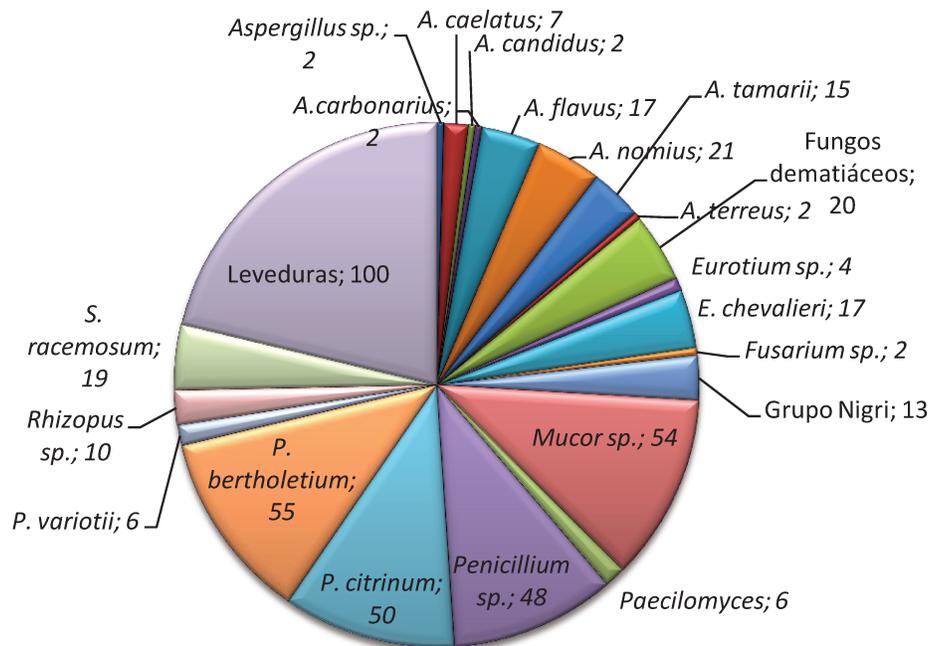


Figura 47. Micobiota (em porcentagem média de infecção) de amêndoas das amostras de castanha do Brasil coletadas nos mercados no Estado do Amazonas

Nas cascas coletadas proveniente de amostras de castanha do Brasil no mercado do Amazonas, todas estavam contaminadas, apresentando média de infecção de 100% e 836 isolados foram identificados. As espécies mais incidentes foram: fungos dematiaceus hifomicetos, *Eurotium spp.*, *P. citrinum*, *Penicillium spp.*, *S. racemosum*, *P. variotii*, *Rhizopus sp*, Grupo Nigri e *A. tamaritii*. (Figura 48). Informações mais detalhadas sobre estas amostras estão descritas no Anexo 13.

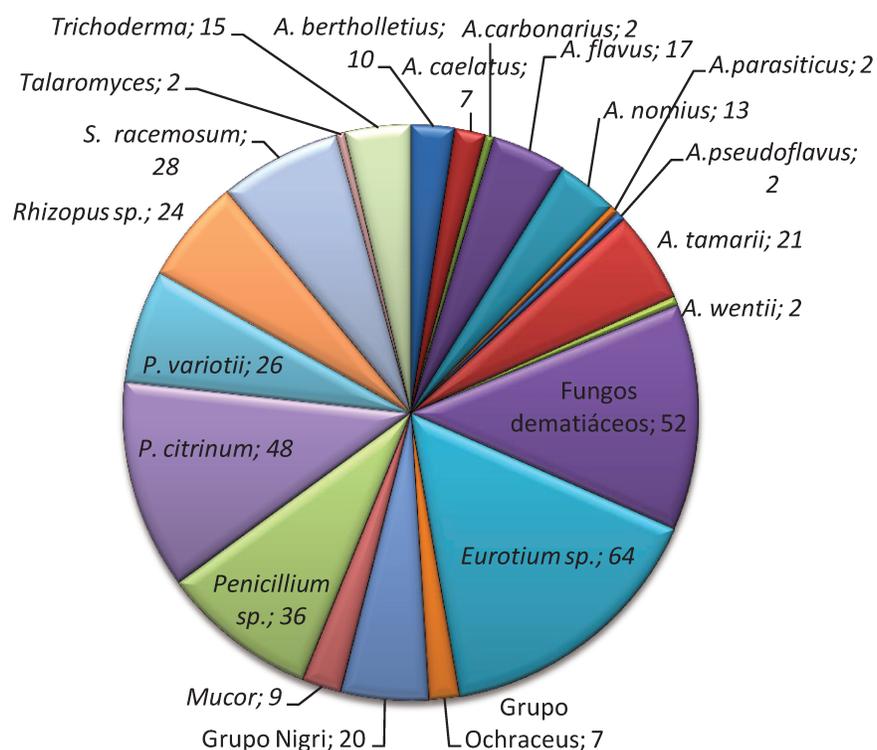


Figura 48. Micobiota (em porcentagem média de infecção) de cascas das amostras de castanha do Brasil coletadas nos mercados do Amazonas.

Amêndoas e cascas das amostras de castanha do Brasil coletadas a partir do mercado apresentaram uma grande biodiversidade de espécies, a Figura 49 apresenta o resultado da porcentagem de infecção por cada grupo ou espécie. *Aspergillus flavus* e *A. nomius* foram encontrados tanto nas amêndoas como nas cascas. Apenas 2 isolados de *A. parasiticus* foram identificados nas cascas.

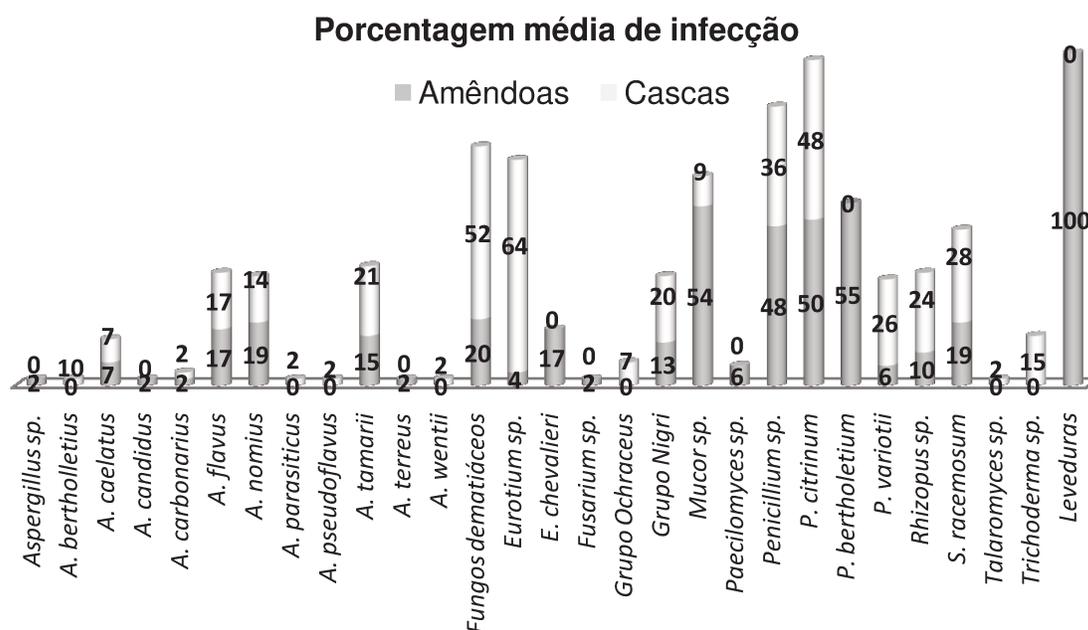


Figura 49. Porcentagem média de infecção das espécies de fungos isoladas de amêndoas e cascas das amostras de castanha do Brasil coletadas do mercado do Estado do Amazonas.

A maioria das amostras coletadas no Estado do Amazonas apresentou alta infecção por fungos, 3.116 isolados foram identificados dentre eles 31 espécies diferentes de fungos filamentosos, além de leveduras. Os principais fungos foram: fungos dematiáceos, *P. citrinum*, *Penicillium spp.*, *A. flavus*, *A. nomius*, *A. tamaritii* e *S. racemosum*. Dentre as espécies pertencentes ao grupo *Aspergillus* section *Flavi* (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*), 509 isolados foram identificados (Figura 50).

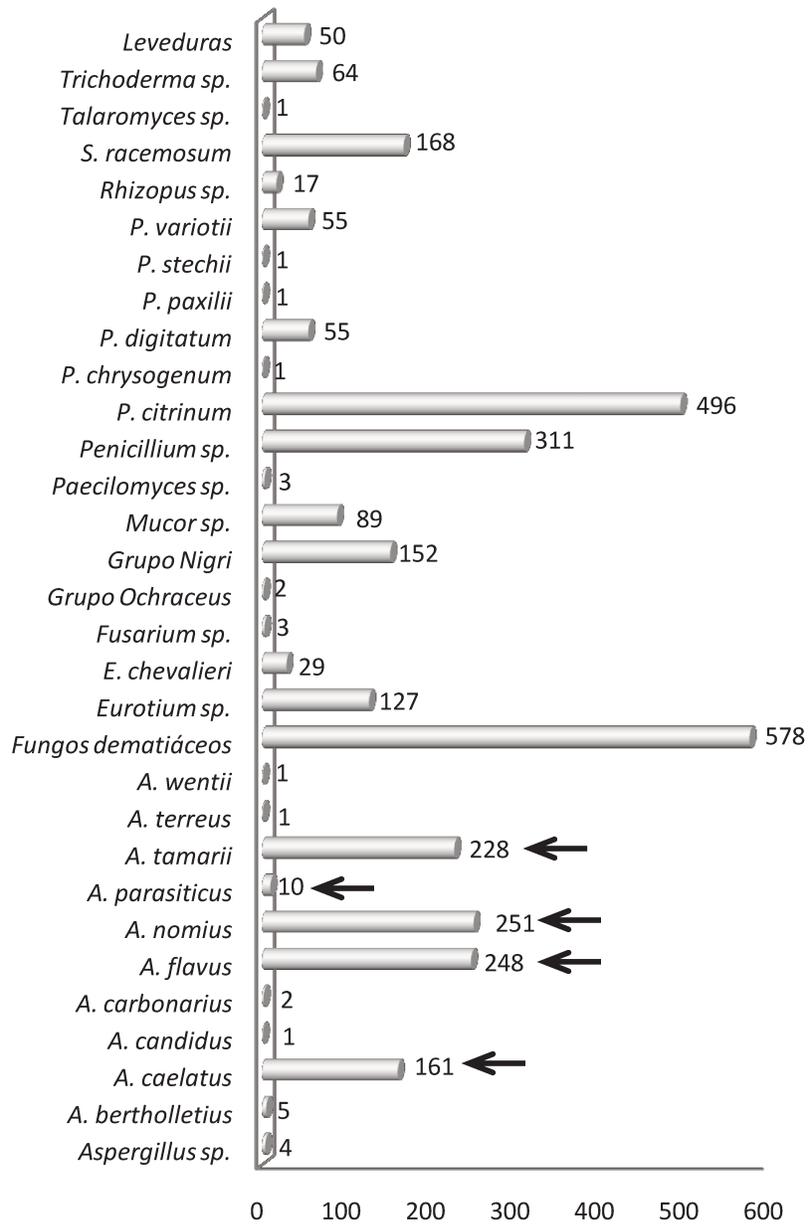


Figura 50. Número de isolados das amostras (cascas e amêndoas) de castanha do Brasil coletadas no Estado do Pará, em destaque as espécies pertencentes ao grupo *Aspergillus* section *flavi*.

Com base nos valores de atividade de água podemos concluir que os valores altos de atividade de água (entre 0,7 e 0,9) das amostras favoreceram o desenvolvimento de diversas espécies de fungos filamentosos, inclusive espécies aflatoxigênicas (Tabela 11).

