

**UERR**

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOLOGIA  
MESTRADO ACADÊMICO EM ASSOCIAÇÃO COM  
EMBRAPA E IFRR**

**DISSERTAÇÃO**

**Qualidade sanitária de amêndoas de castanha-do-  
brasil e controle biológico de fungos aflatoxigênicos**

**Raimundo Silva Araújo**

**2018**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE RORAIMA  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOLOGIA  
MESTRADO ACADÊMICO EM ASSOCIAÇÃO COM EMBRAPA E  
IFRR**

## **Qualidade sanitária de amêndoas de castanha-do-brasil e controle biológico de fungos aflatoxigênicos**

**RAIMUNDO SILVA ARAÚJO**

*Sob a Orientação da Professora*  
**Dra. Hyanameyka Evangelista de Lima Primo**

*Coorientação do Pesquisador*  
**Dr. Daniel Augusto Schurt**

*Coorientação do Pesquisador*  
**Dr. Otniel Freitas Silva**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Agroecologia**. Área de concentração em Agroecologia.

Boa Vista, RR  
Abril de 2018

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**RAIMUNDO SILVA ARAÚJO**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Agroecologia**, área de concentração em Agroecologia.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 04/04/2018

---

Dra. Hyanameyka Evangelista de Lima Primo  
Pesquisadora da Embrapa Roraima  
Orientadora

---

Pesquisador Dr. Otniel Freitas Silva  
Embrapa Agroindústria de Alimentos  
Coorientador

---

Pesquisadora Dra. Teresinha Costa Silveira de Albuquerque  
Embrapa Roraima

---

Prof. Dr. Leonardo Tavares de Souza  
Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de Roraima

**Copyright © 2019 Raimundo Silva Araújo**

Todos os direitos reservados. Está autorizada a reprodução total ou parcial deste trabalho, desde que seja informada a **fonte**.

Universidade Estadual de Roraima – UERR  
Coordenação do Sistema de Bibliotecas  
Multiteca Central  
Rua Sete de Setembro, 231 Bloco – F Bairro Canarinho  
CEP: 69.306-530 Boa Vista - RR  
Telefone: (95) 2121.0945  
E-mail: biblioteca@uerr.edu.br

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

A663q Araújo, Raimundo Silva.  
Qualidade sanitária de amêndoas de castanha-do-brasil e controle biológico de fungos aflatoxigênicos. / Raimundo Silva Araújo. – Boa Vista (RR) : UERR, 2018.  
58 f. : il. Color. 30 cm.

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Agroecologia. Área de concentração em Agroecologia, sob a orientação da Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Hyanameyka Evangelista de Lima Primo e coorientação dos Pesquisadores. Dr. Daniel Augusto Schurt e Dr. Otniel Freitas Silva.

1. Aflatoxinas 2. Biocontrole 3. *Trichoderma* spp I. Lima Primo, Hyanameyka Evangelista de (orient.) II. Schurt, Daniel Augusto (coorient.) III. Silva, Otniel Freitas (coorient.) IV. Universidade Estadual de Roraima – UERR V. Instituto Federal de Roraima VI. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA VII. Título

UERR.Dis.Mes.Agr.2019.10 CDD – 634.575 (22. ed.)

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária  
Sônia Raimunda de Freitas Gaspar – CRB 11/273 - RR

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Francisca e José Borges (*in memoriam*).

DEDICO.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, que mesmo nos momentos mais difíceis de nossas vidas, nunca deixa de nos guiar.

Aos meus queridos irmãos: Nazaré, Araújo, Joseane, Josedelson, Joseângela, Josejanes e Joselaine pela amizade e companheirismo.

A Universidade Estadual de Roraima por proporcionar um curso de extrema importância para o nosso estado.

A Embrapa Roraima e todo o seu corpo de funcionários.

Ao Instituto Federal de Roraima pela liberação durante o curso e concessão de bolsa auxílio a qualificação a este servidor.

Aos Professores Dr.<sup>a</sup> Hyanameyka Evangelista de Lima Primo e Dr. Daniel Augusto Schurt, pelo processo ensino-aprendizagem ao longo do curso.

Ao Dr. Otniel Freitas-Silva e toda a equipe do Laboratório de Micotoxinas e Micologia da Embrapa Agroindústria de Alimentos pelas análises de aflatoxinas.

Aos colegas do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Roraima, Lila, Rosiane, Gabi, Morieli, Vitor e Jéssica, pelos momentos de descontração.

A todos os meus colegas do Mestrado em Agroecologia pelos momentos de aprendizagem.

Ao Sr. Mário Etevaldo do Campo Experimental Confiança da Embrapa Roraima pela coleta dos ouriços e condução dos trabalhos no SAF.

Ao senhor Waldivino Pereira de Oliveira pela colaboração na escalada das castanheiras-do-brasil para retirada dos ouriços.

Ao senhor Francisco de Assis Oliveira pela contribuição na abertura dos ouriços.

Muito obrigado!

## RESUMO

ARAÚJO, Raimundo Silva. **Qualidade sanitária de amêndoas de castanha-do-brasil e controle biológico de fungos aflatoxigênicos**. 2018. 58 p. Dissertação (Mestrado em Agroecologia). Universidade Estadual de Roraima, Boa Vista, Roraima, 2018.

A castanha-do-brasil tem grande importância para as populações da região Amazônica, principalmente as amêndoas, que são comercializadas como produto orgânico e, têm do sabor e propriedades nutricionais desejáveis. Contudo, seu consumo tem sofrido algumas restrições, principalmente, devido à contaminação de substâncias tóxicas produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*. Entretanto, a utilização do *Trichoderma* surge como uma ferramenta eficaz no controle de fitoparasitas. Objetivou-se com este trabalho, determinar a incidência de fungos e a presença de aflatoxinas em amêndoas de castanha-do-brasil, provenientes de ouriços submetidos a diferentes períodos de exposição sobre o solo após abscisão, bem como a eficiência dos isolados de *Trichoderma* spp., como agente de biocontrole em castanha-do-brasil. Para a avaliação da qualidade sanitária das amêndoas de castanha-do-brasil realizou-se o método de incubação em papel filtro “*Blotter-test*”, em amostras de ouriços, coletados diretamente das árvores e, ouriços expostos por um, 30, 60 e 90 dia(s) no solo do Sistema Agroflorestal do Campo Experimental Confiança da Embrapa Roraima, onde os resultados foram expressos em porcentagem de amêndoas contaminadas. Para o isolamento dos fungos do gênero *Aspergillus* adotou-se a técnica do plaqueamento direto das amêndoas no meio Ágar Dicloran 18% Glicerol e as análises para detecção e quantificação de aflatoxinas foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência. Nas análises descritivas, observou-se incidência de 100% do gênero *Aspergillus* nas amêndoas provenientes de ouriços que permaneceram expostos sobre solo por períodos de 30, 60 e 90 dias após a abscisão, enquanto, nos ouriços coletados diretamente da árvore, esse número foi reduzido para 15%. Todos os tratamentos apresentaram aflatoxinas, destacando-se as castanhas de ouriços expostos por 90 dias no solo, com 142,83  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para Afls B<sub>1</sub>. Nos testes de confrontação direta entre os dois isolados de *Trichoderma* sp., (Tsp5 e Tsp12) e os 35 isolados de *Aspergillus* spp., tanto nas análises estatísticas, bem como, na avaliação da escala proposta por Bell et al. (1982), o isolado de *Trichoderma* spp., (Tsp5) se comportou como o mais eficiente. Avaliando as amêndoas dos ouriços expostos por até sete dias no SAF depois de inoculadas com isolado de *Trichoderma* sp., (Tsp5) e armazenadas por [um, 30, 60 e 90 dia(s)], observou-se que, as amostras inoculadas com (Tsp5) e armazenadas por 90 dias tiveram uma redução significativa do número de isolados de *Aspergillus* spp., demonstrando que o isolado Tsp5 é um agente de biocontrole promissor.

**Palavras-chave:** Aflatoxinas; Biocontrole; *Trichoderma* spp.

## ABSTRACT

ARAÚJO, Raimundo Silva. **Sanitary quality of Brazil nut almonds and biological control of aflatoxigenic fungi**. 2018. 58 p. Dissertation (Master in Agroecology). State University of Roraima, Boa Vista, Roraima, 2018.

Brazil nuts are of great importance to the populations of the Amazon region, especially almonds, which are marketed as an organic product and have the desirable taste and nutritional properties. However, its consumption has suffered some restrictions, mainly due to the contamination of toxic substances produced by *Aspergillus* fungi. However, the use of *Trichoderma* has emerged as an effective tool for phytoparasite control. The objective of this work was to determine the incidence of fungi and the presence of aflatoxins in Brazil nuts, from fruits submitted to different periods of soil exposure after abscission, as well as the efficiency of *Trichoderma* spp. isolates, as a biocontrol agent in Brazil nuts. To evaluate the health quality of Brazil nuts, the *Blotter-test* filter paper incubation method was performed on fruits samples collected directly from the trees and fruits exposed by one, 30, 60 and 90 day(s) in the soil of the Embrapa Roraima Confiança Experimental Field Agroforestry System, where the results were expressed as a percentage of contaminated almonds. For the isolation of *Aspergillus* fungi, the technique of direct plating of almonds on Dichloran 18% Glycerol Agar medium was adopted and aflatoxin detection and quantification analyzes were performed by high performance liquid chromatography. In the descriptive analysis, 100% incidence of *Aspergillus* genus was observed in almonds from hedgehogs that remained exposed to soil for 30, 60 and 90 days after abscission, while in the fruits collected directly from the tree, this number was reduced. to 15%. All treatments presented aflatoxins, highlighting the fruits nuts exposed for 90 days in the soil, with 142.83  $\mu\text{g kg}^{-1}$  for Afls B1. In the direct confrontation tests between the two isolates of *Trichoderma* sp., (Tsp5 and Tsp12) and the 35 isolates of *Aspergillus* spp., Both in the statistical analyzes as well as in the scale evaluation proposed by Bell et al. (1982), the isolate of *Trichoderma* spp., (Tsp5) behaved as the most efficient. Evaluating the fruits almonds exposed for up to seven days in the APS after inoculation with *Trichoderma* sp. isolate (Tsp5) and stored for [one, 30, 60 and 90 day(s)], it was observed that the inoculated samples com (Tsp5) and stored for 90 days had a significant reduction in the number of *Aspergillus* spp. isolates, demonstrating that the Tsp5 isolate is a promising biocontrol agent.

**Keywords:** aflatoxins, biocontrol, *Trichoderma* spp.



## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Curva de regressão linear que define a correlação entre o teor de umidade e atividade de água das amêndoas de castanha-do-brasil em ouriços coletados nas árvores e em diferentes períodos de exposição após abscisão, sobre o solo no Sistema agroflorestal (SAF).	32
Figura 2 – Percentual médio dos fungos identificados nas amêndoas de castanha-do-brasil em ouriços coletados nas árvores e em diferentes períodos de exposição após abscisão, sobre o solo no sistema agroflorestal (SAF) no teste de sanidade.	35
Figura 3 – Percentagem de isolados identificados nas amêndoas de castanha-do-brasil em ouriços coletados nas árvores e em diferentes períodos de exposição após abscisão, sobre o solo no Sistema agroflorestal (SAF) no teste plaqueamento direto.	37
Figura 4 – Isolado de Assp 30 contra Isolado de <i>Trichoderma</i> spp5 no teste de pareamento aos 5 dias de cultivo.	38
Figura 5 – Número de isolados nos tratamentos com e sem bioformulado a base de <i>Trichoderma</i> sp. nos diferentes períodos de armazenamento de castanha-do-brasil.	42

## ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Teor de aflatoxinas detectadas nas amostras de castanhas-do-brasil de ouriços coletados nas árvores e nos diferentes períodos de exposição dos ouriços no SAF. Valores expressos em ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ).	33
Tabela 2 - Precipitação pluviométrica acumulada durante os períodos de exposição dos ouriços no solo e coletados das árvores no SAF.	36
Tabela 3 – Média do crescimento micelial (cm) dos isolados de <i>Aspergillus</i> spp., na presença de <i>Trichoderma</i> spp. após 7 dias de cultivo pareado.	39
Tabela 4 - Notas de escala de Bell et al. (1982), modificada por Louzada (2009) do antagonismo in vitro de <i>Aspergillus</i> spp. na presença de <i>Trichoderma</i> spp.	40

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
2.1	Castanha-do-brasil .....	14
2.2	Extrativismo da castanha-do-brasil na Amazônia .....	15
2.3	Contaminação da castanha-do-brasil por fungos produtores de aflatoxinas .....	17
2.4	Micotoxinas .....	18
2.5	Gênero <i>Aspergillus</i> .....	19
2.6	<i>Aspergillus</i> seção <i>Flavi</i> .....	20
2.7	Biocontrole .....	21
2.8	<i>Trichoderma</i> spp.....	23
	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
	Objetivo Geral .....	25
	Objetivos Específicos .....	25
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
3.1	Área de estudo e coleta de amêndoas de castanha-do-brasil para análises laboratoriais .....	26
3.2	Teor de umidade, atividade de água (Aw) e presença de aflatoxinas em amêndoas de castanha-do-brasil .....	27
3.3	Análise da qualidade sanitária de amêndoas de castanha-do-brasil .....	28
3.4	Isolamento e identificação de fungos em amêndoas de castanha-do-brasil.....	28
3.5	Eficiência de bioformulado a base de <i>Trichoderma</i> spp. no controle biológico <i>in vitro</i> de isolados de <i>Aspergillus</i> spp. em castanha-do-brasil .....	29
3.6	Eficiência do bioformulado a base de <i>Trichoderma</i> sp. em amêndoas de castanhas-do-brasil armazenadas por diferentes períodos de tempo .....	31
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>32</b>
4.1	Teor de umidade, atividade de água (Aw) e presença de aflatoxinas em amêndoas de castanha-do-brasil .....	32
4.2	Análise da qualidade sanitária em amêndoas de castanha-do-brasil .....	35
4.3	Isolamento e identificação de fungos em amêndoas de castanha-do-brasil.....	37
4.4	Eficiência de bioformulado a base de <i>Trichoderma</i> spp. no controle biológico <i>in vitro</i> de isolados de <i>Aspergillus</i> spp. em castanha-do-brasil .....	38
4.5	Eficiência do bioformulado a base de <i>Trichoderma</i> sp. em amêndoas de castanhas-do-brasil armazenadas por diferentes períodos de tempo .....	42
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>44</b>
	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>45</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A castanheira-do-brasil (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) tem grande relevância econômica e social para a agricultura familiar na região Amazônica, por se tratar de um produto onde se explora basicamente o extrativismo vegetal não madeireiro. A extração de suas amêndoas é de fundamental importância como fonte de alimentação e renda para os habitantes dessa região (TAVARES et al., 2010).

Nos últimos anos, a castanha-do-brasil tem ganhado destaque no cenário internacional, tendo seu produto um grande impacto na balança comercial brasileira, sendo exportada para vários países ao redor do mundo, principalmente, os da América do Norte e da Europa, impulsionando a economia do país. Além disso, em decorrência do seu sabor e de suas propriedades nutricionais, as amêndoas estão sendo comercializadas como produto orgânico, satisfazendo um mercado consumidor cada vez mais exigente (COSTA, 2012; AGUIAR, 2014; REIS et al., 2014).

