



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

DISSERTAÇÃO

**Ocorrência de fungos com potencial toxígeno em
castanha-do-brasil no estado de Roraima**

Kellen Souza Rodrigues

2016



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

Ocorrência de fungos com potencial toxígeno em castanha-do-brasil no estado de Roraima

Kellen Souza Rodrigues

Sob a Orientação da Professora

Dra. Hyanameyka Evangelista de Lima Primo

Co-orientação do Pesquisador

Dr. Daniel Augusto Schurt

Co-orientação do Pesquisador

Dr. Otniel Freitas Silva

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

Boa Vista, RR
Abril de 2016

Copyright © 2016 by Kellen Souza Rodrigues

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 de Sistemas de Bibliotecas
Multiteca Central
Rua Sete de Setembro, 231 bloco – F Bairro Canarinho
CEP: 69. 306-530 Boa Vista – RR
Telefone: (95) 2121.0946
e-mail: biblioteca@uerr.edu.br

Ficha catalográfica elaborada pela biblioteca central da UERR

A75p

SOUZA RODRIGUES, Kellen.

Ocorrência de fungos com potencial toxígeno em castanha-do-brasil no estado de Roraima. /Kellen Souza Rodrigues. Boa Vista: UERR, 2016.

75 p.: il. 30 cm

Dissertação (Mestrado em Agroecologia) – Universidade Estadual de Roraima. Orientador: DSc. Hyanameyka Evangelista de Lima Primo

1. Ocorrência de fungos com potencial toxígeno em castanha-do-brasil no estado de Roraima. I. Primo, Hyanameyka Evangelista de Lima (Orient.) II. Universidade Estadual de Roraima – UERR, Mestrado em Agroecologia. III. Ocorrência de fungos com potencial toxígeno em castanha-do-brasil no estado de Roraima.

CDD.: 631.41

FOLHA DE APROVAÇÃO

KELLEN SOUZA RODRIGUES

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM / /

Prof.^a Dr.^a Hyanameyka Evangelista de Lima Primo
Embrapa Roraima
Orientadora

Pesquisador Dr. Otniel Freitas Silva
Embrapa Agroindústria de Alimentos
Co-orientador

Prof.^a Dr.^a Silvana Tulio Fortes
Universidade Federal de Roraima

Prof. Dr. Alessandro Antônio Fortunato
Universidade Federal de Roraima

Prof. Dr. Daniel Chiaradia Oliveira
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Roraima

DEDICATÓRIA

Aos meus Pais, Maria da Paz Souza Rodrigues e
Antonio Airton Rodrigues.
À minha avó, Maria Alves de Souza.
Ao meu noivo, Washington Costa Silva.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por toda a proteção e força, permitindo-me chegar ao final deste trabalho.

Aos meus pais, Maria da Paz e Antonio, pelo sacrifício diário que fizeram por mim, para que eu realizasse o meu sonho e por todo o incentivo que me ajudou a continuar em frente.

À minha família, por todo o apoio.

Ao meu noivo, Washington, pelo incentivo, pela compreensão, pela paciência e por estar sempre ao meu lado.

Aos Professores Dr^a. Hyanameyka Evangelista de Lima Primo e Dr. Daniel Augusto Schurt, pela orientação, pelo ensinamentos e confiança.

Ao Dr. Otniel Freitas-Silva pela orientação e sugestões; sua equipe da Embrapa Agroindústria de Alimentos, pelo auxílio nas análises de aflatoxinas.

Aos colegas do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Roraima, Giovanni, Rose, Inaira, Aline, Carla, Laís, Aveline, Roseane e Pedro pelo auxílio e momentos de descontração.

Aos meus colegas do Mestrado em Agroecologia, pelo incentivo.

Ao Sr. Mário Etevaldo Pereira Coelho, por toda a dedicação e apoio na condução do experimento em campo e coleta de amostras.

Aos Senhores Anchieta e Francisco, pela grande ajuda para abrir os ouriços.

Ao Senhor Adebaldo Sampaio Teles, pela amizade.

Aos meus amigos e colegas de trabalho, que sempre estiveram ao meu lado, me incentivando e apoiando, Rebeca, Dona Leda, Sr. José, Jefison, Alzira, André, Fabrícia, Nathalie, Sr. Francisco e Jadinea.

A todos que colaboraram de forma direta ou indireta para conclusão deste trabalho.

Muito Obrigada!

RESUMO

RODRIGUES, Kellen Souza. **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.

A castanha-do-brasil é uma árvore nativa da Floresta Amazônica e sua amêndoa é um dos principais produtos extrativistas exportados pela região norte, trazendo divisas para a economia dos estados da Amazônia brasileira. A amêndoa é bastante apreciada pelos consumidores devido ao seu sabor, assim como pelas características nutricionais. No entanto, o comércio da castanha-do-brasil pode ser afetado pela contaminação por aflatoxinas, um grupo de metabólitos secundários produzidos por fungos do gênero *Aspergillus* spp. Seção *Flavi*, que constituem um risco à saúde humana devido aos seus efeitos tóxicos. Este trabalho teve por objetivo estudar a micobiota associada à castanha-do-brasil e verificar a influência do tempo de exposição do ouriço ao solo após a queda, tanto em condições naturais de campo quanto em ambiente com condições controladas de temperatura e umidade, sobre a contaminação das amêndoas por micotoxinas. No primeiro ensaio, ouriços foram mantidos no campo por 1, 15, 35, 55, 75 e 95 dias de exposição sobre o solo após a queda, e após este período as amêndoas foram analisadas pelo método de incubação em papel filtro “Blotter-test”, para determinação da micobiota. Os resultados deste estudo foram expressos em porcentagem de amêndoas contaminadas, determinando os percentuais médios para cada gênero de fungo detectado nas amêndoas. No segundo ensaio os ouriços foram mantidos no campo por 1, 30, 60 e 90 dias de exposição sobre o solo após a queda, e após este período as amêndoas foram analisadas adotando-se a técnica do plaqueamento direto das amêndoas no meio ágar dicloran 18% glicerol para análise da infecção fúngica. As análises para detecção e quantificação de aflatoxinas foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Das amêndoas analisadas pelo método Blotter-test houve incidência do gênero *Aspergillus* spp. em 100% das amêndoas provenientes de ouriços que permaneceram sobre solo por períodos de 15 a 95 dias após a queda, enquanto que em ouriços com um dia de exposição a incidência foi de quase 50%. No segundo ensaio houve predominância de *Macrophomina phaseolina*, observada em todos tratamentos, representando 39,08% do total de espécimes isolados. A análise da estatística de todos tratamentos e fungos mostrou que o *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nomius*, *Penicillium* spp. e *Paecilomyces variotii* apresentaram diferença significativa ao nível de 5% de significância, para os locais de exposição, demonstrando que o Sistema Agroflorestal (SAF) possui as condições ambientais que favorecem desenvolvimento destes fungos. Na análise do potencial toxígeno no meio ágar coco o SAF destacou-se em relação ao ambiente com condições controladas, pois apresentou maior número de isolados produzindo fluorescência. Na análise estatística o *Aspergillus nomius*, apresentou diferença significativa em relação aos demais fungos do gênero *Aspergillus* ao nível de 5% de significância pelo teste de Kruskal-Wallis, observando estes isolados nas amêndoas dos ouriços mantidos sobre o solo do SAF. Não foi detectado aflatoxinas nas amêndoas dos tratamentos do segundo ensaio, este resultado pode estar relacionado à atividade de água e teor de umidade abaixo do indicado para que houvesse produção de aflatoxinas, embora a condição tenha sido propícia ao crescimento de fungos potencialmente produtores de aflatoxinas.

Palavras-chave: amêndoas, aflatoxinas, *Aspergillus flavus*.

ABSTRACT

RODRIGUES, Kellen Souza. **Occurrence of fungi with toxigenic potential in Brazil nut the state of Roraima**. 2016. 65 p. Dissertation (Master Science in Agroecology). State University of Roraima, Boa Vista, RR, 2016.

The Brazil-nut tree is native to the Amazon rainforest and its nut is one of the main extractive products exported from the north of Brazil, bringing foreign exchange to the economy of the states of the Brazilian Amazon. This nut is appreciated by consumers due to its flavor, as well as the nutritional characteristics. However, the Brazil nut trade can compromise the exports due to aflatoxins contamination, since Brazil nut can be affected by aflatoxins contamination. Those aflatoxins are, a group of secondary metabolites produced by *Aspergillus* spp. Section *Flavi*, which constitutes a risk to human health due to their toxic effects. This work aimed to study the Brazil nut associated mycobiota and its influence on the pod exposure time after the fall, both in natural forest conditions, and controlled (temperature and humidity) ones on the kernel contamination by aflatoxins. In the first trial, pods were kept in the field for 1, 15, 35, 55, 75 and 95 days of exposure on the ground after the fall, and after this period nuts were analyzed through Blotter-test incubation to determine the mycobiota contamination. The results were expressed as a percentage of kernel contamination, the average percentage for each detected genus in nuts. In the second trial the pods were kept in the field for 1, 30, 60 and 90 days exposure time on the ground after the fall, and the nuts were analyzed by direct plating on agar dicloran-glycerol 18% for fungal infection. The analysis for detection and quantitation of aflatoxin was carried out by high-performance liquid chromatography (HPLC). Results show that blotter-test presented the 100 % of *Aspergillus* spp. incidence in nuts from pods that remain on the soil for 15 to 95 days after the fall. However, in pods with one day of exposure this incidence reduced for 50%. In the second trial there was observed the predominance of *Macrophomina phaseolina* in all treatments representing 39.08% of the isolated species. The statistical analysis for all treatments revealed that *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nomius*, *Penicillium* spp. and *Paecilomyces variotii* presented differences at 5% of significance for the exposure time demonstrating that the Agroforestry System (AS) where the Brazil nut are produced has the environmental conditions to promote the further development of these four species. In the analysis of toxigenic potential in coconut agar AS stood out in relation to the environment under controlled conditions, for the greatest number of isolates producing fluorescence. Statistical analysis *Aspergillus nomius*, showed a significant difference compared to other fungi of the genus *Aspergillus* at 5% significance by Kruskal-Wallis test, watching these isolated almonds fruits of Brazil nut tree kept on the soil of the AS. It was not aflatoxins detection on the second assay. These results can be related to the water activity and moisture content below to the aflatoxins production although it has been favorable to the growth of potentially aflatoxins producing fungi on nuts.

Keywords: almonds, aflatoxins, *Aspergillus flavus*.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Percentual das amêndoas de castanhas-do-brasil infectadas por diversos fungos em diferentes períodos de exposição dos ouriços sobre o solo após a queda.....	36
Tabela 2 - Precipitação diária média durante os períodos de exposição dos ouriços no solo ..	37
Tabela 3 - Teste de Kruskal-Wallis para os isolados de <i>Aspergillus</i> spp. e <i>Penicillium</i> spp. identificados nas amêndoas de castanha-do-brasil, em cada período de exposição dos ouriços sobre o solo após a queda	38
Tabela 4 - Incidência de fungos que infectaram as amêndoas de castanhas-do-brasil quando os ouriços foram expostos a diferentes períodos sobre o solo do SAF.....	41
Tabela 5 – Incidência de fungos que infectaram as amêndoas de castanhas-do-brasil nos diferentes períodos de armazenamento no ambiente climatizado sob condições controladas .	41
Tabela 6 - Percentual das amêndoas de castanhas-do-brasil infectadas por diversos fungos em diferentes períodos de exposição do ouriço sobre o solo do SAF e armazenados em ambiente climatizado sob condições controladas (ACC).....	42
Tabela 7 - Número de <i>Aspergillus</i> spp. e <i>Penicillium</i> spp. detectados contaminando amêndoas de castanha-do-brasil provenientes de ouriços submetidos a diferentes períodos de exposição sobre o solo do SAF após a queda.....	44
Tabela 8 – Número de <i>Aspergillus</i> spp. e <i>Penicillium citrinum</i> que contaminaram as amêndoas de castanha-do-brasil provenientes de ouriços submetidos a diferentes períodos de exposição armazenados no ambiente com condições controladas	44
Tabela 9 - Médias dos fungos que infectaram as amêndoas de castanha-do-brasil nos dois locais de exposição dos ouriços, Sistema agroflorestal (SAF) e em ambiente sob condições controladas (ACC), utilizando o Teste Kruskal-Wallis.....	45
Tabela 10 - Número médio de <i>Penicillium citrinum</i> pelo Teste de Kruskal-Wallis detectadas infectando amêndoas de castanha-do-brasil provenientes de ouriços submetidos a diferentes períodos de exposição após a queda sobre o solo do Sistema Agroflorestal (SAF) e armazenados em ambiente climatizado sob condições controladas (ACC).	46
Tabela 11 - Teor de umidade e atividade de água das amêndoas de castanha-do-brasil, submetidas a diferentes períodos de exposição dos ouriços após a queda, sobre o solo no Sistema agroflorestal (SAF) e armazenados em Ambiente com condições controladas ACC.....	47
Tabela 12 - Isolados de <i>Aspergillus</i> spp. obtidos das amêndoas de castanha-do-brasil, submetidas a diferentes períodos de exposição dos ouriços após a queda, sobre o solo no	

Sistema agroflorestal (SAF) e armazenados em ambiente com condições controladas (ACC),	49
Tabela 13 - Número médio de isolados de <i>Aspergillus nomius</i> das amêndoas de castanha-do-brasil, submetidas a diferentes períodos de exposição dos ouriços após a queda, sobre o solo no SAF e armazenados no ACC, que apresentaram fluorescência quando cultivados em meio ágar coco.....	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação das principais micotoxinas.	23
Figura 2 - Percentual médio dos fungos identificados nos tratamentos T1 a T6 no teste de sanidade.	35
Figura 3 - Percentual médio dos fungos isolados das amêndoas de castanhas-do-brasil em diferentes períodos de exposição do ouriço sobre o solo do SAF e armazenados em ambiente climatizado sob condições controladas (ACC) no teste de qualidade sanitária.	40

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
	2.1 A Castanha-do-brasil.....	16
	2.2 Extrativismo da castanha-do-brasil.....	17
	2.3 Micobiota associada à castanha-do-brasil.....	18
	2.4 Gênero <i>Aspergillus</i> spp.....	19
	2.5 <i>Aspergillus</i> spp. seção <i>Flavi</i>	20
	2.6 Micotoxinas.....	22
	2.7 Aflatoxinas.....	24
	2.8 Legislação sobre os níveis toleráveis de aflatoxinas.....	25
	OBJETIVOS.....	27
	Objetivo Geral.....	27
	Objetivos Específicos.....	27
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
	3.1 Área de estudo.....	28
	3.2 Coletas das amostras para efetuar o teste de sanidade.....	28
	3.2.1 Teste de sanidade.....	29
	3.3 Coleta de amostras para análise da qualidade sanitária de amêndoas de castanha-do-brasil.....	30
	3.3.1 Teor de umidade.....	31
	3.3.2 Atividade de água (Aw).....	31
	3.3.3 Plaqueamento direto.....	31
	3.3.4 Isolamento e Identificação dos fungos.....	32
	3.3.5 Potencial toxígeno dos <i>Aspergillus</i> spp.....	32
	3.3.6 Amostras para análise de aflatoxinas.....	33
	3.3.7 Análises das aflatoxinas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
	4.1 Teste de sanidade.....	35
	4.2 Análise da qualidade sanitária das amêndoas.....	39
	4.3 Teor de umidade e atividade de água (Aw) das amêndoas.....	47
	4.4 Potencial toxígeno.....	49
	4.3 Análise das amêndoas para detecção das aflatoxinas (AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2)..	50

5	CONCLUSÕES.....	52
	REFERÊNCIAS.....	53
	ANEXOS.....	64
	APÊNDICES.....	67

1 INTRODUÇÃO

A castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) é uma árvore nativa da Floresta Amazônica e suas amêndoas são um dos principais produtos extrativistas exportados pela região norte, trazendo divisas para a economia dos estados da Amazônia brasileira, sendo encontrada ainda na Bolívia, Colômbia, Guianas, Peru e Venezuela (PACHECO; SCUSSEL, 2006; PIMENTEL et al., 2010; TONINI, 2011).

Uma vez que a coleta das castanhas-do-brasil não exige a derrubada das castanheiras, é considerada uma atividade à ligada conservação da Floresta Amazônica com baixos impactos ambientais, desta forma a coleta representa para as comunidades locais que vivem na Amazônia, uma forma de explorar a floresta de modo sustentável, constituindo uma fonte de renda para manutenção de suas famílias (WADT; KAINER; GOMES, 2005; WADT et al., 2008).

A amêndoa da castanha-do-brasil é bastante apreciada pelos consumidores devido ao seu sabor, assim como pelas características nutricionais. Rica em proteínas, lipídios essenciais (ômega 3 e 6), carboidratos e fibra alimentar, a castanha possui ainda tocoferóis que podem atuar contra doenças como o câncer, aterosclerose e doenças inflamatórias (PACHECO; SCUSSEL, 2006). Possui também concentrações consideráveis de compostos fenólicos, carotenóides, selênio e a vitamina E, que possui atividade antioxidante combatendo os radicais livres e prevenindo o envelhecimento precoce (PACHECO; SCUSSEL, 2006).

A castanha-do-brasil é exportada para países da América do Norte e Europa como produto de alto valor. Absorvida pelo mercado de alimentos orgânicos, atende às necessidades de consumidores exigentes, preocupados com a segurança dos alimentos presentes em suas dietas e com os impactos de sua compra sobre as pessoas e o ambiente (REIS et al., 2014; COSTA, 2012; AGUIAR, 2014; OLIVEIRA, 2011).

A comercialização da castanha-do-brasil pode ser prejudicada devido a contaminação por micotoxinas (aflatoxinas - AF), que são um grupo de metabólitos secundários produzidos por fungos do gênero *Aspergillus* spp. seção *Flavi* (MASSI et al., 2014). Tais toxinas constituem um risco à saúde humana, devido aos seus efeitos tóxicos imediatos, imunossupressores, mutagênicos, teratogênicos e carcinogênicos (MASSI et al., 2014; HONTANAYA et al., 2015). Dentre as diversas amêndoas comercializadas no país, a castanha-do-brasil é a que apresenta a maior incidência de aflatoxinas (COSTA et al., 2009a).

A contaminação pode estar relacionada com as condições climáticas do país, desta forma o clima da Floresta Amazônica, com umidade e temperatura altas a maior parte do ano, o baixo nível tecnológico da cadeia produtiva e o período extenso em que o ouriço pode permanecer em contato com o solo na estação chuvosa após sua queda, constituem, ambientes favoráveis à contaminação das castanhas por fungos produtores de aflatoxinas (de SOUZA et al., 2004).

A exposição humana às micotoxinas pelo consumo das castanhas-do-brasil contaminadas torna-se então questão de saúde pública, e de gera prejuízos econômicos a toda cadeia produtiva. O monitoramento dos alimentos importados de países de fora da União Europeia coloca a castanha-do-brasil entre os 10 produtos com maior índice de contaminação por aflatoxinas (FREITAS-SILVA; DIAS, 2012).