Tabela 11. Relação da atividade de água e porcentagem média de infecção por fungos nas amostras do Amazonas.

<b>Origem</b>		<b>Número de amostras</b>	<b>Média Atividade de água (Aw)</b>	<b>Variação de infecção (%)</b>	<b>Média de infecção (%)</b>
Floresta	amêndoas	12	0,949	0 – 100	75,7
	cascas	12	0,933	0 – 100	100
Processadoras	amêndoas	3	-	0 – 61	41
	cascas	3	-	0 – 100	97
Mercado	amêndoas	19	0,798	0 – 100	80,6
	cascas	12	0,735	0 – 100	100

### 5.2.3 Amostras coletadas no Estado de São Paulo

#### a. Amostras coletados nos mercados.

Nas 21 amêndoas das amostras de castanha do Brasil coletadas em diferentes mercados do Estado de São Paulo, 489 isolados foram identificados, apresentando média de infecção de 52%. Apenas uma amostra não apresentou infecção fúngica. A espécie *S. racemosum* foi a única que apresentou 100% de infecção em duas amostras. A porcentagem média de infecção e o número de isolados foram menores que as encontradas nas amostras coletadas no mercado do Estado do Pará e do Amazonas. Ainda assim foram isolados fungos

aflatoxigênicos (*Aspergillus nomius* e *A. flavus*) como mostra a Figura 51. Informações mais detalhadas sobre estas amostras estão descritas no Anexo 14.

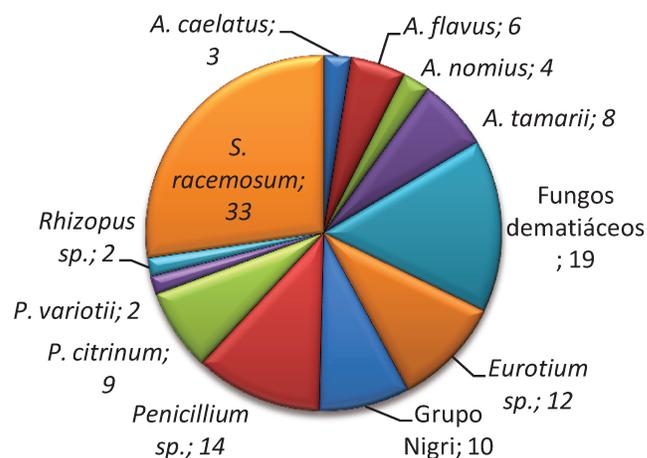


Figura 51. Micobiota (em porcentagem média de infecção) de amêndoas das amostras de castanha do Brasil coletadas nos mercados de São Paulo.

Devido ao fato da maioria das amostras comercializadas no mercado serem descascadas e processadas (17 amostras), isto é, prontas para o consumo, um menor número de amostras de cascas foram coletadas. Todas as amostras de cascas (4 amostras) de castanha do Brasil estavam infectadas e foram identificados 57 isolados. As espécies mais freqüentes foram: *Penicillium sp.*, fungos dematiáceos, *Aspergillus* section *Nigri*, *A. flavus*, *A. tamarii* e *A. nomius* (Figura 52). Informações mais detalhadas sobre estas amostras estão descritas no Anexo 15.

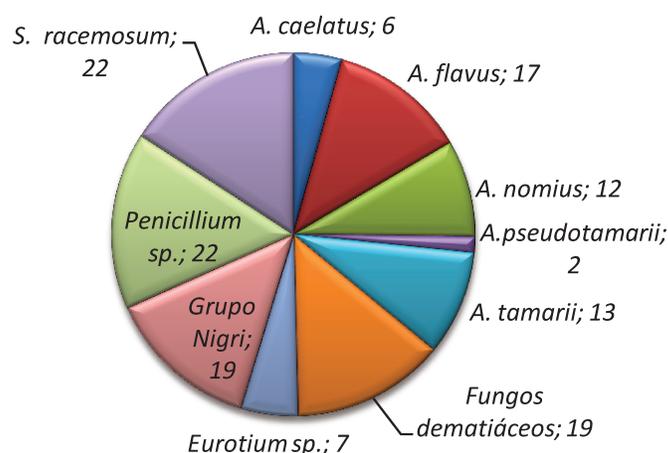


Figura 52. Micobiota (em porcentagem média de infecção) de cascas das amostras de castanha do Brasil coletadas nos mercados de São Paulo.

Apesar das amêndoas apresentarem maior biodiversidade de espécies, a maior infecção fúngica ocorreu nas cascas, com espécies potencialmente aflatoxigênicas de *Aspergillus nomius* e *Aspergillus flavus* (Figura 53).

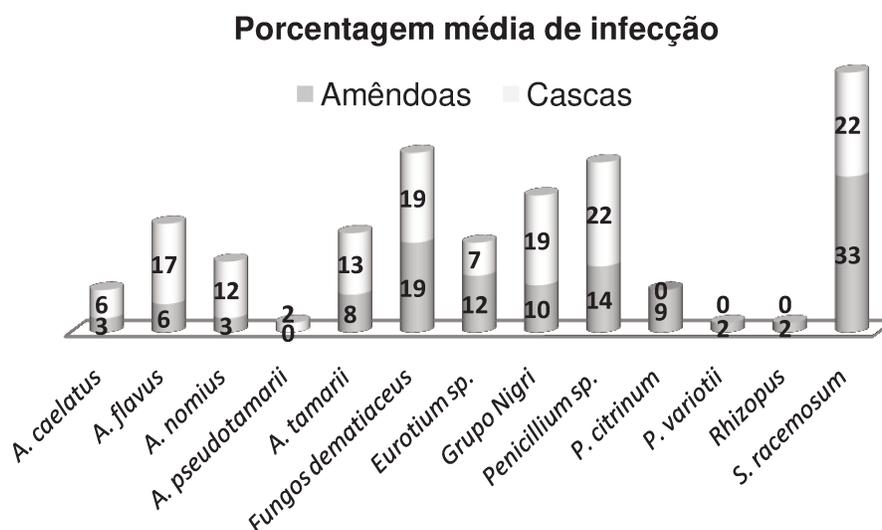


Figura 53. Porcentagem média de infecção das espécies de fungos isoladas de amêndoas e cascas das amostras de castanha do Brasil coletadas nos mercados de São Paulo

As amostras coletadas nos mercados de São Paulo, apresentaram baixa infecção por fungos nas amêndoas (52% das amostras contaminadas) e 546 isolados foram identificados, sendo 13 diferentes espécies de fungos filamentosos. As espécies mais isoladas foram: *S. racemosum*, *Aspergillus* section *Nigri*, *Eurotium spp*, fungos dematiáceos, *Penicillium spp.* e *A. flavus*. Dentre as espécies aflatoxigênicas pertencentes a *Aspergillus* section *flavi* ocorreram 50 isolados (Figura 54).

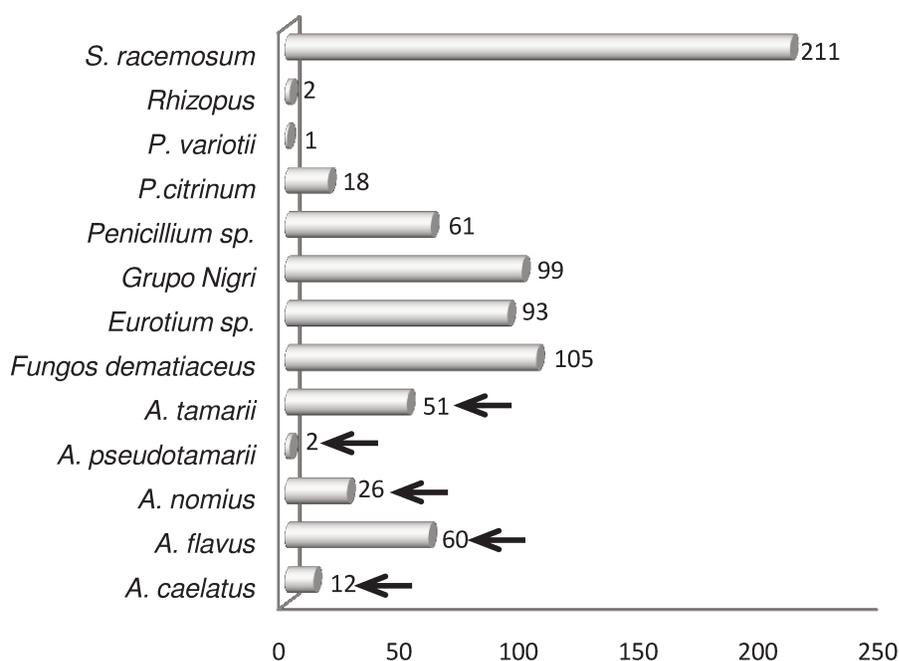


Figura 54. Número de isolados das amostras (cascas e amêndoas) de castanha do Brasil coletadas no Estado do Pará, em destaque as espécies pertencentes ao grupo *Aspergillus* section *flavi*.

Amêndoas coletadas dos mercados de São Paulo apresentaram pouca incidência de contaminação fúngica, pois estavam com valores baixos de atividade de água. Entretanto as amostras de cascas apresentaram alta infecção (Tabela 12).

Tabela 12. Relação da atividade de água e porcentagem média de infecção fúngica nas amostras do mercado de São Paulo.

<b>Origem</b>		<b>Número de amostras</b>	<b>Média Atividade de água (Aw)</b>	<b>Varição de infecção (%)</b>	<b>Média de infecção (%)</b>
Mercado	amêndoas	21	0,491	0 – 100	51,9
	cascas	4	0,519	0 – 100	100

Do total de 143 amostras analisadas, amêndoas e cascas, coletadas nas florestas, processadoras e mercados do Estado do Pará, Amazonas e São Paulo, 13.625 isolados foram identificados, com média de infecção por fungos filamentosos variando de 51,9% a 100%. As espécies, gêneros e grupos mais incidentes foram: *P. citrinum*, *S. racemosum*, *Aspergillus section Flavi*, *Aspergillus section Nigri*, *Eurotium spp.*, *Rhizopus sp.*, *Penicillium spp.* e fungos demateáceos.

Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Bayman (2002) que analisaram 59 amostras de castanha do Brasil de mercado da Califórnia e isolaram *Aspergillus flavus*, *Rhizopus sp.*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus tamaris* e *Aspergillus niger*.

De acordo com Campo/Pas (2004) dentre as espécies encontradas em castanha do Brasil destacam-se *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. clavatus*, *P. viridicatum*, *P. citrinum*, *Fusarium sacchari*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides* e *Alternaria alternata*.

Valores de atividade de água maior que 0,9 foram encontrados nas amostras coletadas na floresta do Pará e do Amazonas, comprovando que o clima úmido destes ambientes afeta diretamente a umidade das castanhas que lá se encontram. Nas amostras coletadas na floresta do Pará ocorreu maior número de

isolados, mostrando que a alta atividade de água favorece o desenvolvimento fúngico naquelas condições.

Nas amostras coletadas nas processadoras do Pará, apesar destas apresentarem baixos valores de atividade de água (0,6), considerável número de isolados foram identificados, incluindo espécies aflatoxigênicas.

As amostras coletadas do mercado, tanto no Pará quanto no Amazonas, apresentaram atividade de água em torno de 0,7 e considerável número de isolados foram identificados, ao contrário das amostras coletadas em São Paulo, que apresentaram valores inferiores a 0,5 de atividade de água (Tabela 13).

Arrus et al. (2005) isolaram *A. flavus* em amostras de castanha do Brasil coletadas na floresta Amazônica do Peru. Estes autores concluíram que as condições ótimas para o crescimento de *A. flavus* são temperatura em torno de 30°C e umidade relativa de 97%, que são as condições encontradas nas florestas, associadas a alta atividade de água da castanha, em torno de 0,91.

Tabela 13. Número de isolados nas diferentes etapas da cadeia nos Estados do Pará, Amazonas e São Paulo.