Entretanto, as exportações para esse mercado consumidor, têm sido extremamente afetadas em decorrência do elevado índice de contaminação por aflatoxina, substância que, devido seus efeitos toxicológicos, pode ocasionar câncer nos seres vivos. Segundo a Agência Internacional de Pesquisa do Câncer – AIPC, essa substância é produzida principalmente, pelos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, que são microrganismos muito comuns no ambiente em que a castanheira-do-brasil é produzida (FRANK; BETANCOURT, 1981).

Segundo Souza et al. (2004), as principais causas para essa contaminação está diretamente relacionada à sazonalidade do produto em nosso país e o clima da região Amazônica, que apresenta elevada temperatura e umidade elevada durante boa parte do ano. Constata-se também baixo nível de tecnologia adotado pelos extrativistas e o longo período em que o fruto da castanha-do-brasil fica em contato com a microbiota do solo, no período chuvoso, após o desprendimento do pedúnculo, constituindo os fatores primordiais para a contaminação das amêndoas de castanha-do-brasil por fungos produtores de aflatoxinas.

O controle biológico pode ser uma das alternativas no manejo de doenças em plantas, pois, consegue atuar em muitas situações, onde outros métodos de controle não atuam ou tem resultados muito limitados (BETTIOL et al., 2009). No entanto, essa forma de controle foi viabilizada após muitos anos de pesquisa em vários países, com a seleção de antagonistas e o desenvolvimento de formulações estáveis, que carregam uma grande quantidade de esporos

viáveis, que possam ser competitivos no seu sítio de atuação, principalmente, no solo (LOBO JÚNIOR et al., 2009).

Fungos do gênero *Trichoderma*, tem se mostrado como os principais agentes de controle biológico por apresentar resultados significativos como microrganismos antagônicos, conseguindo inibir alguns parasitas de plantas. Assim, a hipótese estabelecida para a pesquisa é que fungos do gênero *Trichoderma* poderão auxiliar no controle biológico de *Aspergillus* spp., fungos produtores de aflatoxinas em amêndoas de castanha-do-brasil.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Castanha-do-brasil

A castanheira-do-brasil (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) é caracterizada por ser uma planta arbórea que pertence ao grupo de nozes. Foi descrita inicialmente em 1808 na Venezuela, nos relatórios das viagens de Humboldt e Aimé Bonpland, que pesquisaram e descreveram a flora de várias regiões do mundo (PACHECO; SCUSSEL, 2006). Na década de 1960, para fins de comercialização e exportação, foi regulamentada por lei pelo Ministério da Agricultura, passando a ser denominada efetivamente de castanha-do-brasil (BRASIL, 1961).

Pertencente à família das Lecythidaceae, é uma planta típica das florestas tropicais de clima quente e úmido, estando presente em alguns países da Amazônia como o Brasil, Venezuela, Colômbia, Bolívia, Peru e Guianas. Encontra-se distribuída principalmente ao longo das bacias hidrográficas dos rios Amazonas e Orenoco, no Brasil, é encontrada em grande escala nos estados da Região Norte, Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins (SCOLES, KLEIN, GRIBEL, 2014; TONINI et al., 2014), bem como nos estados de Mato Grosso e Tocantins.

A árvore da castanha-do-brasil tem porte alto, podendo atingir mais de 50 m de altura. Seu caule é cilíndrico e liso com tronco reto, apresentando ramos laterais até a altura de sua copa. Sua casca é densa, escura e fendida. Os galhos são encurvados e bem separados nas extremidades com folhas bem largas, alternadas, pecioladas e onduladas de coloração verde-escuras na parte abaxial e pálida na axial (BRASIL, 1976).

Uma árvore de castanha-do-brasil adulta, de ocorrência natural, frutifica pela primeira vez entre oito a 12 anos e, normalmente, produz após os 14 anos (PAS, 2004). Após o florescimento, o período de crescimento e maturação dos frutos se completa aos 15 meses (PACHECO; SCUSSEL, 2006). O início da floração da castanheira-do-brasil nos municípios que são produtores no estado de Roraima acontece nos meses de baixa precipitação pluviométrica, e o período de maior queda dos ouriços ocorre na época de maior incidência de chuvas (TONINI et al., 2014).

O fruto, também conhecido como ouriço é um pixídio globoso, apresentando em média 10 cm de diâmetro, podendo conter até 25 sementes de comprimento variáveis. Esta semente contém uma amêndoa comestível, rica em proteínas, carboidratos e fibras. A casca

do ouriço é espessa com material lenhoso e duro, de cor castanha clara, repleta de resina, com massa variando entre 0,5 a 5 kg (BRASIL, 2002).

Segundo Camargo; Castro; Gavilanes (2000), a amêndoa da castanha-do-brasil é composta por tecidos que são delimitados por um anel meristemático, sendo este envolto por uma camada epidérmica e uma película constituída por material de lignina. Sua estrutura embrionária explica, em parte, seu lento processo de germinação e relaciona-se com o sucesso em sua dispersão em condições naturais, principalmente por animais silvestres incluindo a cotiara (*Myoprocta* spp.).

## **2.2. Extrativismo da castanha-do-brasil na Amazônia**

As espécies florestais da Amazônia apresentam grande potencial para o extrativismo, sendo uma das atividades mais importantes para as populações que habitam a região, estimulando o uso sustentável e racional dos seus recursos naturais existentes, bem como o desenvolvimento econômico e social com a preservação e equilíbrio ecológico do ambiente, evitando assim, a longo prazo o risco de devastação e extinção da floresta amazônica (FAO, 2008).

Pimentel et al. (2007) citam que, no caso da amêndoa da castanha-do-brasil ser um produto que é comercializado *in natura*, políticas de preços acessíveis devem ser implantadas, para promover o desenvolvimento do seu sistema de produção, além de algumas outras políticas de incentivo ao extrativismo, as quais possibilitariam a implantação de cultivos comerciais da castanha-do-brasil, sendo que na Amazônia, a importância social e econômica dos produtos florestais não madeireiros (PFNM) é secular em função de seus povos tradicionais.

O desenvolvimento inicial da Amazônia teve como modelo o extrativismo vegetal, que foi durante um longo período, o carro chefe da economia dessas populações e mesmo que, nos últimos anos tenha perdido força em decorrência do crescimento de atividades agrícolas que visam lucro a curto e médio prazo, continua sendo alternativa na geração de renda, trabalho e emprego e, principalmente, na subsistência dos habitantes das regiões ribeirinhas (TONINI et al., 2007).

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 2016, a semente da castanha-do-brasil, foi o quarto produto extrativista em relevância econômica para Amazônia brasileira, com uma produção estimada em 34.644 toneladas, decréscimo de 14,7% em relação a 2015, com valor de produção estimado em R\$ 110,1 milhões; destacando-se o

estado do Amazonas que atingiu a posição de maior produtor da federação com 14.945 toneladas (IBGE, 2016).

O estado do Acre que em 2015 era o maior produtor nacional teve uma redução de 37,7% em sua produção, em função da escassez de chuvas que afetaram as principais regiões produtoras do estado. Já o estado de Roraima, que ainda possui uma produção insipiente de 161 toneladas, destaca-se o município de Rorainópolis, responsável por 58 toneladas (IBGE, 2016). Ainda, de acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2015), o Brasil foi o principal responsável pelas exportações da castanha-do-brasil, contribuindo de maneira significativa para o Produto Interno Bruto (PIB) do país.

Os extrativistas que moram nas comunidades rurais, comercializam a sua produção por um valor relativamente baixo para um negociante intermediário (atravessador) que, geralmente, vêm de outras localidades da Amazônia, na época do pico de produção da castanha-do-brasil. Posteriormente, essa produção adquirida é enviada para outros estados, sendo armazenada em depósitos por um período até a chegada da entressafra, época que atingirá um melhor preço de mercado (TONINI et al., 2014).

No estado de Roraima, o extrativismo da castanha-do-brasil é praticado, principalmente, por agricultores familiares, indígenas e ribeirinhos que vivem ao longo da bacia do Rio Branco, sendo os maiores produtores os municípios de Rorainópolis, Caroebe, Caracará, São João da Baliza e São Luís do Anauá (TONINI et al., 2014). Entretanto, o sistema extrativista praticado por esses produtores em Roraima, enfrenta grandes problemas durante todo o seu processo produtivo, principalmente, os relativos à adoção de boas práticas extrativistas de pós-colheita, que consiga diminuir a infestação das castanhas por fungos produtores de aflatoxinas, potencializando sua comercialização (TONINI et al., 2014).

A adoção do extrativismo sustentável tanto na colheita como no transporte configura-se como alternativa viável para minimizar essa contaminação, e conseqüentemente, aumentar a produtividade da castanha-do-brasil. Entre essas práticas destacam-se o enterrio e a amontoa dos restos culturais da safra anterior, redução de permanência do fruto em contato com o solo e a quebra dos frutos com a imediata retirada das castanhas, em áreas que sejam bem arejadas e com superfície limpa, distante da área de coleta (NOGUEIRA et al., 2010; CALDERARI, 2011; SANTOS, 2012).



### 2.3. Contaminação da castanha-do-brasil por fungos produtores de aflatoxinas

Fungos do gênero *Aspergillus* produzem aflatoxinas, que, no ponto de vista econômico e social, acarretam prejuízo significativo para a sociedade a curto e longo prazo, pois esses produtos podem sofrer sanções para sua comercialização e exportação, além de ser um agente de intoxicação alimentar (LEITE; SOUZA, 2002; PEREIRA et al., 2002).

As aflatoxinas com potencial cancerígeno podem ser encontradas em diversos alimentos, incluindo, principalmente, o grupo das oleaginosas. A aflatoxina B<sub>1</sub> é o principal metabólito produzido pelos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus nomius*. Outra espécie, a *Aspergillus parasiticus*, além de, produzirem as aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> também produzem as aflatoxinas G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> (JOHNSON, 2006).

Ao detectar a presença de fungos nos alimentos, os países importadores passaram a estabelecer padrões e níveis de contaminação aceitáveis quanto à presença de micotoxinas, instituídos por meio da elaboração de legislações cada vez mais rígidas, no que dizem respeito aos níveis máximos permitidos, onde os valores variam conforme o país, os quais flutuam para aflatoxinas totais de 1 µg kg<sup>-1</sup> na França, e 30 µg kg<sup>-1</sup> no Brasil e em outros países (CASTRILLON; PURCHIO, 1988; FREIRE et al., 2007).

A prevenção da contaminação de alimentos por aflatoxinas nem sempre é efetiva ou praticável, especialmente em países de clima tropical, como o Brasil, onde as condições de temperatura são favoráveis o ano todo contribuindo para que os fungos aflatoxigênicos cresçam e produzam toxinas (SYLOS, 2006).

Desta forma, é essencial o controle em caráter preventivo para diminuir a contaminação da castanha por fungos e a produção da micotoxina (PACHECO, 2007), o que foi preconizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) por meio da Instrução Normativa n° 11, de 22 de março de 2010 (BRASIL, 2010), com as medidas para a prevenção e redução da contaminação por aflatoxinas na cadeia produtiva da castanha-do-brasil.

Arrus et al. (2005) revelam que, uma estratégia eficaz para evitar aflatoxina em castanha-do-brasil é a prevenção do crescimento do fungo após a coleta do produto mediante controle adequado de temperatura e umidade relativa do ar durante o armazenamento. Nunes et al. (2003) complementam ainda que, o fungo pode não estar presente no produto, mas suas micotoxinas podem permanecer, pois, estas não são facilmente eliminadas.

Reduzindo o tempo de permanência do ouriço após abscisão na floresta e a secagem adequada do produto, também são medidas citadas como de fundamental importância para

reduzir a incidência dos fungos produtores de aflatoxinas (PEREIRA et al., 2002). No entanto, de acordo com Pacheco (2003), nem mesmo a secagem pode garantir a não contaminação por aflatoxina, devendo ser feito controle rigoroso para evitar o crescimento dos fungos, principalmente na sua coleta na floresta evitando que ocorra a contaminação do produto já no início da cadeia produtiva.

#### 2.4. Micotoxinas

Micotoxinas são substâncias tóxicas, oriundas do metabolismo secundário de alguns fungos filamentosos, que possuem baixo peso molecular e também são altamente contaminantes de alimentos. Além disso, possuem alta tolerância aos tratamentos físicos e químicos; físicos e a ação de enzimas do sistema digestivo do homem e dos animais (ASTOVIZA; SUAREZ, 2005).

Pitt e Hocking (2009) relatam que, é conhecido um elevado número de micotoxinas, resultados da síntese metabólica dos *Aspergillus* spp., que produzem a aflatoxina, considerada a mais perigosa e tóxica para o ser humano e animais domésticos, presente em diversos alimentos, dentre eles a castanha-do-brasil. O gênero *Fusarium* também produz outros tipos de micotoxinas, tais como a fumonisinas, zearalenona e o deoxinivalenol (CAVALIERE et al., 2007). Os principais microrganismos que tem potencial para produzir as micotoxinas pertencem basicamente a cinco gêneros de fungos, sendo eles: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria* e *Claviceps* (XAVIER, 2007).

Lopes et al. (2005) citam que, no processo de beneficiamento de um produto industrializado, mesmo com a total remoção dos fungos micotoxigênicos, as substâncias consideradas tóxicas podem permanecer nos alimentos. Por isso, é praticamente quase impossível eliminar totalmente esses compostos tóxicos dos alimentos, sendo necessária sua redução a um nível tolerável, com posterior inspeção dos malefícios que esses compostos podem trazer a humanidade (CODEX, 1995; ANDRADE, 2012).

O substrato em que o fungo está presente se caracteriza como um dos principais fatores de influência na produção dos tipos e nas quantidades das micotoxinas, visto que, é onde são encontradas as maiores taxas de compostos orgânicos para a alimentação e sobrevivência desses microrganismos (IAMANAKA; OLIVEIRA; TANIWAKI, 2010), como, por exemplo, a amêndoa da castanha-do-brasil.

Outros dois fatores como a umidade relativa do ar e a atividade de água ( $A_w$ ), também são importantes e podem influenciar diretamente na produção desses metabólitos secundários,

pois, os fungos produtores desses compostos tóxicos conseguem se desenvolver em ambientes com umidade relativa do ar superior a 80% e atividade de água entre 0,60 e 0,90 (CALDERARI, 2011; TANIWAKI; IAMANAKA; SILVA, 2011). Além disso, a atividade de água, que é medida numa escala de 0 a 1, também se caracteriza por interferir no equilíbrio dos alimentos, sendo possível influenciar tanto sua vida útil como a sua deterioração (PITT; HOCKING, 2009).

A aflatoxina destaca-se das demais, por ser a principal micotoxina encontrada em amêndoas de castanha-do-brasil e isso se deve principalmente, por ser um elemento considerado contaminante dos alimentos e com um elevado potencial cancerígeno, sendo que, o patógeno produtor da aflatoxina pode ocorrer desde a fase do campo até o armazenamento desses alimentos (CALDAS; SILVA; OLIVEIRA, 2002).