Desta forma, conhecer a micobiota associada à castanha-do-brasil, bem como desenvolver metodologias que visem reduzir a contaminação por micotoxinas torna-se necessário, para garantir que os consumidores tenham acesso a um produto com qualidade sanitária satisfatória, e que, ao mesmo tempo, atendam às exigências da legislação nacional e internacional para comercialização. A hipótese estabelecida para o trabalho é que, com o progressivo aumento do número de dias em que o ouriço permanece em contato com o solo após a queda, haja uma elevação da contaminação das amêndoas por fungos aflatoxigênicos, e consequentemente a presença de micotoxinas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Castanheira-do-brasil

Considerada uma das espécies nativas mais valiosas da Floresta Amazônica, a castanheira-do-brasil (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) é utilizada há várias gerações pelos povos da Amazônia como fonte de alimentação e renda (COSTA et al., 2009b). Pertencente à família Lecythidaceae, é uma árvore típica de florestas tropicais úmidas de terra firme, com ocorrência natural ao longo da bacia hidrográfica dos rios Amazonas e Orenoco, sendo encontrada nos estados de Rondônia, Acre, Amazonas, Roraima, Pará, Amapá e Mato Grosso (SCOLES, KLEIN, GRIBEL, 2014; TONINI et al., 2014).

A castanheira é uma árvore de grande porte, podendo atingir de 30 a 60 m de altura, e 2 m de diâmetro na sua base. Possui a copa grande, hábito social, sendo geralmente encontrada em agrupamentos denominados castanhais (PACHECO; SCUSSEL, 2006). Desenvolve-se em regiões de clima quente e úmido com temperaturas médias de 25°C, chuvas abundantes e períodos de estiagem bem definidos (MÜLLER, 1995).

Seus frutos, os ouriços, podem pesar de 500 a 1.500g e ter no seu interior até 25 sementes. É uma cápsula globosa, quase esférica, medindo de 8 a 15 cm em de diâmetro, possui casca espessa, lenhosa, dura e de cor castanha (COSTA et al., 2009b; WADT; KAINER, 2009).

As sementes da castanheira são angulosas, estreitas, compridas, com o tegumento duro, com rugosidade transversal, e apresentam um tecido meristemático circundando a amêndoa (WADT; KAINER, 2009). A amêndoa é utilizada como alimento e considerada uma das proteínas vegetais mais completas. Possui cálcio e fósforo, essenciais na alimentação infantil, apresenta elevado índice de magnésio e potássio, minerais importantes para o equilíbrio da saúde e é rica em selênio, um mineral de ação rejuvenescedora e energética (COSTA et al., 2009b).

As flores da castanheira são dispostas em inflorescências, abrindo uma ou duas flores por dia. As mesmas são cobertas por uma das pétalas, que precisa ser levantada pelos polinizadores durante a polinização (MAUÉS, 2002).

Entre a queda das flores até a maturação dos ouriços decorrem aproximadamente quinze meses (PACHECO; SCUSSEL, 2006). Em Roraima a castanheira-do-brasil floresce nos meses de fevereiro a abril, na estação seca. A dispersão dos frutos ocorre por um período

de quatro a seis meses, durante a estação chuvosa com auge nos meses de abril a junho (TONINI et al., 2014).

2.2 Extrativismo da castanha-do-brasil

A castanha-do-brasil é produzida quase que exclusivamente pelo sistema extrativista, sendo atualmente a principal atividade econômica de milhares de famílias que vivem na Amazônia (WADT; KAINER, 2009).

Nos quatro primeiros meses de 2012, foram exportadas 4.940 toneladas de castanha-do-brasil para a Europa e Estados Unidos, gerando uma receita de U\$ 6,5 milhões (CONAB, 2012). O Brasil é o país que mais exporta a castanha-do-brasil, e sua produtividade é de aproximadamente 36 mil toneladas anuais (CONAB, 2015).

Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) revelam que a semente da castanheira-do-brasil, é o segundo produto extrativista não madeireiro em importância econômica para Amazônia Brasileira, com uma produção de 37.499 toneladas em 2014. A produção de Roraima pode ser considerada pequena (166 toneladas) quando comparada a produção do Acre (13.684 toneladas), principal produtor, e a do Amazonas (12.901 toneladas) e Pará (6.903 toneladas) (IBGE, 2014).

Em Roraima, os municípios produtores de castanha-do-brasil localizam-se no sul do estado, destacando-se Caracaraí, Caroebe, São João da Baliza, São Luís do Anauá e Rorainópolis, com o extrativismo praticado por agricultores em assentamentos rurais, por ribeirinhos, na região do baixo rio Branco, e por indígenas da etnia Wai Wai (TONINI et al., 2014).

No extrativismo da castanha-do-brasil são utilizados poucos investimentos tecnológicos, com técnicas simples de coleta e quebra dos ouriços, realizadas ainda dentro da floresta, sendo seguida as etapas de transporte, armazenamento e beneficiamento das castanhas (CALDERARI, 2011).

A produção dos agricultores que vivem nos assentamentos é comprada por atravessadores, que vêm de outros estados na época de safra da castanha. Estes armazenam a produção em depósitos por um período de até 90 dias, esperando a entressafra no Acre, Amazonas e Pará, e o aumento dos preços (TONINI et al., 2014).

O extrativismo praticado por agricultores, ribeirinhos e indígenas possui pontos críticos relativos à adoção de boas práticas extrativistas, que evitem a contaminação das

castanhas, principalmente nas fases de lavagem, secagem e armazenamento (TONINI et al., 2014).

Como forma de reduzir essa contaminação e aumentar a produtividade, recomenda-se a adoção de boas práticas por parte dos extrativistas, em que os restos de safras anteriores devem ser enterrados ou depositados em locais distantes da área de coleta e amontoa. Os ouriços devem permanecer o menor tempo possível em contato com o solo, para isto, ele pode ser armazenado com opérculo voltado para baixo em mesas artesanais (girais). Além disso, deve-se realizar a quebra dos ouriços em áreas limpas em cima de sacos, preferencialmente na cor branca, para facilitar a visualização das castanhas deterioradas (CALDERARI, 2011; SANTOS, 2012; NOGUEIRA et al., 2010; PACHECO; SCUSSEL, 2006).

Após a seleção das castanhas viáveis para o consumo, estas podem passar pelo processo de lavagem para eliminação das castanhas chochas e retirada das impurezas (de SOUZA et al., 2004).

Todavia em alguns casos essa etapa não é recomendada, pois se não houver uma secagem eficiente irá aumentar do teor de umidade da amêndoa e favorecer a sua deterioração (de SOUZA et al., 2004).

A incorporação destas e outras práticas pelos extrativistas da castanha-do-brasil, associado ao uso de metodologias extrativistas em conjunto com treinamentos e capacitação, contribuem para a melhoria da qualidade do produto nas etapas do preparo do castanhal até o transporte para o beneficiamento, visto que são consideradas etapas críticas e dependendo da forma que são conduzidas, pode haver maior ou menor contaminação por fungos e por possíveis toxinas (VALOIS, 2003; PACHECO; SCUSSEL, 2006).

2.3 Microbiota associada à castanha-do-brasil

Os alimentos possuem uma microbiota natural variável concentrada principalmente na parte superficial, constituída por fungos e bactérias que possuem a função de deteriorá-lo, assim como exercer eventualmente atividade patogênica para o homem (BAQUIÃO et al., 2012).

Na castanha-do-brasil, os fungos filamentosos saprófitas são os que mais participam deste processo, podendo ser encontrados no ar, na água e no solo, sendo este último lugar, o reservatório primário de muitos fungos (BAQUIÃO et al., 2012). Entre os danos causados

pela deterioração fúngica estão: a diminuição do poder germinativo, alterações no sabor e no aroma, descoloração e mudanças químicas e nutricionais (PASTEUR; BULLERMAN, 1988).

Vários estudos realizados sobre a micobiota da castanha-do-brasil mostraram que as espécies comumente isoladas são *Aspergillus flavus* Link; *Aspergillus nomius* Kurtzman; *Aspergillus parasiticus* Speare; *Aspergillus niger* Tiegh; *Aspergillus tamaritii* Kita; *Aspergillus pulverulentus* (McAlpine) Thom; *Aspergillus flavo-furcatus* Bat. e H. Maia, *Penicillium glabrum* (Wehmer) Westling; *Penicillium citrinum* Thom; *Rhizopus spp.* e *Fusarium oxysporum* Schltdl. (FREIRE et al., 2000; BAYMAN et al., 2000; OLSEN et al., 2008; GONÇALVES et al., 2012).

Baquião et al. (2012) relataram alta frequência do fungo *A. flavus* toxigênicos no solo onde são coletadas castanhas-do-brasil na Amazônia, assim como a presença destes nos frutos e casca. Costa et al. (2009a) analisando a micobiota da castanha-do-brasil com casca e a amêndoa, verificaram uma maior frequência de *A. flavus*, *A. niger* e *A. tamaritii*, *Chaetomium brasiliense* Bat. e Pontual e *Cladosporium sphaerospermum* Penz em ambas formas, e nas castanhas com casca verificou-se também uma maior predominância de *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn, *Phialophora spp.* e *P. glabrum*.

Pacheco et al. (2010) estudando a micobiota em amêndoas da castanha-do-brasil observou uma maior ocorrência dos gêneros *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.* e *Fusarium spp.* considerando-os nativos da micoflora da castanha-do-brasil.

Em um estudo realizado em três marcas de castanha-do-brasil comercializadas no estado do Acre, Álvares et al., (2011) encontraram numa amostra, fungos filamentosos, entre eles *A. flavus* e *A. parasiticus*. Resultado similar foi relatado por Leite (2008), que verificou a presença de *A. flavus* e *A. parasiticus*, bem como outros fungos, em amostras provenientes da floresta da seleção por amontoa, como também durante a etapa de armazenamento comunitário.

2.4 Gênero *Aspergillus spp.*

Aspergillus foi descrito pela primeira vez em de 1729, por Pier Antonio Micheli (MACKENZIE, 1988). O gênero pertence a um dos grupos de fungos mais difundidos na Terra, composto por cerca de 300 a 350 espécies, que estão distribuídas em quatro subgêneros (*Aspergillus*, *Fumigati*, *Circumdati*, e *Nidulantes*), e divididos em vinte seções (SAMSON et al., 2014; HOUBRAKEN et al., 2014; HUBKA et al., 2015). O gênero compreende fungos

saprófitas, encontrados na matéria orgânica a ser decomposta, principalmente em regiões de clima tropical e subtropical (KLICH, 2002a).

Muitos destes microrganismos possuem grande importância econômica e social sendo utilizados na fermentação de alimentos, produção de enzimas, bioprocessos industriais. Além disso algumas espécies são conhecidas por deteriorar alimentos, produzir micotoxinas, e ser patogênicas à plantas e animais (VARGA et al., 2004; da SILVA et al., 2015; SAMSON et al., 2014).

Fungos do gênero *Aspergillus* spp. são caracterizados por possuírem os conidióforos asseptados, com uma célula na base do conidióforo em formato de “T” ou “L”, denominada de célula pé. No ápice do conidióforo encontra-se a vesícula de onde surgem as fiáldes, e os conídios nas espécies monoseriadas. Nas espécies bisseriadas, entre a vesícula e as fiáldes existe uma estrutura denominada métula. (RAPER; FENNEL, 1965; KLICH; PITT, 1988a; KOZAKIEWICZ, 1989; GAMS et al., 1998).

A classificação e identificação de *Aspergillus* spp. tem sido baseada em caracteres fenotípicos, mas nas últimas décadas foi fortemente influenciado pela caracterização molecular e quimiotaxonômica (SAMSON et al., 2014).

Na identificação tradicional, são observadas as características que incluem, a cor das colônias em meios de cultura, diâmetro da colônia, cor do reverso, produção de exsudatos e pigmentos solúveis, presença de esclerócios e cleistotécio. Na micromorfologia são observados a forma de seriação, o tamanho da vesícula, a morfologia de conídios, morfologia do conidióforo, a presença de células “Hülle” e a morfologia dos esclerócios (KLICH, 2002b).

As espécies mais estudadas pertencem às seções *Circumdati*, *Flavi* e *Nigri*, pois algumas produzem micotoxinas (KLICH, 2002b; VARGA et al., 2004). O grande desafio da cadeia produtiva de castanha-do-brasil está em controlar a elevada taxa de contaminação por espécies de *Aspergillus* da seção *Flavi* e, conseqüentemente, controlar o alto potencial de produção de aflatoxinas (TANIWAKI et al., 2012).

2.5 *Aspergillus* spp. seção *Flavi*

A taxonomia da seção *Flavi* é complexa e está em constante evolução. A identificação das espécies pode ser realizada por meio da caracterização bioquímica e morfológica entretanto a sequências de genes β -tubulina e calmodulina têm sido cada vez mais

consideradas como sendo essencial para a identificação adequada da espécie (MASSI et al., 2014; GONÇALVES et al., 2012; RODRIGUES et al., 2009).

De acordo com a revisão feita por Varga et al. (2011), *Aspergillus* spp. seção *Flavi* contém 21 espécies, que podem ser agrupadas em sete clados: *A. flavus* (8 espécies); *A. tamarii* (4 espécies); *Aspergillus nomius* (3 espécies); *Petromyces alliaceus* (2 espécies); *Aspergillus togoensis* (2 espécies); *Aspergillus leporis* (1 espécie); e *Aspergillus avenaceus* (1 espécie) sendo posteriormente descrito uma nova espécie de *Aspergillus* seção *Flavi* que conforme o estudo realizado por Taniwaki et al. (2012), representa um novo clado filogenético.

A seção *Flavi* pode ainda ser subdividida em duas classes com base nos seus efeitos sobre alimentação e saúde humana em espécies produtoras, ou não-produtoras de aflatoxinas. Entre as espécies produtoras estão incluídos *A. flavus*, *A. parasiticus*, *Aspergillus nomius* Kurtzman, B. W. Horn e Hesselt, *Aspergillus pseudotamarii* Yoko Ito, S. W. Peterson, Wicklow e T. Goto, *Aspergillus bombycis* S. W. Peterson, Yoko Ito, B. W. Horn e T. Goto, *Aspergillus parvisclerotigenus* Saito e Tsurota, *Aspergillus toxicarius* Murakami, *Aspergillus arachidicola* Pildain, Frisvad e Samson, e *Aspergillus minisclerotigenes* Vaamonde, Frisvad e Samson, e as três primeiras espécies são as mais prejudiciais para alimentos (GONÇALVES et al., 2012).

Entre as espécies não produtoras de aflatoxinas estão o *Aspergillus sojae* Sakag. e K. Yamada ex Murak, *Aspergillus oryzae* (Ahlb.) Cohn, (consideradas importantes pois, são utilizadas na preparação de alimentos fermentados), *Aspergillus tamarii* Kita e *Aspergillus caelatus* B.W. Horn. (MIDORIKAWA, 2014). A identificação da Seção *Flavi* é realizada por meio da caracterização bioquímica e morfológica (GONÇALVES et al., 2012; RODRIGUES et al., 2009). *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* são relatadas como espécies recorrentes afetando as amêndoas de castanha-do-brasil (REIS et al., 2014).

A ornamentação dos conídios é considerada um dos caracteres morfológico para a separação de *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* (KOZAKIEWICZ, 1989; KLICH, 2002b). Os conídios de *A. flavus* têm paredes relativamente delgadas, lisas a moderadamente rugosas e asua forma pode variar esférica a elíptica. Os conídios de *A. parasiticus* são esféricos e visivelmente equinulados ou rugosos (RODRIGUES et al., 2009). A cabeça conidial de *A. nomius* é semelhante a de *A. flavus*, porém são predominantemente unisseriadas, enquanto que em *A. flavus* são predominantemente bisseriados. Os conídios de *A. nomius* são mais rugosos que os conídios de *A. flavus*, mas não como os conídios de *A. parasiticus* (KLICK; PITT, 1988).

De acordo com a Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos - ICMSF (1996), a temperatura para desenvolvimento do *A. flavus* varia de 10 a 43 °C, com temperatura ótima de 33 °C. Para a produção de aflatoxina a temperatura pode variar de 13 a 37 °C, tendo como ótima a faixa entre 16 a 31 °C.

A temperatura para o crescimento do *A. parasiticus* varia de 12 a 42 °C, tendo como temperatura mais favorável 32 °C. Para a produção da aflatoxina a temperatura varia entre 12 a 42 °C, sendo 25°C a temperatura considerada ótima ICMSF (1996).

Aspergillus nomius não se desenvolve em substratos com baixa atividade de água, necessitando de uma atividade de água mínima de 0,83, Aw e temperatura entre 25 °C a 30 °C, ou 0,81 Aw para temperatura de 37 °C (PITT; HOCKING, 2009).

2.6 Micotoxinas

Os estudos sobre as micotoxinas iniciaram-se na Inglaterra em 1960, devido à morte de aves em curto período de tempo, ocasionada pelo consumo de ração com torta de amendoim oriunda do Brasil, contaminada por aflatoxinas (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009; PINHEIRO, 2004).

As micotoxinas são substâncias químicas produzidas por fungos filamentosos em seus hospedeiros, que podem ocasionar de doenças até a morte de animais, incluindo o homem, quando ingeridas em níveis acima do tolerado pelo organismo (PINHEIRO, 2004). Existem mais de 300 substâncias identificadas como micotoxinas e o seu estudo é de extrema importância, pois são consideradas um problema de saúde pública, devido à gravidade das doenças causadas (PEREIRA; SANTOS, 2011).

As micotoxinas são produtos do metabolismo secundário de alguns fungos, termoestáveis, possuem baixo peso molecular, resistência a altas temperaturas, a tratamentos químicos e ação de enzimas do sistema digestivo (ASTOVIZA; SUAREZ, 2005). Devido a esta grande estabilidade química, mesmo após a remoção dos fungos durante a industrialização dos produtos, as toxinas podem permanecer nos alimentos (LOPES et al., 2005). Desta forma, a completa eliminação das micotoxinas presentes nos alimentos pode não ser possível, e sua presença deve ser reduzida ao nível mais baixo, e também ser realizado o monitoramento contínuo da presença destes contaminantes, com avaliação dos riscos que os mesmos podem trazer à população exposta (CODEX, 1995; ANDRADE, 2012).

A produção dos tipos e quantidades de micotoxinas, depende de varios fatores, dentre eles o substrato, uma vez que as micotoxinas são mais susceptíveis de serem encontradas em alimentos com alto teores de carboidratos, como em algumas sementes oleaginosas, por exemplo a castanha-do-brasil (IAMANAKA; OLIVEIRA; TANIWAKI, 2010). A umidade relativa do ar e atividade de água, podem influenciar a produção de micotoxinas, pois os fungos necessitam de uma umidade relativa do ar acima de 80% para o seu desenvolvimento. A produção de micotoxinas ocorre em alimentos com atividade de água numa faixa entre 0,60 a 0,90 Aw (TANIWAKI; IAMANAKA; SILVA, 2011; CALDERARI, 2011).

Nos alimentos, a água pode ser encontrada na forma de molécula livre ou ligada ao substrato, e a atividade de água é uma medida que permite avaliar a disponibilidade de água livre, suscetível as reações físicas, químicas e biológicas (SCOTT, 1957). Desta forma, a atividade de água é um dos fatores que interferem na estabilidade dos alimentos e, o seu conhecimento permite estabelecer tanto a vida de prateleira quanto o potencial de deterioração dos mesmos por microrganismos. Sua medida é feita numa escala de 0 a 1 (PITT; HOCKING, 2009). De acordo com Labuza (1980), um alimento será estável em relação à deterioração por microrganismos quando a atividade de água (Aw) for inferior a 0,60.

Outro fator que pode interferir na produção de micotoxinas é a temperatura, encontrando-se a temperatura ótima no intervalo compreendido entre a temperatura máxima, e mínima do crescimento do fungo. Por fim, a concentração de oxigênio interfere para o surgimento de micotoxinas, já que alguns fungos conseguem desenvolver em concentrações de oxigênio de até 0,2%, sendo sensível a altos níveis de dióxido de carbono e nitrogênio (TANIWAKI; IAMANAKA; SILVA, 2011; CALDERARI, 2011).