<b>ORIGEM</b>	<b>Número de amostras</b>	<b>Média de atividade de água (Aw)</b>	<b>Média de infecção (%)</b>	<b>Número de isolados</b>
<b>PARÁ</b>				
Floresta	42	0,951	94,5	5.616
Processadoras	35	0,670	96	3.325
Mercados	11	0,781	92	1.066

<b>AMAZONAS</b>				
Floresta	12	0,941	87,5	975
Processadoras	3	-	69	204
Mercados	19	0,766	90	1.893
<b>SÃO PAULO</b>				
Mercados	21	0,505	76	546

**5.4. Avaliação do potencial de produção de aflatoxinas pelos fungos *Aspergillus* section *Flavi* isolados das amêndoas de castanhas.**

A Figura 55 apresenta os isolados de *A.nomius* no meio CYA e no YESA, para teste de produção de aflatoxinas. A Figura 56 apresenta a produção de aflatoxinas dos isolados testados.

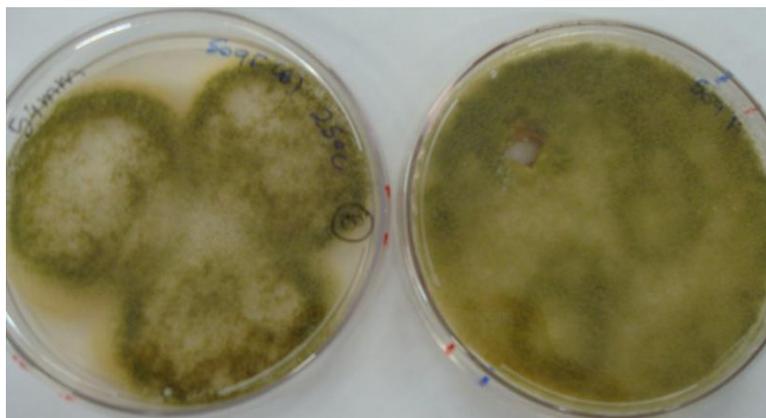


Figura 55. *Aspergillus nomius* em placa de CYA 25°C (à esquerda) e em placa de YESA 25°C (à direita).

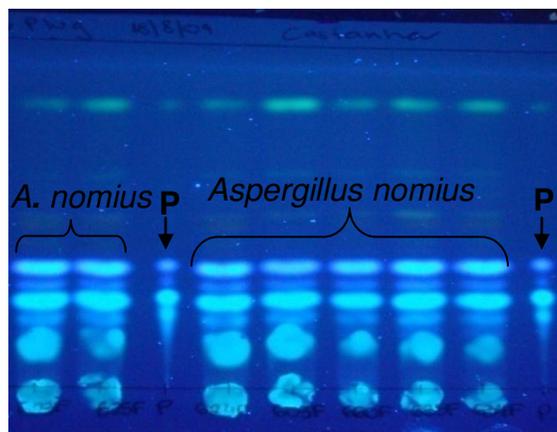


Figura 56. Produção de aflatoxinas do grupo B e G por isolados de *A. nomius*.

#### 5.4.1. Amêndoas de amostras coletadas no Estado do Pará

Dentre as amostras do Pará coletadas, foram identificadas 1.038 espécies do grupo Flavi (*Aspergillus flavus*, *A. nomius*, *A. tamarii*, *A. parasiticus* e *A. pseudotamarii*). A Tabela 14 apresenta o número de isolados de amêndoas em todas as etapas da cadeia produtiva da castanha do Brasil e a porcentagem de produção de aflatoxinas pelos isolados.

Tabela 14. Relação das espécies isoladas de amêndoas em diferentes etapas da cadeia produtiva no Pará e sua capacidade de produção de aflatoxinas.

<b>Espécies</b>	<b>Número de isolados</b>	<b>Porcentagem de produção de toxina</b>
<i>Aspergillus flavus</i>	519	37,8% (B <sub>1</sub> B <sub>2</sub> )
<i>Aspergillus nomius</i>	327	100% (B <sub>1</sub> B <sub>2</sub> G <sub>1</sub> G <sub>2</sub> )

<i>Aspergillus parasiticus</i>	4	100% (B <sub>1</sub> B <sub>2</sub> G <sub>1</sub> G <sub>2</sub> )
<i>Aspergillus pseudotamarii</i>	3	100% (B <sub>1</sub> )
<i>Aspergillus tamaraii</i>	185	100% Negativo

#### 5.4.2. Amêndoas de amostras coletadas no Amazonas

Dentre as amostras do Amazonas coletadas, foram identificados 356 espécies do grupo Flavi (*Aspergillus flavus*, *A. nomius* e *A. tamaraii*, *A. parasiticus*). Não foram identificados isolados de *A. pseudotamarii*. A Tabela 15 apresenta o número de isolados nas diferentes etapas da cadeia produtiva da castanha do Brasil e a porcentagem de produção de aflatoxinas pelos isolados.

Tabela 15. Relação das espécies isoladas em diferentes etapas da cadeia produtiva no Amazonas e sua capacidade de produção de aflatoxinas.

<b>Espécies</b>	<b>Número de isolados</b>	<b>Porcentagem de produção de toxina</b>
<i>Aspergillus flavus</i>	152	62,7% (B <sub>1</sub> B <sub>2</sub> )
<i>Aspergillus nomius</i>	119	100% (B <sub>1</sub> B <sub>2</sub> G <sub>1</sub> G <sub>2</sub> )
<i>Aspergillus parasiticus</i>	5	100% (B <sub>1</sub> B <sub>2</sub> G <sub>1</sub> G <sub>2</sub> )
<i>Aspergillus tamaraii</i>	80	100% Negativo

### 5.4.3. Amêndoas de amostras coletadas no Estado de São Paulo

Nas amêndoas das amostras coletadas no mercado de São Paulo, foram identificadas 60 espécies do grupo Flavi (*Aspergillus flavus*, *A. nomius* e *A. tamarii*). Não foram identificados isolados de *A. parasiticus* e *A. pseudotamarii*. A Tabela 16 apresenta o número de isolados das amêndoas coletadas dos mercados e a porcentagem de produção de aflatoxinas pelos isolados.

Tabela 16. Relação das espécies isoladas em amêndoas dos mercados de São Paulo e sua capacidade de produção de aflatoxinas.

<b>Espécies</b>	<b>Número de isolados</b>	<b>Porcentagem de produção de toxina</b>
<i>Aspergillus flavus</i>	32	90% (B <sub>1</sub> B <sub>2</sub> )
<i>Aspergillus nomius</i>	4	100% (B <sub>1</sub> B <sub>2</sub> G <sub>1</sub> G <sub>2</sub> )
<i>Aspergillus tamarii</i>	24	100% Negativo

Dentre os isolados pertencentes ao grupo *Aspergillus* section *Flavi* das amostras de amêndoas coletadas do Estado do Pará, Amazonas e São Paulo, os identificados como *A. parasiticus* e *A. nomius* foram potencialmente produtores das quatro aflatoxinas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>), todos os *A. pseudotamarii* foram produtores de B<sub>1</sub> e os *A. tamarii* não foram produtores de aflatoxinas. Com relação aos isolados de *A. flavus*, apesar da pouca incidência nas amostras de São Paulo, 90% foram

potencialmente produtores de aflatoxinas. Nas amostras do Amazonas 62,6% foram produtoras e nas amostras do Pará, apenas 38% foram positivas

Analisando amostras de castanha do Brasil, Olsen et al. (2008) isolaram as espécies de *A. flavus* e *A. nomius*. E 52% e 100% foram produtores de aflatoxinas do grupo B e do grupo B e G, respectivamente.

Considerando o clima da floresta e os métodos inadequados de manejo, o crescimento de fungos aflatoxigênicos e a produção de aflatoxinas nas castanhas é possível. A presença e a frequência das espécies de *A. parasiticus*, *A. nomius* e *A. flavus* potencialmente capazes de produzir aflatoxinas foram comprovadas neste trabalho.

## 5.5. Análise de aflatoxinas em amêndoas de castanha do Brasil

### 5.5.1. Otimização da metodologia de aflatoxinas em castanha do Brasil

Os limites de detecção e quantificação de aflatoxinas na castanha do Brasil foram de 0,04µg/kg e 0,2µg/kg para aflatoxinas totais respectivamente, estes valores foram encontrados somando o limite de detecção e quantificação de todas as aflatoxinas, de acordo com a Tabela 17.

Tabela 17. Limite de detecção e quantificação das aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>.

Aflatoxina	Limite de detecção	Limite de quantificação
B <sub>1</sub>	0,0179µg/kg	0,0896µg/kg
B <sub>2</sub>	0,0103µg/kg	0,0517µg/kg
G <sub>1</sub>	0,0106µg/kg	0,0532µg/kg
G <sub>2</sub>	0,0073µg/kg	0,0366µg/kg
<b>TOTAL</b>	<b>0,0461µg/kg</b>	<b>0,231µg/kg</b>

A Tabela 18 apresenta os resultados obtidos de recuperação, em três níveis testados: 0,5; 5,0 e 15,0µg/kg, com valores de recuperação 83,6%, 85,7% e 86,3%, respectivamente. As Figuras 57 à 60 apresentam a curva padrão para as quatro aflatoxinas.

Tabela 18. Otimização da metodologia de detecção e quantificação de aflatoxinas em castanha do Brasil.

<b>Aflatoxinas totais (µg/kg)</b>	<b>Repetições</b>	<b>Recuperação (%)</b>
0,5	1	70,68
	2	84,64
	3	95,53
	<b>Média</b>	<b>83,62</b>
5,0	1	85,81
	2	87,13
	3	84,07
	<b>Média</b>	<b>85,67</b>
15,0	1	89,66
	2	84,87
	3	84,47
	<b>Média</b>	<b>86,33</b>

As Figuras 57 à 60 apresentam a curva padrão para as quatro aflatoxinas.

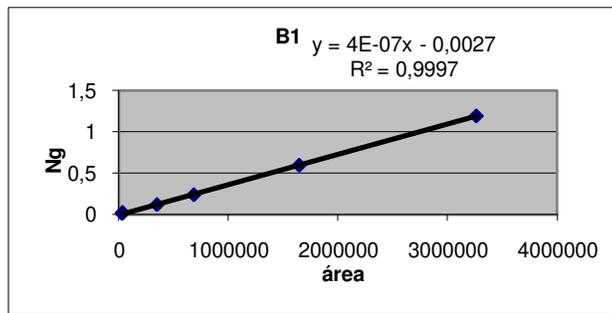


Figura 57. Curva padrão de aflatoxina B<sub>1</sub>.

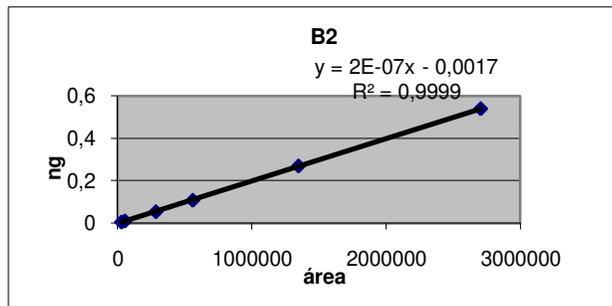


Figura 58. Curva padrão de aflatoxina B<sub>2</sub>.

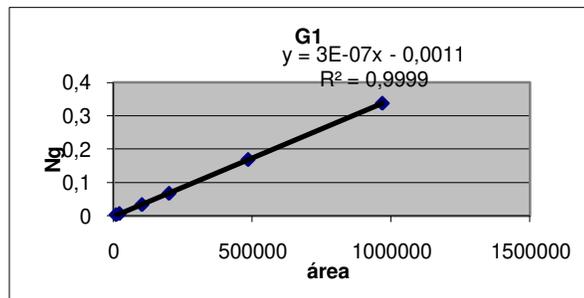


Figura 59. Curva padrão de aflatoxina G<sub>1</sub>.