Segundo Teixeira et al. (2008), o controle das micotoxinas está inteiramente relacionado com a inspeção da qualidade dos alimentos e também a procedimentos reguladores, sendo que, vários países no mundo adotam um parâmetro, limitando a entrada de produtos contaminados em suas fronteiras, principalmente a aflatoxina.

## 2.5. Gênero *Aspergillus*

Representa um dos gêneros de fungos mais antigos do mundo e seu primeiro registro data do ano de 1729, por Micheli (BENNETT, 2010). *Aspergillus* spp. é um grupo de fungos de natureza filamentosa, mais conhecidos na atualidade, com mais de 300 espécies identificadas, ordenadas em quatro grandes subgêneros, sendo eles discriminados como *Aspergillus*, *Nidulantes*, *Fumigati*, e *Circumdati*, e comumente distribuídos em seções (HOUBRAKEN et al., 2014; HUBKA et al., 2015). Sendo fungos, originalmente, saprófitas, têm a matéria orgânica em decomposição como principal substrato e meio de sobrevivência, encontrados, principalmente, em regiões mais quentes (KLICH, 2002a).

Muitos desses organismos possuem elevada relevância para as áreas econômica e social, sendo muito usados no processamento de alimentos industrializados, bioprocessos industriais, produção de enzimas, antibióticos e ácidos orgânicos, além disso, várias dessas espécies também são muito conhecidas por apresentarem potencialidade na deterioração de alimentos, produção de micotoxinas, além de serem patogênicas à fauna e a flora (VARGA et al., 2004; SAMSON et al., 2014; SILVA et al., 2015).

As espécies do gênero *Aspergillus* caracterizam-se de forma peculiar por apresentarem conidióforo asseptados, apresentando uma célula em formato de talo filamentoso, conhecida

como célula pé. No ápice desse conidióforo está localizada uma estrutura denominada vesícula, que é de onde surgem as fiálides, e posteriormente os conídios nas espécies monosseriadas. Além disso, nas espécies que são bisseriadas, existe uma célula conhecida como métula, que fica localizada, entre a vesícula e as fiálides (RAPER; FENNEL, 1965; KOZAKIEWICZ, 1989; GAMS et al., 1998). Nos últimos anos a classificação e identificação dos fungos do gênero citado acima foram fortemente influenciadas pela caracterização biológica e molecular, sendo meramente baseada em caracteres fenotípicos resultando em avanços significativos para a taxonomia (SAMSON et al., 2014).

Para a identificação na forma mais tradicional, os fungos do gênero *Aspergillus* exigem algumas observações que, são bem característicos em suas estruturas de reprodução, incluindo principalmente, a coloração das colônias, diâmetro das colônias, cor do reverso, produção de compostos exsudatos e pigmentos solúveis, tipos de hifas, além, da presença e ausência de esclerócios e cleistotécio. Além disso, na micromorfologia também são observados o formato de seriação, o comprimento da vesícula, a morfologia dos conídios, conidióforos e esclerócios (KLICH, 2002b).

As seções *Flavi*, *Circumdati* e *Nigri* são as espécies mais comumente estudadas, pois, algumas delas têm grande potencial para produzir as micotoxinas (KLICH, 2002b; VARGA et al., 2004). O controle da elevada taxa de contaminação por espécies de *Aspergillus* da seção *Flavi* reflete num dos maiores entraves na produção de amêndoas de castanha-do-brasil e, conseqüentemente, no controle da alta incidência de aflatoxinas na produção de amêndoas (TANIWAKI et al., 2012). Entretanto, esta contaminação, apesar de ocorrer com muita frequência, ainda não foi amplamente discutida e elucidada, mas sabe-se que ocorre, principalmente, em regiões de clima quente e úmido, lugares que são historicamente conhecidos e implicados na deterioração de alimentos (TANIWAKI; SILVA, 2001).

## **2.6. *Aspergillus* seção *Flavi***

As espécies de fungos que são potencialmente produtores de micotoxinas distribuem-se em três grandes seções do gênero *Aspergillus*, porém, a seção *Flavi* é a que tem o maior número de fungos produtores de micotoxinas (PILDAIN et al., 2004). A distribuição taxonômica da seção *Flavi* é muito extensa e está ao longo dos anos em constante evolução. As espécies são identificadas por caracterização bioquímica e morfológica, porém, os genes calmodulina e  $\beta$ -tubulina têm sido considerados cada vez mais primordiais para a adequada identificação da espécie (RODRIGUES et al., 2009; GONÇALVES et al., 2012; MASSI et

al., 2014). As espécies de fungos mais comumente identificadas afetando as amêndoas da castanheira-do-brasil são *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* (REIS et al., 2014).

*Aspergillus* spp., são fungos pertencentes à seção *Flavi* e incluem espécies que apresentam conídios com coloração que pode variar de verde-amarela para verde-oliva (KLICH, 2002). Esta seção contém 22 espécies de fungos estreitamente relacionadas umas com as outras e separadas em clados que produzem diferentes perfis de metabólitos secundários. Esta seção que é dividida em dois grupos apresenta seis espécies de fungos que, são economicamente importantes de acordo com o impacto sobre os alimentos e a saúde do homem (GODET; MUNAUT, 2010).

Essas espécies são constituídas por organismos que podem prejudicar e ocasionar danos em cereais e oleaginosas armazenados, sendo que, o primeiro grupo representa os compostos que são considerados perigosos para o homem e os animais, como as micotoxinas. As espécies de fungos que não produzem aflatoxinas estão no segundo grupo, como *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus tamarisii* e *Aspergillus sojae*. Muitas vezes observa-se que *A. flavus* é erroneamente utilizado para descrever as espécies de *Aspergillus* da seção *Flavi*. Há pouco tempo houve a descrição e a inclusão de novas espécies na seção *Flavi* como, *Aspergillus novoparasiticus*, (GONÇALVES, et al., 2012), *Aspergillus sergii*, *Aspergillus transmontanensis* *Aspergillus mottae* (SOARES et al., 2012) e *Aspergillus bertholletius* (TANIWAKI et al., 2012), porém, não se consegue o isolamento de muitas dessas espécies.

Os fungos da seção *Flavi* produzem, além da aflatoxina, o ácido ciclopiazônico uma micotoxina que, no início da década de 1960 pode ter sido responsável por uma grande síndrome na Inglaterra, e representa atualmente uma ameaça à indústria alimentícia, pois, afeta diretamente produtos em fase de armazenamento. Um grande número de isolados de *Aspergillus flavus* é potencialmente capaz de fazer a sintetização tanto das aflatoxinas quanto do ácido ciclopiazônico (ZORZETE et al., 2013), porém, pouco se sabe do efeito e da reação destas substâncias no nosso organismo, o que notadamente ainda deverá ser pesquisado e estudado (BAQUIÃO et al., 2013).

## 2.7. Biocontrole

O controle biológico das doenças de plantas surgiu a partir da necessidade de minimizar os danos causados ao meio ambiente, devido ao uso indiscriminado de agrotóxicos. Problemas como a contaminação dos solos, da água, dos alimentos e dos animais, bem como o surgimento de doenças decorrentes do contato excessivo do agricultor com substâncias

químicas, outro problema extremamente relevante é o surgimento de populações de pragas resistentes aos princípios ativos dos agroquímicos, decorrentes do mal-uso destes produtos, causando um desequilíbrio ambiental e biológico, muitas vezes difícil de contornar. (BETTIOL; GHINI, 2003).

A praticidade no uso de agroquímicos, porém, muitas vezes não levando em consideração os princípios necessários para aumentar a eficiência dos produtos é o que favorece o desequilíbrio do sistema, pois, de acordo com Bettiol (2008), a comercialização destes produtos ditam as regras. A partir da observação destes fatores e com a necessidade de reduzir o efeito nocivo dos agrotóxicos sobre o meio ambiente, surgiu a busca por métodos alternativos de controle de pragas, dentre eles o controle biológico. O clássico conceito de controle biológico foi proposto por Baker e Cook (1974), dizendo que o controle biológico se caracteriza pela redução na densidade de inóculo ou atividades da relação entre o hospedeiro e a praga, em um determinado ambiente e em consequência do seu estado de equilíbrio e dormência.

Ainda segundo Baker e Cook (1983), doenças de plantas representam mais do que a interação planta-patógeno-ambiente, pois, nesta interação também existe a participação de agentes benéficos às plantas, que visam reduzir os danos causados pelos patógenos. Sendo assim, práticas de manejo devem ser adotadas de modo a favorecer a presença de antagonistas, que podem atuar diretamente sobre patógenos ou mesmo na indução de resistência em plantas (GRIGOLLETI JÚNIOR et al., 2000).

Os mecanismos do controle biológico têm como base o antagonismo entre as espécies, como a predação, antibiose, amensalismo, competição e parasitismo, na maioria das vezes a competição é uma forma comum de antagonismo, pois, microrganismos antagonistas possuem, em sua maioria, uma boa capacidade de se desenvolver melhor em ambientes onde há a necessidade de competir por nutrientes, espaço e oxigênio (CHET e ELAD, 1983). Outros possuem a capacidade de atuar inibindo o crescimento devido à síntese de metabólitos voláteis ou não voláteis (DENNIS e WEBSTER, 1971a, b; RAI et al., 1980; CAMPOROTA, 1985; CLAYDON et al., 1987) e há, ainda, os que exercem ação direta sobre os patógenos, exercendo hiperparasitismo (BARNETT, 1963; DENNIS e WEBSTER 1971 a, b e c; CHET e ELAD, 1983; BARAK et al., 1985; PAPAVIDAS, 1985; VAJNA, 1985 a, b).

Existe uma ampla gama de microrganismos que exercem a função de antagonistas, podendo ser citadas espécies de bactérias como *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., leveduras como *Streptomyces* spp., e fungos, principalmente, o gênero *Trichoderma*, que vem

apresentando eficiência no biocontrole de diversas espécies de patógenos (ROBBS, 1991; MELO, 1998; FORTES et al. 2007; MOHAMED e HAGGAG 2007).

## 2.8. *Trichoderma* spp.

O gênero *Trichoderma* Pers., ordem Hypocreales, pertencente à classe dos hifomicetos, possui um amplo número de espécies e são encontrados entre os numerosos fungos de solo (ROIGERS et al., 1991). São fungos de vida livre que se reproduzem assexuadamente e a fase sexuada, quando encontrada, em geral, colonizando madeira, é denominada *Hypocrea* (HERMAN, 2004). Este fungo possui uma alta capacidade de dispersão, pois, produz esporos secos e leves que se adaptam às mais diversas situações.

Características como forma, coloração tamanho e ornamentação dos conídios; presença e a forma das ramificações, formação de elongações (estéreis ou férteis) dos conidióforos são utilizadas para a identificação morfológica das espécies do gênero *Trichoderma* (BISSET, 1984; RIFAI 1969). Além da caracterização morfológica e cultura, onde se avaliam as características da cultura pura de cada isolado do gênero, métodos moleculares vêm sendo utilizados para diferenciar e agrupar isolados de acordo com sua semelhança genética (FUJIMORI e OKUDA, 1994).

Menezes et al. (2010), estudando a variabilidade genética de fungos do gênero *Trichoderma* e *Fusarium*, verificaram que o sequenciamento de bases da região ITS foi um método eficiente para identificação e separação de isolados de *Trichoderma* e *Fusarium*. Na agricultura, fungos do gênero *Trichoderma* spp., representam uma atividade considerada de suma importância e com elevado potencial econômica, onde, seu uso auxilia no controle biológico de vários parasitas e organismos causadores de doenças em plantas (MOHAMED e HAGGAG, 2007).

Devido à sua importância no controle de fitopatógenos, muitas espécies de *Trichoderma* spp., passaram a ser objeto de interesse público, no que diz respeito ao ensino, pesquisa e extensão (MELLO et al., 2007). Fungos do gênero *Trichoderma* atuam como antagonistas de parasitas de plantas de interesse comercial, produzindo compostos metabólitos que agem por hiperparasitismo, espaço, oxigênio e competição por alimento (BARNETT, 1963; DENNIS e WEBSTER, 1971a, b; RAI et al., 1980; CHET e ELAD, 1983; BARAK et al., 1985; CAMPOROTA, 1985;; PAPAVIDAS, 1985; VAJNA, 1985 a, b; CLAYDON et al., 1987).

A produção de compostos tóxicos produzidos por fungos do gênero *Trichoderma*, foi observada inicialmente por Weindling (1934), que observou a propagação e morte de hifas jovens de fungos fitopatogênicos. Fungos do gênero *Trichoderma*, produzem vários compostos enzimáticos, entre eles a celobiase e a quitinase, responsáveis pelo processo de decomposição da célula de resistência dos fungos causadores de doenças em plantas (ELAD et al., 1982; PAPAIVIZAS, 1985; RIDOUT et al., 1988).

O potencial de *Trichoderma* spp., como agentes de biocontrole, é conhecido há décadas e, muitos isolados são simbioses de plantas, podendo atuar no controle de fitopatógenos e promoção do crescimento de plantas (BROTMAN et al., 2010; GAVA e PINTO, 2016). As espécies do gênero *Trichoderma* estão entre os antagonistas mais estudados. De ocorrência natural, interagem direta e indiretamente com outros organismos do solo, principalmente os fitopatógenos (HARMAN et al., 2004; SHORESH et al., 2005; VITERBO et al., 2005; PERAZZOLLI et al., 2008; VINALE et al., 2008).

Além da atuação direta sobre os fitopatógenos, *Trichoderma* spp. também atuam indiretamente através da indução de resistência em plantas a patógenos, ou mesmo na promoção do crescimento de plantas. O uso de *Trichoderma* para promover o crescimento de plantas tem sido estudado durante muitos anos e pode ocorrer em sistemas axênicos ou em solos (CHANG et al., 1986; YEDIDIA et al., 2001; ADAMS et al., 2007).

Comparando os mecanismos utilizados para o controle biológico e os mecanismos utilizados na promoção do crescimento de plantas por *Trichoderma* spp., estes ainda são pouco esclarecidos (ALTOMARE, 1999; POMELLA e RIBEIRO, 2009; BAUGH e ESCOBAR, 2017).

Manter a produção de culturas de modo a minimizar os impactos causados pela agricultura constitui um dos principais desafios para as próximas décadas. É necessária uma produção melhorada para fornecer alimentos suficientes para a crescente população humana, dentre outros fatores. Os métodos atuais de produção na agricultura, por exemplo, o uso indiscriminado de agroquímicos, geram problemas ambientais e de saúde (GUNNELL et al., 2007; LEACH e MUMFORD, 2008). Somado a estes entraves, os patógenos das plantas continuam sendo um desafio para nossa capacidade de proteger o crescimento e a saúde das plantas (MILLER et al., 2009).



## **OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

Determinar a incidência de fungos e a presença de aflatoxinas em amêndoas de castanha-do-brasil, provenientes de ouriços coletados nas árvores e sobre o solo após abscisão, bem como a eficiência de isolados de *Trichoderma* spp., como agente de biocontrole de fungos em castanhas-do-brasil.