As micotoxinas são produzidas principalmente por cinco gêneros de fungos: *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Alternaria* spp. e *Claviceps* spp. (XAVIER, 2007). Em 1993, a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC), identificou seis micotoxinas consideradas de maior risco à saúde humana e animal classificando-as da seguinte forma:

Classificação	Micotoxinas
Carcinógenos do grupo 1	Aflatoxina
Carcinógenos do grupo 2B	Fumonisina Ocratoxina
Carcinógenos do grupo 3	Tricoteceno Zearalenona Patulina

Figura 1 - Classificação das principais micotoxinas. Fonte: IARC, 2002.

A gravidade e os sintomas da micotoxicose dependem do tipo e da toxicidade da micotoxina, da quantidade, da duração e via de exposição, bem como, do sexo, da idade, do estado nutricional e da saúde do indivíduo exposto (BANDO et al., 2007).

Os estudos sobre micotoxinas em castanha-do-brasil incluem, principalmente as aflatoxinas, devido ao seu potencial carcinogênico. A contaminação dos alimentos pode acontecer no campo, antes ou após a colheita, durante o transporte e o armazenamento do produto (CALDAS; SILVA; OLIVEIRA, 2002). Deste modo o conhecimento da micobiota associada a amêndoa das castanha-do-brasil pode ajudar a prevenir os riscos de contaminação por micotoxinas.

2.7 Aflatoxinas

Os primeiros relatos a respeito de problemas toxicológicos com a castanha-do-brasil datam da década de 60, quando foi descrito a “podridão da castanha” causada pelo fungo do gênero *Aspergillus* spp. (ALMEIDA, 1963). Depois disso, a castanha-do-brasil começou então a sofrer medidas restritivas dos países importadores.

As quatro principais micotoxinas produzidas naturalmente são conhecidas como aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, com “B” e “G” referindo-se às cores azul e verde fluorescentes quando irradiadas por luz ultravioleta (PITT; HOCKING, 2009). Entre as espécies de fungos produtores de aflatoxinas nas amêndoas brasileiras estão o *A. flavus*, que produz as aflatoxinas B1 (AFB1) e B2 (AFB2), *A. parasiticus* e *A. nomius* que também sintetizam essas aflatoxinas, além das G1 (AFG1) e G2 (AFG2).

Há relatos da produção de aflatoxinas por *Aspergillus pseudotamarii* Yoko Ito, S.W. Peterson, Wicklow e T. Goto, *Aspergillus toxicarius* Murak, *Aspergillus parvisclerotigenus* (Mich. Saito e Tsuruta) Frisvad e Samson, *Aspergillus bombycis* S.W. Peterson, Yoko Ito, B.W. Horn e T. Goto, *Aspergillus rambellii* Frisvad e Samson, *Emericella venezuelensis* Frisvad e Samson, *Aspergillus ochraceus* G. Wilh., *Emericella astellata* (Fennell e Raper) Y. Horie, *Aspergillus arachidicola* Pildain, Frisvad e Samson, *Aspergillus minisclerotigenes* Vaamonde, Frisvad e Samson, *Aspergillus oryzae* (Ahlb.) Cohn., *Aspergillus parvisclerotigenus* (Mich. Saito e Tsuruta) Frisvad e Samson (ITO et al., 2001; FRISVAD et al., 2005; RODRIGUES, 2009). Outra forma da aflatoxina é a M1 (AFM1), um produto de biotransformação do hidroxilado, encontrado no leite de animais e mulheres lactantes que consumiram produtos contaminados com aflatoxina B1 (KWIATKOWSKI; ALVES, 2007).

A ingestão de alimentos contendo aflatoxinas podem levar a quadro de aflatoxicose aguda podendo causar morte iniciando os primeiros sintomas após seis horas da ingestão da micotoxina com severa depressão, presença de sangue nas fezes, tremores musculares, hipertermia. A aflatoxicose crônica desencadeia alterações patológicas mais prolongadas, como o câncer e imunossupressão. A aflatoxicose aguda se manifesta como hepatite aguda, pois o principal órgão afetado é o fígado (MURRAY et al., 2006).

Calderari et al. (2013), analisando amostras de castanha-do-brasil oriundas da Floresta Amazônica, em diferentes fases da cadeia produtiva até a sua comercialização em supermercados de São Paulo, evidenciaram que o *A. nomius* foi a espécie mais comum encontrada nas amostras, com nível de ocorrência de 30%, seguido por *A. flavus* com 29%.

Todos os isolados de *A. nomius* produziram aflatoxinas B1 e G1, e 46% dos *A. flavus* produziram aflatoxinas B1 e B2. Um número reduzido de outras espécies com potencial para produzir aflatoxinas também foram isolados, estando entre estes o *A. arachidicola* e *A. bombycis* produtores das aflatoxinas B e G, e o *A. pseudotamarii*, responsável por sintetizar a aflatoxina B1. A contaminação da castanha-do-brasil por aflatoxinas tem afetado as exportações brasileiras. E neste sentido, vêm sendo desenvolvidos estudos sobre a natureza da contaminação, com a finalidade de resolver o problema, e melhorar a qualidade da castanha brasileira (MAPA, 2002; PACHECO, 2003; ARRUS et al., 2005b).

Em seu estudo, Pacheco et al. (2010) relata que a qualidade microbiológica da castanha-do brasil, atendendo os níveis tolerados de contaminação por aflatoxinas, poderia evitar as barreiras comerciais. Freitas-Silva e Venâncio (2011) salientam que é um desafio produzir castanhas-do-brasil livres de micotoxinas, em especial por possuir a cadeia produtiva com elevado atraso tecnológico, o que poderia ser contornado adotando boas práticas de manejo; garantindo assim a qualidade e segurança do produto para os consumidores, que buscam além das características nutritivas, propriedades funcionais que são atribuídas a castanha-do-brasil.

2.8 Legislação sobre os níveis toleráveis de aflatoxinas

Devido aos riscos à saúde relacionados com a presença de micotoxinas em alimentos, bem como os prejuízos causados a economia por este tipo de contaminação, diversos países estabeleceram legislações baseadas em aspectos científicos, hábitos alimentares, clima e

viabilidade para realização de análises, estabelecendo os níveis máximos de contaminação por micotoxinas, com a finalidade de minimizar seus efeitos negativos (XAVIER, 2007).

Os Estados Unidos foi um dos primeiros países que estabeleceu níveis máximos para aflatoxinas, com o nível de $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$ para aflatoxinas totais, em alimentos. A União Europeia (UE) até 2002 adotava os níveis toleráveis de $2 \mu\text{g.kg}^{-1}$ para a aflatoxina B1 e $4 \mu\text{g.kg}^{-1}$ para as aflatoxinas totais. Em 2010, por meio da diretiva nº165/2010 da Comissão Europeia, a UE passou a utilizar níveis menos restritivos para as importações de castanha-do-brasil, com valores de $8 \mu\text{g.kg}^{-1}$ para a aflatoxina B1, e $15 \mu\text{g.kg}^{-1}$ para aflatoxinas totais em amêndoas de castanha-do-brasil com casca. Para amêndoas destinadas ao consumo direto, o limite tolerável é de $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de aflatoxinas totais, e $5 \mu\text{g.kg}^{-1}$ para a aflatoxina B1 (UE, 2010). No entanto, até a União Europeia adotar esses valores que são mais alinhados com a atual legislação brasileira, as exportações de castanha-do-brasil sofreram diversas variações, chegando a alguns momentos a prejudicar exportações do produto no país (AGUIAR, 2014).

No Brasil, os limites máximos para aflatoxinas em alimentos destinados ao consumo humano foram inicialmente regulados em 1976, após o trabalho da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos, que definiu os limites para o somatório de aflatoxinas B1 e G1 de $30 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (ANDRADE, 2012).

Atualmente a resolução nº 07 de 18 de fevereiro de 2011, da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, determina que os alimentos comercializados no Brasil devem respeitar um limite máximo para a presença de aflatoxinas (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2+AFM1), ocratoxinas, deoxinivalenol, fumonisinas (FB1+FB2), patulina e zearalenona (BRASIL, 2011).

Para a castanha-do-brasil sem casca, ficou estabelecido o limite máximo tolerado para o somatório das aflatoxinas AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 de $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$. A castanha com casca, deverá ter no máximo $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Para amêndoas que passarão por processamento, o limite máximo tolerado de aflatoxinas de $15 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (BRASIL, 2011), tendo os comerciantes até 1º de janeiro de 2017 para se adequarem as estas normas (BRASIL, 2013).

Devido à importância da exposição humana às aflatoxinas para a saúde pública, o monitoramento da qualidade das amêndoas e a adoção de boas práticas de manejo tornam-se importantes para que o produtor ofereça castanhas de melhor qualidade e obtenha maior rentabilidade pelo produto. A castanha-do-brasil por se tratar de um produto sem padrões de mercado bem definidos, suas variações de preço são imprevisíveis, passando a qualidade a exercer aspecto determinante nas negociações (WADT et al., 2005).

OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi estudar a microbiota associada à castanha-do-brasil e verificar a influência do tempo de exposição, do ouriço ao solo após a queda, em condições naturais de campo e controladas de temperatura e umidade, sobre a contaminação das amêndoas por micotoxinas.

Objetivos Específicos

- Isolar e identificar os fungos presentes nas amêndoas de castanha-do-brasil;
- Determinar a umidade e a atividade de água das amêndoas de castanha-do-brasil;
- Identificar o potencial toxígeno dos isolados do gênero *Aspergillus* spp. Seção *Flavi*.
- Verificar a presença de aflatoxinas nas amostras de castanhas-do-brasil e quantificá-las.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

Os experimentos de campo foram conduzidos no Campo Experimental Confiança da Embrapa Roraima, localizado no município do Cantá/RR, onde há um Sistema Agroflorestal (SAF) instalado há 20 anos, contendo espécies de castanha-do-brasil, cupiúba (*Goupia glabra*) Aubl., cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*)(Willd. ex Sprengel) Schumann, café (*Coffea canéfora*) Pierre ex A. Froehner, saman (*Samanea saman*)(Jacq.)Merr., abiu (*Micropholis venulosa*)(Mart. e Eichler) Pierre e andiroba (*Carapa guianensis*) Aubl. A região apresenta vegetação de floresta, clima do tipo Ami (Köppen) e precipitação variando entre 1.363 a 1.393 mm ano⁻¹, com período chuvoso concentrado entre os meses de maio a julho (FERREIRA; TONINI, 2009). 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, 1999).

3.2 Coletas das amostras para efetuar o teste de sanidade

O SAF instalado no Campo Experimental Confiança possui seis blocos, contendo em cada bloco aproximadamente de 10 a 12 plantas de castanha-do-brasil. No período de julho a novembro de 2014, foi realizado o monitoramento da queda dos ouriços em cada bloco. Antes do monitoramento da queda dos ouriços em campo, para marcação dos mesmos, todos os ouriços que estavam presentes no solo foram removidos da área. Desta forma, foi possível manter um controle da quantidade de ouriços expostos às condições de campo, em períodos variando de 1 a 95 dias após a queda. Os ouriços foram marcados com tinta (esmalte sintético) nas cores amarela, vermelha, azul, verde, branca e rosa, de forma que cada cor representasse um período de exposição do ouriço sobre o solo após a queda, sendo eles respectivamente de 1, 15, 35, 55, 75 e 95 dias, separados por intervalos de até 20 dias, para a marcação do período seguinte. No local onde cada ouriço caiu, foi fixada uma etiqueta plástica contendo a data da queda, para definir a data correta de retirada de cada ouriço da área, controlando o período máximo permitido que o ouriço poderia ficar exposto às condições naturais do campo em contato com o solo. Decorrido o período de exposição dos ouriços no campo, em contato com o solo, estes foram coletados e transportados à sede da Embrapa Roraima, no município de Boa Vista, RR, onde foram abertos com auxílio de uma serra elétrica circular (Makita®), para

retirada das castanhas. As castanhas foram descascadas com auxílio de uma faca, para retirada das amêndoas e encaminhadas ao Laboratório de Fitopatologia da empresa supracitada para análise das amostras.

3.2.1 Teste de sanidade

As amêndoas provenientes dos ouriços expostos à diferentes períodos sobre o solo do SAF após a queda, foram utilizadas no teste de sanidade. Foi estabelecido que cada período representasse um tratamento, definidos da seguinte forma: T1= ouriços com 1 dia após a queda, T2= ouriços com 15 dias após a queda, T3= ouriços com 35 dias após a queda, T4= ouriços com 55 dias após a queda, T5= ouriços com 75 dias após a queda e T6= ouriços com 95 dias após a queda.

Neste primeiro ensaio, para o isolamento de fungos presentes nas amêndoas de castanha-do-brasil, adotou-se o método de incubação em papel filtro “Blotter test”, conforme descrito por Brasil (2009) sem a prévia desinfestação das amêndoas. Foram utilizadas duas folhas de papel filtro como substrato, previamente esterilizadas e umedecidas com água destilada esterilizada. Foram distribuídas cinco amêndoas uniformemente, mantendo-as distanciadas aproximadamente cinco centímetros uma das outras, sobre o substrato de papel em caixas de acrílico do tipo “gerbox”, tamanho 11 x 11 x 3,5 cm, e mantidas sob luz branca em câmara tipo B.O.D., com fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias à temperatura de 27°C.

Após este período, com auxílio de estereomicroscópio Motic SMZ-168, foi analisada 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 a chave taxonômica de Pitt e Hocking (2009), para auxiliar na identificação dos fungos.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com seis tratamentos (períodos de exposição no solo) e 10 repetições, sendo cada repetição composta por um gerbox com cinco amêndoas. Os resultados foram expressos em porcentagem de amêndoas contaminadas, determinando os percentuais médios para cada gênero de fungo detectado nas amêndoas.

Os dados foram submetidos a teste de normalidade homogeneidade de variância. A falta de normalidade e homogeneidade levou a realização do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ao nível de 1% de significância, com os dados transformados a raiz quadrada de $(Y+0.5)$. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software InfoGen versão 2013.

3.3 Coleta de amostras para análise da qualidade sanitária de amêndoas de Castanha-do-brasil

O ensaio foi montado no SAF do Campo Experimental Confiança da Embrapa Roraima, para análise da qualidade sanitária das amêndoas. A marcação dos ouriços iniciou-se nos meses de abril e maio, período de maior precipitação pluviométrica e consequentemente maior queda dos ouriços, estendendo-se a coleta até o mês de novembro 2015.

Antes do monitoramento para marcação dos ouriços no campo, todos os ouriços presentes no solo foram removidos da área, possibilitando assim, ter um controle dos ouriços expostos às condições de campo durante a execução do trabalho. Os ouriços foram marcados com quatro cores de tinta diferentes (branco, amarelo, azul e vermelho), cada uma representando o período de tempo estabelecido para o ouriço ficar exposto às condições naturais do campo em contato com o solo (1, 30, 60 e 90 dias após a queda). Cada período de exposição do ouriço representou um tratamento. Estes períodos diferiram do primeiro ensaio, devido uma adequação da forma de coleta que possibilitou obter cinco ouriços de cada bloco em cada tratamento.

Os ouriços recém caídos (com 1 dia) também foram coletados e armazenados pelos mesmos períodos em sacos de ráfia, em uma sala com ambiente climatizado sob condições controladas (ACC) de temperatura e umidade (32°C e 72% de umidade) na sede da Embrapa Roraima.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados com 4 repetições, dispostos em esquema fatorial 2 x 4, sendo o fator A os dois locais de exposição dos ouriços (campo e ambiente controlado) e o fator B os quatro períodos de exposição. Após o período de exposição dos ouriços no campo e no ambiente controlado, estes foram abertos, conforme descrito anteriormente, para retirada das amêndoas, e foram enviadas para o Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Roraima, para processamento das amostras.

3.3.1 Teor de umidade

Após serem descascadas com auxílio de uma faca, aproximadamente 5 g das amêndoas de cada repetição e tratamento, foram pesados em uma balança de precisão. Posteriormente, as amêndoas foram aquecidas em estufa com circulação forçada de ar a 105 °C durante 3 horas e resfriadas em dessecador até a temperatura ambiente. A operação de pesagem foi repetida, seguido do aquecimento e resfriamento até a amostra atingir peso constante. O teor de umidade foi calculado conforme a fórmula abaixo, com os resultados expressos em porcentagens.

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

Onde:

P = peso inicial do recipiente, mais o peso da semente úmida;

p = peso inicial do recipiente, mais o peso da semente seca;

t = peso do recipiente.

3.3.2 Atividade de água (Aw)

A atividade de água (Aw) conforme a metodologia proposta por Damodaram; Parkin e Fenema (2010), foi obtida por meio da relação da atividade de água com a umidade relativa de equilíbrio do ar (U.R.E), onde $Aw = \% \text{ U.R.E.} / 100$. Para tanto aproximadamente 5 g das amêndoas de cada bloco, em cada tratamento, foram colocadas em uma câmara fechada durante o tempo suficiente para atingir o equilíbrio (peso constante), medindo-se posteriormente a umidade relativa dentro desta câmara com um higrômetro.

3.3.3 Plaqueamento direto

Foram analisadas 40 amêndoas de cada tratamento, que passaram inicialmente por um processo de desinfestação superficial utilizando uma solução de 0,4 % de hipoclorito de sódio por dois minutos, e enxaguadas com água deionizada estéril. Posteriormente as amêndoas foram cortadas ao meio, e uma das metades foi plaqueada (cinco pedaços de amêndoas colocados em cada placa, totalizando duas placas analisadas de cada bloco nos tratamentos)

contendo o meio de cultura Ágar Dicloran Glicerol 18% (DG-18 ACUMEDIA 7592A anexo I) com cloranfenicol. As placas foram incubadas a 25°C por cinco dias e os resultados apresentados em porcentagem de amêndoas infectadas por fungos conforme Taniwaki; Iamanaka; Silva (2011). Os dados foram submetidos a teste de normalidade homogeneidade de variância. A falta de normalidade e homogeneidade levou a realização do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ao nível de 5% de significância. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software InfoGen versão 2013.

3.3.4 Isolamento e Identificação dos fungos

Após a incubação, os fungos que se desenvolveram no meio DG18, foram isolados em placas de Petri contendo BDA (anexo II) e incubados na câmara B.O.D. a 25°C por sete dias. Posteriormente, foram analisadas as suas características macro, microscópicas e identificados de acordo com Pitt e Hocking (2009).

Os fungos do gênero *Aspergillus* spp. foram colocados no meio Czapek Extrato de Levedura (CYA, anexo III), incubados a 25°C por sete dias, para identificação de acordo com a chave taxonômica proposta por Pitt e Hocking (2009).

Os fungos da seção *Flavi* foram cultivados no meio ágar AFPA (OXOID CM731, anexo IV), incubados na B.O.D. a 25°C por 48 horas, prosseguindo posteriormente para a confirmação da identidade como *A. flavus* ou *A. parasiticus*, que foi definida pela coloração característica amarelo-laranja produzida no reverso da colônia, no meio de cultura AFPA.

3.3.5 Potencial toxígeno dos *Aspergillus* spp.

O potencial toxigênico dos *Aspergillus* spp., foi avaliado de acordo com a metodologia descrita por Lin e Dianese (1976). Os isolados foram semeados em meio de cultura Ágar Coco (anexo V), e incubados no B.O.D. por seis dias, a 25°C. Decorrido o tempo de incubação foi realizada a leitura das placas, observando-se através de um cromatovisor de luz ultravioleta de 366 nm o verso e reverso da colônia a cada 24h, por seis dias, para verificar a presença de um halo fluorescente azulado, produzido pelo fungo no meio de cultura, o qual indica a presença de micotoxina. A fluorescência, característica da micotoxina, foi expressa com o símbolo (+) para positividade e (-) para negatividade conforme descrito por Cavalet (2012).