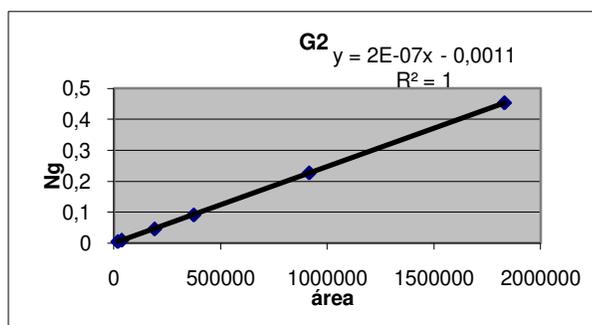


Figura 60. Curva padrão de aflatoxina G<sub>2</sub>.

### 5.5.2. Ocorrência de aflatoxinas totais nas amostras coletadas no Estado do Pará

A Tabela 19 apresenta os níveis de aflatoxinas totais obtidos nas amostras do Pará.

Tabela 19. Relação da atividade de água e aflatoxinas totais em diferentes etapas da cadeia produtiva de amostras de castanha coletadas no Pará.

Descrição	Florestas	Processadoras	Mercados
nº. amostras contaminadas / nº. total de amostras	7/ 42	25/ 35	5/ 11
Média de Aflatoxinas totais (µg/kg)	4,3	7,7	9,5
Faixa de contaminação de aflatoxinas totais (µg/kg)	N.D* – 18,1	N.D. – 84	Traços** – 104,2
Número de amostras acima do limite - 10µg/kg (RDC 07/2011)	1	3	1
Média de atividade de água	0,955	0,661	0,716

\*Não detectado (Limite de detecção 0,04µg/kg).

\*\* Traços: menor que o limite de quantificação

Das 42 amostras de amêndoas de castanha do Brasil coletadas na floresta, sete estavam contaminadas com aflatoxinas com média de 4,3µg/kg, variando de amostras não detectadas (<0,04µg/kg) a 18,1µg/kg. Resultados já esperados devido aos elevados valores de atividade de água (0,9) e o grande número de isolados aflatoxigênicos.

Com relação as amostras coletadas em diferentes etapas das processadoras, os valores médios de aflatoxinas totais foram 7,7µg/kg, e duas amostras que apresentaram valores elevados (67,5µg/kg e 84µg/kg) foram coletadas antes das etapas de processamento, logo após chegarem nas processadoras, ainda com casca. O valor médio de atividade de água das amostras coletadas nas processadoras estava baixo, em torno de 0,6. Todas as amostras adquiridas no mercado estavam contaminadas, a maioria com níveis abaixo do limite de quantificação. As amostras apresentaram valores elevados de aflatoxinas totais (9,5µg/kg) devido ao fato de uma amostra estar com 104,2µg/kg. (Tabela 19).

Freire et al. (2000) analisaram 4 amostras de castanhas adquiridas na cidade de Belém e dividiram-nas em boa e baixa qualidade. Eles detectaram aflatoxinas somente nas de baixa qualidade, em níveis de 29,2 µg/kg.

Após verificar a coloração amarela em amostras de castanha do Brasil sob luz ultravioleta de 360nm, Steiner et al. (1992) analisaram 8kg de castanha e encontraram níveis de 4µg/kg para aflatoxina B<sub>1</sub> e 1,2 µg/kg para aflatoxina G<sub>1</sub>.

### **5.5.3. Ocorrência de aflatoxinas totais nas amostras coletadas no Estado do Amazonas**

A maioria das amostras coletadas na floresta, apesar de apresentarem elevados valores de atividade de água (0,9), não apresentaram contaminação por aflatoxinas. As amostras contaminadas estavam com média de 2,1µg/kg e variaram de 0,3 até 7,4µg/kg de aflatoxinas totais, níveis inferiores aos

encontrados nas amostras da floresta do Pará, que apresentou maior infecção por fungos *Aspergillus section flavi*. Das três amostras coletadas em diferentes etapas das processadoras, duas estavam negativas para aflatoxinas e uma amostra estava contaminada abaixo do limite de quantificação (0,2 µg/kg).

Com relação as 19 amostras adquiridas nos mercados, em apenas 6 não se detectou contaminação maior que o limite de detecção. Nas amostras contaminadas, o nível médio de aflatoxinas totais foi de 1,3µg/kg (Tabela 20).

Tabela 20. Relação da atividade de água e aflatoxinas totais em diferentes etapas da cadeia produtiva de amostras de castanha coletadas no Amazonas.

<b>Descrição</b>	<b>Florestas</b>	<b>Processadoras</b>	<b>Mercados</b>
nº. amostras contaminadas / nº. total de amostras	4/ 12	0/ 3	8/19
Média de Aflatoxinas totais (µg/kg)	2,11	N.D.	1,30
Faixa de contaminação de aflatoxinas totais (µg/kg)	0,32 – 7,44	N.D.	N.D – 2,73
Número de amostras acima do limite - 10µg/kg (RDC 07/2011)	-	-	-
Média de atividade de água	0,949	-	0,798

N.D: Não detectado (Limite de detecção 0,04µg/kg).

Simões (2004) analisando amostras de castanha do Brasil nos municípios de Democracia e Capanã Grande, do Amazonas, encontrou altos níveis de aflatoxinas nas amostras de Democracia, com média de 41,4µg/kg e 3,9µg/kg nas amostras de Capanã Grande.

Pacheco; Scussel (2007) analisaram amostras do leste e oeste do Amazonas, encontrando mais da metade das amostras contaminadas com níveis variando de 1,2 a 11,5 µg/kg.

#### **5.5.4. Ocorrência de aflatoxinas totais nas amostras coletadas no Estado de São Paulo**

As amostras coletadas nos mercados do Estado de São Paulo foram as que apresentaram menores níveis de aflatoxinas totais, com média de 0,5µg/kg como mostra a Tabela 21. As amostras estavam secas e aparentemente boas.

Souza (2003) analisando amostras da cidade de Campinas, não encontrou níveis de aflatoxinas em amostras de castanhas e tortas obtidas a partir das mesmas.

Tabela 21. Relação da atividade de água e aflatoxinas totais em diferentes etapas da cadeia produtiva de amostras de castanha coletadas em São Paulo.

<b>Descrição</b>	<b>Mercados</b>
nº. amostras contaminadas / nº. total de amostras	11/ 21
Média de Aflatoxinas totais (µg/kg)	0,5
Faixa de contaminação de aflatoxinas totais (µg/kg)	traços* – 1,0
Número de amostras acima do limite - 10µg/kg (RDC 07/2011)	-
Média de atividade de água	0,491

\*Traços: menor que o limite de quantificação

Caldas et al. (2002) analisaram amostras dos mercados do Distrito Federal e 15,8% das amostras estavam contaminadas com níveis de 42µg/kg a 294µg/kg e média de 27µg/kg de aflatoxina totais.

Arrus et al. (2005a) analisando 50 pedaços de amostras com cascas e sem cascas exportadas do Peru, apesar de terem isolado *Aspergillus flavus* e este ter mostrado ser potencialmente toxigênico, não detectaram níveis de aflatoxinas nas amostras analisadas. Da mesma forma Candlish (2001 analisando 33 amostras de castanha do Brasil não detectou esta toxina nas mesmas.

Das 143 amostras analisadas, apenas 5 amostras que foram coletadas na floresta e em diferentes etapas de processamento no Pará, excederam os limites máximos de aflatoxinas totais estabelecidos pela legislação nacional (ANVISA, 2011) e pela União Européia (EU, 2010) de 10,0µg/kg para castanhas do Brasil sem casca destinadas diretamente ao consumo humano. Estas amostras apresentaram valores entre 18µg/kg a 104,2µg/kg.

Considerando as amêndoas de amostras de castanha do Brasil coletadas em diferentes etapas da cadeia produtiva do Estado do Pará, Amazonas e São Paulo, as amostras que apresentaram elevados valores de aflatoxinas foram as coletadas nas florestas, onde as condições são favoráveis para o crescimento e desenvolvimento de fungos aflatoxigênicos, nas processadoras e nos mercados os níveis de aflatoxinas totais foram baixos devido as etapas de seleção e secagem que diminuem significativamente a contaminação por fungos filamentosos e a conseqüente produção de aflatoxinas.

A figura 61 apresenta os valores médios de aflatoxinas totais encontrados em diferentes regiões durante a cadeia produtiva da castanha do Brasil.

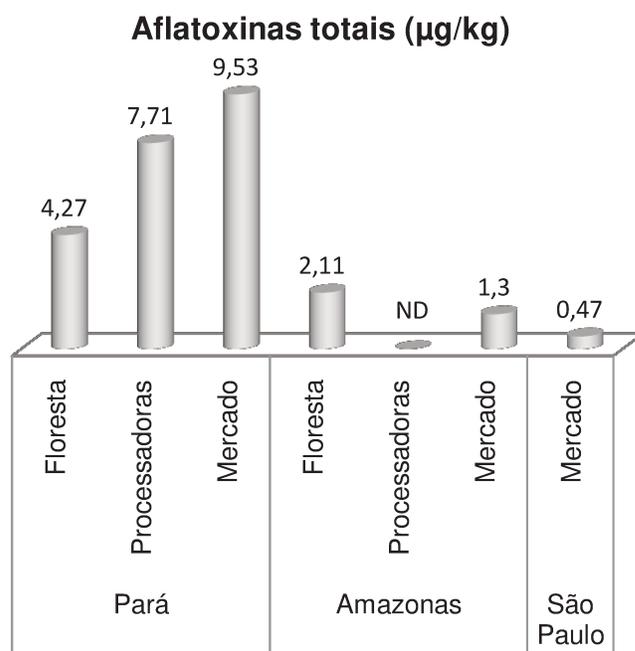


Figura 61. Valores médios de aflatoxinas totais obtidos no total de amostras de castanha do Brasil analisadas.

## 6. CONCLUSÃO

Os valores de atividade de água das amostras de castanha do Brasil coletadas tanto na floresta do Estado do Pará como do Amazonas foram mais elevados que os valores encontrados nas processadoras e nos mercados. De acordo com os resultados a seleção e a secagem realizadas nas processadoras são eficientes para reduzir os níveis de contaminação por fungos filamentosos nas amostras. As castanhas no início possuem aparência úmida e heterogênea e ao final das etapas saem das processadoras com baixos valores de atividade de água e selecionadas.

Através dos resultados obtidos a partir deste estudo, podemos concluir que os fungos filamentosos fazem parte da micobiota natural das castanhas do Brasil. Foram isoladas leveduras e 47 diferentes espécies de fungos filamentosos, sendo incidentes as espécies: *Penicillium citrinum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nomius*, *Aspergillus tamarii*, *Penicillium* spp., *Syncephalastrum racemosum*, *Absidia corymbifera*, *Eurotium* spp., *Aspergillus* section *Nigri* e fungos dematiáceos. Assim como os valores de atividade de água estavam maiores nas amostras das florestas, elas foram as que apresentaram maior biodiversidade de espécies, já nas amostras de mercado, ocorreu um número reduzido de isolados.

A maioria das espécies foi comum para as três regiões, com exceção de algumas espécies. A região do Estado do Pará foi a que apresentou maior biodiversidade, com 14 espécies isoladas apenas nesta região. Das amostras de amêndoas coletadas em todo o trabalho, foram isoladas 1.454 espécies aflatoxigênicas, destas 450 foram identificadas como *A. nomius* e 9 *A. parasiticus*, ambos apresentaram 100% de capacidade de produção de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>. Do total de 703 espécies de *A. flavus* isolados, 63,5% apresentaram a capacidade de produzir aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>.

A metodologia de análise de aflatoxinas em amêndoas de castanhas do Brasil utilizando colunas de imunoafinidade e Cromatografia Líquida de Alta

Eficiência com detector de fluorescência e derivatização com Kobra-cell, foi eficiente para detecção e quantificação de aflatoxinas nessa matriz, sendo que as extrações apresentaram altas porcentagens de recuperação com média de 85,2%.