### **Objetivos Específicos**

- Determinar a microbiota fúngica em amêndoas de castanha-do-brasil;
- Determinar a presença de aflatoxinas em amostras de amêndoas de castanha-do-brasil;
- Avaliar em condições *in vitro* a eficiência de bioformulado a base de *Trichoderma* spp. contra isolados de *Aspergillus* spp. provenientes de amêndoas de castanha-de-brasil;
- Avaliar a eficiência do bioformulado a base de *Trichoderma* sp. em amostras de castanhas-do-brasil armazenadas por diferentes períodos de tempo (1, 30, 60 e 90 dias), em condições controladas.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Área de estudo e coleta de amêndoas de castanha-do-brasil para análises laboratoriais

Os experimentos de campo foram conduzidos no Campo Experimental Confiança da Embrapa Roraima, localizado no município do Cantá, Roraima, Brasil, em um Sistema Agroflorestal (SAF) instalado há 20 anos, divididos em cinco blocos, contendo em cada bloco aproximadamente de 10 a 12 árvores de castanha-do-brasil em consórcio com cupiúba (*Goupia glabra* Aubl.), cupuaçuzeiro [*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Sprengel) K.Schumann], cafeeiro (*Coffea canefora* Pierre ex A. Froehner), saman [*Samanea saman* (Jacq.) Merr.], abiu [*Micropholis venulosa* (Mart. e Eichler) Pierre] e andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.).

De acordo com Ferreira; Tonini (2009), a região apresenta vegetação de floresta, clima do tipo Am (Köppen) e precipitação variando entre 1.363 a 1.393 mm ano<sup>-1</sup>, com período chuvoso concentrado entre os meses de maio a julho. Solo do tipo argissolo constituído por material mineral, que têm como características diferenciais a presença de horizonte B textural de argila de baixa atividade (EMBRAPA, 2014).

A marcação dos ouriços foi realizada nos meses de março, abril e maio de 2017 no SAF, durante o período de maior precipitação pluviométrica, quando ocorreu uma maior abscisão dos ouriços, estendendo-se a coleta até o mês de junho de 2017. Para ter um controle do número de ouriços que foram coletados durante o experimento, foi feita a retirada de todos os demais ouriços presentes no solo antes do início da pesquisa, possibilitando a marcação dos ouriços expostos às condições de campo durante a execução do trabalho.

Ouriços foram coletados ainda na árvore, quando estavam em processo de maturação, antes do fruto se desprender do pedúnculo. Os demais ouriços foram coletados após a abscisão, sendo marcada com tinta (esmalte sintético) de quatro cores diferentes (branco, amarelo, azul e vermelho), cada uma representando o período de tempo (1, 30, 60 e 90 dias) estabelecido para o ouriço ficar exposto às condições naturais do campo em contato com o solo. Cada período de exposição dos ouriços sobre o solo mais os ouriços coletados na árvore constituíram os tratamentos, definidos da seguinte forma: T0 = ouriços coletados na árvore; T1 = ouriços com um dia após abscisão; T30 = ouriços com 30 dias após abscisão; T60 = ouriços com 60 dias após abscisão; T90 = ouriços com 90 dias após abscisão.

Após o período de exposição dos ouriços no campo referente a cada tratamento, estes foram enviados para a sede da Embrapa Roraima onde foram abertos com auxílio de uma serra elétrica circular para a retirada das amêndoas de castanha-do-brasil, que eram enviadas para o laboratório de Fitopatologia da Embrapa Roraima.

### **3.2. Teor de umidade, atividade de água ( $A_w$ ) e presença de aflatoxinas em amêndoas de castanha-do-brasil**

As amêndoas foram retiradas com o auxílio de um canivete e posteriormente 5 g das amostras de cada tratamento, foram pesados em uma balança de precisão. Em seguida, as amêndoas foram desidratadas em uma estufa com circulação forçada de ar a 105 °C durante 4 horas e resfriadas em dessecador até a temperatura ambiente. Esse procedimento foi repetido seguidamente até o aquecimento e resfriamento da amostra. O resultado do teor de umidade foi calculado e expresso em porcentagem, seguindo a fórmula abaixo:

$$\% \text{ de Umidade (U)} = 100 \cdot \frac{(P - p)}{P - t}$$

Portanto:

Peso inicial do vasilhame mais o peso da amostra úmida → P

Peso inicial do vasilhame mais o peso da amostra seca → p

Peso do vasilhame → t

Para análise de presença de aflatoxinas em amêndoas de castanha-do-brasil, aproximadamente 0,5 kg de amêndoas de castanha-do-brasil de cada tratamento, foram enviadas ao Laboratório de Micotoxinas e Micologia da Embrapa Agroindústria de Alimentos – Rio de Janeiro, para análise da presença das aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A metodologia para a determinação da atividade de água nas amostras de castanha-do-brasil foi a de Damodaram; Parkin e Fenema (2010), sendo esta obtida por meio da relação da atividade de água com a umidade relativa de equilíbrio do ar (%URE), onde  $A_w = \%URE \div 100$ . Para se chegar ao valor da umidade relativa, primeiro pesou-se, 5 g das amostras de cada tratamento, colocando-as em uma câmara fechada durante o tempo suficiente para atingir o peso constante, medindo-se posteriormente com um higrômetro.

### 3.3. Análise da qualidade sanitária de amêndoas de castanha-do-brasil

As análises foram realizadas no laboratório de fitopatologia da Embrapa Roraima, com a finalidade de determinar a microbiota associada às amêndoas de castanha-do-brasil, adotando-se o método de incubação em papel filtro “*Blotter test*”, conforme descrito por Brasil (2009), sem a prévia desinfestação das amêndoas, utilizando-se uma folha de papel filtro como substrato, previamente, esterilizada e umedecida com água destilada, também esterilizada.

Cada amêndoa foi seccionada ao meio, sendo que uma parte foi distribuída uniformemente e distanciadas a aproximadamente sete centímetros uma das outras, sobre o substrato de papel em caixas do tipo “gerbox”, tamanho 11 cm x 11 cm x 3,5 cm, e mantidas sob luz branca em câmara tipo *Biochemical Oxygen Demand* (B.O.D.), com fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias à temperatura de 27 °C, sendo um total de 10 gerbox por tratamento analisado.

Após este período, com auxílio de estereomicroscópio (Motic SMZ-168), analisou-se a presença de sinais fúngicos sobre cada amêndoa, observando-se a formação e o tipo de colônia formada nas mesmas. Os fragmentos fúngicos encontrados foram transferidos para lâminas de microscopia e observados nos microscópios ópticos (Opton TNB41 e Leica DM 2500), utilizando-se as chaves taxonômicas de Klich (2002), Sanson et al. (2004) e Pitt e Hocking (2009), para auxiliar na identificação dos fungos.

Os resultados foram expressos em porcentagem de amêndoas contaminadas, determinando os percentuais médios para cada gênero de fungo detectado nas amêndoas em cada tratamento por meio de análise estatística descritiva.

### 3.4. Isolamento e identificação de fungos em amêndoas de castanha-do-brasil

As amostras da outra metade das 50 amêndoas referente a cada tratamento que foi cortado para análise do “*Blotter test*” foram submetidas a um processo de desinfestação superficial utilizando uma solução de 0,4% de hipoclorito de sódio por dois minutos, e enxaguadas com água deionizada esterilizada. Posteriormente, as amêndoas de cada um dos cinco tratamentos foram distribuídas em 10 placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo meio de cultura Ágar Dicloran Glicerol 18% (DG-18 ACUMEDIA 7592A) com cloranfenicol (TANIWAKI; IAMANAKA; SILVA, 2011) mantendo-as distanciadas, aproximadamente,

cinco centímetros uma das outras, sendo em seguida incubadas em câmara tipo B.O.D., com fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias à temperatura de 27 °C.

Após o período de incubação foi determinado a porcentagem de amêndoas infectadas por fungos conforme Taniwaki; Iamanaka; Silva (2011), e os fungos que se desenvolveram no meio DG18, foram isolados em placas de Petri de 9 cm contendo BDA e incubados na câmara B.O.D. a 27 °C por sete dias. Posteriormente, foram analisadas as suas características macro, microscópicas e identificados de acordo com os métodos de Klich (2002), Sanson et al. (2004) e Pitt e Hocking (2009). Os fungos do gênero *Aspergillus* foram colocados no meio Agar Czapek Extrato de Levedura (CYA) e incubados a 27 °C por sete dias para identificação de acordo com a chave taxonômica proposta por Klich (2002), Sanson et al. (2004) e Pitt e Hocking (2009).

### **3.5. Eficiência de bioformulado a base de *Trichoderma* spp. no controle biológico *in vitro* de isolados de *Aspergillus* spp. em castanha-do-brasil**

Foram utilizados dois isolados de *Trichoderma* sp., pertencentes à coleção de trabalho do laboratório de fitopatologia da Embrapa Roraima, que foram previamente selecionados apresentando potencial antagônico contra *Aspergillus* spp., em um bioensaio realizado previamente conforme relatado por Souza (2015). Para a multiplicação do número de isolados de *Trichoderma*, adotou-se o método da colonização em grãos de arroz sem casca, com o objetivo de avaliar a capacidade de produzirem esporos em massa. Para tal, foram preparadas amostras de 100 g de grãos de arroz que foram embebidas em 100 mL de água destilada.

Após 3 horas de embebição, o material foi transferido para peneira plástica para eliminação do excesso de líquido, acondicionado em *Erlenmeyer* vedados com bucha de algodão coberto com papel manteiga e preso com liga elástica, sendo as amostras posteriormente, submetidas à esterilização em autoclave a 121° C durante 20 minutos. Posteriormente, as amostras de arroz foram transferidas para a câmara de fluxo laminar onde foi feita a infestação dos grãos adicionando-se cinco discos de micélio de cada isolado de *Trichoderma* sp. em cada *Erlenmeyer*, sendo em seguida, mantido em câmara B.O.D com fotoperíodo de 12 horas, durante 10 dias à temperatura de 27 °C até o substrato ser totalmente colonizado pelos esporos do fungo. A cada 24 horas, as amostras foram agitadas manualmente para favorecer a troca gasosa e produção de mais esporos, conforme metodologia proposta por Jackson (1997).

Quando os grãos de arroz foram totalmente colonizados pelos isolados de *Trichoderma* sp. e apresentaram aspecto de grãos secos, em câmara de fluxo laminar foi realizada a transferência de amostras contendo 1 g de arroz colonizado, de cada isolado, para dois *Erlenmeyer* contendo 100 mL de água destilada estéril, que foram submetidos em seguida à agitação manual. Concomitantemente, foram produzidos 500 mL do formulado composto por glicerol 10,0 g L<sup>-1</sup>, extrato de levedura 0,5 g L<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (sulfato de magnésio) 0,2 g L<sup>-1</sup>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (fosfato de potássio) 0,5 g L<sup>-1</sup>, NaCl (cloreto de sódio) 0,1 g L<sup>-1</sup>, Goma xantana, 0,5 g L<sup>-1</sup> PVP (Polivinilpirrolidona) 0,5 g L<sup>-1</sup> e CMC (Carboximetilcelulose) 1,0 g L<sup>-1</sup>, sendo distribuídos 200 mL do formulado por *Erlenmeyer*, totalizando duas amostras a serem utilizadas para cada isolado de *Trichoderma* spp. selecionado.

Os *Erlenmeyers* foram vedados com bucha de algodão, coberto com papel manteiga e preso com liga elástica, sendo posteriormente submetidos à esterilização em autoclave a 121° C durante 21 minutos. Foram retirados 20 mL da suspensão de cada isolado de *Trichoderma* spp. e inseridos nos *Erlenmeyers* contendo 200 mL da formulação, com posterior homogeneização manual e armazenamento durante 24 horas, a temperatura ambiente, em prateleiras nas dependências do laboratório de Fitopatologia. Posteriormente, avaliou-se a aplicabilidade *in vitro* das formulações contendo os isolados de *Trichoderma* spp., adotando-se o teste de confrontação direta.

Para tal, um disco de ágar de 8 mm de diâmetro contendo micélios de *Aspergillus* spp. foi retirado de colônias com 24 horas de cultivo e depositado em placa de Petri (9,0 cm), posicionado a 0,5 cm da borda, contendo meio BDA solidificado. Em seguida, alíquotas de 40 µL do formulado a base de *Trichoderma* spp. foram transferidas para as placas em posição oposta ao disco de micélio do patógeno e, em seguida, mantidas em câmara B.O.D. a 27° C e fotoperíodo de 12 horas. Foram utilizadas três repetições para cada isolado, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri e como controle foram consideradas placas contendo disco de micélio de *Aspergillus* spp. numa extremidade da placa e na outra extremidade os 40 µL do formulado sem *Trichoderma* spp., as quais foram mantidas nas mesmas condições.

O crescimento radial do micélio foi quantificado através da medida (cm) do diâmetro, previamente marcado na parte externa do fundo da placa de Petri com auxílio de régua milimetrada, em um intervalo de tempo de 24 horas. Os resultados obtidos foram utilizados para o cálculo do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) conforme a fórmula de Oliveira (1991), e o crescimento expresso em cm 24 h<sup>-1</sup>. Após sete dias de cultivo, também foi avaliado o crescimento micelial dos fungos adotando a escala proposta

por Bell et al. (1982), modificada conforme descrito por Louzada et al. (2009), considerando-se o isolado como antagonico ou eficiente quando sua nota for menor, ou igual a 3,0. Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado, com 35 tratamentos e três repetições, sendo os dados do crescimento micelial dos fungos submetidos aos testes de normalidade e homogeneidade de variância, análise de variância e agrupamento de médias pelo teste de Scott-Knott ( $\alpha = 5\%$ ), utilizando-se o *software* Sisvar 5.6 (FERREIRA, 2011).

### **3.6. Eficiência do bioformulado a base de *Trichoderma* sp. em amêndoas de castanhas-do-brasil armazenadas por diferentes períodos de tempo**

Ouriços expostos por no máximo sete dias sobre o solo, após abscisão, foram coletados no SAF do Campo Experimental Confiança da Embrapa Roraima e transportados para a sede da Embrapa Roraima, onde foram abertos para retirada das castanhas conforme descrito no item 3.1, sendo posteriormente enviadas para o laboratório de fitopatologia onde foram inoculadas com o bioformulado a base de *Trichoderma* spp. que apresentou maior eficiência nos testes de aplicabilidade *in vitro* das formulações, conforme determinado previamente no item 3.5.