3.3.6 Amostras para análise de aflatoxinas

Foram coletados aproximadamente 0,5 kg de amêndoas de cada tratamento, sendo tais amostras enviadas ao Laboratório de Micotoxinas e Micologia da Embrapa Agroindústria de Alimentos – RJ, para análise da presença das aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂.

3.3.7 Análises das aflatoxinas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Preparo da Amostra

As amêndoas de castanha-do-brasil descascadas, foram trituradas no processador de alimentos ou Moinho Geiger® com igual massa de água ultrapura, formando uma pasta.

Extração das Aflatoxinas

Para extração das aflatoxinas foram pesados 100 g da pasta, adicionados 5g de cloreto de sódio, 200 mL de metanol (grau HPLC) e 100 mL de hexano (grau HPLC). A mistura foi agitada por 3 minutos a 800 rpm no homogeneizador/dispersor de alta rotação Omni Mixer®, e posteriormente filtrado em papel de filtro rápido, seguido de filtração em membrana de fibra de vidro utilizando sistema de vácuo.

Purificação da Aflatoxina

Foram transferidos 10 mL do filtrado para erlenmeyer e adicionado 60 mL de tampão fosfato (ANEXO VI). A solução foi passada na coluna de imunoafinidade com fluxo de 2-3 mL/min. Em seguida a coluna foi lavada com 15 mL de água deionizada e secada com ar. Foi adicionado 2 mL de metanol na coluna e, após 2 minutos, eluídas as aflatoxinas que foram recolhidas em frasco âmbar, e evaporado o extrato sob nitrogênio, em banho-maria a 40°C.

Detecção e Quantificação da Aflatoxina

Sob a cabine de fluxo laminar, o resíduo seco foi dissolvido em 3 mL de metanol: água (2:3), agitado no agitador tipo vórtex por 30 s e transferido para o vial.

Preparo do padrão

Foi preparado uma solução de trabalho contendo as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂. A partir desta solução de trabalho, obteve-se uma curva padrão de oito pontos e os procedimentos usados nos itens anteriores foram repetidos para cada amostra.

Condições Cromatográficas

Para a detecção das aflatoxinas foi utilizada Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, com detector de fluorescência com excitação de 360 nm e emissão de 440 nm, sistema de derivatização Kobra-cell® para derivatização pós-coluna das aflatoxinas B₁ e G₁, ligado a uma corrente de 100 µA. Coluna XBridge™ C18, 5 µm, 4,6x250 mm foram empregadas para separação dos compostos. A fase móvel utilizada foi composta por Acetonitrila: Metanol: Água: KBr: HNO₃ 4M (ANEXO VII) nas proporções (15:20:65:198 mg:585 µL), em um fluxo de 0,8mL/min., com volume de injeção de 40 µL.

Cálculos para derivatização pós-coluna (com Kobra-cell®)

Ordem de eluição: G₂, G₁, B₂, B₁

$$\text{Quantidade de aflatoxinas } (\mu\text{g/kg}) = \frac{\text{Ca} \times \text{V}_1 \times \text{V}_3}{\text{m} \times \text{V}_2}$$

Ca = concentração da amostra obtida através da curva de calibração (µg/mL).

V₁ = volume de extração da amostra (250 mL).

V₂ = volume do filtrado adicionado à coluna de imunoafinidade (10 mL).

V₃ = volume de retomada do extrato purificado (3 mL).

m = massa da amostra em kg.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Teste de sanidade

Das 300 amêndoas avaliadas neste primeiro ensaio, destas 91 % apresentou contaminação e em muitas delas apresentavam mais de um fungo. Do total de fungos de todos os tratamentos foram identificados 554 isolados, distribuídos nos gêneros *Aspergillus* spp. (87,55 %), *Rhizopus* spp. (3,07 %), *Penicillium* spp. (6,86%), *Curvularia* spp. (1,62%), *Paecilomyces* spp. (0,36%), *Trichoderma* spp. (0,18%), *Acremonium* spp. (0,18%) e *Verticillium* spp. (0,18%) do total de fungos isolados em todos tratamentos (Figura 2).

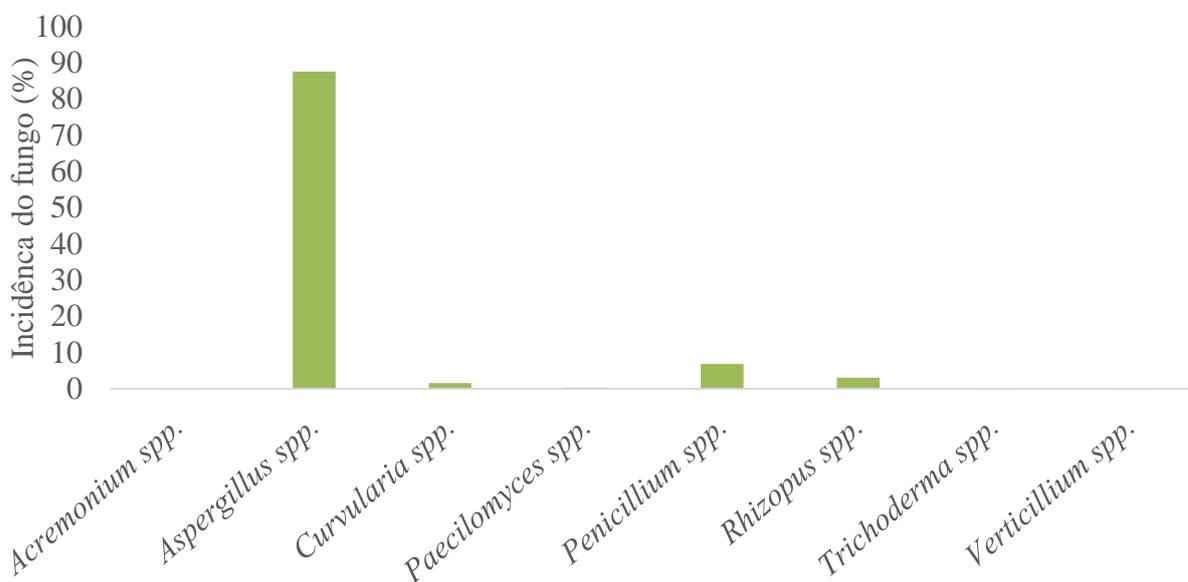


Figura 2 - Percentual médio dos fungos identificados nos tratamentos T1 a T6 no teste de sanidade.

Estudando as amêndoas provenientes dos ouriços expostos aos diferentes períodos de exposição sobre o solo do SAF sendo eles de 1, 15, 35, 55, 75 e 95 dias, referentes aos tratamentos T1, T2, T3, T4, T5 e T6, observou-se que o gênero *Aspergillus* spp. foi o mais abundante, infectando 100 % das amêndoas dos tratamentos T2 (15 dias) a T6 (95 dias), e 48 % das amêndoas de T1 (1 dia)(Tabela 1).

Tabela 1- Percentual das amêndoas de castanhas-do-brasil infectadas por diversos fungos em diferentes períodos de exposição dos ouriços sobre o solo após a queda.

FUNGOS	Período de exposição do ouriço sobre o solo após a queda (dias)					
	95	75	55	35	15	1
<i>Aspergillus</i> spp.	100	100	100	100	100	48
<i>Penicillium</i> spp.	2	4	0	0	70	0
<i>Rhizopus</i> spp.	4	14	8	8	0	0
<i>Curvularia</i> spp.	0	0	0	0	18	0
<i>Acremonium</i> spp.	0	2	0	0	0	0
<i>Verticillium</i> spp.	0	2	0	0	0	0
<i>Trichoderma</i> spp.	0	2	0	0	0	0
<i>Paecilomyces</i> spp.	4	0	0	0	0	0

* % número de amostras que continha uma espécie fúngica / total de amostras avaliadas.

Tal fato demonstra que ouriços que ficaram sobre o solo por períodos de 15 a 95 dias após a queda, apresentam o dobro da incidência de fungos do gênero *Aspergillus* spp. em relação aos ouriços que ficaram exposto por até um dia.

O segundo gênero mais frequente nas amostras foi o *Penicillium* spp., contaminando 70 % das amêndoas no tratamento T2 (15 dias), 2 % das amêndoas em T6 (95 dias), e 4 % em T5 (75 dias).

Os espécimes associados a castanha-do-brasil observados neste trabalho, foram relatados em outros estudos por afetar as amêndoas, destacando-se os gêneros *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. por apresentar um elevado percentual de infecção.

Baquião et al. (2012) analisando a micobiota e micotoxinas em amostras de de castanha-do-brasil coletadas no campo, verificaram predominancia dos gêneros fúngicos *Aspergillus* spp. com total de $1,5 \times 10^7$ UFC.g⁻¹ e de *Penicillium* spp. e $6,6 \times 10^6$ UFC.g⁻¹ contaminando as amêndoas.

Pacheco et al. (2010) avaliou a segurança microbiológica de 120 amostras das castanha-do-brasil de diferentes etapas da cadeia produtiva, e igualmente observou maior predominância dos gêneros *Aspergillus* spp. (27,5 %), seguido por *Penicillium* spp. (21,5 %) considerando-os nativos da micobiota da castanha-do-brasil.

Freire, Kozakiewicz e Paterson (2000) assim como Costa et al.(2009 a) relataram que além da elevada incidência de *A. flavus* e o notório percentual de infecção por *Penicillium* spp. nas amêndoas, verificaram também os gêneros *Rhizopus* spp., *Curvularia* spp., *Acremonium* spp., *Verticillium* spp., *Trichoderma* spp. e *Paecilomyces* spp., corroborando

com resultados obtidos neste estudo, e evidenciando que todos gêneros fúngicos observados, foram relatados infectando amêndoas de castanha-do-brasil.

Observando os períodos de exposição de 75 e 95 dias, verifica-se que os mesmos se destacaram por apresentar maior riqueza fúngica, com 6 e 4 gêneros diferentes, respectivamente conforme a Tabela 1. O maior tempo de exposição destes ouriços sobre o solo contribuiu para ação dos microrganismos resultando numa maior deterioração destas amêndoas.

Analisando as precipitações pluviométricas durante o período de exposição dos ouriços sobre o solo, constatou-se que a mesma variou de 1,8 mm a 5,5 mm diários, sendo que nos períodos de exposição de 15 e 95 dias, obteve-se maiores precipitações (5,5 e 4,4 mm), o que pode ter contribuído para a maior variedade de fungos colonizando estas amêndoas (Tabela 2).

Tabela 2 - Precipitação diária média durante os períodos de exposição dos ouriços no solo.

Tempo de exposição dos ouriços no solo (dias)	Precipitação pluviométrica média diária (mm)
95	4,4
75	3,5
55	3,7
35	4,6
15	5,5
1	1,8

Nos períodos de exposição dos ouriços por 35, 55, 75 não foi possível estabelecer uma ligação entre quantidade de gêneros fúngicos encontrados nas amêndoas com a precipitação, visto que foram observados dois gêneros nos dois primeiros períodos supracitados, e seis gêneros fúngicos nas amêndoas dos ouriços expostos por 75 dias, com as precipitações de 4,6, 3,7 e 3,5 mm.

Desta forma o maior tempo de exposição dos ouriços sobre o solo após a queda (para o período de 75 dias) pode ter contribuído de forma mais efetiva para a maior colonização fúngica das amêndoas, do que a precipitação observada neste período (3,5 mm), visto que foi uma das menores precipitações.

As amêndoas dos ouriços recém-caídos no solo foram as que apresentaram menor contaminação e também ficaram expostas a uma menor precipitação pluviométrica o que resultou no menor número de gêneros fúngicos colonizando estas amêndoas, restringindo-se ao *Aspergillus* spp..

Com relação a quantidade de fungos isolados nas amêndoas de cada tratamento, verificou-se que houve diferença significativa entre os tratamentos quando a infecção foi causada pelos gêneros *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., ao nível de 1% de significância, (Tabela 3, Apêndice A).

Tabela 3 – Teste de Kruskal-Wallis para os isolados de *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. identificados nas amêndoas de castanha-do-brasil, em cada período de exposição dos ouriços sobre o solo após a queda.

Período de exposição dos ouriços no solo	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.
95 dias	45,85a ^{*,**}	27,00b ^{*,**}
75 dias	45,25a ^{*,**}	27,20b ^{*,**}
55 dias	19,20b ^{*,**}	24,50b ^{*,**}
35 dias	18,00b ^{*,**}	24,50b ^{*,**}
15 dias	45,40a ^{*,**}	55,30a ^{*,**}
1 dia	9,30b ^{*,**}	24,50b ^{*,**}

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ao nível de 1% de significância. **Dados transformados a raiz quadrada de (Y+0.5).

Foram detectados 24 isolados de *Aspergillus* spp., infectando as amêndoas provenientes de ouriços que permaneceram por um dia exposto sobre o solo. Com o aumento do período de exposição do ouriço no solo (15, 75 e 95 dias), houve aumento para 120 isolados *Aspergillus* spp. colonizando as amêndoas. Quando a contaminação foi ocasionada por *Penicillium* spp., verificou-se maior deterioração das amêndoas dos ouriços expostos por 15 dias no solo, onde foram observados 35 isolados, em comparação ao restante dos tratamentos onde verificou-se a presença de 1 a 7 isolados.

Leite (2008) estudando a influência da aplicação de boas práticas extrativistas na incidência de fungos aflatoxigênicos da castanha-do-brasil, com amostras de castanha-do-brasil coletadas em três épocas (0 a 5, 15 a 20 e 60 dias) após queda dos frutos, observou que embora não tenha ocorrido diferença significativa para a quantificação de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, há maior quantidade dos mesmos aos 60 dias (19,44 UFC.g⁻¹), sugerindo assim que a intensificação da coleta influencia na redução da população desses fungos e corroborando com os resultados obtidos no presente trabalho.

Baquião (2012) avaliando a presença de fungos e aflatoxinas em amostras de castanhas-do-brasil expostas às condições de campo, objetivando estabelecer as vias de contaminação fúngica, observou maior quantidade de *Aspergillus flavus* (1,3 X 10⁹ UFC.g⁻¹) quando os ouriços ficaram expostos pelo período de 10 dias, em comparação aos períodos de

0 (fruto colhido da castanheira) e 5 dias, que apresentaram respectivamente $1,8 \times 10^8$ UFC.g⁻¹ e $3,9 \times 10^7$ UFC.g⁻¹, confirmando os resultados observados neste estudo.

No presente trabalho maior quantidade de *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Curvularia* spp. foram detectadas infectando as amêndoas dos ouriços expostos por 15 dias. Tal fato pode ser explicado devido ter ocorrido neste período a maior precipitação pluviométrica média, quando comparada aos valores das precipitações dos outros períodos de exposição dos ouriços sobre o solo, conforme a Tabela 2.

De acordo com o estudo de Arrus et al. (2005b), que analisou amostras de castanha-do-brasil coletadas diretamente da castanheira, a ausência de *A. flavus* em suas amostras foi atribuído ao não contato dos ouriços com o solo, e a medida que houve o contato dos ouriços com o solo e o aumento desse período de contato, ocorreu rápido aumento da predominância *A. flavus*, principalmente quando o solo continha espécies de *Aspergillus*, funcionando assim como reservatório primário do patógeno. Estes resultados corroboram com os resultados deste estudo, uma vez que a medida que houve aumento do período de exposição dos ouriços no solo (15 a 95 dias), manteve-se alto o nível de contaminação das amêndoas por *Aspergillus* spp., verificando-se menor percentual de infecção quando os ouriços ficaram expostos por um dia.

Embora Baquião et al., (2013) e Arrus et al., (2005b) tenham identificado o solo como a fonte primária da contaminação de amêndoas da castanha-do-brasil por fungos, a incidência de fungos aflatoxigênicos em amêndoas colhidas diretamente das árvores, foi relatada como elevada por Baquião et al., (2012). Estudando diversas espécies de abelhas que visitavam as flores da castanheira-do-brasil, Massi et al., (2015) conseguiram verificar a presença de *A. nomius* nestas abelhas; o que indica que possivelmente as abelhas contribuem para dispersões dos conídios de *Aspergillus* spp. que infectam tecidos prematuros ainda na inflorescência ou durante formação das sementes. Isso explica, o percentual de contaminação de 48 % das amêndoas por *Aspergillus* spp. dos ouriços expostos por apenas 1 dia no solo do presente trabalho.

4.2 Análise da qualidade sanitária das amêndoas

Do total de 320 amêndoas analisadas nos oito tratamentos (2 locais e 4 períodos de armazenamento), foram isolados e identificados 238 espécimes de fungos, distribuídos em 15 taxa, referente ao segundo ensaio.

Verificou-se que a *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid., apresentou maior número de espécimes isolados, representando 39,08 %, seguido do *Penicillium citrinum* e *Aspergillus flavus*, respectivamente com 21,43 % e 14,29 % do total de espécimes isolados. *Aspergillus nomius*, *Penicillium* spp., *Aspergillus ochraceus*, *Paecilomyces variotii* Bainier e *Penicillium glabrum* apresentaram respectivamente percentuais de 7,56 %; 6,3 %, 5,88 %; 1,68 % e 0,84 % dos fungos isolados. Verificou-se ainda que *Aspergillus niger*, *Aspergillus tamarii*, *Cladosporium* spp., *Paecilomyces lilacinus*, *Verticillium* spp., *Fusarium* spp. e *Neosartorya fisheri* apresentaram os menores percentuais de ocorrência com 0,42% (Figura 3).

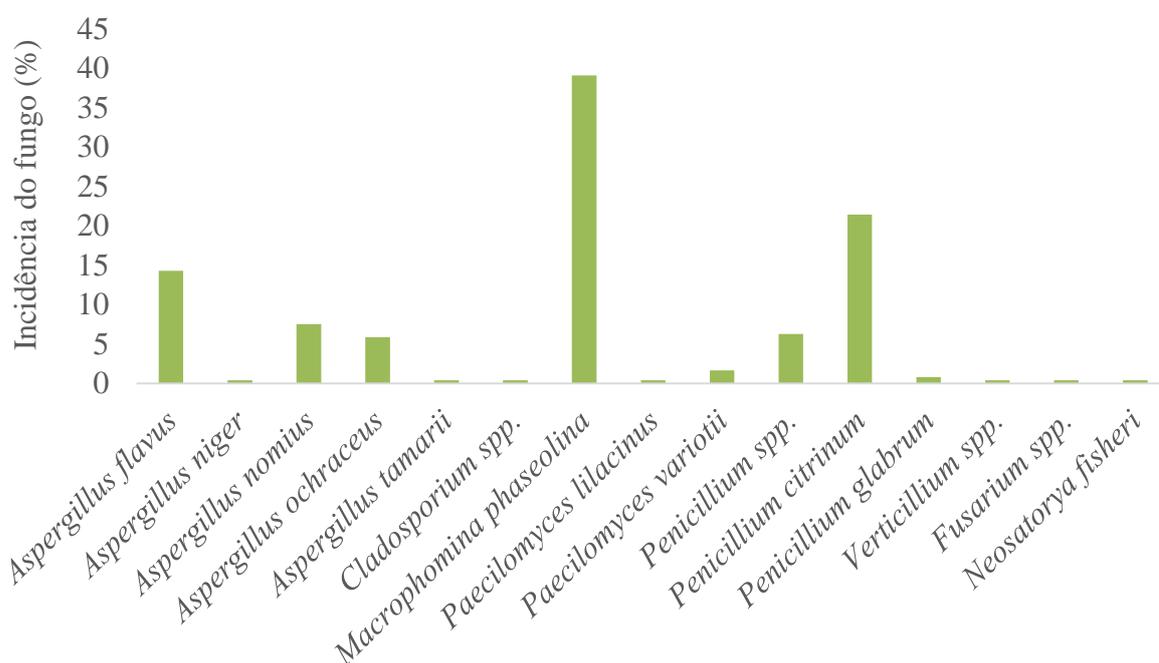


Figura 3 – Incidência de fungos isolados das amêndoas de castanhas-do-brasil em diferentes períodos de exposição do ouriço sobre o solo do SAF e armazenados em ambiente climatizado sob condições controladas (ACC) no teste de qualidade sanitária.