As amêndoas de amostras coletadas das florestas apresentaram maiores níveis de aflatoxinas totais que as amêndoas dos mercados, mostrando a eficiência e a importância das etapas de beneficiamento da castanha, para a redução da contaminação por fungos aflatoxigênicos e formação de aflatoxinas. Das 143 amostras coletadas, apenas 5 amostras excederam os limites máximos de aflatoxinas totais estabelecidos pela União Européia e pela ANVISA (10,0µg/kg para castanhas do Brasil sem casca destinadas diretamente ao consumo humano).

A alta incidência destas espécies aflatoxigênicas na castanha do Brasil demonstra a importância do monitoramento desses fungos em toda a sua cadeia produtiva. A adoção de boas práticas desde a coleta na floresta, quebra, transporte, processamento e comercialização da castanha são práticas que devem ser adotadas e poderão auxiliar na redução de espécies toxigênicas e de aflatoxinas neste produto.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADS. Agência de Desenvolvimento Sustentável do Amazonas. *O Amazonas é o maior produtor de Castanha-do-Brasil, um dos produtos mais característicos da Região Amazônica*. Disponível em: <www.ads.com.br>. Acesso em: 15 nov. 2010.

AKATSU T.H. *Cadeia produtiva da castanha do Brasil – Estudo exploratório*. Departamento de estudos sócio-econômicos rurais. Paraná, 2005, 32p.

ÁLVARES V.S. *Princípios para o manejo pós colheita da castanha do Brasil*. EMBRAPA Acre. Disponível em: <www.embrapa.com.br>. Acesso em: 7 out. 2010.

AMARAL K.A.S., JÚNIOR M.M. Métodos analíticos para a determinação de aflatoxinas em milho e seus derivados: uma revisão. *Revista analytica* n.24, 2006.

ANDRADE, E. H. A. et al. Seed Composition of Amazonian *Lecythidaceae* Species: Part 3 in the Series .Studies of Edible Amazonian Plants. *J. of Food Comp. and Analysis*, 12, p. 37-51, 1999.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº7 de 18 de fevereiro de 2011. *Diário Oficial da União*. n. 37, seção 1, 22 de fevereiro de 2011.

APIZ. Associação do povo indígena Zoró. In: *Boas práticas de coleta, armazenamento e comercialização da castanha do Brasil*. 2ª edição. Cuiabá – Mato Grosso. Defanti Editora, 2009.

ARRUS, K.; BLANKA, G.; ABRAMSONB, D.; CLEARC, R.; HOLLEYA, R. A. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. *J. of Stor. Prod. Research*, v.41, p.513-527, 2005a.

ARRUS, K., et al. Microbiological and aflatoxin evaluation of Brazil nut pods and the effects of unit processing operations. *Journal of Food Prot.* 68, p.1060-1065, 2005b.

AZIZ N.H., MOUSSA L.A.A. Influence of gamma-radiaton on mycotoxin producing moulds and mycotoxin in fruits. *Food control*, v.13, p.281-288, 2002.

BAYMAN, P.; BAKER, J.; MAHONEY, N. *Aspergillus* on tree nuts, *Mycopathologia*. v.155, p.161-169, 2002.

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

- BINDER, E. M. et al. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Anim. Feed Sci. and Technology*, v.137, p.265-282, 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Decreto nº 51.209, de 18/08/1961 aprova as novas especificações para a classificação e fiscalização da exportação da Castanha-do-Brasil*. Diário Oficial de Brasília, p.853-855, 1961.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. *Especificações para padronização, classificação e comercialização interna da castanha do Brasil (Bertholletia excelsa H.B.K.)*. Portaria Nº846, de 08 de novembro de 1976. Diário Oficial da União de 19/11/1976, Seção 1, 1976.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Projeto de *Monitoramento da Castanha do Brasil - Relatório de Atividades*. Brasília, p.110, 2002.
- CALDAS E.D., SILVA S.C., OLIVEIRA J.N. Aflatoxinas e ocratoxinas A em alimentos e riscos para a saúde humana. *Revista Saúde Pública*, v.36 n.3 p. 319-323, 2002.
- CAMPO/PAS, *Manual de Segurança e Qualidade para a Cultura da castanha do Brasil*. Série Qualidade e Segurança dos Alimentos. Brasília, DF: Campo PAS, 2004.
- CAMPOS, F. et al. Trypanocidal activity of extracts and fractions of *Bertholletia excelsa*. *Fitoterapia*, v.76, p.26-29, 2005.
- CANDLISH, A. et al. A survey of ethnic foods for microbial quality and aflatoxin content. *Food Addit. and Contaminants*, v.18, n.2, p.129-136, 2001.
- CARY J.W., KLICH M.A., BELTZ S.B. Characterization of aflatoxin-producing fungi outside of *Aspergillus* section *Flavi*. *Mycologia*, v.97, n.2, p.425-432, 2005.
- CAVALIERE, C. et al. Determination of aflatoxins in olive oil by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, n.596, p.141-148, 2007a.
- CAVALIERE, C. et al. Mycotoxins produced by *Fusarium* genus in maize: determination by screening and confirmatory methods based on liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, v.105, p.700-710, 2007b.
- CHUNHIENG, T. et al. Study of selenium in the protein fractions of the Brazil nut, *Bertholletia excelsa*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v.52, p.4318-4322, 2004.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. *Subsídios para as operações de castanha do Brasil no Programa de Aquisição de alimentos*. Disponível em: <www.conab.gov.br>. Acesso em: 10 set. 2010.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. *Proposta de Preços Mínimos para os Produtos da Sociobiodiversidade*. Brasília, 2008. Disponível em: <www.conab.gov.br>. Acesso em: 23 de jan. 2011.

COOPERACRE. Cooperativa central de comercialização extrativista do estado do Acre. *Ficha técnica de produtos – castanha do Brasil*. Disponível em: <www.cooperacre.gov.br>. Acesso em: 20 de fev. 2011.

COSLOVSKY S.V. Determinantes de Sucesso na Indústria da Castanha - Como a Bolívia desenvolveu uma indústria competitiva enquanto o Brasil ficou para trás. Versão preliminar para discussão, *Massachusetts Institute of Technology*, p.21, 2005.

COSTA, S. et al, Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. *Process Biochemistry*, v.41, p.483-488, 2006

COSTA C.L., PERDONCINI M.R.F.G., ARROTÉIA C.C., KEMMELMEIER C. Inibição da produção de aflatoxina B1 por óleo de nim em culturas de *Aspergillus flavus*. *Rev. Ciên. Vida*. Seropédica, RJ, EDUR, v. 28, 2008.

COZZOLINO, S. M. F. *Usos e aplicações das dietary reference intake*. DRIs. ILSI BRASIL. São Paulo, 2001.

CRISHOLM, A., et al. Cholesterol lowering effects of nuts compared with a Canola oil enriched cereal of similar fat composition. *Nut., Met. & Card. Diseases*. v.15, p. 284-292, 2005.

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

DREW N.; FUJIWARA L. Projeto Castanha Do Brasil Estado Do Amapá. *Vinte experiências de gestão pública e cidadania*. São Paulo 1ª Edição, 2002. Disponível em: <www.inovando.fgvsp.br>. Acesso em: 26 mar. 2010

ELLIS, W. O. et al. Control of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* under modified atmosphere packaging (MAP) conditions. *Food Microbiology*, v.10, p. 9-21, 1993.

EMBRAPA. Brasília, 2009. Disponível em: < <http://www.embrapa.br/>>. Acesso em: 9 nov. 2009.

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

EU- EUROPEAN UNION. Commission Decision of 4 July 2003, imposing special conditions on the import of Brazil nuts in shell originating in or consigned from Brazil (2003/493/EC). *Official Journal of the European Union*. L 168/33, 2003.

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

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

FADINI A.L. et al. Isotermas de sorção de umidade e estudo de estabilidade de macadâmias drageadas. *Braz. Journal Food Technol.* v.9, n.2, p.83-88, 2006.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Amino acid content of foods and biological data on proteins*, p.62-63, 1970.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Statistics*. Disponível em: <[www.fao.org](http://www.fao.org)>. Acesso em: 26 de fev. 2010.

FEIBELMAN T.P., COTTY P.J., DOSTER M.A., MICHAILIDES T.J. A morphologically distinct strain of *Aspergillus nomius*. *Mycologia* v.90, n.4, p.618-623, 1998.

FERREIRA, P. R. A Bolívia é uma das causas da crise. *A expansão da fronteira agrícola está reduzindo a atividade extrativista da castanha*. Disponível em:<[www.revistaagroamazonia.com.br/castanha1](http://www.revistaagroamazonia.com.br/castanha1)>. Acesso em: 28 de ago. 2010.

FIGUEIREDO E.O., SANTOS J.C., FIGUEIREDO S.M.M. *Demandas tecnológicas para o manejo florestal da castanha-do-Brasil (Bertholletia excelsa)*. Embrapa Acre. Rio Branco, 2001, 15p.

FILTENBORG, O., FRISVAD, J. C., SVENDENSEN, J. A. Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, v.45, p.581-585, 1983.

- FILTENBORG O., FRISVAD J.C., THRANE U. Moulds in food spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, v.33, p.85-102, 1996.
- FRAGA, C. Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. *Molec. Asp.of Medicine*, v.26, p.235-244, 2005.
- FREIRE, F.; OFFORD, L. Bacterial and yeast counts in Brazilian commodities and spices. *Braz. J. Microbiol.* v.33, n.2, 2002.
- FREIRE, F.C.O.; KOZAKIEWICZ, Z.; PATERSON, R.M. Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. *Mycopathologia*, n.149, p.13-19, 2000.
- FREITAS S.C., GONÇALVES E.B., ANTONIASSI R., FERLBERG I., OLIVEIRA S.P. Meta-análise do teor de selênio na castanha do brasil. *Braz. Journal Food Technol.* v.11, n.1, p.54-62, 2008.
- FRISVAD J.C., SKOUBOE P., SAMSON R. A. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B1, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. *Systematic and applied microbiology* v.28, p.442-453, 2005.
- FRISVAD J.C., ANDERSEN B; THRANE U. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous gunfi. *Mycologicalresearch*, v.112 n.2, p.231-240, 2008.
- GLOBO RURAL. Castanha-do-Pará. Disponível em: <<http://video.globo.com>> Acesso em: 24 fev. 2009.
- GLÓRIA, M.; DARCE, R. M. Concentrado e isolado protéico de torta de Castanha do Pará: Obtenção e caracterização química e funcional. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 20, n.2, 2000.
- GONÇALEZ E. *Distribuição de fungos e micotoxinas em amostras de amendoim do plantio à colheita*. Dissertação (Doutorado em Ciências). Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2008, 94p.
- GONÇALEZ E., FELICIO J.D., PINTO M.M. Biflavonoids inhibit the production of alfatoxin by *Aspergillus flavus*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* v.34, p.1453-1456, 2001.
- GONÇALEZ E., SOUZA T.N., ROSSI M.H., FELICIO J.D., CORRÊA B. Avaliação da micoflora e ocorrência de micotoxinas em cascas de amendoim em diferentes estágios de maturação da vagem. *Ciência Agrotec.* v.32, n.5, p.1380-1386, 2008.

GREENPEACE. Viva Amazônia. Disponível em: <[www.greenpeace.org.br](http://www.greenpeace.org.br)>. Acesso em: 02 de mar. 2011.

GUTIERREZ, E. M. R.; D'ARCE, M. R.; RAUENMIGUEL, A. M. O. Estabilidade Oxidativa do Óleo Bruto da castanha-do-Pará (*Bertholletia excelsa*). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 17, n.1, p.22-27, 1997.

HOMMA, A. K. O. Extrativismo Vegetal na Amazonia: Limites e possibilidades. In: CLUSENER G. M.; SACHS I. *Extractivismo na Amazonia Brasileira: Perspectivas sobre o desenvolvimento regional*. Paris pág. 35-61, 1996.