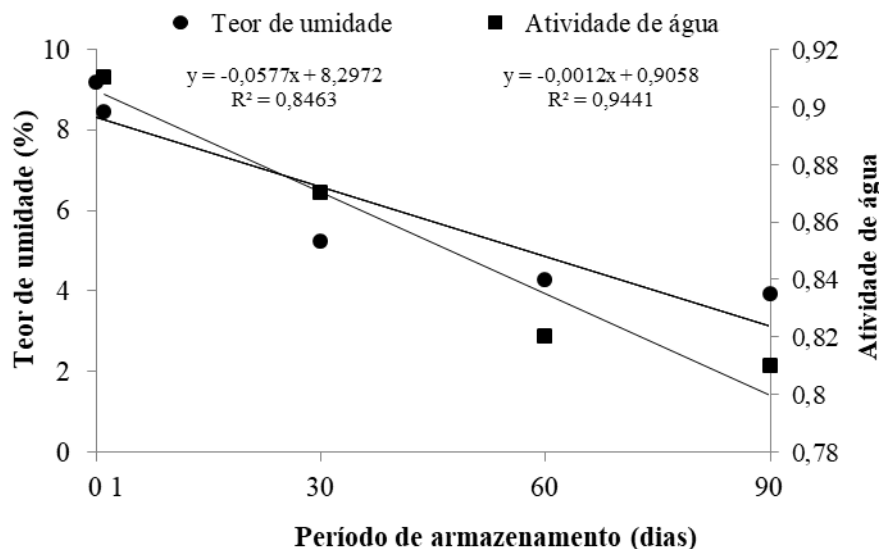
A inoculação foi realizada utilizando-se um pulverizador manual, aplicando-se o bioformulado na concentração de  $10^5$  esporos  $\text{mL}^{-1}$ . Após a aplicação deste bioformulado, as castanhas foram armazenadas por diferentes períodos de tempo (1, 30, 60 e 90 dias), em saquinhos de papel, que foram mantidos em sala com temperatura ambiente. Como controle, as mesmas quantidades de castanhas foram mantidas sob as mesmas condições, porém, aplicando-se apenas água deionizada esterelizada, sem a inoculação do bioformulado a base de *Trichoderma* spp. Após cada período de armazenamento, as castanhas foram descascadas para retirada das amêndoas, e posteriormente submetidas ao teste de sanidade (*Blotter test*), conforme descrito no item 3.3.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x4, com cinco repetições, sendo o fator A referente ao tratamento com e sem aplicação do bioformulado a base de *Trichoderma* spp. e o fator B referente aos quatro períodos de armazenamento das castanhas. Os dados foram submetidos aos testes de normalidade e homogeneidade de variância, análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ), utilizando-se o *software* Sisvar 5.6 (FERREIRA, 2011).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Teor de umidade, atividade de água ( $A_w$ ) e presença de aflatoxinas em amêndoas de castanha-do-brasil

Os valores do teor de umidade das amêndoas de castanha-do-brasil analisadas neste estudo, variaram entre 3,93 e 9,18% (Figura 1), sendo próximos ao valor indicado na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2011) que é de 3,5% e, aos estabelecidos por Ribeiro et al (1993), para castanhas armazenadas em ambiente, com média geral de 4,5% de umidade.



**Figura 1.** Curva de regressão linear que define a correlação entre o teor de umidade e atividade de água das amêndoas de castanha-do-brasil em ouriços coletados nas árvores e em diferentes períodos de exposição após abscisão, sobre o solo no Sistema agroflorestal (SAF).

Apenas as amêndoas de 60 e 90 dias apresentaram teor de umidade dentro das faixas estabelecidas, 3,93 e 4,28% respectivamente, entretanto, as amêndoas dos períodos equivalentes às coletadas nas árvores, 1 e 30 dias apresentaram uma ampla faixa de umidade, sendo valores correspondendo a 9,18, 8,45 e 5,21% respectivamente. Estes valores apresentaram diferença significativa e não devem ser desconsiderados de acordo com o teste apresentado.

As castanhas coletadas das árvores e as castanhas expostas por um dia apresentaram maior teor de umidade, não diferindo entre si estatisticamente. Porém, mesmo diferindo estatisticamente, as amêndoas de 30 dias apresentaram valores de umidade acima do indicado.



As amêndoas que permaneceram no solo por 60 e 90 dias apresentaram os menores teores de umidade, apresentando uma diferença significativa das demais amostras.

Sabe-se que a umidade é um fator essencial para o crescimento e desenvolvimento dos fungos, devendo-se observar o limite de segurança indicado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, através da portaria nº 846 de 08 de novembro de 1976, onde para a castanha-do-brasil este limite está determinado entre 11 e 15% de umidade. Amêndoas descascadas devem ser mantidas sob umidade em torno de 4,5% ou dentro da faixa de 3,0-6,5% visando não favorecer o desenvolvimento de fungos e principalmente de *Aspergillus flavus* e a produção de aflatoxinas (ARRUS et al., 2005; PACHECO e SCUSSEL, 2006).

A atividade de água das amêndoas nos tratamentos avaliados, variou entre 0,77 e 0,91, sendo a maior atividade nas amêndoas das castanhas coletadas nas árvores, com 0,91 diferindo estatisticamente a 5% de probabilidade pelo teste Tukey, das amêndoas de 90 dias com atividade igual a 0,77, os demais períodos não apresentaram diferença significativa nem para as castanhas de um dia, nem para as de 90 dias. Para Baquião (2012), a faixa ideal de atividade de água e conseqüentemente a infestação por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus nomius* em amêndoas de castanha-do-brasil varia entre 0,50 e 0,83 corroborando com os resultados obtidos nesta pesquisa.

Das amostras de castanha-do-brasil enviadas ao Laboratório de Micotoxinas e Micologia da Embrapa Agroindústria de Alimentos – Rio de Janeiro, observou-se que, todos os tratamentos das amêndoas de castanha-do-brasil provenientes de ouriços retirados das árvores e expostas por diferentes períodos 1, 30, 60 e 90 dias no SAF, apresentaram a presença de Aflatoxinas, conforme (Tabela 1).

**Tabela 1.** Variação do teor de aflatoxinas detectadas nas amostras de castanhas-do-brasil de ouriços coletados nas árvores e nos diferentes períodos de exposição dos ouriços no SAF. Valores expressos em ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ).

Período de exposição (dias)	Afls B1	Afls B2	Afls G1	Afls G2
T0	1,60/4,98	0,88	ND/LQ	ND*
T1	1,23/7,95	0,72	3,49	0,46
T30	1,88/67,90	11,11/1,72	11,86	2,92
T60	2,96/11,00	0,99/1,06	1,85/5,15	0,91
T90	3,12/142,83	<LQ**	2,44/21,98	0,58

\*Não determinado; \*\*Menor que o limite de quantificação do método; T0 = Tratamento controle (ouriços coletados das árvores); T1 = Ouriços expostos por um dia no solo após abscisão; T30 = Ouriços expostos por 30 dias no solo após abscisão; T60 = Ouriços expostos por 60 dias no solo após abscisão; T90= Ouriços expostos por 90 dias no solo após abscisão.

Em Roraima é o primeiro registro de incidência por Aflatoxinas em Sistema Agroflorestal, contrapondo os resultados obtidos por Rodrigues (2016), que não detectou a presença de Aflatoxinas em amostras de castanha-do-brasil oriundas de ouriços expostos por 1, 30, 60 e 90 dias na mesma área de coleta deste estudo. Foi identificada a presença de aflatoxinas B<sub>1</sub> nos tratamentos T0, T1, T30, T60 e T90, aflatoxinas B<sub>2</sub> nos tratamentos T0, T1, T30 e T60, G<sub>1</sub> nos tratamentos T1, T30, T60 e T90 e G<sub>2</sub> nos tratamentos T1, T30, T60 e T90.

O fato de todos os tratamentos terem a presença de aflatoxinas pode estar relacionado à atividade de água das amostras avaliadas neste estudo, bem como também os altos índices de precipitação observados durante a coleta dos ouriços, favorecendo uma maior incidência de fungos produtores de aflatoxinas. As castanhas dos ouriços retirados ainda na árvore (T0), apresentaram contaminação por aflatoxina B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, que são metabolitos tóxicos produzidos por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus nomius*. Os tratamentos T1, T30 e T60, além de terem apresentado contaminação pelas aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, também foram afetados pelas aflatoxinas G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>, estas duas últimas produzidas por *Aspergillus parasiticus*.

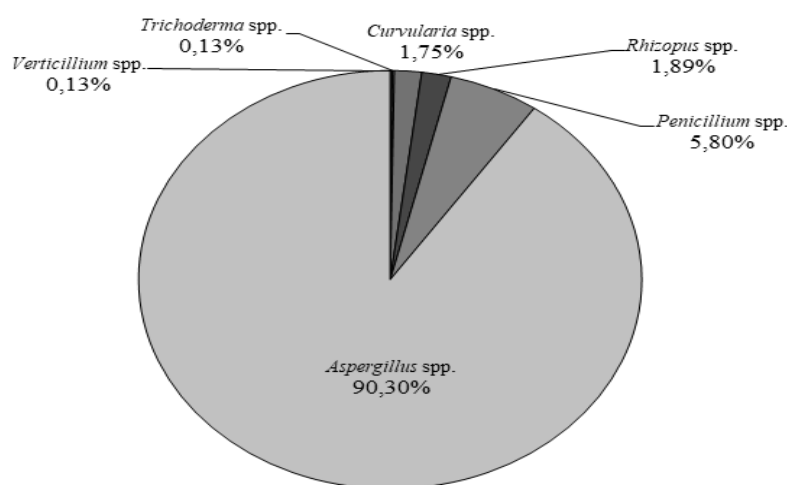
As amostras das castanhas do T0 apresentaram um teor de Aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> variando entre, 1,60 e 4,98  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , valores considerados dentro dos níveis toleráveis para o consumo humano de acordo com a comissão nacional de normas e padrões para alimentos, que padronizou os limites para o somatório de aflatoxinas B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub> em 30  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (ANDRADE, 2012). Para as aflatoxinas G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> do mesmo tratamento não foi possível determinar um valor ou a amostra foi menor que o limite de quantificação do método.

Prosseguindo com as análises dos dados, observou-se que esses os níveis de contaminação por aflatoxinas foram aumentando gradativamente de acordo com o período de exposição que esses ouriços permaneciam em contato com o solo; esses valores foram observados no T90, que teve uma variação entre 3,12 e 142,83  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Esse dado é considerado um valor discrepante aos níveis de aceitação tanto para o consumo humano bem como para sua exportação.

Imanura et al. (2012) estudando a incidência de amendoim cru em casca da região da alta paulista em São Paulo, detectaram a presença de aflatoxinas acima do limite máximo permitido pela legislação. Calderari (2011) analisando amostras de castanha-do-brasil, provenientes dos estados de São Paulo, Amazonas e Pará, obteve resultados semelhantes em cinco amostras excedendo o limite máximo de Aflatoxinas estabelecidos pela União Europeia e pela ANVISA (10,0  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para castanhas-do-brasil sem casca destinadas ao consumo direto para humanos).

## 4.2. Análise da qualidade sanitária em amêndoas de castanha-do-brasil

No resultado do “*Blotter test*” realizado em amêndoas de castanha-do-brasil, onde foram isolados um total de 498 fungos de cinco espécimes diferentes, observou-se que, 96% estavam contaminadas, sendo o fungo do gênero *Aspergillus* spp., responsáveis por 90,30% desta contaminação. Fungos do gênero *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp, *Curvularia* sp., *Trichoderma* sp. e *Verticillium* sp., apresentaram participação nesta contaminação com 5,80%, 1,89%, 1,75%, 0,13% e 0,13% respectivamente, conforme( Figura 2).



**Figura 2.** Percentual médio dos fungos identificados nas amêndoas de castanha-do-brasil em ouriços coletados nas árvores e em diferentes períodos de exposição após abscisão, sobre o solo no sistema agroflorestal (SAF) no teste de sanidade.

Das 250 amostras analisadas, fungos do gênero *Aspergillus* spp., contaminaram 100% das amostras dos 30, 60 e 90 dias de exposição T30, T60 e T90 respectivamente, apresentando índices mais baixos nas amostras dos ouriços coletados nas árvores e um dia de exposição T0 e T1 com 15 e 40%, respectivamente. Estes resultados indicam que quanto maior o período de exposição em que ouriço permanece em contato com o solo, maiores serão os índices de contaminação por *Aspergillus* spp., no entanto, amêndoas oriundas dos ouriços coletados ainda na árvore apresentaram, mesmo que níveis mais baixos, contaminação por espécies deste gênero de fungos.

Estudos anteriores sugerem alta variabilidade de espécies fúngica presentes na microbiota de castanhas-do-brasil, relatando a incidência de *Penicillium* spp. *Rhizopus* spp., *Curvularia* spp., *Acremonium* spp., *Verticillium* spp., *Trichoderma* spp. e *Paecilomyces* spp.,

(FREIRE, KOZAKIEWICZ E PATERSON, 2000). Sendo os fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* os mais predominantes e responsáveis por uma maior proporção na contaminação das amêndoas (PACHECO et al. 2010; BAQUIÃO et al. 2012; RODRIGUES, 2016).

Neste trabalho, observa-se a presença de uma grande maioria desses fungos com exceção apenas dos gêneros *Acremonium* spp. e *Paecilomyces* spp., entretanto, a maior variedade fúngica ocorre nos maiores períodos de exposição sendo, 30, 60 e 90 dias. Rodrigues (2016) estudando a ocorrência de fungos com potencial toxígeno em castanha-do-brasil no estado de Roraima detectou a presença de *Aspergillus* spp. em 100% das amostras sob períodos de exposição em contato com o solo de 15 a 95 dias, com intervalos de 20 dias para cada período, bem como a presença significativa do gênero *Penicillium* spp., em 70% das amostras sob período de exposição de 15 dias.

Estes gêneros também foram encontrados de forma abundante por Baquião et al. (2012), estudando a micobiota e micotoxinas presentes em amostras de castanha-do-brasil coletadas em campos. Um dos fatores que podem ocasionar a incidência de fungos em amêndoas de castanha-do-brasil é a umidade. Na (Tabela 2) observam-se os dados pluviométricos obtidos durante a coleta dos ouriços.

**Tabela 2.** Precipitação pluviométrica acumulada durante os períodos de exposição dos ouriços no solo e coletados das árvores no SAF.

Tempo de exposição dos ouriços no solo (dias)	Precipitação pluviométrica acumulada (mm)
T0	5,5
T1	6,8
T30	12,3
T60	24,6
T90	49,2

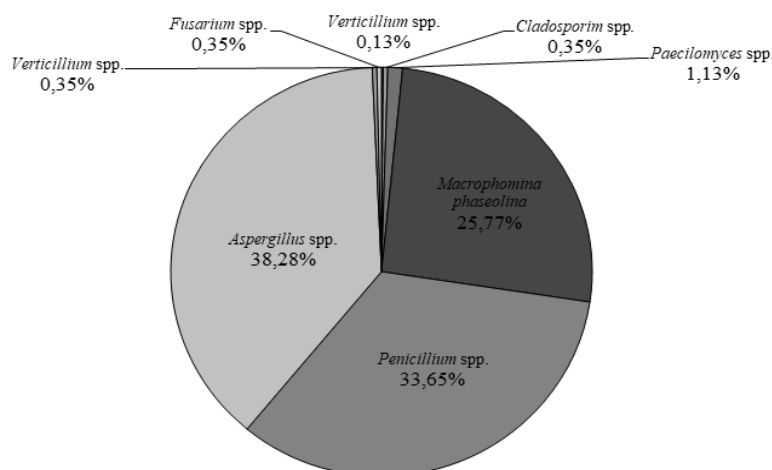
T0 = Tratamento controle (ouriços coletados das árvores); T1 = Ouriços expostos por um dia no solo após abscisão; T30 = Ouriços expostos por 30 dias no solo após abscisão; T60 = Ouriços expostos por 60 dias no solo após abscisão; T90 = Ouriços expostos por 90 dias no solo após abscisão.