Realizando a análise sanitária das amêndoas dos ouriços armazenados nos dois locais SAF e ACC, e nos quatro períodos de armazenamento (1, 30, 60 e 90 dias) observou-se que no SAF pode estar ocorrendo exclusão competitiva entre os fungos. No primeiro contato do ouriço com o solo do SAF ocorreu maior riqueza de espécies fúngicas verificada nas amêndoas, que tendeu a decair, a medida que aumentou o tempo de exposição do ouriço no solo do SAF ou quando mudou-se o local de exposição do ouriço para o ACC.

Verificou-se ainda que os fungos mais frequentes foram *Macrophomina phaseolina*, *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp., observados nas amêndoas dos ouriços mantidos no SAF ou no ACC, e na maioria dos períodos de exposição de 1, 30, 60 e 90 dias (Tabela 4 e 5).

A exceção ocorreu com amêndoas dos ouriços expostos por um dia no ACC, onde foi observado somente *Macrophomina phaseolina*, nas amêndoas. A infecção causada pelos fungos nas amêndoas dos ouriços expostos por um dia no solo, é um indicativo que os mesmos podem estar infectando as amêndoas mesmo antes dos ouriços caírem sobre o solo.

Freire et al. (2000) indicaram a possibilidade da penetração e germinação dos esporos e da infecção acontecer durante inflorescência ou durante formação das sementes, sugerindo invasão de tecidos prematuros.

Tabela 4 – Incidência de fungos que infectaram as amêndoas de castanhas-do-brasil quando os ouriços foram expostos a diferentes períodos sobre o solo do SAF.

Fungos	Períodos de exposição do ouriço sobre o SAF			
	1 dia	30 dias	60 dias	90 dias
<i>Aspergillus flavus</i>	8	6	6	7
<i>Aspergillus niger</i>	0	1	0	0
<i>Aspergillus nomius</i>	4	6	0	8
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0	0	9	0
<i>Aspergillus tamaritii</i>	0	1	0	0
<i>Cladosporium</i> spp.	0	1	0	0
<i>Macrophomina phaseolina</i>	19	4	12	14
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	1	0	0	0
<i>Paecilomyces variotii</i>	4	0	0	0
<i>Penicillium</i> spp.	4	11	0	0
<i>Penicillium citrinum</i>	0	0	23	18
<i>Penicillium glabrum</i>	1	1	0	0
<i>Verticillium</i> spp.	1	0	0	0
<i>Fusarium</i> spp.	1	0	0	0
<i>Neosatorya fisheri</i>	0	0	0	1

A menor riqueza de fungos observada no ACC (Tabela 5) pode estar relacionada às condições daquele ambiente, que restringiu o desenvolvimento de uma maior variedade de fungos devido a umidade relativa média durante o experimento ter sido de 72 %, valor próximo do mínimo citado por Scussel (2002) para o desenvolvimento dos fungos que é de 70 %. Scussel (2002) relata ainda que a umidade relativa ótima para a produção de aflatoxinas e crescimento dos fungos encontra-se dentro da faixa de 80- 85 %.

Tabela 5 – Incidência de fungos que infectaram as amêndoas de castanhas-do-brasil nos diferentes períodos de armazenamento, em ambiente sob condições controladas.

Fungos	Períodos de exposição no ambiente controlado			
	1 dia	30 dias	60 dias	90 dias
<i>Aspergillus flavus</i>	0	1	5	1
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0	1	1	3
<i>Macrophomina phaseolina</i>	11	12	13	8
<i>Penicillium citrinum</i>	0	2	7	1

Os fungos *Aspergillus niger*, *Aspergillus tamarii*, *Cladosporium* spp., *Paecilomyces lilacinus*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium glabrum*, *Verticillium* spp., *Fusarium* spp. e *Neosartorya fisheri* apresentaram as menores ocorrências, observados nas amêndoas dos ouriços expostos no solo do SAF, restringindo-se aos tratamentos de 1, 30 e 90 dias de exposição (Tabela 4).

Com relação aos percentuais de infecção das amêndoas, os ouriços expostos ao solo do SAF por 1 dia tiveram as amêndoas afetadas em maior porcentagem por *Macrophomina phaseolina*. Durante os períodos exposição de 30 a 90 dias as amêndoas foram contaminadas em maiores percentuais por *Penicillium* spp. e *Penicillium citrinum*, conforme a Tabela 6. Em todos os períodos de exposição dos ouriços no ACC, as amêndoas foram contaminadas em maiores percentuais por *Macrophomina phaseolina*.

Tabela 6 - Percentual das amêndoas de castanhas-do-brasil infectadas por diversos fungos em diferentes períodos de exposição do ouriço sobre o solo do SAF, e armazenados em ambiente sob condições controladas (ACC).

Fungos	SAF				ACC			
	Período de exposição do ouriço sobre o solo após a queda (dias)							
	1	30	60	90	1	30	60	90
<i>Aspergillus flavus</i>	20	15	15	17,5	0	2,5	12,5	2,5
<i>Aspergillus niger</i>	0	2,5	0	0	0	0	0	0
<i>Aspergillus nomius</i>	10	15	0	20	0	0	0	0
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0	0	22,5	0	0	2,5	2,5	7,5
<i>Aspergillus tamarii</i>	0	2,5	0	0	0	0	0	0
<i>Cladosporium</i> spp.	0	2,5	0	0	0	0	0	0
<i>Macrophomina phaseolina</i>	47,5	10	30	35	27,5	30	32,5	20
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	2,5	0	0	0	0	0	0	0
<i>Paecilomyces variotii</i>	10	0	0	0	0	0	0	0
<i>Penicillium</i> spp.	10	27,5	0	0	0	0	0	0
<i>Penicillium citrinum</i>	0	0	57,5	45	0	5	17,5	2,5
<i>Penicillium glabrum</i>	2,5	2,5	0	0	0	0	0	0
<i>Verticillium</i> spp.	2,5	0	0	0	0	0	0	0
<i>Fusarium</i> spp.	2,5	0	0	0	0	0	0	0
<i>Neosartorya fisheri</i>	0	0	0	2,5	0	0	0	0

Constatou-se que houve uma predominância da *Macrophomina phaseolina* observada em todos os tratamentos. Costa et al., (2009 a) estudando os fungos associados às amêndoas de castanha-do-brasil comercializadas em feiras de Fortaleza (CE), verificaram pela primeira vez este fungo afetando 1 % das amêndoas analisadas.

Almeida et al. (2001), num estudo sobre a podridão de carvão em soja, observaram que *Macrophomina phaseolina* é um fungo encontrado no solo, identificado tanto em solo de mata virgem, quanto em solos cultivados. Com difícil manejo, as práticas que melhoram as condições físicas do solo e o uso de cultivares com tolerância à seca e a temperaturas altas contribuem para níveis baixos da incidência do fungo.

A incidência de *Macrophomina phaseolina* nas amêndoas pode estar relacionada ao solo, que sob elevada temperatura, apresenta condições que favorecem a infecção por esse fungo, conforme relatado por Almeida et al., (2001).

Analisando a ocorrência dos fungos *Penicillium* spp., *Penicillium glabrum* e *Penicillium citrinum* em conjunto, assim como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nomius*, *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus tamarisii*, no período inicial de exposição dos ouriços sobre o solo (1 dia), estes apresentaram percentuais menores de infecção nas amêndoas, sendo verificado um aumento da incidência destes fungos, em períodos de exposição dos ouriços sobre o solo de 30 a 60 dias após queda.

Desta forma constata-se que há uma correspondência com as fases do crescimento microbiano. No primeiro momento os ouriços foram expostos por um dia no solo do SAF ou no ACC, apresentando comportamento similar a fase lag, em que estes microorganismos estão se adaptando ao substrato.

Em seguida os períodos de exposição de 30 e 60 dias ocorreu o crescimento exponencial sem fatores limitantes para o desenvolvimento das espécies de *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp.

Por fim observou-se a fase de estacionária ou declínio, onde houve uma redução da incidência dos fungos nas amêndoas provenientes de ouriços com 90 dias após a queda. Esta redução da incidência dos fungos pode ser consequência do déficit de nutrientes e/ou acúmulo de metabólitos, que podem reduzir progressivamente o crescimento fúngico (Tabela 7 e 8).

Quando os ouriços ficaram expostos por 90 dias sobre o solo no SAF e em ACC, foi verificado redução da quantidade de *Penicillium* spp. infectando as amêndoas. Nas amêndoas dos ouriços armazenados por 90 dias em ACC, houve decréscimo na incidência de *Aspergillus* spp.

Em relação aos *Aspergillus* spp. detectados em amêndoas provenientes dos ouriços expostos no SAF por 90 dias, observou-se que a quantidade de *Aspergillus* spp., foi igual a das amêndoas expostas por 60 dias no SAF, sugerindo que pode estar ocorrendo a fase estacionária ou de declínio destes fungos, onde o déficit dos nutrientes e o acúmulo de metabólitos podem reduzir progressivamente o crescimento fúngico.

Tabela 7 - Número de *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. contaminando amêndoas de castanha-do-brasil, provenientes de ouriços submetidos a diferentes períodos de exposição sobre o solo do SAF após a queda.

Fungos	Período de exposição no solo do SAF			
	1 dia	30 dias	60 dias	90 dias
* <i>Aspergillus</i> spp.	12	14	15	15
** <i>Penicillium</i> spp.	5	12	23	18

* *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nomius*, *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus tamarii*; ***Penicillium* spp., *Penicillium citrinum* e *Penicillium glabrum*.

Tabela 8 – Número de *Aspergillus* spp. e *Penicillium citrinum* que contaminaram as amêndoas de castanha-do-brasil provenientes de ouriços submetidos a diferentes períodos de exposição armazenados no ambiente com condições controladas.

Fungos	Períodos de exposição dos ouriços no ACC			
	1 dia	30 dias	60 dias	90 dias
* <i>Aspergillus</i> spp.	0	2	6	4
<i>Penicillium citrinum</i>	0	2	7	1

* *Aspergillus flavus* e *Aspergillus ochraceus*.

Reis et al., (2012) analisando a micobiota e micotoxinas em amostras de castanha-do-brasil de diferentes estados brasileiros, encontraram 16 e 4% de amêndoas contaminadas por *Penicillium* ssp. e *Aspergillus* spp., respectivamente. Tais percentuais de infecção são menores que os relatados no presente estudo.

Bayman et al., (2002) e Freire et al., (2000) sugerem que a contaminação ocasionada por *Aspergillus flavus* ocorre precocemente ainda em campo na fase de pré – coleta, caracterizando esta contaminação pela distribuição uniforme e homogênea do fungo nas amêndoas, levando à deterioração da amêndoa no interior de cascas, aparentemente sem indícios de injúrias.

Bayman et al., (2002) relatam ainda que a contaminação por uma espécie de *Aspergillus* torna os frutos mais suscetíveis a outros *Aspergillus* spp., e que poderia levar ao antagonismo por exclusão competitiva com *Penicillium* spp. e os outros fungos, o que pode ser uma explicação para a menor diversidade de fungos nas amêndoas dos tratamentos onde os ouriços permaneceram por um maior período em contato com o solo no SAF.

Os resultados do teste de Kruskal-Wallis indicam que *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nomius*, *Penicillium* spp. e *Paecilomyces variotii* apresentaram diferença significativa, ao nível de 5% de significância, para os locais de exposição (Tabela 9, Apêndice B).

Isto indica que o SAF possui as condições ambientais que favorecem o maior desenvolvimento destes fungos. Provavelmente, atendendo aos quesitos de temperatura, umidade relativa do ar, precipitação, microclima, o solo, o ar, pH, atividade de água e teor de umidade das amêndoas, além da presença de insetos que podem causar injúrias às castanhas bem como disseminar os esporos fúngicos. Tais fatores exercem papel importante no favorecimento do crescimento destes fungos nas amêndoas de castanha-do-brasil.

Tabela 9 – Médias dos fungos que infectaram as amêndoas de castanha-do-brasil nos dois locais de exposição dos ouriços, Sistema agroflorestal (SAF) e em ambiente sob condições controladas (ACC), utilizando o teste Kruskal-Wallis.

Local	Fungos			
	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus nomius</i>	<i>Penicillium spp.</i>	<i>Paecilomyces variotii</i>
SAF	1,69 a *	1,13 a *	0,94 a *	1 a*
ACC	0,44 b *	0 b *	0 b *	0 b*

*Médias com letras minúsculas diferentes nas colunas, diferem estatisticamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis, considerando ao nível de 5% de significância.

Durante o armazenamento dos ouriços em ACC, a temperatura média foi de 32,5°C e a umidade relativa do ar de 72%. No SAF segundo Mourão et al. (2003), a temperatura média anual, varia entre 26 a 29 °C, com amplitude térmica inferior a 5°C, entre as médias do mês mais quente e do mês mais frio. A precipitação pluviométrica diária média do SAF no período de exposição até a coleta dos ouriços variou entre 8,64 mm a 26,6 mm.

Desta forma, as condições ambientais do SAF, onde a precipitação pluviométrica deve ter ocasionado uma maior umidade relativa do ar, em conjunto com a temperatura favoreceram o crescimento dos fungos em especial *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nomius*, *Penicillium spp.* e *Paecilomyces variotii*.

Costa (2012) e Fonseca (2009) destacaram que a temperatura do ambiente e a umidade relativa do ar são fatores críticos para o crescimento de fungos e produção de micotoxinas, onde áreas quentes e úmidas, com condições de umidade relativa entre 70 a 100% e temperatura do ambiente acima de 25 °C, propiciam o desenvolvimento dos mesmos. Freire et al., (2000) observaram que o aumento da umidade relativa do ar de 65,77% para 75,70% favoreceu o aumento na população de fungos aflatoxigênicos na castanha-do-brasil.

Estes resultados despertam a atenção para a necessidade da adoção de boas práticas extrativistas, para reduzir a contaminação das amêndoas por fungos, em especial os aflatoxigênicos, onde as amêndoas dos ouriços armazenados em um ambiente com temperatura e umidade realtiva do ar controlada, não apresentaram colonização por

Aspergillus nomius e *Paecilomyces variotii*, e quantidades reduzidas de *Aspergillus flavus* e *Penicillium* spp., quando comparado a exposição no solo do SAF. Para os extrativistas a oferta de amêndoas de maior qualidade sanitária, atendendo a atributos de aparência, aroma, textura e sabor, possivelmente levaria a uma maior aceitação das amêndoas por parte dos consumidores revertendo em acréscimo na sua renda.

Em relação a contaminação das amêndoas por *Penicillium citrinum* em cada período de exposição dos ouriços, o teste de Kruskal-Wallis permitiu identificar uma diferença ao nível de 5% de significância (Tabela 10, Apêndice B).

Tabela 10 – Número médio de *Penicillium citrinum* pelo teste de Kruskal-Wallis detectadas infectando amêndoas de castanha-do-brasil provenientes de ouriços submetidos a diferentes períodos de exposição após a queda sobre o solo do Sistema Agroflorestal (SAF) e armazenados em ambiente climatizado sob condições controladas (ACC).

Local	Período (dias)	<i>Penicillium citrinum</i>
SAF	1	0,00 b *
SAF	30	0,00 b *
SAF	60	5,75 a *
SAF	90	4,50 a *
ACC	1	0,00 b *
ACC	30	0,50 b *
ACC	60	1,75 ab*
ACC	90	0,25 b *

*Médias com letras minúsculas diferentes nas colunas, diferem estatisticamente entre si pelo teste Kruskal-Wallis, ao nível 5% de significância.

Nas amêndoas infectadas pela espécie *Penicillium citrinum*, verificou-se que houve diferença significativa quando as amêndoas foram expostas sobre o solo do SAF por 60 e 90 dias, sendo que o primeiro destes períodos, apresentou amêndoas com maiores níveis de contaminação e aos 90 dias, houve o decréscimo quando comparado a exposição de 60 dias, indicando que pode estar ocorrendo um déficit dos nutrientes, água ou umidade nas amêndoas, dificultando o crescimento desta espécie.

A coleta dos ouriços em períodos inferiores a 60 dias de exposição, pode ter reduzido a população do *Penicillium citrinum*. Nota-se ainda que pode estar ocorrendo uma relação de antagonismo entre a microbiota, uma vez que nesta mesma época houve uma menor incidência de outros fungos nas amêndoas.

Calderari (2011) estudando amostras de amêndoas de castanha-do-brasil coletadas das florestas do estado do Pará, identificou 2.597 isolados de fungos filamentosos, com média de infecção total de 90%, sendo *Penicillium citrinum* a espécie mais abundante.

No presente estudo, constatou-se ainda que para os fungos *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus tamarii*, *Cladosporium* spp., *Macrophomina phaseolina*, *Paecilomyces variotii*, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium variotii*, *Penicillium glabrum*, *Verticillium* spp., *Fusarium* spp. e *Neosartorya fischeri*, não houve diferença significativa entre os tratamentos, desta forma, para ouriços coletados com 1, 30, 60 ou 90 dias, mantidos sobre o solo do SAF ou armazenados em ACC, os níveis de contaminação das amêndoas foram estatisticamente semelhantes.

4.3 Teor de umidade e atividade de água (Aw) das amêndoas

O teor de umidade das amêndoas analisadas neste experimento variou entre 3,7 a 8,05% (Tabela 11). Com exceção do valor encontrado no período de exposição do ouriço no solo do SAF por um dia, os outros valores dos teores de umidade das amêndoas se encaixam no valor verificado na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2011) que é de 3,5%, bem como ao valor relatado por Ribeiro et al., (1993) para castanhas descascadas e armazenadas ao ambiente, que foi de 4,5%.

Tabela 11 - Teor de umidade e atividade de água das amêndoas de castanha-do-brasil, submetidas a diferentes períodos de exposição dos ouriços após a queda, sobre o solo no Sistema agroflorestal (SAF) e armazenados em Ambiente com condições controladas ACC.

Período de exposição (dias)	Local	Teor de umidade (%)	Aw
1	SAF	8,05 a	0,83 a
30	SAF	3,90 a	0,81 a
60	SAF	3,84 a	0,79 ab
90	SAF	3,70 a	0,78 b
1	ACC	4,31 a	0,81 a
30	ACC	4,08 a	0,81 a
60	ACC	3,94 a	0,77 ab
90	ACC	3,70 a	0,75 b
CV (%)		11,07	0,25

*Médias com letras minúsculas diferentes nas colunas, diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, considerando o valor a 5% de significância.