HOMMA, A. K. O.; CARVALHO, R. A.; FERREIRA, C. A. P. E NASCIMENTO, J. D. B. *A destruição de recursos naturais: o caso da Castanha-do-Brasil do Pará no sudeste paranaense*. Embrapa Amazônia Oriental. Documentos 32, 2000, 74p.

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

IARC. International Agency for Research on Cancer. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene an styrene. In *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans* Lyon, France, 2002, v. 82, p.171–300.

ITO Y., PETERSON S.W., WICKLOW D.T., GOTO T. *Aspergillus pseudotamarii*, anew aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*. *Mycol. Res.* v.105, n.2, p.233-239, 2001.

JARDIM D.C.P. Atividade de água: considerações teóricas e práticas. In: JARDIM D.C.P., GERMER S.P.M. *Atividade de água em alimentos*. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1997. p.1-11, n.1.

KABAK B., DOBSON A.D.W., VAR I. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed. *Critical reviews in food science and nutrition*, v.46, p.593-619, 2006.

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

KERN H., GONÇALVES D. *Boas práticas da castanha do Brasil é tema de curso*. EMBRAPA Acre, 2008. Disponível em: <[www.embrapa.org.br](http://www.embrapa.org.br)>. Acesso em: 20 fev. 2011.

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

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

KORNSTEINER, M.; WAGNER, K; ELMADFA, I. Tocopherols and total phenolic in 10 different nut types. *Food chemistry*, v.98, p.381-387, 2006.

LEE, K.; JUN-HO, H. Reduction of aflatoxin B1 contamination in wheat by various cooking treatments, *Food Chemistry*, v.98, p. 71-75, 2006.

LEE S. et al. Inhibitory Effects of Naturally Occurring Compounds on Aflatoxin B1 Biotransformation, *J. Agric. Food Chem*, v.49, p.5171-5177, 2001.

LOCATELLI M., VIEIRA A.H., GAMA M. M.B. *Cultivo da Castanha-do-Brasil em Rondônia*. EMBRAPA, Rondônia, 2005. Disponível em:<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>>. Acesso em: 01 abr. 2010.

LORINI, I. *Armazenagem de Grãos*. 1ªed. Campinas/SP: IBG, 2002. 1.000p.

MACIEL, R. C. G.; REYDON, B. P. Produção de castanha-do- Brasil certificada na Resex Chico Mendes: impactos e avaliações. In: *Congresso Brasileiro da Sociedade de Economia, Administração e Sociologia Rural – SOBER*. Acre. Anais, 2008, p.1-21.

MATAN, N. et al. Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. *Int. J. of Food Microbiology*, v.107, p.180-185, 2006.

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

MOHAMED, R. et al. Quantitative determination of five ergot alkaloids in rye flour by liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *J. of Chromatography A*,v.114, p.62-72, 2006.

MOODLEY, R.; KINDNESS, A.; JONNALAGADDA S. B. Elemental composition and chemical characteristics of five edible nuts (almond, Brazil, pecan, macadamia and walnut) consumed in Southern Africa. *Journal of Env. Sci. and Health*, v.42, p.585-591, 2007.

MORI, S. A.; PRANCE G.T. Taxonomy, Ecology, and Economic Botany of the Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. and Bonpl.: *Lecythidaceae*). *Adv. Econ. Bot*, v.8, p.130-50, 1990.

MOSS, M.O. Risk assessment for aflatoxins in foodstuffs. *Int. Biod. & Biodegradation*, v.50, p.37-142, 2002.

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

NAGASHIRO, C.W. et al. Chemical composition, digestibility and aflatoxin content of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) cake produced in North-eastern Bolívia. *Livest. Res. for Rural development*, v.13, 2001.

NAS- National Academy of Sciences (US). In: *Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids*, 2000. Disponível em: <<http://www.nap.edu/catalog/9810.html>>. Acesso em: 13 fev. de 2010.

NETO R.O.T.; QUAST D.G. Atividade de água em alguns alimentos de teor intermediário de umidade. In: QUAST D.G. *Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos*. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1975, v.6, n.1 p.203-232.

NORDLEE, J. et al. Identification of a Brazil-Nut allergen in transgenic soybeans. *The New England journal of medicine*, v.14, p.688-692, 1996.

NYBG- The New York Botanical Garden. *The Brazil nut Industry- Past, present and the future*. Disponível em: <<http://www.nybg.org/bsci/braznut/>>. Acesso em: 15 mar. 2011.

OLIVEIRA C.A.F.; GERMANO P.M.L. Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular. *Revista de saúde Pública* v.31, n.4, p.417-424, 1997.

OSLEN M., JOHNSSOM P., MOLLER T., PALADINO R., LINDBLAD M. *Aspergillus nomius*, an important aflatoxin producer in Brazil nuts?. *World mycotoxin journal*, v.1, n.2, p.123-126, 2008.

PACHECO, A.M. *Selênio e aflatoxinas em castanha-do-Brasil (Bertholletia excelsa H.B.K.) e seus produtos derivados*. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Florianópolis, SC. Departamento de ciência e Tecnologia de Alimentos, 2007, 144p.

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

- 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.
- PARK K.J., BIN A., BROD F.P.R. Obtenção das isotermas de sorção e modelagem matemática para a pêra bartlett com ou sem desidratação osmótica. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.21, n.1, p.73-77, 2001.
- PASTER N., BULLERMAN L.B. Mould spoilage and mycotoxins formation in grains as controlled by physical means. *Int. J. Food Microbiol.* v.7, p.257-265, 1988.
- PEREIRA M.M.G., CARVALHO E.P., PRADO G. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos* v.20 n.1, 2002.
- PERES C.A. et al. Demographic threats to the sustainability of Brazil nut exploitation. *Science* n.302 p.2112-2112, 2003.
- PHILIPS, K.; RUGGIO, D. M.; ASHRAF-KHORASSANI, M. Phytosterol composition of nuts and seeds commonly consumed in the United States. *J. Agric. Food Chem*, v.53, p.9436-9445, 2005.
- PINHEIRO R.R. *Estudo da variabilidade genética de Aspergillus flavus como base para o desenvolvimento do PCR Multiplex para a detecção de fungos produtores de aflatoxinas em castanha do Brasil e castanha de caju*. Dissertação de Mestrado – universidade Católica de Brasília, Pós graduação em Genômica e Biotecnologia, 2004, 149p.
- PITT, J.I. *Toxigenic Aspergillus and Penicillium Species*. Department of Agriculture, Bangkok, Thailand, 1989.
- PITT J.I. Toxigenic fungi: which are importante? *Medical Mycology*, v.38, p.17-22, 2000.
- PITT, J.I., A.D. HOCKING. *Fungi and Food Spoilage*. Springer. 3ª Edição, 2009, 471p.
- QUAST D.G. Físico-química da água em alimentos desidratados. In QUAST D.G et.al. *Boletim do Instituto de Tecnologia dos Alimentos* Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1968, v.13 p.1-23.
- RATERS M., MATISSEK R. Termal stability of aflatoxin B1 and ochratoxin A. *Mycotoxin Research* v.24, n.3, p.130-134, 2008.

RYAN, E. et al. Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of Brazil, pecan, pine, pistachio and cashew nuts. *International journal of food Science and nutrition*, v.57, p.219-228, 2006.

SALEEMULLAH A.I., KHALIL I.A., SHAH H. Aflatoxin contents of stored and artificially inoculated in cereals and nuts. *Food Chemistry* v.98 p.699-703, 2006.

SAMSON R.A., HOEKSTRA E.S., FRISVAD J.C., FILTENBORG O. *Introduction to food and airborne fungi*. The Netherland, CBS, 2002, 389p.

SANTOS M.M. *Ocorrência de fungos filamentosos e micotoxinas em bagaço de cevada destinado á alimentação do rebanho bovino leiteiro no mercado da Bahia*. Dissertação (Mestrado em Medicina veterinária tropical). Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, 2004, 148p.

SANTOS J.C., SENA A.L.C., ROCHA C.I.L. Competitividade brasileira no comércio internacional de castanha do Brasil. In: 48º *Congresso Brasileiro da Sociedade de Economia, Administração e Sociologia Rural* – SOBER. Acre. Anais, 2010.

SILVA, F.A.; MARSAIOLI, A. Jr., Atividade de água em amêndoas de castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*) secas por microondas e convencionalmente. *Rev. Cienc. Exatas e Naturais*, v. 5, n.1, 2003.

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

SOBER. Participação Social no âmbito do Programa de Aquisição de Alimentos (PAA): o caso da comercialização de Castanha do Brasil pela Cooperacre In: 45º *Congresso Brasileiro da Sociedade de Economia, Administração e Sociologia Rural*. Campo Grande – MS, 2010.

SOLIS, V. E.S. *Modificações no óleo da castanha do Pará*. Tese (Doutorado em tecnologia de alimentos). São Paulo: Universidade de São Paulo, 2001, 105p.

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

SOUSA, W. P.; FERREIRA, L A. Os sistemas agrários com castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) na região sul do Estado do Amapá. *Ciência e Desenvolvimento*, Belém, v.2, n.3, p.217-246, 2006.

SOUZA, M. L.; MENEZES, H. C. Processamento de amêndoa e torta de Castanha do Brasil e Farinha de Mandioca: parâmetros de qualidade. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas/SP: v. 24, n.1, 2004.

STEINER, W.E. et al, Aflatoxins and fluorescence in Brazil nuts and Pistachio nuts. *J. of Agric. and Food Chem.* v.40, p.2453-2457, 1992.

STOIAN D. Cosechando lo que cae: la economia de la castaña (*Bertholletia excelsa*) em la amazônia boliviana. In: ALEXIADES M.N., SHANLEY P. *Productos forestales, médios de subsistência y conservaci3n de productos forestales no maderables*, Pará, 2004, v.3, n.5, p.89-116.

STROKA, J.; ANKLAM, E.; JORISSEN, U.; GILBERT, J. 2000. Immunoaffinity Column Cleanup with Liquid Chromatography Using Post-Column Bromination for Determination of Aflatoxins in Peanuts Butter, Pistachio Paste, Fig Paste and Paprika Powder: Collaborative Study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International*, Baltimore, v.83, n.2, p.320-340, 2000.

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

SURAI P.F., MEZES M., MELNICHUK S.D., TATIANA I., Mycotoxins and animal health: from oxidative stress to gene expression. *Krmiva*, v.50, n.1, p.35-46, 2008.

TAVARES F.F., FISCHER T.B., TONETTE R. *Agregaç3o de valor na castanha do Brasil: o caso da Natura Ekos*. Núcleo de estudos do agroneg3cio, ESPM – SP, 2010.

TEIXEIRA A.S. et al. Análise e quantificaç3o de aflatoxinas por cromatografia líquida de alta eficiência (clae) em amostras de castanha-do- Brasil. *Rev. Ciênc. Vida*. Seropédica, RJ, EDUR, v. 28, 2008.

THUVANDER, A. et al. Dietary intake of some important mycotoxins by the Swedish population. *Food Addit. and Contaminants*. v.18, n.8, p.696-706, 2001.

TONINI E., KAMINSKI P.M., COSTA P., SCHWNGBER L.A.M. Estrutura populacional e produç3o de castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa* Bomp.) e Andiroba (*Carapa* sp.) no sul do Estado de Ror3ima. Anais do 1º Semin3rio do Projeto Kamukaia - *Manejo sustent3vel de produtos florestais n3o madeireiros na Amaz3nia*. EMBRAPA Acre, 2008.

TRABULSI L.R. et.al. Biologia dos fungos. In:GOMPERTZ O.F. et al. *Microbiologia m3dica*. S3o Paulo. Atheneu, 1999 p.365-374.

VALOIS A.C.C. Aflatoxinas: um perigo que pode estar na castanha-do-Brasil, 2003. Disponível em:<www.folhadetefe.com.br>. Acesso em: 15 mar. 2011.

VIEIRA A.H., GAMA M.M.B., OLIVEIRA A.C., ROCHA B.R., LOCATELLI M. Comportamento fenológico da castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa* Bompl.) em Porto Velho, Rondônia. Anais do 1º Seminário do Projeto Kamukaia - *Manejo sustentável de produtos florestais não madeireiros na Amazônia*. EMBRAPA Acre, 2008.