Analisando esses dados de precipitação, podemos observar que os períodos de 30, 60 e 90 dias de exposição dos ouriços de castanha-do-brasil, somaram os maiores índices pluviométricos, de 12,3; 24,6 e 49,2 mm respectivamente. Estes valores elevados correspondem ao tempo em que os ouriços ficaram expostos, acumulando umidade. Já as amostras coletadas em T0 e T1 dia de exposição apresentaram 5,5 e 6,8 mm respectivamente, não acumulando, portanto, tanta umidade comparando-se com os demais períodos, nestes períodos também foi constatada a presença de menor diversidade fúngica.

Os altos índices de umidade podem justificar a presença de maior quantidade de fungos aos 30, 60 e 90 dias de exposição dos ouriços no solo após abscisão, devido, principalmente ao acúmulo de umidade. No entanto, amêndoas dos ouriços coletados ainda na árvore, representados pelo tratamento indicado como T0, também apresentaram contaminação fúngica pelo gênero *Aspergillus* spp., o que pode indicar que não só fatores pluviométricos estão ligados à contaminação.

#### 4.3. Isolamento e identificação de fungos em amêndoas de castanha-do-brasil

Das 250 amêndoas avaliadas em plaqueamento direto, houve incidência fúngica em 96% das amostras. Esses resultados apresentaram uma expressiva diferença em comparação com os resultados que foram obtidos no “*Blotter test*”, observou-se ainda que houve uma menor incidência do gênero *Aspergillus* spp. 38,33% e maior infestação por *Penicillium* spp. 33,69%, *Macrophomina phaseolina* com 25,80%, *Paecilomyces* spp. 1,33%, *Cladosporium* spp. 0,35%, *Verticillium* spp. 0,35% e *Fusarium* spp. 0,35% foram os outros gêneros de fungos encontrados contaminando as amostras de castanha-do-brasil conforme ilustra a (Figura 3).



**Figura 3.** Percentagem de isolados identificados nas amêndoas de castanha-do-brasil em ouriços coletados nas árvores e em diferentes períodos de exposição após abscisão, sobre o solo no Sistema agroflorestal (SAF) no teste plaqueamento direto.

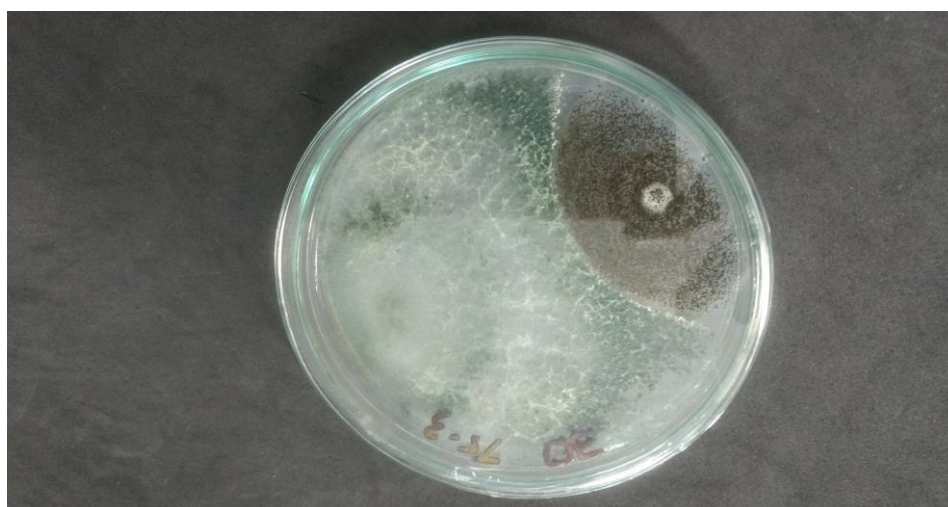
As amêndoas do T0 apresentaram incidência apenas de *Aspergillus* spp. Baquião (2012) citando Beuchat (1975) relata que já há registros da presença desses isolados

acometendo ouriços de castanha-do-brasil ainda na árvore, corroborando com os resultados deste estudo.

Foi observado ainda, que nos tratamentos T1, T30, T60 e T90 o fungo *Macrophomina phaseolina* e o gênero *Penicillium* spp., apareceram de forma bastante expressiva. Rodrigues (2016) relata que, *Macrophomina phaseolina*, *Penicillium* spp. e ainda *Aspergillus* spp., ocorrem com maior predominância nas amêndoas de castanha-do-brasil de ouriços mantidos no SAF ou em um ambiente de condições controladas.

#### 4.4. Eficiência de bioformulado a base de *Trichoderma* spp. no controle biológico *in vitro* de isolados de *Aspergillus* spp. em castanha-do-brasil

Após as avaliações das 72 horas, em que era necessário aguardar os sete dias para analisar os dados da escala de Bell et al. (1982), observou-se que aos cinco dias de cultivo a maioria dos isolados do fungo antagonico encontravam-se sobrepondo o patógeno, conforme ilustra a (Figura 4).



**Figura 4.** Isolado de Assp 30 contra Isolado de *Trichoderma* spp5 no teste de pareamento aos 5 dias de cultivo. (ARAÚJO, 2018).

As análises estatísticas realizadas no bioensaio nos testes de pareamento entre o disco de micélio de *Aspergillus* spp., e a formulação contendo esporos de *Trichoderma* mostrou que o isolado Tssp5, se comportou como o mais eficiente contra todos os isolados de *Aspergillus* spp. em comparação com Tssp 12 (Tabela 3).

**Tabela 3.** Média do crescimento micelial (cm) dos isolados de *Aspergillus* spp., na presença de *Trichoderma* spp. após 7 dias de cultivo pareado.

Código de acesso dos isolados de <i>Aspergillus</i> spp. na presença de <i>Trichoderma</i> spp	Índice de velocidade do crescimento micelial (cm) dos isolados de <i>Aspergillus</i> spp. testados		
	Tspp 5	Tspp 12	Controle
Aspp 1	0,61 d	0,70 c	0,77 a
Aspp 2	0,54 c	0,71 c	0,90 c
Aspp 3	0,62 d	0,83 d	0,91 c
Aspp 4	0,73 e	0,84 d	0,98 c
Aspp 5	0,77 e	0,65 c	0,81 b
Aspp 6	0,57 c	0,68 c	0,86 b
Aspp 7	0,71 e	0,96 e	1,12 d
Aspp 8	0,53 c	0,72 c	1,00 c
Aspp 9	0,45 b	0,78 c	0,94 c
Aspp 10	0,62 d	0,85 d	1,02 c
Aspp 11	0,58 c	0,69 c	1,16 d
Aspp 12	0,64 d	0,72 c	1,08 d
Aspp 13	0,67 d	0,76 c	0,96 c
Aspp 14	0,66 d	0,70 c	0,96 c
Aspp 15	0,65 d	0,64 c	0,82 b
Aspp 16	0,51 c	0,69 c	1,00 c
Aspp 17	0,66 d	0,71 c	0,63 a
Aspp 18	0,49 b	0,69 c	0,77 a
Aspp 19	0,72 e	0,85 d	0,74 a
Aspp 20	0,64 d	0,84 d	0,76 a
Aspp 21	0,62 d	0,85 d	0,97 c
Aspp 22	0,59 c	0,70 d	1,04 d
Aspp 23	0,59 c	0,71 c	0,71 a
Aspp 24	0,64 d	0,83 d	0,77 a
Aspp 25	0,47 b	0,74 c	0,67 a
Aspp 26	0,70 e	0,90 d	0,80 b
Aspp 27	0,34 a	0,52 b	0,75 a
Aspp 28	0,55 c	0,84 d	0,86 b
Aspp 29	0,52 c	0,68 c	0,86 b
Aspp 30	0,72 e	0,81 d	1,00 c
Aspp 31	0,74 e	1,09 f	0,86 b
Aspp 32	0,59 c	0,74 c	0,92 c
Aspp 33	0,78 e	0,75 c	0,84 b
Aspp 34	0,71 e	0,43 a	0,82 b
Aspp 35	0,71 e	0,76 c	1,02 c
CV%	8,54	6,86	8,63

Os resultados representam as médias de três repetições. Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si ( $p \leq 0,05$ ) de acordo com o teste de agrupamento Scott-Knott. CV = coeficiente de variação.

Tal fato demonstra o potencial de espécies de *Trichoderma* no controle biológico de doenças em plantas. Resultados semelhantes foram obtidos por Ethur et al. (2007), que verificaram a viabilidade de formulações em pó contendo arroz e *Trichoderma virens* em testes *in vitro* no controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, obtendo 100% de eficiência. Os dois isolados de *Trichoderma* spp. utilizados nos testes de confrontação direta neste estudo demonstraram também apresentar efeito antagônico quando confrontados com os isolados de *Aspergillus* spp. aos sete dias de pareamento (Tabela 4).

**Tabela 4.** Notas de escala de Bell et al. (1982), modificada por Louzada (2009) do antagonismo *in vitro* de *Aspergillus* spp. na presença de *Trichoderma* spp.

Código de acesso dos isolados de <i>Aspergillus</i> spp. Testados	Notas de acordo com a escala de Bell et al. (1982) atribuídas aos isolados de <i>Trichoderma</i> spp quanto ao antagonismo ao 7º dia	
	Tspp 5	Tspp 12
Aspp 1	2,0	2,5
Aspp 2	2,0	2,0
Aspp 3	2,0	2,5
Aspp 4	2,0	2,5
Aspp 5	2,0	2,0
Aspp 6	2,0	2,0
Aspp 7	2,5	3,5
Aspp 8	2,0	2,0
Aspp 9	2,5	2,5
Aspp 10	1,5	2,0
Aspp 11	2,0	2,0
Aspp 12	3,0	3,5
Aspp 13	2,0	2,0
Aspp 14	2,0	2,5
Aspp 15	2,5	2,0
Aspp 16	2,0	2,0
Aspp 17	2,0	2,5
Aspp 18	2,0	2,0
Aspp 19	2,0	2,5
Aspp 20	2,0	2,0
Aspp 21	2,0	2,0
Aspp 22	2,0	2,5
Aspp 23	1,5	2,0
Aspp 24	2,0	2,5
Aspp 25	2,0	2,0
Aspp 26	2,0	2,5
Aspp 27	1,5	1,5
Aspp 28	1,5	2,0
Aspp 29	2,0	3,0
Aspp 30	2,5	2,5
Aspp 31	2,5	2,5
Aspp 32	2,0	2,0
Aspp 33	2,0	2,0
Aspp 34	2,0	2,5
Aspp 35	2,5	3,0

35 Isolados de *Aspergillus* contra os dois Isolados de *Trichoderma* e suas respectivas notas de acordo com a escala de Bell et al. (1982).

De acordo com a escala proposta por Bell et al. (1982), os isolados que apresentarem notas iguais ou inferiores a 3,0, podem ser considerados como antagônicos, o que aconteceu para todos os isolados confrontados com os isolados de *Trichoderma* spp. Tspp5 e Tspp12,



com exceção para os isolados de *Aspergillus* spp. 07 e 12, que apresentaram notas superiores quando confrontados com o antagonista Tssp12.

A partir destes resultados pode-se afirmar que as formulações elaboradas com os dois isolados de *Trichoderma* spp. Tssp5 e Tssp12, foram eficientes, apresentando antagonismo contra isolados de *Aspergillus* spp. obtidos de castanha-do-brasil dos tratamentos avaliados nesta pesquisa. Resultado semelhante foi obtido por Ethur et al. (2005), que selecionou oito isolados de *Trichoderma* spp. antagonistas a *S. sclerotiorum*, patógeno responsável pelo mofo branco em plantas de pepino, que foram capazes de apresentar antibiose e também outros mecanismos que atuaram diretamente sobre o patógeno e suas estruturas de resistência. Lima-Primo et al. (2015) estudando o antagonismo *in vitro* de seis isolados de *Trichoderma* spp. contra quatro isolados de *Aspergillus* spp. produtores de aflatoxinas em castanha-do-brasil também observaram que todos os isolados de *Trichoderma* spp. inibiram o crescimento micelial dos isolados de *Aspergillus* spp., enaltecendo os resultados obtidos nesta pesquisa.

Estudando 23 isolados de *Trichoderma harzianum* contra o patógeno *Sclerotium rolfsii* em plantas de feijão e soja, Auler et al. (2013) verificaram que 13 isolados de *Trichoderma harzianum* apresentaram efeito antagônico com a nota 2 pela escala de Bell et al. (1982), corroborando os resultados obtidos neste estudo.

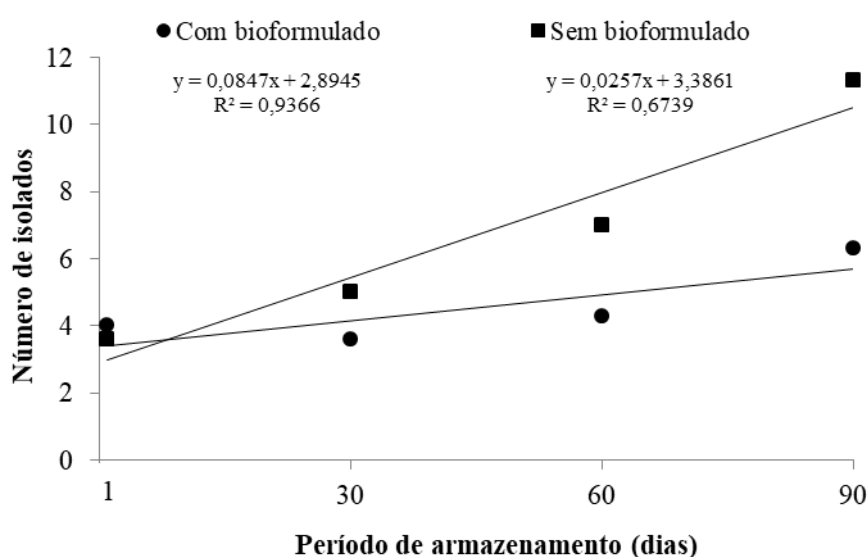
Os isolados Aspp10, Aspp23, Aspp27 e Aspp28 foram os mais sensíveis à presença do Tssp5, pois, as notas apresentadas por eles foram de 1,5, indicando um crescimento sobre o patógeno. O isolado Aspp27 foi o mais sensível entre os demais, uma vez que apresentou nota de 1,5 para os dois tratamentos com *Trichoderma* spp. (Tssp5 e Tssp12). Os resultados obtidos por Carvalho et al. (2011) estudando o controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* *in vitro* e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*, foram semelhantes aos encontrados neste estudo, pois, conseguiram agrupar 3 isolados de *Trichoderma harzianum* na classe 1, onde a nota, seguindo a escala de Bell et al. (1982), para estes isolados foi 1.