A umidade pode favorecer a proliferação de fungos sendo recomendado a sua redução até um limite de segurança. Conforme a Portaria nº 846 de 08 de novembro de 1976, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, a castanha-do-brasil com casca deve ser seca até um valor compreendido entre 11 a 15%. Segundo Arrus et al., (2005 a) após a colheita as castanhas descascadas devem ser mantidas com umidade em torno de 4,5%, para evitar o crescimento do *Aspergillus flavus* e a produção de aflatoxinas. Pacheco e Scussel

(2006) relatam que a castanha-do-brasil tem sua estabilidade assegurada quando o seu teor de umidade está na faixa de 3 a 6,5%, considerada eficiente para controlar a proliferação fúngica.

A atividade de água das amêndoas nos tratamentos estudados alternou entre 0,75 e 0,83 (Tabela 11), valores estes que podem favorecer o crescimento dos fungos aflatoxigênicos na castanha e a formação de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* uma vez que de acordo com Lacey e Magan (1991), a atividade de água mínima para crescimento do *Aspergillus flavus*, encontra-se na faixa de 0,78 a 0,80, sendo que para a produção de aflatoxinas essa faixa varia de 0,83 a 0,87.

Verifica-se que, com exceção das amêndoas dos ouriços armazenados no ACC pelos períodos de 60 e 90 dias, as amêndoas dos demais tratamentos encontraram-se dentro da faixa relatada por Lacey e Magan (1991) sujeita a deterioração por *Aspergillus flavus*. Entretanto foram encontrados *Aspergillus flavus* contaminando as amêndoas destes dois tratamentos. Este fato foi igualmente observado por Baquião (2012), que verificou *Aspergillus flavus* infectando as amêndoas de castanha-do-brasil com atividade de água numa faixa entre 0,50 a 0,83, ou seja, com valor mínimo inferior ao relatado por Lacey e Magan (1991) para o crescimento de *Aspergillus flavus*.

Aspergillus nomius também foi observado por Baquião (2012) afetando as amêndoas numa faixa de atividade de água de 0,57 a 0,80, inferior ao relatado por Pitt e Hocking (2009) para o seu crescimento, que foi de 0,83 e desta forma, explicando o desenvolvimento desta espécie no período de exposição dos ouriços por 90 dias no solo do SAF, cuja a atividade de água das amêndoas foi de 0,78.

Segundo a CAC (2010), como medida de prevenção para que haja redução da contaminação por aflatoxinas, as castanhas-do-brasil devem ser secas até um nível que a atividade de água seja menor que 0,70 dentro do período de 10 dias após a coleta, na comunidade extrativista.

A análise estatística do teor de umidade e da atividade de água das amêndoas (Tabela 11) revelou que os teores de umidade não diferiram estatisticamente entre si ao nível de 5% de significância. As atividades de água das amêndoas não diferiram entre si com relação aos locais de armazenamento, entretanto com relação aos períodos de armazenamento foi possível verificar diferença, sendo que os maiores teores de atividade de água nas amêndoas foram observados no período de exposição dos ouriços por 1 e 30 dias, diferindo estatisticamente do período de exposição de 90 dias.

4.4 Potencial toxígeno

A avaliação do potencial toxígeno dos 68 isolados de espécies de *Aspergillus* (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nomius*, *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus tamaritii*) revelou que 57 destes isolados, produziram fluorescência e possuíam potencial para síntese de micotoxinas (Tabela 12).

Tabela 12 - Isolados de *Aspergillus* spp. obtidos das amêndoas de castanha-do-brasil, submetidas a diferentes períodos de exposição dos ouriços após a queda, sobre o solo no Sistema agroflorestal (SAF) e armazenados em ambiente com condições controladas (ACC), que apresentaram fluorescência quando cultivados em meio ágar coco.

Local	Período	A. <i>flavus</i>	A. <i>niger</i>	A. <i>nomius</i>	A. <i>ochraceus</i>	A. <i>tamaritii</i>	Fluoresceram
SAF	1	8	0	4	0	0	6
SAF	30	6	1	6	0	1	13
SAF	60	6	0	0	9	0	14
SAF	90	7	0	8	0	0	13
ACC	1	0	0	0	0	0	0
ACC	30	1	0	0	1	0	2
ACC	60	5	0	0	1	0	6
ACC	90	1	0	0	3	0	3

Verificou-se que o SAF destacou em relação ao ACC, pois apresentou maior número de isolados produzindo fluorescência, havendo maior quantidade de isolados fluorescendo no período de exposição de 60 dias dos ouriços sobre o solo conforme a tabela 12.

Apenas o *Aspergillus nomius* apresentou diferença significativa em relação aos demais fungos do gênero *Aspergillus* ao nível de 5% de significância pelo teste de Kruskal-Wallis, sendo observados estes isolados fúngicos nas amêndoas provenientes de ouriços mantidos sobre o solo do SAF, apresentando fluorescência no meio ágar coco (Tabela 12, Tabela 13 e Apêndice C).

Tabela 13 – Número médio de isolados de *Aspergillus nomius* das amêndoas de castanha-do-brasil, submetidas a diferentes períodos de exposição dos ouriços após a queda, sobre o solo no SAF e armazenados no ACC, que apresentaram fluorescência quando cultivados em meio ágar coco.

Período (dias)	Local	Médias
1	SAF	0,25 a
30	SAF	1,50 a
60	SAF	0,00 a
90	SAF	2,00 a

1	ACC	0,00 a
30	ACC	0,00 a
60	ACC	0,00 a
90	ACC	0,00 a

*Médias com letras minúsculas diferentes nas colunas, diferem estatisticamente entre si pelo teste Kruskal-Wallis, ao nível 5% de significância.

Bozza (2010), Torelli et al., (2006) e Costa e Scussel (2002), relatam que os dados obtidos pela técnica do ágar coco não são precisos, visto que de acordo com Jamali et al. (2013) já foram verificados em outros estudos resultados falso-positivos ou falso-negativos, sendo necessário a realização de testes confirmatórios como por exemplo, a utilização da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência. Boza (2010) indica que a técnica do ágar coco deve ser utilizada como uma triagem inicial para a detecção dos fungos produtores de aflatoxinas.

Costa e Scussel (2002) ressaltam que, os testes toxigênicos podem não fornecer todas as informações devido às diferenças de comportamento dos fungos em diferentes meios, ou diferentes substratos e os dados obtidos devem ser considerados somente como um indicativo para produção de micotoxinas.

4.3 Análise das amêndoas para detecção das aflatoxinas (AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2)

A análise das amêndoas por cromatografia líquida de alta eficiência (Sistema CLAE-KobraCell®-DFL) para determinação de aflatoxinas AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 revelou que as amostras obtidas do SAF e do ACC, não apresentavam aflatoxinas para nenhum dos períodos de exposição dos ouriços.

Cartaxo et al. (2003) analisando 1,5 kg de amostras de castanhas-do-brasil provenientes de áreas extrativas do Acre, por cromatografia de camada delgada as castanhas coletadas após caírem ao solo com 1, 30, 60 e 90 dias, também não detectaram aflatoxinas em nenhuma das amostras.

De acordo com Pereira et al. (2002) a presença do fungo no substrato não implica, obrigatoriamente em produção de micotoxinas, isto porque, para a produção são necessárias condições propícias para o seu desenvolvimento, como teor de umidade do substrato ótimo, bem como atividade de água, temperatura e umidade relativa do ar.

Dados da atividade de água indicam se os fungos poderão se desenvolver ou não durante a comercialização das castanhas. A presença de amostras com alto teor de água (maior que 0,8) pode favorecer o crescimento dos fungos toxigênicos na castanha e a

subseqüente formação de aflatoxinas, tornando um risco para a saúde do consumidor (PITT; HOCKING, 2009).

Para Arrus et al., (2005 a) a atividade da água ideal para a redução da produção de aflatoxinas em castanhas-do-brasil encontra-se numa faixa de de 0,68 a 0,75 Aw e o teor de umidade das amêndoas para evitar o crescimento de fungos toxigênicos deverá ser de 4,5%. Outros dois parâmetros que podem influenciar a produção de micotoxinas são a temperatura e umidade reativa do ar, e quando encontram-se na faixa de 25 a 30 °C e 97% favorecem o desenvolvimento de fungos e micotoxinas.

Para Lacey e Magan (1991) a atividade de água ótima para produção de aflatoxinas por *A. flavus* varia de 0,83 a 0,87 Aw. Pitt e Hocking (2009) relatam que *A. nomius* necessita de uma atividade de água mínima de 0,83 Aw, a uma temperatura entre 25 °C a 30 °C para o seu desenvolvimento.

Levando em consideração que amostras das amêndoas apresentavam atividade de água na faixa de 0,75 a 0,83 Aw, e teores de umidade na faixa de 3,70 a 8,05, é possível que os fungos aflatoxigênicos não tenham encontrado condições favoráveis para a produção de aflatoxinas, muito embora tenham se desenvolvido no substrato, uma vez que os mesmos necessitam de valores de atividade de água menor para o crescimento do que para produção de aflatoxinas.

O resultado reforça a importância para a adoção de boas práticas extrativistas desde a coleta dos ouriços na floresta, e principalmente para a manutenção das condições ambientais controladas com o monitoramento do teor de umidade e atividade de água das amêndoas, ou de forma mais simples após a coleta dos ouriços realizar secagem das castanhas, o que poderia auxiliar na redução de espécies toxigênicas e de aflatoxinas neste produto, permitindo ao extrativista ofertar aos consumidores um produto com maior qualidade organoléptica e segurança toxicológica.

A outra possibilidade para ausência de aflatoxinas nas amêndoas pode estar relacionada a uma competição microbiológica, visto que Pacheco e Scussel (2006) relataram em seu trabalho sobre existência de castanhas atóxicas, que apesar de estarem contaminadas por fungos, foi evidenciado uma queda abrupta da quantidade da produção de aflatoxinas após a produção máxima, levando a pensar na existência de uma competição entre os microrganismos resistentes a toxina e aptos a inibir sua produção e degradá-la.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos a partir deste estudo, permitem concluir que os fungos *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp., *Macrophoma phaseolina*, *Curvularia* spp., *Paecilomyces* spp., *Verticillium* spp., *Trichoderma* spp., *Cladosporium* spp., *Acremonium* spp., *Fusarium* spp. e *Neosartorya fischeri* fazem parte da microbiota natural das amêndoas de castanha-do-brasil, sendo que os quatro primeiros fungos foram os mais incidentes em Roraima.

Ouriços com um dia de contato com o solo apresentam incidência de *Aspergillus* spp., indicando que a contaminação destes pode ter ocorrido quando estes ainda se encontravam aderidos à planta.

O aumento dos dias de exposição dos ouriços sobre o solo manteve-se alta a infecção das amêndoas por *Aspergillus* spp no primeiro ensaio.

Nas condições do experimento não foi detectado a presença de aflatoxinas nas amostras o que possivelmente pode estar relacionado com os baixos valores da atividade de água e teor de umidade das amêndoas.

As amêndoas de castanha-do-brasil produzidas nas condições do SAF, não oferecem risco ao consumidor pois as mesmas não apresentaram aflatoxinas.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, G. P. **Competitividade do setor exportador brasileiro de Castanha-do-brasil**. Curitiba: UFPR, 2014. 138 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014. Disponível em: <<http://www.sifloresta.ufv.br/handle/123456789/9448>>. Acesso em: 13 fev. 2015.
- ALMEIDA, A. M. R.; TORRES, E.; FARIAS, J. R. B.; BENATO, L. C.; PINTO, M. C.; MARIN, S. R. *Macrophomina phaseolina* em soja: sistema de semeadura, sobrevivência em restos de cultura e diversidade genética. **Embrapa Soja**, 2001.
- ALMEIDA, C. P. de. Castanha-do-brasil, sua exportação e importância na economia amazônica. Rio de Janeiro: **Ministério da Agricultura**, SIA, 83p., 1963.
- ÁLVARES, V. S.; CASTRO, I. M.; COSTA, D. A.; LIMA, A. C.; MADRUGA, A. L. S. Qualidade da Castanha-do-brasil do comércio de Rio Branco, Acre. **Acta Amazonica**, v. 42, n. 2, 2011. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/aa/v42n2/v42n2a13.pdf>>. Acesso em: 13 fev. 2015.
- 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. Disponível em: < <http://repositorio.unb.br/handle/10482/11472>>. Acesso em: 13 fev. 2015.
- ARRUS, K.; BLANK, G.; ABRAMSON, D.; CLEAR, R.; HOLLEY, R. A. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. **Journal of Stored Products Research**, v.41, p.513-527, 2005 a.
- 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**, 68, p.1060-1065, 2005 b.
- ASTOVIZA, M. B.; SUAREZ, M. S. Micotoxinas y cáncer. **Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas**, v. 24, n. 1, p. 54-59, 2005.
- BANDO, E.; GONÇALES, L. N.; TAMURA, N. K.; JUNIOR, M. M. Biomarcadores para avaliação da exposição humana às micotoxinas. **Revista Brasileira de Patologia Médica**, v.43, n. 3, p. 175-180, jun. 2007.
- 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. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42132/tde-01082012-113328/>>. Acesso em: 22 mar. 2016.
- 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**, 139, 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, p.224-229, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713512002277>>. Acesso em: 13 fev. 2015.

BAYMAN, P.; BAKER, J. L.; MAHONEY, N. E. *Aspergillus* on tree nuts: incidence and associations. **Mycopathologia**, v. 155, n. 3, p. 161-169, 2002.

BAYMAN, P.; BAKER, J.; MAHONEY, N. *Aspergillus* on tree nuts. **Mycopathologia**, v.155, p.161-169, 2000.

BOZZA, A. **Detecção e quantificação de ocratoxina A produzida por espécies de *Aspergillus* isoladas de grãos de café**. Curitiba, UFPR, 2010. Dissertação. Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia. Universidade Federal do Paraná, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Brasília: ANVISA.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 59, de 26 de dezembro de 2013. Brasília: ANVISA.

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. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/2946_regras_analise__sementes.pdf>. Acesso em: 13 fev. 2015.

CAC (Codex Alimentarius Commission). Proposed Draft Revision of the Additional Measures for the Prevention and Reduction of Aflatoxin Contamination in Brazil Nuts. ALINORM 103341 - **Appendix VI Joint FAO - WHO Food Standards**. Program, FAO, Rome, p. 58. 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. Disponível em: <<http://volans.fea.unicamp.br/alimentarium/admin/download.php?aid=2229>>. Acesso em: 13 fev. 2015.

CALDERARI, T. O.; IAMANAKA, B. T.; FRISVAD, J. C., PITT, J. I.; SARTORI, D.; PEREIRA, J. L.; FUNGARO, M. H. P.; TANIWAKI, M. H. The biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in brazil nuts: from rainforest to consumer. **International journal of food microbiology**, v. 160, n. 3, p. 267-272, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160512005661>>. Acesso em: 13 fev. 2015.

CANDLISD, A. A. G.; PEARSON, S. M.; AIDOO, K. E.; KELLY, B.; IRVINE, H. A survey of ethic foods for microbial quality and aflatoxina contente. **Food additives and Contaminants**, v. 18, n.2, p. 129-136.2001.

CARDARELLI, H.R.; OLIVEIRA, A.J. Conservação do leite de castanha-do-pará. **Scientia Agrícola**, Campinas, v.57, n.4, p.617, 2000. Disponível em:<<http://www.scielo.br/pdf/sa/v57n4/a04v57n4.pdf>>. Acesso em: 13 fev. 2015.

CARTAXO, C. B. C.; SOUZA, J. M. L.; CORRÊA, T. B.; COSTA, P.; FREITAS-SILVA, O. Occurrence of aflatoxin and filamentous fungi contamination in brazil-nuts left inside the forest. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE MICOTOXICOLOGIA, 4, Havana 2003.

CAVALET, R.M.; PEREIRA, M.M.G.; COSTA, A.P.R.; FIALHO, R.C.J.; MURATORI, M. C.S. Fungos toxigênicos em camarões marinhos cultivados e potenciais toxigênicos das cepas isoladas de *Aspergillus* seção *Flavi* e seção *Nigri*. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, v. 71, n.4, p.638-44, 2012. Disponível em: <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-98552012000400004&lng=pt&nrm=iso> . Acesso em: 13 fev. 2015.

CODEX ALIMENTARIUS. **Codex general standard for contaminants and toxins in food and feed**. CODEX STAN 193, 1995. Disponível em: <<http://www.codexalimentarius.org/standards/list-of-standards/>>. Acesso em: 13 fev. 2015.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Conjuntura Mensal**. abr. 2012. Disponível em:<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_05_17_15_27_18_conjuntura_castanhadoBrasilabril2012.pdf>. Acesso em: 08 mar. 2016.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Proposta de Preços Mínimos - Safra 2015 - 2016/Produtos da sociobiodiversidade.Companhia Nacional de Abastecimento - Brasília, CONAB, v. 2, 2015. Disponível em:<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_08_19_09_15_16_proposta_preco_minimo_-_sociobiodiversidade.pdf>. Acesso em: 08 mar. 2016.

COSTA, A. K. F. da; FREIRE, F. das C. O.; VIEIRA, I. G. P.; ANDRADE, J. A.; MENDES, F. N. P. Fungos associados à Castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bompl) e ao amendoim (*Arachis hypogaea* L.) comercializados em Fortaleza (Ceará). **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 40, n. 3, p. 455-460, jul./set, 2009 a. Disponível em: <<http://ccarevista.ufc.br/seer/index.php/ccarevista/article/viewFile/768/367>>. Acesso em: 13 fev. 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. Disponível em: <<http://www.ufac.br/portal/unidades-academicas/pos-graduacao/mestrado-emagronomia-producao-vegetal/dissertacoes/turma-de-2012/DavidAquino.pdf>>. Acesso em: 13 fev. 2015.

COSTA, J. R.; CASTRO, A. B. C.; WANDELLI, E. V.; CORAL, S. C. T.; SOUZA, S. A. G. de. Aspectos silviculturais da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) em sistemas agroflorestais na Amazônia Central. **Acta Amazonica**, v. 39, p. 843-850. 2009 b. Disponível em:

<
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S004459672009000400013&lng=en&tlng=pt>. Acesso em: 13 jan. 2016.

COSTA, L. L. F.; SCUSSEL, V. M. Toxigenic fungi in beans (*Phaseolus vulgaris* L.) classes black and color cultivated in the state of Santa Catarina, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 138-144, 2002.

da SILVA, F. C.; 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**, p. 1-11, 2015.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. Porto Alegre, 4^a ed., ed. Artmed, 875 p., 2010. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=bdAVu_tQGi0C&printsec=frontcover&hl=pt-BR#v=onepage&q&f=false> . Acesso em 13 fev. 2015.

de SOUZA, J. M. L.; 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. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Manual+castanha_000g2hia5yh02wx5ok0ghx3a9j5yyj4v.pdf>. Acesso em: 08 mar. 2016.

EMBRAPA. Sistema brasileiro de classificação de solos. Embrapa Solos, Rio de Janeiro, 412 p. 1999.

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**, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/aa/v39n4/v39n4a12.pdf>>. Acesso em: 13 fev. 2015.

FONSECA, H. **Os fungos e a deterioração de alimentos**. 2009. Disponível em: <<http://www.micotoxinas.com.br/boletim4.htm>>. Acesso em: 15 maio 2011.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. **As micotoxinas**. n.7. 2009. Disponível em:<<http://www.revista-fi.com/materias/90.pdf>>. Acesso em: 19. mar. 2015.

FREIRE, F. C. O.; KOZAKIEWICZ, Z.; PATERSON, R. M. Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. **Mycopathologia**, v.49, p.13-19, 2000.

FREITAS-SILVA, O.; DIAS, J.do S. A. Fungos e micotoxinas em castanha do Brasil: manejo e alternativas de controle. **Portal do Agronegócio**, Embrapa Agroindústria de Alimentos. 2012. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/958448>>. Acesso em: 03 jan. 2016.