WADT L.H.O., KAINER K.A., GOMES D.A.S., Population structure and nut yield of a *Bertholletia excelsa* stand in southwestern Amazonian. *Forest ecology and management*. v.211 n.3 p.371-384, 2005.

WADT L.H.O., SILVA A.C.C. Remoção de sementes de castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa* B.H.K.) em floresta primária do sudoeste da Amazônia. Anais do 1º Seminário do Projeto Kamukaia - *Manejo sustentável de produtos florestais não madeireiros na Amazônia*. EMBRAPA Acre, 2008.

WOOD G.E. Mycotoxins in food and feeds in the United States. *Journal of Animal Science*. v.70 p.3941-3944, 1992.

YIN Y., YAN L., JIANG J., MA Z. Biological control of aflatoxin contamination of crops. *Journal of Zhejiang University Science B* v.9, n.10, p.787-792, 2008.

YU F.L., BENDER W., GERONIMO I.H. Base and sequence specificities of aflatoxin B1 binding to single and double-stranded DNAs. *Carcinogenesis* v.11, p.475-478, 1990.

YU, J. et al. Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Appl. and Environ. Microbiology*, p.1253-1262, 2004.

## 8. ANEXOS

Anexo 1. Número de isolados, variação e porcentagem média de infecção das amêndoas das amostras coletadas na floresta do Estado do Pará.

<b>Espécies isoladas das amêndoas</b>	<b>Número de isolados</b>	<b>Variação de infecção (%)</b>	<b>Porcentagem média de infecção (%)</b>
SECTION FLAVI			
<i>Aspergillus flavus</i>	156	0 – 60	12,5
<i>Aspergillus parasiticus</i>	1	0 – 4	4
<i>Aspergillus nomius</i>	189	0 – 96	25,6
<i>Aspergillus caelatus</i>	127	0 – 98	19,3
<i>Aspergillus pseudotamarii</i>	2	0 – 4	4
<i>Aspergillus tamarii</i>	34	0 – 54	10
Grupo Nigri			
<i>Nigrospora sp.</i>	4	0 – 8	8
<i>Penicillium sp.</i>	146	0 – 100	32,2
<i>Penicillium citrinum</i>	857	0 – 100	80,6
<i>Penicillium bertholetium</i>	129	0 – 100	76,2
<i>Penicillium variotii</i>	1	0 – 2	2
<i>Eurotium sp.</i>	34	0 - 38	14
<i>Eurotium chevalieri</i>	17	0 - 16	8,5
<i>Eurotim rubrum</i>	1	0 - 2	2
<i>Mucor sp.</i>	20	0 – 61	61
<i>S. racemosum</i>	187	0 – 72	26,7

<i>Aspergillus sp.</i>	1	0 – 2	2
<i>Acremonium sp.</i>	30	0 – 60	60
<i>A.corymbifera</i>	65	0 – 92	43,3
<i>Cladosporium sp.</i>	1	0 – 3	3
Fungos dematiáceos	161	0 – 100	29
<i>Fusarium sp.</i>	1	0 – 2	2
<i>Trichoderma sp.</i>	3	0 – 4	3,5
Leveduras	5	0 – 10	10
<b>TOTAL</b>	<b>2.597</b>	<b>0 – 100</b>	<b>90</b>

Anexo 2. Número de isolados, variação e porcentagem média de infecção das cascas das amostras coletadas em floresta do Estado do Pará.

<b>Espécies isoladas das cascas</b>	<b>Número de isolados</b>	<b>Variação de infecção (%)</b>	<b>Porcentagem média de infecção (%)</b>
SECTION FLAVI			
<i>Aspergillus flavus</i>	116	0 – 40	10,8
<i>Aspergillus parasiticus</i>	1	0 – 2	2
<i>Aspergillus nomius</i>	181	0 – 92	17,3
<i>Aspergillus caelatus</i>	93	0 – 86	14,9
<i>Aspergillus tamaritii</i>	23	0 – 14	5,9
Grupo Nigri	346	0 – 97	23,3
<i>Nigrospora sp.</i>	5	0 – 10	10
<i>Penicillium sp.</i>	149	0 – 100	23,9

<i>Penicillium citrinum</i>	745	0 – 100	56,4
<i>Penicillium bertholetium</i>	187	0 – 100	78,5
<i>Penicillium raistrickii</i>	5	0 – 10	10
<i>Penicillium variotii</i>	10	0 – 6	4
<i>Eurotium sp.</i>	28	0 – 100	29
<i>Eurotium chevalieri</i>	14	0 – 10	5,6
<i>Mucor sp.</i>	8	0 – 33	21
<i>Rhizopus sp.</i>	12	0 – 73	37,5
<i>S. racemosum</i>	176	0 – 100	24
<i>Acremonium sp.</i>	13	0 - 26	26
<i>A.corymbifera</i>	40	0 – 32	20
Fungos dematiáceos	490	0 – 100	100
<i>Fusarium sp.</i>	6	0 – 12	12
<i>Trichoderma sp.</i>	28	0 – 38	11,2
<b>TOTAL</b>	<b>2.756</b>	<b>0 – 100</b>	<b>99</b>

Anexo 3. Número de isolados, variação e porcentagem média de infecção dos ouriços das amostras coletadas em floresta do Estado do Pará.

<b>Espécies isoladas dos ouriços</b>	<b>Número de isolados</b>	<b>Variação de infecção (%)</b>	<b>Porcentagem média de infecção (%)</b>
<b>SECTION FLAVI</b>			
<i>Aspergillus nomius</i>	5	0 – 12	9

<i>Aspergillus tamarii</i>	5	0 – 10	10
Grupo Nigri	35	3 – 40	27
<i>Penicillium citrinum</i>	50	0 – 100	100
<i>Penicillium bertholetium</i>	59	0 – 100	75
<i>S. racemosum</i>	6	0 – 12	12
Fungos dematiaceus	103	0 – 100	100
<b>TOTAL</b>	<b>263</b>	<b>0 – 100</b>	<b>100</b>

Anexo 4. Número de isolados, variação e porcentagem média de infecção das amêndoas das amostras coletadas em processadoras no Pará.

<b>Espécies isoladas das amêndoas</b>	<b>Número de isolados</b>	<b>Variação de infecção (%)</b>	<b>Porcentagem média de infecção (%)</b>
SECTION FLAVI			
<i>Aspergillus flavus</i>	326	0 – 100	23,3
<i>Aspergillus parasiticus</i>	3	0 – 4	3
<i>Aspergillus nomius</i>	130	0 – 50	17
<i>Aspergillus caelatus</i>	75	0 – 38	11,5
<i>Aspergillus pseudotamarii</i>	1	0 – 2	2
<i>Aspergillus tamarii</i>	99	0 – 40	11
Grupo Nigri	238	0 – 82	19,8
<i>Aspergillus theobromus</i>	2	0 - 2	4
<i>Penicillium sp.</i>	105	0 – 40	19
<i>Penicillium citrinum</i>	259	0 – 100	32,3

<i>Penicillium fellutanum</i>	1	0 – 2	2
<i>Penicillium lividum</i>	1	0 – 2	2
<i>Penicillium variotii</i>	3	0 – 4	3
<i>Penicillium islandicum</i>	6	0 – 6	4
<i>Eurotium sp.</i>	219	0 – 100	36,5
<i>Eurotium chevalieri</i>	160	0 – 100	35,5
<i>Eurotim amstelodami</i>	77	0 – 100	30,8
<i>S. racemosum</i>	226	0 – 74	23,7
<i>Rhizopus sp.</i>	52	0 – 100	52
<i>Mucor sp.</i>	2	0 – 4	4
<i>Aspergillus sp.</i>	35	0 – 68	35
<i>A.terreus</i>	1	0 – 2	2
<i>A.corymbifera</i>	3	0 – 6	6
<i>Cladosporium sp.</i>	3	0 – 6	6
Fungos dematiáceos	42	0 – 24	8,4
<i>Fusarium sp.</i>	1	0 – 2	2
<i>Trichoderma sp.</i>	3	0 – 4	3
Leveduras	2	0 – 4	4
<b>TOTAL</b>	<b>2.005</b>	<b>0 – 100</b>	<b>74,2</b>

Anexo 5. Número de isolados, variação e porcentagem média de infecção das cascas das amostras coletadas de processadoras no Pará.

<b>Espécies isoladas</b>	<b>Número de</b>	<b>Variação</b>	<b>Porcentagem</b>
--------------------------	------------------	-----------------	--------------------

<b>das cascas</b>	<b>isolados</b>	<b>de infecção (%)</b>	<b>média de infecção (%)</b>
SECTION FLAVI			
<i>Aspergillus flavus</i>	198	0 – 44	22
<i>Aspergillus parasiticus</i>	1	0 – 2	2
<i>Aspergillus nomius</i>	219	0 – 82	27
<i>Aspergillus caelatus</i>	82	0 – 36	3,6
<i>Aspergillus tamaritii</i>	115	0 – 36	17,7
<i>Aspergillus section Nigri</i>	201	0 – 64	28,7
<i>Penicillium digitatum</i>	10	0 – 20	20
<i>Penicillium sp.</i>	12	0 – 20	12
<i>Penicillium citrinum</i>	68	0 – 32	19,4
<i>Penicillium corylophilum</i>	5	0 – 10	10
<i>Penicillium variable</i>	1	0 – 2	2
<i>Penicillium variotii</i>	2	0 – 4	4
<i>Eurotium spp.</i>	35	0 – 54	23,3
<i>Eurotium rubrum</i>	2	0 – 4	4
<i>Eurotium chevalieri</i>	66	0 – 100	18,8
<i>Eurotim amstelodami</i>	4	0 – 6	4
<i>S. racemosum</i>	67	0 – 46	14,8
<i>Rhizopus sp.</i>	16	0 – 14	6,4
<i>Aspergillus sp.</i>	1	0 – 2	2
Fungos dematiáceos	192	0 – 100	38,4

<i>Fusarium sp.</i>	2	0 – 2	2
<i>Trichoderma sp.</i>	18	0 – 10	6
Leveduras	2	0 – 4	4
<b>TOTAL</b>	<b>1320</b>	<b>0 – 100</b>	<b>91,8</b>

Anexo 6. Número de isolados, variação e porcentagem média de infecção das amêndoas das amostras coletadas em mercados do Estado do Pará.

<b>Espécies isoladas das amêndoas</b>	<b>Número de isolados</b>	<b>Variação de infecção (%)</b>	<b>Porcentagem média de infecção (%)</b>
<b>SECTION FLAVI</b>			
<i>Aspergillus flavus</i>	37	0 – 52	18,5
<i>Aspergillus nomius</i>	8	0 – 8	4
<i>Aspergillus caelatus</i>	64	0 – 100	25,6
<i>Aspergillus tamaritii</i>	52	0 – 58	17,3
<i>Aspergillus section Nigri</i>	18	0 – 22	9
<i>Penicillium brasiliacum</i>	1	0 - 2	2
<i>Penicillium sp.</i>	74	0 – 66	29,6
<i>Penicillium citrinum</i>	10	0 – 8	4
<i>Eurotium sp.</i>	118	0 – 100	78,6
<i>Eurotium chevalieri</i>	50	0 – 100	100
<i>S. racemosum</i>	114	0 – 84	38
<i>Rhizopus sp.</i>	12	0 – 16	8

Fungos dematiáceos	42	0 – 28	16,8
<i>Talaromyces sp.</i>	1	0 – 2	2
<i>A. corymbifera</i>	46	0 – 82	46
<b>TOTAL</b>	<b>643</b>	<b>0 – 100</b>	<b>87,3</b>

Anexo 7. Número de isolados, variação e porcentagem média de infecção das cascas das amostras coletadas em mercados do Estado do Pará.