Estes testes de pareamento *in vitro*, apresentam alto desempenho e são extremamente importantes para os estudos de biocontrole, uma vez que indicam a capacidade do isolado testado exercer antagonismo e sua efetividade na capacidade de crescimento, colonização de estruturas, competição por espaço, oxigênio, nutrientes, e até hiperparasitismo (BOSAH et al., 2010).

#### 4.5. Eficiência do bioformulado a base de *Trichoderma* sp. em amêndoas de castanha-do-brasil armazenadas por diferentes períodos de tempo

No teste de sanidade para as amêndoas de castanha-do-brasil dos ouriços expostos por até sete dias sobre o solo após abscisão, com e sem a aplicação do bioformulado a base de Tsp 5 e armazenadas por (1, 30, 60 e 90 dias), foram encontrados isolados de *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Verticillium* spp., e *Macrophomina phaseolina* estas amostras apresentaram menor contaminação em relação aos períodos de maior exposição dos ouriços no solo e a cada avaliação o número de isolados aumentou.

Foram avaliadas 600 amostras correspondentes aos quatro períodos de armazenamento das amêndoas de castanha-do-brasil, sendo uma metade inoculada com o bioformulado a base de *Trichoderma* sp., e a outra inoculada apenas com água deionizada estéril. Na (Figura 5) são apresentados os números de isolados de *Aspergillus* spp., encontrados nos diferentes períodos de armazenamento após a inoculação do bioformulado com Tsp 5.



**Figura 5.** Número de isolados nos tratamentos com e sem bioformulado a base de *Trichoderma* sp. nos diferentes períodos de armazenamento de castanha-do-brasil.

Analisando os dados estatísticos conforme discriminado na figura acima, observou-se que houve uma estreita correlação entre os fatores A e B ao nível de 5% de significância, sendo o fator A o isolado de *Trichoderma* sp. com e sem a aplicação do bioformulado e o fator B os quatro períodos de armazenamento (1, 30, 60 e 90) dias das castanhas oriundas de

ourios expostos por até 7 dias do SAF do Campo Experimental Confiança da Embrapa Roraima.

Não houve diferença significativa entre as médias do número de isolados de *Aspergillus* spp., encontrados nas amêndoas das castanhas armazenadas por 1, 30, 60 e 90 dias com a aplicação do bioformulado a base de Tspp 5. Quando comparado aos dados obtidos sem a aplicação do bioformulado essas médias tiveram uma variação significativa entre as amêndoas avaliadas aos 60 e 90 dias de armazenamento.

Avaliando o desdobramento dos períodos de armazenamento das castanhas com a aplicação do bioformulado a base de Tspp5, observou-se que, não houve diferença significativa a 5% de probabilidade nas amostras avaliadas até 60 dias de armazenamento. Já para as amostras tratadas apenas com água deionizada houve uma diferença significativa dos períodos de armazenamento 60 e 90 dias para os de 1 e 30 dias. Por fim, os dados analisados demonstram que as castanhas inoculadas com o bioformulado a base de Tspp 5, mostrou-se eficiente na redução do número de isolados de *Aspergillus* spp., apenas aos 90 dias de armazenamento. Parzianello (2012) que, utilizando o uso de formulações a base de dois isolados de *Trichoderma* em intervalos de 30, 60, 90, 120 e 180 dias observou que *T. harzianum* foi o mais eficiente em todos os períodos de armazenamento no controle de *Fusarium oxysporum*.

## 5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos nesta pesquisa, conclui-se que, fungos potencialmente produtores de aflatoxinas como os do gênero *Aspergillus* spp., acometem de forma natural as castanheiras-do-brasil do Campo Experimental Confiança da Embrapa Roraima e, as demais espécies fúngicas encontradas fazem parte da microbiota natural.

Amêndoas de ouriços retirados ainda da planta, apresentaram a incidência dos fungos *Aspergillus* spp., bem como a presença de aflatoxinas.

Formulações a base *Trichoderma* spp., apresentam ao longo do tempo, efeito significativo no controle biológico de *Aspergillus* spp., sendo viáveis tanto em testes *in vitro*, bem como em ambientes em condições controladas.

## REFERENCIAS

ADAMS, P.; DE-LEIJ, F. A.; LYNCH, J. M. *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22 mediates growth promotion of Crack willow (*Salix fragilis*) saplings in both clean and metal-contaminated soil. **Microbial Ecology**, v. 54, n. 2, p. 306–313, 2007.

AGUIAR, G. P. **Competitividade do setor exportador brasileiro de Castanha-do-brasil**. Curitiba: UFPR, 2014. 138p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

ALTOMARE, C.; NORVELL, W. A.; BJÖRKMAN, T. E.; HARMAN, G. E.– Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 7, p.2926-2933, 1999.

ANDRADE, P. D. **Aflatoxinas e Ocratoxina na dieta de lactentes e adultos: desenvolvimento de metodologia e avaliação da exposição**. Brasília: UNB, 2012. 116p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

ARRUS, K.; BLANK, G.; CLEAR, R., HOLLEY, R. A.; ABRAMSON, D. Microbiological and aflatoxin evaluation of Brazil nut pods and the effects of unit processing operations. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 5, p.1060-1065, 2005.

ASTOVIZA, M. B.; SUAREZ, M. S. Micotoxinas y cáncer. **Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas**, v. 24, n. 1, p. 54-59, 2005.

AULER, A. C. V.; CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M. Antagonismo de *Trichoderma harzianum* a *Sclerotium rolfsii* nas culturas do feijoeiro e soja. **Revista Agro@ambiente Online**, v. 7, n. 3, p. 359-365, 2013.

BAKER, K.F.; COOK, R.J. **Biological Control of Plant Pathogens**. San Francisco. Freeman. 1974.

BAKER, R.; CHET, I. **Induction of suppressiveness**. In: Schneider, R.W. (Ed.). *Suppressive Soils and Plant Disease*. St Paul. APS Press. 1984. p.35-50.

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

BAQUIÃO, A. C.; de OLIVEIRA, M. M. M.; REIS, T. A.; ZORZETE, P.; ATAYDE, D. D.; CORREA, B. Polyphasic approach to the identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts. **Food chemistry**, v. 139, n.1, p.1127-1132, 2013.

BAQUIÃO, A. C.; ZORZETE, P.; REIS, T.A.; ASSUNÇÃO, E.; VERGUEIRO, S.; CORREA, B. Mycoflora and mycotoxins in field samples of Brazil nuts. **Food Control**, v. 28, n.2, p. 224-229, 2012.

BARAK, R.; ELAD, Y.; MICRELMAN, O; CHET, I. Lectins: a possible basis for specific recognition in the interaction of *Trichoderma* and *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathology**, v.75, p.458-462, 1985.

BARNETT, H. L. The nature of mycoparasitism by fungi. Annual. **Review of Microbiology**, v. 17, p. 01-14, 1963.

BAUGH, C. L. ESCOBAR, B. The genus *Bacillus* and genus *Trichoderma* for agricultural bio-augmentation. **Rice Farm Magazine**, v. 1, n. 4, p. 01-04. 2007.

BELL, D.K.; WELLS, H.D.; MARKHABELL, D.K.; WELLS, C.R. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v. 72, p. 379-382, 1982.

BETTIOL, W. Conversão de sistemas de produção. In: **Poltronieri, L.S. & Ishida, A.K.N.** (Eds.) Métodos Alternativos de Controle de Insetos-Praga, Doenças e Plantas Daninhas: Panorama atual e perspectivas. Belém. Embrapa Amazônia Oriental. 2008. pp. 289-308.

BETTIOL, W.; GHINI, R.; MARIANO, R. L. R.; MICHEREFF, S. J.; MATTOS, L. P.; ALVARADO, I. C.; PINTO, Z. V. . Supressividade a fitopatógenos habitantes do solo. In: **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (Org.). 205 ed. Jaguariúna: Embrapa Meio-Ambiente, 2009, v., p.183.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Proteção de plantas em sistemas agrícolas alternativos. In: **Campanhola, C. & Bettiol, W. (Eds.) Métodos Alternativos de Controle Fitossanitário.** Jaguariúna. Embrapa Meio Ambiente. 2003. pp. 79-95.

BEUCHAT, L. R. Incidence of molds on pecan nuts at different points during harvesting. **Applied Microbiology**, v.29, n.6, p.852-854, 1975.

BISSET, J. A revision of the genus *Trichoderma* sp. Sect. Longibrachiatum sect. Canadian **Journal of Botany, Morden**, v. 69, n. 1, p. 924-931, 1984.

BOSAH, O.; IGELEKE, C. A.; OMORUSI, V. I. In vitro microbial control of pathogenic *Sclerotium rolfsii*. **International Journal of Agriculture & Biology**, v.12, n.3, p.474-476, 2010.

BRASIL, Ministério da Agricultura Diário Oficial da União. Decreto - lei n. 51.209 de 1961. Decreto que determina a alteração da denominação de “castanha-do-pará” para “Castanha-do-Brasil”. **Diário Oficial**. Brasília, DF. Março de 1961.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ ACS, 2009. 399p.

BRASIL. **Projeto de monitoramento da castanha-do-brasil.** Relatório de atividades. Brasília: MAPA, 2002. 110p.

BROTMAN, Y.; GUPTA, K.J.; VITERBO, A. *Trichoderma*. **Current Biology**, v. 20, n. 9, p. 390-391, 2010.

CALDAS, E. D.; SILVA, S. C.; OLIVEIRA, J. N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista Saúde Pública**, v. 36, n. 3, p. 319-23, 2002.

CALDERARI, T. O. **Biodiversidade de fungos aflatoxigênicos e aflatoxinas em Castanha-do-brasil.** UNICAMP, 2011. Dissertação (Mestrado Engenharia de Alimentos). Campinas, São Paulo, 2011.

CAMARGO, I. P.; CASTRO, E. M.; GAVILANES, M. L. Aspectos da anatomia e morfologia de amêndoas e plântulas de castanheira-do-brasil, **Revista CERNE**, v. 6, n. 2, p.11-18, 2000.

CAMPOROTA, P. Antagonism in vitro of *Trichoderma* spp. vis-a-vis *Rhizoctonia solani* Kuhn. **Agronomie**, v.5, n.7, p.613-620, 1985.

CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M.; LOBO JÚNIOR, M., SILVA, M. C. Controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in vitro e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. **Tropical Plant Pathology**. v. 36, n. 1, 2011

CASTRILLON, A. L.; PURCHIO, A. **Fungos contaminantes e produtores de aflatoxina em castanha do Pará** (*Bertholletia excelsa* Humb. and Bonpl.). **Acta Amazonica**, v. 18, p. 173-183, 1988.

CAVALIERE, C.; FOGLIA, P.; GUARINO, C.; MOTTO, M.; NAZZARI, M.; SAMPERI, R.; LAGANA, A.; BERARDO, N. Mycotoxins produced by *Fusarium* genus in maize: determination by screening and confirmatory methods base don liquid chromatography tandem mass spec trometry. **Food Chemistry**, v. 105, p. 700-710, 2007.

CHANG, Y. C.; CHANG, Y. C., BAKER, R., KLEIFELD, O. & CHET, I. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. **Plant Disease**, v. 70, n. 2, 145-148, 1986.

CHET, I.; ELAD, Y. Mechanism of mycoparasitism. In: **Les antagonismes microbiens**. Mode d'action et application à la lutte biologique controle les maladies des plantes. Colloques de L'I.N.R.A., v.18, p.35-40, 1983.

CLAYDON, N.; ALLAN, M. L HANSON, J. R.; AVENT, G. A. Antigungal alkyl pyrones of *Trichoderma harzianum*. **Transactions of the British Mycological Society**, v.88, n.4, p.503-513, 1987.

CODEX ALIMENTARIUS. **Codex general standard for contaminants and toxins in food and feed**. CODEX STAN 193, 1995.



CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Proposta de Preços Mínimos - Safra 2015 -2016/Produtos da sócio biodiversidade**. Companhia Nacional de Abastecimento - Brasília, CONAB, v. 2, 2015.

COSTA, D. A. da. **Qualidade da Castanha-do-brasil após o uso de secador de ar por convecção natural e armazém com ventilação**. UFAC, 2012. 110 p. Dissertação (Mestrado) Centro de Ciências Biológicas e da Natureza, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, 2012.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I - Production of non-volatile antibiotics. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 57, p. 25-39, 1971a.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. II - Production of volatile antibiotics. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 57, p. 41-48, 1971b.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. III - Hyphal interaction. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 57, p. 368-369, 1971c.

ELAD, Y.; CHET, I.; HENIS, Y. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.28, n.7, p.719-725, 1982.

EMBRAPA, Empresa brasileira de pesquisa agropecuária. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Embrapa Solos, Rio de Janeiro, 412 p. 1999.

ETHUR, L. Z. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 127-133, 2005.

ETHUR, L. E.; NICOLINI, C.; BLUME, E. Viabilidade de formulação em pó de *Trichoderma virens* em diferentes embalagens e temperaturas. **Revista Brasileira Agrocência**, v.14, n.2, p. 391-394, 2008.

FAO, Food and Agricultural Organization. **Codex committee on contaminants in food**. Discussion paper on aflatoxina contamination in brazil nuts second session. Agenda item 11e Netherlands, 2008.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1.039-1.042, 2011.

FERREIRA, L. M. M.; TONINI, H. Comportamento da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) e da cupiúba (*Goupia glabra*) em sistema agrosilvicultural na região da Confiança, Cantá-Roraima. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 4, p. 835-842, 2009.

FRANK, H. K.; BETANCOURT, L. A Castanha-do-pará I: Origem, Produção e Características Físicas e Químicas. **Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 15, n. 4, p. 351-365, 1981.

FREIRE, F. DAS C. O.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F.; MENDES, F. N. P. **Micotoxinas: Importância na alimentação e na saúde humana e animal**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Agroindústria Tropical Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Fortaleza, CE 2007 ISSN 1677- 1915 Outubro, 2007.

FUJIMORI, F.; OKUDA, T. Application of the random amplified polymorphic DNA using the polymerase chain reaction for efficient elimination of duplicate strains in microbial screening fungi. **The Journal of Antibiotics**, v.47, n.2, p.173-182, 1994.

GAMS, W.; HOEKSTRA, E. S.; ATROOT, A. **Fungal Biodiversity Centre - CBS, course of mycology**. 4. ed. Wageningen: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1998. 165 p.

GAVA, C. A. T.; PINTO, J. M. Biocontrol of melon wilt caused by *Fusarium oxysporum* Schlect f. sp. melonis using seed treatment with *Trichoderma* spp. and liquid compost. **Biological Control**. v. 97, p.13-20, 2016.

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

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

GUNNELL, , D.; FERNANDO, R.; HEWAGAMA, M.; PRIYANGIKA, W. D. D.; KONRADSEN, F.; EDDLESTON, M. The impact of pesticide regulations on suicide in Sri Lanka. **International Journal of Epidemiology**, v. 36, n. 6, p. 1235-1242, 2007.

HARMAN GE, HOWELL CR, VITERBO A, CHET I, LORITO M. *Trichoderma* species: opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 43-56, 2004 a.