FREITAS-SILVA, O.; VENÂNCIO, A. Brazil nuts: benefits and risks associated with contamination by fungi and mycotoxins. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1434-

1440,2011. Disponível em:
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996911001499>>. Acesso em: 13 fev. 2015.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A.; SMEDSGAARD, J. *Emericella astellata*, a new producer of aflatoxin B1, B2 and sterigmatocystin. **Letters in applied microbiology**, v. 38, n. 5, p. 440-445, 2004.

FRISVAD, J. C.; SKOUBOE P.; SAMSON R. A. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B1, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. **Systematic and applied microbiology**.v.28, p.442-453, 2005.

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

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.

HONTANAYA, C.; MECA, G.; LUCIANO, F. B.; MAÑES, J.; FONT, G. Inhibition of aflatoxin B1, B2, G1 and G2 production by *Aspergillus parasiticus* in nuts using yellow and oriental mustard flours. **Food Control**, v. 47, p. 154-160, 2015.

HOUBRAKEN, J.; DE 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 Agrônômica**, v. 7, p. 138-161, 2010.

IARC. International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. v. 82, p.169–345. 2002.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da extração vegetal e silvicultura. Rio de Janeiro, v.29, p.1-56, 2014. Disponível em: <<http://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=774>>. Acesso em: 08 mar. 2016.

ICMSF. Internacional Commission on Microbiological Specifications For Foods -. Microorganismos de los alimentos: características de los patógenos microbiano. Zaragoza: Acribia, p. 403-428, 1996.

ITO, Y.; PETERSON S.W.; WICKLOW, D.T.; GOTO, T. *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*. **Mycological Research**. v.105, n.2, p.233-239, 2001.

JAMALI, M.; KARIMIPOUR, M.; SHAMS-GHAHFAROKHI, M.; AMANI, A.; RAZZAGHI-ABYANEH, M. Expression of aflatoxin genes aflO (omtB) and aflQ (ordA) differentiates levels of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* strains from soils of pistachio orchards. **Research in microbiology**, v. 164, n. 4, p. 293-299, 2013.

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

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

KLICH, M. A.; PITT, J. I. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. North Ryde: 197 p., 1988a.

KLICH, M. A; PITT, J. I. Differentiation of *Aspergillus flavus* from *Aspergillus parasiticus* and other closely related species. **Transactions of the British mycology society**. v.91, p.99-108, 1988b. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000715368880010X>>. Acesso em: 13 fev. 2015.

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

KWIATKOWSKI, A.; ALVES, A. P. de F. Importância da detecção e do controle de aflatoxinas em alimentos. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 2, n. 2, 2007. Disponível em: < <http://www.revista.grupointegrado.br/revista/index.php/sabios2/article/viewArticle/64>>. Acesso em: 13 fev. 2015.

LABUZA, T. P. The effect of water activity on kinetics of food deterioration. **Food Technology**, v. 39, n. 4, p. 36-41, 1980.

LACEY, J.; MAGAN, N. Fungi in cereal grain: their occurrence and water and temperature relations In: Chelkoski J., Cereal Grain: mycotoxins, fungi and quality in drying and storage. p.77-118, **Elsevier Science**, Amsterdam, 1991.

LEITE, F. M. N. **Fungos aflatoxigênicos na Castanha-do-brasil sob as condições da floresta e de armazenagem comunitária no Acre**. UFAC, 2008. 97 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal do Acre, Rio Branco – Acre, 2008. Disponível em: < <http://www.ufac.br/portal/unidades-academicas/pos-graduacao/mestrado-em-agronomia-producao-vegetal/dissertacoes/turma-de-2006/felicia-maria-nogueira-leite-1>>. Acesso em 13 fev. 2015.

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

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.

MACKENZIE, D. W. R. Keynote lecture: *Aspergillus* in man. In: VANDEN BOSSCHE, H.; MACKENZIE, D. W. R.; CAUWENBERGH, G. (Ed.). ***Aspergillus and Aspergillosis***, New York; Plenum Press, 1988. p. 332.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Prevenção de aflatoxinas em Castanha-do-Brasil; cartilha do produtor**. Brasília, DF. 2002. 6 p.

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.

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

MAUÉS, M. M. 2002. Reproductive phenology and pollination of the Brazil nut tree (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl. Lecythidaceae) in Eastern Amazonia. In: Kevan, P; Imperatriz Fonseca, Y. L. (Eds.). Pollinating bees: the conservation link between agriculture and nature. Ministério do Desenvolvimento. Brasília. p. 245-254.

MIDORIKAWA, G. E. O. **Aspergillus seção Flavi: caracterização molecular de espécies aflatoxigênicas da castanha do Brasil e análise do Transcritoma de *Aspergillus oryzae* em relação a degradação enzimática do bagaço da cana-de-açúcar**. Brasília, UNB, 2014. Tese (Doutorado). Programa de Pós Graduação em Biologia Molecular. Universidade de Brasília, 2014. Disponível em: < <http://repositorio.unb.br/handle/10482/17943>>. Acesso em: 11 maio 2015.

MOURÃO JUNIOR, M.; XAUD, M. R.; XAUD, H. A. M.; MOURA NETO, M. A. de; ARCO-VERDE, M. F.; PEREIRA, P. R. V. S.; TONINI, H. Precipitação pluviométrica em áreas de transição savana-mata de Roraima: campos experimentais Serra da Prata e Confiança. Comunicado Técnico n. 17. **Embrapa Roraima**. Boa Vista, Roraima. 7 p. 2003.

MÜLLER, C.H.; FIGUEIRÊDO, F.J.C.; KATO, A.K.; CARVALHO, J.E.U.; STEIN, R.L.B.; SILVA, A.B. **A cultura de Castanha-do-brasil**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1995.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 5.ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2006.

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; Pós-colheita.com.br. Disponível em: <<http://www.norteempreendedor.com.br/download2.php?cod=8>>. Acesso em: 13 fev. 2015.

OLIVEIRA, F. I. de. **Certificação da castanha-do-brasil e o desenvolvimento sustentável: análise de programas de certificação e de sua aplicação em empreendimentos castanheiros amazônicos**. 137 p. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília - UNB, Brasília, 2011.

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

PACHECO, A. M. **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.; LUCAS, A.; PARENTE, R.; PACHECO, N. Associação de aflatoxinas e fungos aflatoxigênicos em castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). **Food Science and Technology**, Campinas, v. 30, n. 2, p. 330-334, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v30n2/07.pdf>>. Acesso em: 17 mar. 2015.

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

PASTEUR, N.; BULLERMAN, L.B. Mould spoilage and mycotoxin formation in grains as controlled by physical means. **International Journal of Food Microbiology**, n.7, 257-265, 1988.

PEREIRA, K. C.; SANTOS, C. F. dos. Micotoxinas e seu potencial carcinogênico. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 15, n. 4, p. 147-165, 2011. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=26022135011>>. Acesso em: 13 fev. 2015.

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.

PIMENTEL, F. A.; CARDOSO, M. das G.; BATISTA, L. R.; GUIMARÃES, L. G. de L.; SILVA, D.M. Ação fungitóxica do óleo essencial de *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. e K. Shum sobre o *Aspergillus flavus* isolado da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*). **Acta Amazonica**, Manaus , v. 40, n. 1, p. 213-220, Mar. 2010 .

PINHEIRO, M. **Estudo de variabilidade genética de *Aspergillus flavus* como base para o desenvolvimento de PCR multiplex para a detecção de fungos produtores de aflotoxinas em Castanha-do-brasil e castanha-de-caju**. Brasília, UCB, 2004 Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia.

Universidade Católica de Brasília, 2004. Disponível em: <http://www.bdttd.ucb.br/tede/tde_arquivos/13/TDE-2004-07-01T084347Z-76/Publico/Dissert_Maria%20dos%20Reis%20Rodrigues%20Pinheiro.pdf>. Acesso em: 13 fev. 2015.

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

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.

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

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.

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.

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, 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. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9133/tde-10092012-110036/en.php>>. Acesso em: 17. mar. 2015.

SCHROEDER, H. W. Effect of corn steep liquor on mycelial growth and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus*. **Applied microbiology**, v. 14, n. 3, p. 381-385, 1966.

SCOLES, R.; KLEIN, G. N.; GRIBEL, R. Crescimento e sobrevivência de castanheira (*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. Disponível em:<[http://www.museu-goeldi.br/editora/bn/artigos/cnv9n2_2014/crescimento\(scoles\).pdf](http://www.museu-goeldi.br/editora/bn/artigos/cnv9n2_2014/crescimento(scoles).pdf)>. Acesso em: 13 jan. 2016.

SCOTT, W. J. Water relations of food spoilage microorganisms. **Advances in food research**, v. 7, p. 83-127, 1957.

SCUSSEL, V. M. Fungos e micotoxinas associados a grãos armazenados. In: Lorini, I. **Armazenagem de grãos**, Campinas, IBG. Seção 9, 2002.

SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: Editora Insular, 144 p.,1998.

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. Disponível em:<www.unicamp.br/nepa/taco/>. Acesso em: 13. Fev. 2015.

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.

TONINI, H. Fenologia da castanheira-do-brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. Bonpl., Lecythidaceae) no sul do estado de Roraima. **CERNE**, Lavras , v. 17, n. 1, p. 123-131, Mar. 2011 .

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 castanhas nativas de Roraima e características socioeconômicas dos extrativistas. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais**. v.9 p. 399-414, 2014. Disponível em:<<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1003240/1/cpamt2014toninicastanhasnativos.pdf>>. Acesso em 13 jan. 2016.

TORELLI, E.; FIRRAO, G.; LOCCI, R.; GOBBI, E. Ochratoxin A- producing strains of *Penicillium* spp. isolated from grapes used for the production of “passito” wines. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, p. 307-312, 2006.

UNIÃO EUROPÉIA. Regulamentação nº 165/2010 de 26 de fevereiro de 2010, que altera o Regulamento (CE) nº 1881/2006, que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos gêneros alimentícios, no que diz respeito às aflatoxinas. **Jornal oficial de União Européia**, 2010. Disponível em:<http://www.esac.pt/noronha/legislalimentar/regulamento_165_2010_aflotoxinas.pdf>. Acesso em 13 fev. 2015.

VALOIS A. C. C. **Benefícios e estratégias de utilização sustentável da Amazônia**. Brasília, Distrito Federal, Embrapa Informação Tecnológica, 2003. Disponível em:<<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/92421/1/sea-texto-18.pdf>>>. Acesso em: 13 fev. 2015.

VARGA, J.; JUHÁSZ, Á.; KEVEI, F.; KOZAKIEWICZ, Z. Molecular diversity of agriculturally important *Aspergillus* species. In.: **Molecular Diversity and PCR-detection of Toxicogenic 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.

VARGA, J.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Two new aflatoxin producing species, and overview of *Aspergillus* section *Flavi*. **Studies in Mycology**. v. 69,p. 57-80, 2011.

WADT, L. H. O.; KAINER, K. A. Domesticação e melhoramento de castanheira. In: BORÉM, A.; LOPES, M. T. G.; CLEMENT, C. R. **Domesticação e melhoramento: espécies amazônicas**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, cap. 15, p. 297-317, 2009.

WADT, L. H. O.; KAINER, K. A.; GOMES-SILVA, D. A. P. Population structure and nut yield of a *Bertholletia excelsa* stand in Southwestern Amazonia. **Forest Ecology and Management**, v. 211, n. 3, p. 371-384, 2005. Disponível em:<<http://www.sciencedirect.com.ez136.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S037811270500143X>>. Acesso em: 13 fev. 2015.

WADT, L. H. O; KAINER, K. A.; STAUDHAMMER, C. L.; SERRANO, R. O. P. Sustainable forest use in Brazilian extractive reserves: natural regeneration of Brazil nut in exploited populations. **Biological Conservation**, v. 141, n. 1, p. 332-346, 2008.

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. Disponível em: < <http://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/89591>>. Acesso em: 13 fev. 2015.

ANEXOS

ANEXO I

Ágar Dicloran 18% Glicerol (DG 18)

Composição	
Glicose	10,0 g
Peptona	5,0 g
KH ₂ PO ₄	1,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
Glicerol p. a.	220 g
Agar	15 g
Água destilada	1 litro
Dicloran	2 mg (0,2% em etanol 1,0 ml)
Cloranfenicol	100 mg

Fonte: TANIWAKI ; IAMANAKA; SILVA, 2011.

Preparado com adição de todos componentes, menos o glicerol em 800 ml de água. Aquecer para dissolver o ágar, em seguida completar para 1 litro com água. Adicionar o glicerol (concentração final de 18%) e esterilizar em autoclave a 121 ° C por 15 minutos.

ANEXO II

Ágar Batata Dextrose

Composição	
Infusão de batatas	200 g
Dextrose	20,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1 litro

Fonte: TANIWAKI; IAMANAKA; SILVA, 2011

Utilizado para preservação dos espécimes de *Aspergillus* spp. isolados. Preparar o meio e autoclavar a 121°C por 15 minutos.

ANEXO III

Ágar Czapek Extrato de Levedura (CYA)

Composição (Czapek Concentrado)	
NaNO ₃	30,0 g
KCl	5,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	5,0 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g
Água destilada	100 ml

Para preparo dissolver todos componentes por meio de agitação.

Composição (CYA)	
K ₂ HPO ₄	1 g
Czapek concentrado	10 ml
Extrato de levedura	5,0 g
Sacarose	30,0 g
Ágar	0,05g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1 litro

Fonte: TANIWAKI; IAMANAKA; SILVA, 2011.

Preparado por meio da dissolução dos componentes e esterilização a 121°C por 15 minutos.

ANEXO IV

Ágar AFPA

Composição	
Peptona Bacteriológica	10,0 g
Extrato de levedura	20,0 g
Citrato férrico amoniacal	0,5g
Cloranfenicol	100 mg
Ágar	15,0 g
Água destilada	1 litro
Dicloran	2 mg (0,2% em etanol 1,0 ml)

Fonte: TANIWAKI; IAMANAKA; SILVA, 2011.

Este é um meio seletivo para o isolamento de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, é preparado dissolvendo todos os componentes e autoclavando-os a 121°C por 15 minutos.

ANEXO V

Ágar Coco (CAM)

Composição	
Leite de coco	250 ml
Ágar	20 g
Água destilada	750 ml

Fonte: TANIWAKI; IAMANAKA; SILVA, 2011.

Indicado para detecção de fungos produtores de aflatoxinas é preparado dissolvendo todos os ingredientes e autoclavando por 121°C por 15 minutos.

ANEXO VI**Solução Tampão fosfato (PBS) 0,1%**

Composição	
KH ₂ PO ₄	0,2g
Na ₂ HPO ₄	1,2 g
NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Água destilada	1 litro

Preparado dissolvendo todos componentes em água ultrapura e homogeneizar.

ANEXO VII**Ácido Nítrico 4M**

Composição	
HNO ₃ 65% P.A (densidade 1,4 g/mL)	2,8 mL
Água ultrapura	4 mL

Preparar transferindo 2,8mL de ácido nítrico (65% de pureza e densidade de 1,4g/mL,) para um balão volumétrico de 10mL, avolumar com água ultrapura e homogeneizar.

APÊNDICES

APÊNDICE -A

Teste de Kruskal-Wallis, para o Teste de sanidade das amêndoas de castanha-do-brasil

Dados Transformados a raiz quadrada de (Y+0.5)

Variável	TRAT	N	Médias	D.E.	GL	H	p	Sig.
<i>Aspergillus</i> spp.	1	10	3,53	0,24	5	46,18	<0.0001	(**)
<i>Aspergillus</i> spp.	2	10	3,52	0,37				
<i>Aspergillus</i> spp.	3	10	2,37	0,06				
<i>Aspergillus</i> spp.	4	10	2,35	0,00				
<i>Aspergillus</i> spp.	5	10	3,53	0,27				
<i>Aspergillus</i> spp.	6	10	1,54	0,77				

Tratamento	Médias	Ranks
1	3,53	45,85 a
2	3,52	45,25 a
3	2,37	19,20 b
4	2,35	18,00 b
5	3,53	45,40 a
6	1,54	9,30 b

Médias com letras iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis ($p > 0.01$)

Variável	TRAT	N	Médias	D.E.	GL	H	p	Sig.
<i>Penicillium</i> spp.	1	10	0,76	0,16	5	24,46	<0.0001	(**)
<i>Penicillium</i> spp.	2	10	0,79	0,28				
<i>Penicillium</i> spp.	3	10	0,71	0,00				
<i>Penicillium</i> spp.	4	10	0,71	0,00				
<i>Penicillium</i> spp.	5	10	1,97	0,37				
<i>Penicillium</i> spp.	6	10	0,71	0,00				

Tratamento	Médias	Ranks
1	0,76	27,00 b
2	0,79	27,20 b
3	0,71	24,50 b
4	0,71	24,50 b
5	1,97	55,30 a
6	0,71	24,50 b

Médias com letras iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis ($p > 0.01$)

Variável	TRAT	N	Médias	D.E.	GL	H	p	Sig.
<i>Rhizopus</i> spp.	1	10	0,79	0,28	5	0,62	0,8061	(ns)
<i>Rhizopus</i> spp.	2	10	0,96	0,56				
<i>Rhizopus</i> spp.	3	10	0,82	0,37				
<i>Rhizopus</i> spp.	4	10	0,85	0,45				
<i>Rhizopus</i> spp.	5	10	0,76	0,16				
<i>Rhizopus</i> spp.	6	10	0,71	0,00				

Variável	TRAT	N	Médias	D.E.	GL	H	p	Sig.
<i>Curvularia</i> spp.	1	10	0,71	0,00	5	0,98	0,0706	(ns)

<i>Curvularia</i> spp.	2	10	0,71	0,00
<i>Curvularia</i> spp.	3	10	0,71	0,00
<i>Curvularia</i> spp.	4	10	0,71	0,00
<i>Curvularia</i> spp.	5	10	1,01	0,65
<i>Curvularia</i> spp.	6	10	0,71	0,00

Variável	TRAT	N	Médias	D.E.	GL	H	p	Sig.
<i>Acremonium</i> spp.	1	10	0,71	0,00	5	0,25	0,4159	(ns)
<i>Acremonium</i> spp.	2	10	0,76	0,16				
<i>Acremonium</i> spp.	3	10	0,71	0,00				
<i>Acremonium</i> spp.	4	10	0,71	0,00				
<i>Acremonium</i> spp.	5	10	0,71	0,00				
<i>Acremonium</i> spp.	6	10	0,71	0,00				

Variável	TRAT	N	Médias	D.E.	GL	H	p	Sig.
<i>Verticillium</i> spp.	1	10	0,71	0,00	5	0,25	0,4159	(ns)
<i>Verticillium</i> spp.	2	10	0,76	0,16				
<i>Verticillium</i> spp.	3	10	0,71	0,00				
<i>Verticillium</i> spp.	4	10	0,71	0,00				
<i>Verticillium</i> spp.	5	10	0,71	0,00				
<i>Verticillium</i> spp.	6	10	0,71	0,00				

Variável	TRAT	N	Médias	D.E.	GL	H	p	Sig.
<i>Trichoderma</i> spp.	1	10	0,71	0,00	5	0,25	0,4159	(ns)
<i>Trichoderma</i> spp.	2	10	0,76	0,16				
<i>Trichoderma</i> spp.	3	10	0,71	0,00				
<i>Trichoderma</i> spp.	4	10	0,71	0,00				
<i>Trichoderma</i> spp.	5	10	0,71	0,00				
<i>Trichoderma</i> spp.	6	10	0,71	0,00				

Variável	TRAT	N	Médias	D.E.	GL	H	p	Sig.
<i>Paecilomyces</i> spp.	1	10	0,81	0,22	5	0,98	0,0705	(ns)
<i>Paecilomyces</i> spp.	2	10	0,71	0,00				
<i>Paecilomyces</i> spp.	3	10	0,71	0,00				
<i>Paecilomyces</i> spp.	4	10	0,71	0,00				
<i>Paecilomyces</i> spp.	5	10	0,71	0,00				
<i>Paecilomyces</i> spp.	6	10	0,71	0,00				

Legenda: Tratamento 1 = 95 dias; Tratamento 2 = 75 dias; Tratamento 3 = 55 dias; Tratamento 4 = 35 dias; Tratamento 5 = 15 dias e Tratamento 6 = 1 dia, de exposição dos ouriços sobre o solo do SAF.