<b>Espécies isoladas das cascas</b>	<b>Número de isolados</b>	<b>Variação de infecção (%)</b>	<b>Porcentagem média de infecção (%)</b>
<b>SECTION FLAVI</b>			
<i>Aspergillus flavus</i>	15	0 – 10	6
<i>Aspergillus nomius</i>	8	0 – 8	5
<i>Aspergillus caelatus</i>	57	0 – 100	38
<i>Aspergillus tamaritii</i>	42	0 – 42	21
<i>Aspergillus section Nigri</i>	13	0 – 20	8,6
<i>Penicillium sp.</i>	22	0 – 16	14,6
<i>Penicillium citrinum</i>	7	0 – 10	4,6
<i>S. racemosum</i>	55	0 – 54	27,5
<i>Rhizopus sp.</i>	2	0 – 4	4
Fungos dematiáceos	131	0 – 100	43,6
<i>Trichoderma sp.</i>	68	0 – 100	45,3
<b>TOTAL</b>	<b>423</b>	<b>0 – 100</b>	<b>97</b>

Anexo 8. Número de isolados, variação e porcentagem média de infecção das amêndoas das amostras coletadas em floresta do Estado do Amazonas.

<b>Espécies isoladas das amêndoas</b>	<b>Número de isolados</b>	<b>Variação de infecção (%)</b>	<b>Porcentagem média de infecção (%)</b>
<b>SECTION FLAVI</b>			
<i>Aspergillus flavus</i>	49	0 – 80	26,7
<i>Aspergillus parasiticus</i>	5	0 – 26	14
<i>Aspergillus nomius</i>	41	0 – 32	14
<i>Aspergillus caelatus</i>	53	0 – 88	37
<i>Aspergillus tamaraii</i>	4	0 – 4	2,6
<i>Aspergillus section Nigri</i>	21	0 – 30	11,2
<i>Penicillium sp.</i>	118	0 – 100	52,3
<i>Penicillium citrinum</i>	24	0 – 73	14,3
<i>Penicillium chrysogenum</i>	1	0 – 2	2
<i>Penicillium paxilii</i>	1	0 – 2	2
<i>Penicillium stechii</i>	1	0 – 2	2
<i>Penicillium variotii</i>	16	0 – 100	51
<i>Eurotium sp.</i>	42	0 – 76	42
<i>S. racemosum</i>	11	0 – 53	29,5
Fungos dematiáceos	94	0 – 100	43
<i>Fusarium sp.</i>	1	0 – 2	2
<i>Trichoderma sp.</i>	1	0 – 2	2
<b>TOTAL</b>	<b>480</b>	<b>0 – 100</b>	<b>75,7</b>

Anexo 9. Número de isolados, variação e porcentagem média de infecção das cascas das amostras coletadas em floresta do Estado do Amazonas.

<b>Espécies isoladas das cascas</b>	<b>Número de isolados</b>	<b>Variação de infecção (%)</b>	<b>Porcentagem média de infecção (%)</b>
SECTION FLAVI			
<i>Aspergillus flavus</i>	10	0 – 14	5
<i>Aspergillus parasiticus</i>	4	0 – 20	10,6
<i>Aspergillus nomius</i>	55	0 – 54	25
<i>Aspergillus caelatus</i>	45	0 – 58	18
<i>Aspergillus tamaritii</i>	9	0 – 10	5,2
<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	34	0 - 90	32
<i>Penicillium</i> sp.	56	0 – 100	34,7
<i>Penicillium citrinum</i>	35	0 – 60	22,8
<i>Penicillium variotii</i>	3	0 – 4	3
<i>S. racemosum</i>	21	0 – 40	14
Fungos dematiáceos	209	0 – 100	57
<i>Trichoderma</i> sp.	17	0 – 18	11,3
<b>TOTAL</b>	<b>495</b>	<b>0 – 100</b>	<b>100</b>

Anexo 10. Número de isolados, variação e porcentagem média de infecção das amêndoas das amostras coletadas nas processadoras do Amazonas.

<b>Espécies isoladas das amêndoas</b>	<b>Número de isolados</b>	<b>Variação de infecção</b>	<b>Porcentagem média de</b>
---------------------------------------	---------------------------	-----------------------------	-----------------------------

		(%)	infecção (%)
<b>SECTION FLAVI</b>			
<i>Aspergillus flavus</i>	3	0 – 9	9
<i>Aspergillus nomius</i>	5	0 – 10	10
<i>Aspergillus caelatus</i>	5	0 – 33	33
<i>Aspergillus tamaritii</i>	16	0 – 30	28
<hr/>			
<i>Aspergillus section Nigri</i>	2	0 – 4	4
Grupo Ochraceus	1	0 – 7	7
<i>Penicillium citrinum</i>	65	0 – 100	100
<i>Eurotium sp.</i>	1	0 – 2	2
<i>S. racemosum</i>	10	0 - 53	28
<i>Mucor sp.</i>	26	0 – 52	52
<i>Rhizopus sp.</i>	1	0 – 2	2
<i>Aspergillus sp.</i>	1	0 – 2	2
Fungos dematiáceos	2	0 – 4	4
<b>TOTAL</b>	<b>55</b>	<b>10 – 61</b>	<b>41</b>

Anexo 11. Número de isolados, variação e porcentagem média de infecção das cascas das amostras coletadas nas processadoras do Amazonas.

<b>Espécies isoladas das cascas</b>	<b>Número de isolados</b>	<b>Variação de infecção</b>	<b>Porcentagem média de infecção (%)</b>
<hr/>			

		(%)	
<b>SECTION FLAVI</b>			
<i>Aspergillus flavus</i>	8	0 – 10	8
<i>Aspergillus nomius</i>	7	2 – 9	6
<i>Aspergillus caelatus</i>	7	4 – 6	5
<i>Aspergillus tamaritii</i>	64	38 – 58	48
<i>Aspergillus section Nigri</i>	19	12 – 16	14
<i>Penicillium citrinum</i>	14	0 – 42	42
<i>Eurotium sp.</i>	7	0 – 14	14
<i>Eurotium chevalieri</i>	4	0 – 8	8
<i>Rhizopus sp.</i>	2	0 – 3	2
<i>S. racemosum</i>	8	0 – 16	16
<i>Fungos dematiáceos</i>	8	0 – 21	11
<i>Fusarium sp.</i>	1	0 – 2	2
<b>TOTAL</b>	<b>149</b>	<b>94 – 100</b>	<b>97</b>

Anexo 12. Número de isolados, variação e porcentagem média de infecção das amêndoas das amostras coletadas em mercados no Estado do Amazonas.

<b>Espécies isoladas das amêndoas</b>	<b>Número de isolados</b>	<b>Variação de infecção (%)</b>	<b>Porcentagem média de infecção (%)</b>
SECTION FLAVI			
<i>Aspergillus flavus</i>	100	0 – 58	17,6
<i>Aspergillus nomius</i>	73	0 – 100	20,8
<i>Aspergillus caelatus</i>	27	0 – 18	7,1
<i>Aspergillus tamaritii</i>	60	0 – 38	15,1
<i>A.carbonarius</i>	1	0 – 2	2
<i>Aspergillus section Nigri</i>	75	0 – 50	13,6
<i>Penicillium sp.</i>	72	0 – 100	48,5
<i>Penicillium citrinum</i>	274	0 – 100	49,9
<i>Penicillium bertholetium</i>	55	0 – 100	55
<i>Penicillium variotii</i>	10	0 – 8	6,6
<i>Eurotium sp.</i>	13	0 – 10	4,5
<i>Eurotium chevalieri</i>	25	0 – 26	16,6
<i>Mucor sp.</i>	54	0 – 100	54
<i>Rhizopus sp.</i>	8	0 – 12	10
<i>S.racemosum</i>	58	0 – 60	19,3
Fungos dematiáceos	90	0 – 100	20,3
<i>Aspergillus sp.</i>	3	0 – 4	2,6
<i>Fusarium sp.</i>	1	0 – 2	2
<i>Paecilomyces sp.</i>	3	0 – 6	6
<i>A.terreus</i>	1	0 – 2	2

<i>A.candidus</i>	1	0 – 2	2
Leveduras	50	0 – 100	100
<b>TOTAL</b>	<b>1057</b>	<b>0 – 100</b>	<b>80,6</b>

Anexo 13. Número de isolados, variação e porcentagem média de infecção das cascas das amostras coletadas em mercados no Estado do Amazonas.

<b>Espécies isoladas das cascas</b>	<b>Número de isolados</b>	<b>Variação de infecção (%)</b>	<b>Porcentagem média de infecção (%)</b>
SECTION FLAVI			
<i>Aspergillus flavus</i>	78	0 – 48	17,5
<i>Aspergillus parasiticus</i>	1	0 – 2	2
<i>Aspergillus nomius</i>	64	0 – 36	13
<i>Aspergillus caelatus</i>	24	0 – 16	7,2
<i>Aspergillus tamaritii</i>	75	0 – 48	21,4
<i>A.carbonarius</i>	1	0 – 2	2
<i>Aspergillus section Nigri</i>	51	0 – 36	20,4
Grupo Ochraceus	1	0 – 7	7
<i>Penicillium sp.</i>	65	0 – 100	36
<i>Penicillium citrinum</i>	84	0 – 100	47,6
<i>Penicillium variotii</i>	26	0 – 44	26
<i>Eurotium sp.</i>	64	0 – 100	64
<i>Mucor sp.</i>	9	0 – 16	9
<i>Rhizopus sp.</i>	6	0 – 24	24

<i>S. racemosum</i>	60	0 – 50	27,8
Fungos dematiáceos	175	0 – 100	52,5
<i>Trichoderma sp.</i>	46	0 – 36	15,3
<i>A.wentii</i>	1	0 – 2	2
<i>Talaromyces sp.</i>	1	0 – 2	2
<b>TOTAL</b>	<b>836</b>	<b>0 – 100</b>	<b>100</b>

Anexo 14. Número de isolados, variação e porcentagem média de infecção das amêndoas das amostras coletadas em mercados do Estado de São Paulo.

<b>Espécies isoladas das amêndoas</b>	<b>Número de isolados</b>	<b>Variação de infecção (%)</b>	<b>Porcentagem média de infecção (%)</b>
SECTION FLAVI			
<i>Aspergillus flavus</i>	32	0 – 26	5,8
<i>Aspergillus nomius</i>	4	0 – 6	4
<i>Aspergillus caelatus</i>	3	0 – 2	2
<i>Aspergillus tamaritii</i>	24	0 – 18	8
<i>Aspergillus section Nigri</i>	26	0 – 10	6
<i>Penicillium sp.</i>	42	0 – 48	17
<i>Penicillium citrinum</i>	9	0 – 16	9
<i>Penicillium variotii</i>	1	0 – 2	2
<i>Eurotium sp.</i>	80	0 – 42	13
<i>Rhizopus sp.</i>	1	0 – 2	2
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	198	0 – 100	36

Fungos dematiáceos	69	0 – 48	23
<b>TOTAL</b>	<b>489</b>	<b>0 – 100</b>	<b>51,9</b>

Anexo 15. Número de isolados, variação e porcentagem média de infecção das cascas das amostras coletadas no mercado do Estado de São Paulo.

<b>Espécies isoladas das cascas</b>	<b>Número de isolados</b>	<b>Variação de infecção (%)</b>	<b>Porcentagem média de infecção (%)</b>
<b>SECTION FLAVI</b>			
<i>Aspergillus flavus</i>	8	0 – 16	16
<i>Aspergillus nomius</i>	5	0 – 10	10
<i>Aspergillus caelatus</i>	2	0 – 4	4
<i>Aspergillus tamaritii</i>	17	0 – 34	34
<i>Aspergillus pseudotamaritii</i>	1	0 – 2	2
<i>Aspergillus section Nigri</i>	6	0 – 12	12
<i>Penicillium sp.</i>	11	0 – 22	22
<i>Eurotium sp.</i>	7	0 – 14	14
<b>TOTAL</b>	<b>57</b>	<b>0 – 100</b>	<b>100</b>