HARMAN GE, PETZOLDT R, COMIS A, CHEN J. Interaction between *Trichoderma harzianum* strain T-22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on disease caused by *Phytophthora ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology**, v. 94, p. 147-153, 2004 b.

HOUBRAKEN, J.; VRIES, R. P.; SAMSON, R. A. Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Advances in Applied Microbiology**. v. 86, p.199-249, 2014.

HUBKA, V.; NOVAKOVA, A.; KOLARIK, M.; JURJEVIC, Z.; PETERSON, S. W. Revision of *Aspergillus* section Flavipedes: seven new species and proposal of section nov. **Mycologia**, v. 107, p.169-208, 2015.

IAMANAKA, B. T.; OLIVEIRA, I. S.; TANIWAKI, M. H. Micotoxinas em Alimentos. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v. 7, p. 138-161, 2010.

IMAMURA, K. B. et al. Incidência de aflatoxinas no amendoim (*Arachis hypogaea* L) cru em casca da região da Alta Paulista-SP, durante o período de 2011 a 2012. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 73, n.2, p.178-187, 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura**. Rio de Janeiro: IBGE, v. 31, 2016. 55p.

JACKSON, M. A. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 19, p 180-187, 1997.

JOHNSSON, P. **Análise de fungos produtores de aflatoxina no *Aspergillus Flavus Parasiticus* Agar (AFPA)**. Rio Branco: Embrapa/Acre. 25 a 27 outubro de 2006.

KLICH, M. A. Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. **Mycologia**, v. 94, n. 1, p. 21-27, 2002 a.

KLICH, M. A. **Identification of common *Aspergillus* species**. Amsterdam: Centraalbureau, 116 p., 2002 b.

KOZAKIEWICZ, Z. *Aspergillus* species on stored products. **Mycological Papers**, ed. 161, Washington: CABI, 188 p. 1989.

LEACH, A. W, MUMFORD, J. D. Pesticide environmental accounting: a method for assessing the external costs of individual pesticide applications. **Environ Pollut**, v. 151, p. 139-47. 2008.

LEITE, F. M. N; SOUZA, C. J. **Qualidade microbiológica de castanha-dobrasil durante seu processamento e recomendações de boas práticas de fabricação**. Rio Branco: UFAC: 2002. 53p. Monografia de especialização em Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Acre.

LOBO JUNIOR, M.; BRANDÃO, R. S.; CORRÊA, C. A.; GÖRGEN, C. A.; CIVARDI, E. A.; OLIVEIRA, P. de. Uso de braquiárias para o manejo de doenças causadas por patógenos habitantes do solo. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2009. 8 p. (Embrapa Arroz e Feijão. Comunicado técnico, 183).

LOPES, P. R. S.; NETO, J. R.; MALLMANN, C. A.; LAZZARI, R.; PEDRON, F. de A.; VEIVERBERG, C. A. Crescimento e alterações no fígado e na carcaça de alevinos de jundiá alimentados com dietas com aflatoxinas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.10, out. 2005.

LOUZADA, G. A. S.; CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C.M.; LOBO JÚNIOR, M., MARTINS, I.; BRAÚNA, L. M. Potencial antagônico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. **Biota Neotropica**, São Paulo, v. 9, n. 3, p. 145-149, 2009.

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

MELLO, S. C. M.; ÁVILA, Z. R.; BRAÚNA, L. M.; PÁDUA, R. R.; GOMES, D. Cepas de *Trichoderma* para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Fitosanidad**, v. 11, n.1, p. 03-09, 2007.

MELO, I. S. **Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas**. In: BETTIOL, W., org. Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna: CNPDA/EMBRAPA. p.135-156. 1991.

MELO, I. S. de. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.4, p.261-295, 1996.

MENEZES, J. P.; LUPATINI, M.; ANTONIOLLI, Z. I.; BLUME, E.; JUNGES, E.; MANZONI, C. G. Variabilidade genética na região ITS do rDNA de isolados de *Trichoderma* spp. (biocontrolador) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *Chrysanthemi* . **Ciência e Agrotecnologia.**, v. 34, n. 1, p. 132-139, 2010.

MILLER, S. A, BEED, F. D, HARMON, C. L. Plant disease diagnostic capabilities and networks. **Annual Review of Phytopathology**, in press, v. 47, p. 15-38, 2009.

MOHAMED, H. A. L. A.; HAGGAG, W. M. Biocontrol potential of salinity tolerant mutants of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum*. **Brazilian Journal of Microbiology**.v. 37, n. 2, p. 181-191. 2007.

NOGUEIRA, R. M.; RUFFATO, S.; SILVA, J. de S. E.; ALVARES, V. de S.; RAMIREZ, K. de L. A. S. **Pós-colheita da Castanha do Brasil**, 2010. UFMT, UFV; EMBRAPA Acre, SEBRAE.

NUNES, I. L.; MAGAGNIN, G.; BERTOLIN, T. E.; FURLONG, E. B. Arroz comercializado na região Sul do Brasil: aspectos micotoxicológicos e microscópicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 190-194, 2003.

PACHECO, A. M. **Ocorrência de Aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2) em Castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) proveniente de municípios do Estado do Amazonas na safra de 2002**. 65 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Amazonas Manaus, AM, 2003.

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

PACHECO, A. M. **Selênio e aflatoxinas em castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) e qualidade de produtos derivados**. 2007. 144 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

PAPAVIZAS, G. C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, v.23, p.23-54, 1985.

PAS. Programa de alimentos seguros. **Manual de segurança e qualidade para a cultura da castanha-do-brasil**. Brasília: Embrapa, 2004. 62 p.

PARZIANELLO, F. R. **Uso de polímeros em formulações para armazenamento de *Trichoderma harzianum* E *Trichoderma viride***. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Agrobiota, RS, 2002.

PERAZZOLLI, M.; DAGOSTIN, S.; FERRARI, A.; ELAD, Y.; PERTOT, I. Induction of systemic resistance against *Plasmopara viticola* in grapevine by *Trichoderma harzianum* T39 and benzothiadizole. **Biological Control**, v.47, p.228-234, 2008.

PEREIRA, M. M. G.; CARVALHO, E.P. de; PRADO, G. Growth and production of aflatoxin by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 20, p.114-156. 2002.

PILDAIN, M. B.; VAAMONDE, G.; CABRAL, D. Analysis of Population structure of *Aspergillus Flavus* from peanut based of vegetative compatibility, geographic origin, mycotoxin and sclerotia production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 93, p. 31-40, 2004.

PIMENTEL, L. D.; JÚNIOR, A. W.; SANTOS, C. E. M. dos; BRUCKNER, C. H. Estimativa de viabilidade econômica no cultivo da castanha-do-brasil. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 37, n. 6, p. 26-27, 2007.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. New York: Springer, 519 p., 2009.

POMELLA, A. W. V. E.; RIBEIRO, R. T. S. **Controle biológico com *Trichoderma* em grandes culturas – uma visão empresarial**. 2009 In: Bettiol, W. e Morandi, M.A.B. (Ed.). *Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas*. Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, p. 238–244.

RAI, B.; SINGH, V. T.; SINGH, D. B. *Trichoderma viride* as a mycoparasite of *Aspergillus* spp. **Plant and Soil**, v. 57, p. 131-135, 1980.

RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. **The genus *Aspergillus***. Baltimore: Williams Wilkins, 685 p., 1965.

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

RIBEIRO, M. A. A.; REGITANO D'ARCE, M. A. B.; LIMA, U. A.; BAGGIO, C. E. Armazenamento da castanha do Pará com e sem casca: efeito da temperatura na resistência ao ranço. **Scientia Agricola**, v. 50, n.3, p. 343-348, 1993.

RIDOUT, C. J.; COLEY-SMITH, J. R.; LYNCH, J.M. Fractionation of extracellular enzymes from mycoparasitic strain of *Trichoderma harzianum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.10, p.180-187, 1988.

RIFAI, M. A revision of the genus *Trichoderma*. **Mycological Papers**, London, n.116, p.1-116, 1969.

ROBS, C. Bactérias como agentes de controle de fungos fitopatogênicos. In: **Controle Biológico de doenças de plantas**. Bettiol, W. (Org.) Jaguariúna: Embrapa-Cnpda, 1991. 338p.

RODRIGUES, P.; VENÂNCIO, A.; KOZAKIEWICZ, Z.; LIMA, N. A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* Section *Flavi* isolated from Portuguese almonds. **International journal of food microbiology**, v.129, n.2, p.187-193, 2009.

RODRIGUES, K. S. **Ocorrência de fungos com potencial toxígeno em castanha-do-brasil no estado de Roraima**. 2016. 75 p. Dissertação (Mestrado em Agroecologia). Universidade Estadual de Roraima, Boa Vista, RR, 2016.

ROIGERS, D.J., JEFFERS, S.N. Evaluation of *Trichoderma* spp. for biological control of Phytophthora crown and root rot of apple seedlings. **Phytopathology**, v.81, p.910-917, 1991.

SAMSON, R. A.; VISAGIE, C.M.; HOUBRAKEN, J.; HONG, S.-B.; HUBKA,V.; KLAASSEN,C.H.W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K.A.; SUSCA, A.; TANNEY, J.B.; VARGA, J.; KOCSUBÉ, S.; SZIGETI, G.; YAGUCHI,T.; FRISVAD, J.C. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*, **Studies in Mycology**, v. 78, p.141-173, 2014.

SANTOS, A. F.; DHINGRA, O.D. Pathogenicity of *Trichoderma* spp. on the sclerotia of *Sclerotinia Sclerotiorum*. **Canadian Journal of Botany**, v. 60, n. 4, p. 472-475, 1982.

SANTOS, O. V. dos. **Estudo das potencialidades da castanha-do-brasil: produtos e subprodutos**. São Paulo, USP, 2012. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 214 p.

SCOLES, R.; KLEIN, G. N.; GRIBEL, R. Crescimento e sobrevivência de castanheira-do-brasil (*Bertholletia excelsa* Bonpl., Lecythidaceae) plantada em diferentes condições de luminosidade após seis anos de plantio na região do rio Trombetas, Oriximiná, Pará. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais** v. 9, n. 2, p. 321-336, 2014.

SHORESH, M.; YEDIDIA, I.; CHET, I. Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. **Phytopathology**, v.95, p.76-84, 2005.

SILVA, F. C. da.; CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R.; SANTOS, C.; LIMA, N. Use of a polyphasic approach including MALDI-TOF MS for identification of *Aspergillus* section *Flavi* strains isolated from food commodities in Brazil. **Annals of Microbiology**, v. 65, n.4, p. 01-11, 2015.

SOARES, C.; RODRIGUES, P.; PETERSON, S. W.; LIMA, N.; VENÂNCIO, A. Three new species of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from almonds and maize in Portugal. **Mycologia**, v. 104, n. 3, p. 682-697, May 2012.



SOUZA, J. M. L. de.; CARTAXO, C. B. da C.; LEITE, F. M. N.; SOUZA, L. M. **Manual de Segurança e Qualidade para a Cultura da Castanha do Brasil**. 2004.

SYLOS, C. M. Efeito da luz sobre a produção de aflatoxinas durante o armazenamento de produtos de amendoim. In: XII Encontro Nacional de Micotoxinas, V Congresso Latino-Americano de Micotoxicologia e IV Simpósio em Armazenagem Qualitativa de Grãos do Mercosul, 2006, Florianópolis. **Livro de Resumos**, p. 269.

TACO. **Tabela brasileira de composição de alimentos**. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação – NEPA. Universidade Estadual de Campinas. Gráfica Book. 4. ed. 161 p. 2011.

TANIWAKI, M. H.; IAMANAKA, B. T.; SILVA, N. da. **Fungos deteriorantes de alimentos: Ocorrências e detecção**. 63p. Campinas, 2011.

TANIWAKI, M. H.; PITT, J. I.; IAMANAKA, B. T.; SARTORI, D.; COPETTI, M. V.; BALAJEE, A.; FUNGARO, M. H. P.; FRISVAD, J. C. *Aspergillus bertholletius* sp. nov. from Brazil Nuts. **PloS one**, v. 7, n. 8, p. e42480, 2012.

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

TEIXEIRA, A. S.; FREITAS-SILVA, O.; GODÓY, R.L.O.; VARGAS, E.A.; MARTINS, A. Análise e quantificação de aflatoxinas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em amostras de castanha-do-Brasil. **Revista Ciência da Vida**, Seropédica, v. 28, p. 22-24, 2008.

TONINI, H.; COSTA, P.; KAMINSKI, P. E. Estrutura e produção de duas populações nativas de castanheira-do-Brasil (*Bertholletia Excelsa* O. Berg) em Roraima. In: **CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL**, 8., 2007, Caxambu. **Anais...** Caxambu, 2007.

TONINI, H.; LOPES, C. E. V.; BORGES, R. A.; KAMINSKI, P. E.; ALVES, M. S.; FAGUNDES, P. R. O. Fenologia, estrutura e produção de sementes em castanhais nativos de Roraima e características socioeconômicas dos extrativistas. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais**. v. 9, p. 399-414, 2014.

VAJNA, L. Phytopathogenic *Fusarium oxysporum* as a necrotrophic mycoparasite. **Phytopathologische Zeitschrift**, v. 114, p. 338-348, 1985 a.

VAJNA, L. Mutual parasitism between *Trichoderma hamatum* and *Trichoderma pseudokoningii*. **Phytopathologische Zeitschrift**, v. 113, p. 300-303, 1985 b.

VARGA, J.; JUHÁSZ, Á.; KEVEI, F.; KOZAKIEWICZ, Z. Molecular diversity of agriculturally important *Aspergillus* species. In.: **Molecular Diversity and PCR-detection of Toxigenic *Fusarium* Species and Ochratoxigenic Fungi** . Springer Netherlands. Molecular Diversity and PCR-detection of Toxigenic *Fusarium* Species and Ochratoxigenic Fungi. Springer, Netherlands, p. 627-640, 2004.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERT, E.L.; MARA, R.; BARBETTI, M.J.; LI, H.; WOO, S.L.; LORITO, M. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 72, p. 80-86, 2008.

VITERBO, A.; HAREL, M.; HORWITZ, B.A.; CHET, I.; MUKHERJEE, P.K. *Trichoderma* mitogen-activated protein kinase signaling is involved in induction of plant systemic resistance. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 6241-6246, 2005.

WEINDLING, R. Studies on lethal principles effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. **Phytopathology**, v. 24, p. 1153-1179, 1934.

XAVIER, J. J. M. **Desenvolvimento de métodos para multi-toxinas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrômetro de massa/massa**. Santa Catarina. UFSC. 2007. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-graduação em Ciências dos Alimentos.

YEDIDIA, I., SRIVASTVA, A. K., KAPULNIK, Y. & CHET, I. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. **Plant Soil**, v. 235, n. 2, p. 235-242, 2001.

ZORZETE, P. BAQUIÃO, A.;[. C.; ATAYDE, D. D.; REIS, T. A.; GONÇALEZ, E.; CORRÊA, B. Mycobiota aflatoxins and cyclopiazonic acid in stored peanuts cultivars. **Food Research International**, Barking, v. 52, n. 1, p. 380-386, 2013.