APÊNDICE -B

Teste de Kruskal -Wallis para qualidade sanitária das amêndoas.

Variável	LOCAL	PERÍODO	N	Médias	D.E.	GL	H	p	Sig.
<i>Aspergillus flavus</i>	A	1	4	2,00	1,83	7	5,19	0,4718	(ns)
<i>Aspergillus flavus</i>	A	30	4	1,50	2,38				
<i>Aspergillus flavus</i>	A	60	4	1,50	1,91				
<i>Aspergillus flavus</i>	A	90	4	1,75	2,36				
<i>Aspergillus flavus</i>	B	1	4	0,00	0,00				
<i>Aspergillus flavus</i>	B	30	4	0,25	0,50				
<i>Aspergillus flavus</i>	B	60	4	1,25	1,89				
<i>Aspergillus flavus</i>	B	90	4	0,25	0,50				

Variável	LOCAL	PERÍODO	N	Médias	D.E.	GL	H	p	Sig
<i>Aspergillus niger</i>	A	1	4	0,00	0,00	7	0,64	0,4289	(ns)
<i>Aspergillus niger</i>	A	30	4	0,25	0,50				
<i>Aspergillus niger</i>	A	60	4	0,00	0,00				
<i>Aspergillus niger</i>	A	90	4	0,00	0,00				
<i>Aspergillus niger</i>	B	1	4	0,00	0,00				
<i>Aspergillus niger</i>	B	30	4	0,00	0,00				
<i>Aspergillus niger</i>	B	60	4	0,00	0,00				
<i>Aspergillus niger</i>	B	90	4	0,00	0,00				

Variável	LOCAL	PERÍODO	N	Médias	D.E.	GL	H	p	Sig
<i>Aspergillus nomius</i>	A	1	4	1,00	1,15	7	6,57	0,0479	(*)
<i>Aspergillus nomius</i>	A	30	4	1,50	1,29				
<i>Aspergillus nomius</i>	A	60	4	0,00	0,00				
<i>Aspergillus nomius</i>	A	90	4	2,00	4,00				
<i>Aspergillus nomius</i>	B	1	4	0,00	0,00				
<i>Aspergillus nomius</i>	B	30	4	0,00	0,00				
<i>Aspergillus nomius</i>	B	60	4	0,00	0,00				
<i>Aspergillus nomius</i>	B	90	4	0,00	0,00				

Tratamento	Médias	Ranks
A:1	1,00	21,25 ab
A:30	1,50	25,13 a
A:60	0,00	13,50 b
A:90	2,00	18,13 ab
B:1	0,00	13,50 b
B:30	0,00	13,50 b
B:60	0,00	13,50 b
B:90	0,00	13,50 b

Médias com letras iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis ($p > 0.05$)

Variável	LOCAL	PERÍODO	N	Médias	D.E.	GL	H	p	Sig
<i>Aspergillus ochraceus</i>	A	1	4	0,00	0,00	7	1,47	0,7273	(ns)
<i>Aspergillus ochraceus</i>	A	30	4	0,00	0,00				
<i>Aspergillus ochraceus</i>	A	60	4	2,25	4,50				
<i>Aspergillus ochraceus</i>	A	90	4	0,00	0,00				
<i>Aspergillus ochraceus</i>	B	1	4	0,00	0,00				
<i>Aspergillus ochraceus</i>	B	30	4	0,25	0,50				
<i>Aspergillus ochraceus</i>	B	60	4	0,25	0,50				
<i>Aspergillus ochraceus</i>	B	90	4	0,75	1,50				

Variável	LOCAL	PERÍODO	N	Médias	D.E.	GL	H	p	Sig
<i>Aspergillus tamaritii</i>	A	1	4	0,00	0,00	7	0,64	0,4289	(ns)
<i>Aspergillus tamaritii</i>	A	30	4	0,25	0,50				
<i>Aspergillus tamaritii</i>	A	60	4	0,00	0,00				
<i>Aspergillus tamaritii</i>	A	90	4	0,00	0,00				
<i>Aspergillus tamaritii</i>	B	1	4	0,00	0,00				
<i>Aspergillus tamaritii</i>	B	30	4	0,00	0,00				
<i>Aspergillus tamaritii</i>	B	60	4	0,00	0,00				
<i>Aspergillus tamaritii</i>	B	90	4	0,00	0,00				

Variável	LOCAL	PERÍODO	N	Médias	D.E.	GL	H	p	Sig
----------	-------	---------	---	--------	------	----	---	---	-----

<i>Cladosporium</i> spp.	A	1	4	0,00	0,00	7	0,64	0,4289	(ns)
<i>Cladosporium</i> spp.	A	30	4	0,25	0,50				
<i>Cladosporium</i> spp.	A	60	4	0,00	0,00				
<i>Cladosporium</i> spp.	A	90	4	0,00	0,00				
<i>Cladosporium</i> spp.	B	1	4	0,00	0,00				
<i>Cladosporium</i> spp.	B	30	4	0,00	0,00				
<i>Cladosporium</i> spp.	B	60	4	0,00	0,00				
<i>Cladosporium</i> spp.	B	90	4	0,00	0,00				

Variável	LOCAL	PERÍODO	N	Médias	D.E.	GL	H	p	Sig
<i>Macrophomina phaseolina</i>	A	1	4	4,75	1,71	7	5,43	0,5884	(ns)
<i>Macrophomina phaseolina</i>	A	30	4	1,00	2,00				
<i>Macrophomina phaseolina</i>	A	60	4	3,00	3,46				
<i>Macrophomina phaseolina</i>	A	90	4	3,50	3,51				
<i>Macrophomina phaseolina</i>	B	1	4	2,75	2,06				
<i>Macrophomina phaseolina</i>	B	30	4	3,00	1,83				
<i>Macrophomina phaseolina</i>	B	60	4	3,25	3,77				
<i>Macrophomina phaseolina</i>	B	90	4	2,00	1,15				

Variável	LOCAL	PERÍODO	N	Médias	D.E.	GL	H	p	Sig
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	A	1	4	0,25	0,50	7	0,64	0,4289	(ns)
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	A	30	4	0,00	0,00				
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	A	60	4	0,00	0,00				
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	A	90	4	0,00	0,00				
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	B	1	4	0,00	0,00				
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	B	30	4	0,00	0,00				
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	B	60	4	0,00	0,00				
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	B	90	4	0,00	0,00				

Variável	LOCAL	PERÍODO	N	Médias	D.E.	GL	H	p	Sig
<i>Paecilomyces variotii</i>	A	1	4	1,00	1,15	7	2,55	0,0435	(*)
<i>Paecilomyces variotii</i>	A	30	4	0,00	0,00				
<i>Paecilomyces variotii</i>	A	60	4	0,00	0,00				
<i>Paecilomyces variotii</i>	A	90	4	0,00	0,00				
<i>Paecilomyces variotii</i>	B	1	4	0,00	0,00				
<i>Paecilomyces variotii</i>	B	30	4	0,00	0,00				
<i>Paecilomyces variotii</i>	B	60	4	0,00	0,00				
<i>Paecilomyces variotii</i>	B	90	4	0,00	0,00				

Tratamento	Medias	Ranks
A:1	1,00	23,5 a
A:30	0,00	15,5 b
A:60	0,00	15,5 b
A:90	0,00	15,5 b
B:1	0,00	15,5 b
B:30	0,00	15,5 b
B:60	0,00	15,5 b
B:90	0,00	15,5 b

Médias com letras iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis ($p > 0.05$)

Variável	LOCAL	PERÍODO	N	Médias	D.E.	GL	H	p	Sig
<i>Penicillium</i> spp.	A	1	4	1,00	0,82	7	9,85	0,0034	(**)
<i>Penicillium</i> spp.	A	30	4	2,75	3,10				

<i>Penicillium</i> spp.	A	60	4	0,00	0,00
<i>Penicillium</i> spp.	A	90	4	0,00	0,00
<i>Penicillium</i> spp.	B	1	4	0,00	0,00
<i>Penicillium</i> spp.	B	30	4	0,00	0,00
<i>Penicillium</i> spp.	B	60	4	0,00	0,00
<i>Penicillium</i> spp.	B	90	4	0,00	0,00

Tratamento	Medias	Ranks
A:1	1,00	24,88 ab
A:30	2,75	26,13 a
A:60	0,00	13,5 b
A:90	0,00	13,5 b
B:1	0,00	13,5 b
B:30	0,00	13,5 b
B:60	0,00	13,5 b
B:90	0,00	13,5 b

Médias com letras iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis ($p > 0.05$)

Variável	LOCAL	PERÍODO	N	Médias	D.E.	GL	H	p	Sig
<i>Penicillium citrinum</i>	A	1	4	0,00	0,00	7	17,5	0,0016	(**)
<i>Penicillium citrinum</i>	A	30	4	0,00	0,00				
<i>Penicillium citrinum</i>	A	60	4	5,75	4,19				
<i>Penicillium citrinum</i>	A	90	4	4,50	1,73				
<i>Penicillium citrinum</i>	B	1	4	0,00	0,00				
<i>Penicillium citrinum</i>	B	30	4	0,50	1,00				
<i>Penicillium citrinum</i>	B	60	4	1,75	2,36				
<i>Penicillium citrinum</i>	B	90	4	0,25	0,50				

Tratamento	Médias	Ranks
A:1	0,00	10,50 b
A:30	0,00	10,50 b
A:60	5,75	27,88 a
A:90	4,50	27,63 a
B:1	0,00	10,50 b
B:30	0,50	13,50 b
B:60	1,75	18,38 ab
B:90	0,25	13,13 b

Médias com letras iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis ($p > 0.05$)

Variável	LOCAL	PERÍODO	N	Médias	D.E.	GL	H	p	Sig
<i>Penicillium glabrum</i>	A	1	4	0,25	0,50	7	1,09	0,5166	(ns)
<i>Penicillium glabrum</i>	A	30	4	0,25	0,50				
<i>Penicillium glabrum</i>	A	60	4	0,00	0,00				
<i>Penicillium glabrum</i>	A	90	4	0,00	0,00				
<i>Penicillium glabrum</i>	B	1	4	0,00	0,00				
<i>Penicillium glabrum</i>	B	30	4	0,00	0,00				
<i>Penicillium glabrum</i>	B	60	4	0,00	0,00				
<i>Penicillium glabrum</i>	B	90	4	0,00	0,00				

Variável	LOCAL	PERÍODO	N	Médias	D.E.	GL	H	p	Sig
<i>Verticillium</i> spp.	A	1	4	0,25	0,50	7	0,64	0,4289	(ns)
<i>Verticillium</i> spp.	A	30	4	0,00	0,00				

<i>Verticillium</i> spp.	A	60	4	0,00	0,00
<i>Verticillium</i> spp.	A	90	4	0,00	0,00
<i>Verticillium</i> spp.	B	1	4	0,00	0,00
<i>Verticillium</i> spp.	B	30	4	0,00	0,00
<i>Verticillium</i> spp.	B	60	4	0,00	0,00
<i>Verticillium</i> spp.	B	90	4	0,00	0,00

Variável	LOCAL	PERÍODO	N	Médias	D.E.	GL	H	p	Sig
<i>Fusarium</i> spp.	A		1	4	0,25	0,50	7	0,64	0,4289 (ns)
<i>Fusarium</i> spp.	A		30	4	0,00	0,00			
<i>Fusarium</i> spp.	A		60	4	0,00	0,00			
<i>Fusarium</i> spp.	A		90	4	0,00	0,00			
<i>Fusarium</i> spp.	B		1	4	0,00	0,00			
<i>Fusarium</i> spp.	B		30	4	0,00	0,00			
<i>Fusarium</i> spp.	B		60	4	0,00	0,00			
<i>Fusarium</i> spp.	B		90	4	0,00	0,00			

Variável	LOCAL	PERÍODO	N	Médias	D.E.	GL	H	p	Sig
<i>Neosartorya fischeri</i>	A		1	4	0,00	0,00	7	0,64	0,4289 (ns)
<i>Neosartorya fischeri</i>	A		30	4	0,00	0,00			
<i>Neosartorya fischeri</i>	A		60	4	0,00	0,00			
<i>Neosartorya fischeri</i>	A		90	4	0,25	0,50			
<i>Neosartorya fischeri</i>	B		1	4	0,00	0,00			
<i>Neosartorya fischeri</i>	B		30	4	0,00	0,00			
<i>Neosartorya fischeri</i>	B		60	4	0,00	0,00			
<i>Neosartorya fischeri</i>	B		90	4	0,00	0,00			

Legenda: A: Sistema Agroflorestal (SAF); B: Ambiente com Condições Controladas (ACC).

Variáveis com diferença significativa para os locais de exposição

Variável	LOCAL	N	Médias	D.E.	GL	H	p	Sig
<i>Aspergillus flavus</i>	A	16	1,69	1,92	1	3,41	0,0373	(*)
<i>Aspergillus flavus</i>	B	16	0,44	1,03				

Tratamento	Médias	Ranks
A	1,69	19,56 a
B	0,44	13,44 b

Médias com letras iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis ($p > 0.05$)

Variável	LOCAL	N	Médias	D.E.	GL	H	p	Sig
<i>Aspergillus nomius</i>	A	16	1,13	2,09	1	3,27	0,0079	(**)
<i>Aspergillus nomius</i>	B	16	0	0				

Tratamento	Médias	Ranks
A	1,13	19,5 a
B	0,00	13,5 b

Médias com letras iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis ($p > 0.05$)

Variável	LOCAL	N	Médias	D.E.	GL	H	p	Sig
<i>Penicillium</i> spp.	A	16	0,94	1,84	1	3,27	0,0079	(**)
<i>Penicillium</i> spp.	B	16	0	0				

Tratamento	Médias	Ranks
A	0,94	19,5 a
B	0,00	13,5 b

Médias com letras iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis ($p > 0.05$)
 Legenda: A: Sistema Agroflorestal (SAF); B: Ambiente com Condições Controladas (ACC).

Variável com diferença significativa para o período de exposição

Variável	PERÍODO	N	Médias	D.E.	GL	H	p	Sig
<i>Penicillium citrinum</i>		1	8	0,00	0	3	10,47	0,0031 (**)
<i>Penicillium citrinum</i>		30	8	0,25	0,71			
<i>Penicillium citrinum</i>		60	8	3,75	3,81			
<i>Penicillium citrinum</i>		90	8	2,38	2,56			

Tratamento	Médias	Ranks
1	0,00	10,50 c
30	0,25	12,00 bc
60	3,75	23,13 a
90	2,38	20,38 ab

Médias com letras iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis ($p > 0.05$)

APÊNDICE -C

Teste de Kruskal-Wallis para potencial toxígeno.

Variável	LOCAL	PERÍODO	N	Médias	D.E.	gl	H	p
<i>Aspergillus flavus</i>	A		1	4	1,25	1,89	7	3,95 0,5551
<i>Aspergillus flavus</i>	A		30	4	1,25	2,50		
<i>Aspergillus flavus</i>	A		60	4	1,25	1,89		
<i>Aspergillus flavus</i>	A		90	4	1,25	1,50		
<i>Aspergillus flavus</i>	B		1	4	0,00	0,00		
<i>Aspergillus flavus</i>	B		30	4	0,25	0,50		
<i>Aspergillus flavus</i>	B		60	4	1,25	1,89		
<i>Aspergillus flavus</i>	B		90	4	0,00	0,00		

Variável	LOCAL	PERÍODO	N	Médias	D.E.	gl	H	p
<i>Aspergillus niger</i>	A		1	4	0,00	0,00	7	0,64 0,4289
<i>Aspergillus niger</i>	A		30	4	0,25	0,50		
<i>Aspergillus niger</i>	A		60	4	0,00	0,00		
<i>Aspergillus niger</i>	A		90	4	0,00	0,00		
<i>Aspergillus niger</i>	B		1	4	0,00	0,00		
<i>Aspergillus niger</i>	B		30	4	0,00	0,00		
<i>Aspergillus niger</i>	B		60	4	0,00	0,00		
<i>Aspergillus niger</i>	B		90	4	0,00	0,00		

Variável	LOCAL	PERÍODO	N	Médias	D.E.	gl	H	p
<i>Aspergillus nomius</i>	A		1	4	0,25	0,50	7	5,65 0,0484
<i>Aspergillus nomius</i>	A		30	4	1,50	1,29		

<i>Aspergillus nomius</i>	A	60	4	0,00	0,00
<i>Aspergillus nomius</i>	A	90	4	2,00	4,00
<i>Aspergillus nomius</i>	B	1	4	0,00	0,00
<i>Aspergillus nomius</i>	B	30	4	0,00	0,00
<i>Aspergillus nomius</i>	B	60	4	0,00	0,00
<i>Aspergillus nomius</i>	B	90	4	0,00	0,00

Tratamento	Médias	Ranks	
A:1	0,25	17,63	A
A:30	1,50	25,88	A
A:60	0,00	14,00	A
A:90	2,00	18,50	A
B:1	0,00	14,00	A
B:30	0,00	14,00	A
B:60	0,00	14,00	A
B:90	0,00	14,00	A

Médias com letras iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis ($p > 0.05$)

Variável	LOCAL	PERÍODO	N	Médias	D.E.	gl	H	p	
<i>Aspergillus ochraceus</i>	A		1	4	0,00	0,00	7	1,47	0,7273
<i>Aspergillus ochraceus</i>	A		30	4	0,00	0,00			
<i>Aspergillus ochraceus</i>	A		60	4	2,25	4,50			
<i>Aspergillus ochraceus</i>	A		90	4	0,00	0,00			
<i>Aspergillus ochraceus</i>	B		1	4	0,00	0,00			
<i>Aspergillus ochraceus</i>	B		30	4	0,25	0,50			
<i>Aspergillus ochraceus</i>	B		60	4	0,25	0,50			
<i>Aspergillus ochraceus</i>	B		90	4	0,75	1,50			

Variável	LOCAL	PERÍODO	N	Médias	D.E.	gl	H	p	
<i>Aspergillus tamaritii</i>	A		1	4	0,00	0,00	7	0,64	0,4289
<i>Aspergillus tamaritii</i>	A		30	4	0,25	0,50			
<i>Aspergillus tamaritii</i>	A		60	4	0,00	0,00			
<i>Aspergillus tamaritii</i>	A		90	4	0,00	0,00			
<i>Aspergillus tamaritii</i>	B		1	4	0,00	0,00			
<i>Aspergillus tamaritii</i>	B		30	4	0,00	0,00			
<i>Aspergillus tamaritii</i>	B		60	4	0,00	0,00			
<i>Aspergillus tamaritii</i>	B		90	4	0,00	0,00			

Legenda: A: Sistema Agroflorestal (SAF); B: Ambiente com Condições Controladas (ACC).