


FELICIA MARIA NOGUEIRA LEITE



**FUNGOS AFLATOXIGÊNICOS NA CASTANHA-DO-BRASIL SOB AS
CONDIÇÕES DA FLORESTA E DE ARMAZENAGEM COMUNITÁRIA
NO ACRE**

RIO BRANCO

2008

FELICIA MARIA NOGUEIRA LEITE

**FUNGOS AFLATOXIGÊNICOS NA CASTANHA-DO-BRASIL SOB AS
CONDIÇÕES DA FLORESTA E DE ARMAZENAGEM COMUNITÁRIA
NO ACRE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, do Centro de Ciências Biológicas e da Natureza da Universidade Federal do Acre, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Luzenira de Souza

RIO BRANCO

2008

© LEITE, F. M. N. 2008.

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade Federal do Acre

L533f LEITE, Felicia Maria Nogueira. *Fungos aflatoxigênicos na castanha-do-brasil sob as condições da floresta e de armazenagem comunitária no Acre*. 2008. 97f.
Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal do Acre, Rio Branco – Acre, 2008.

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Luzenira de Souza

1. Extrativismo, 2. Castanha-do-brasil, 3. Armazenagem, 4. Aflatoxina, 5. *Aspergillus flavus*, 6. *Aspergillus parasiticus*, I. Título

CDU 634.575 (811.2)

FELICIA MARIA NOGUEIRA LEITE

**FUNGOS AFLATOXIGÊNICOS NA CASTANHA-DO-BRASIL SOB AS
CONDIÇÕES DA FLORESTA E DE ARMAZENAGEM COMUNITÁRIA NO
ACRE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, do Centro de Ciências Biológicas e da Natureza da Universidade Federal do Acre, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Aprovada em 29 de agosto de 2008.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Maria Luzenira de Souza
Universidade Federal do Acre - UFAC
Orientadora

Prof^a. Dra. Virgínia de Souza Álvares
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa
1º Membro

Prof. Dr. Reginaldo Ferreira da Silva
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa
2º Membro

Rio Branco

2008

À Deus, por permitir nossa existência e nossa sabedoria, aos meus pais, Jacy Ferreira Leite e Elvira Nogueira Leite, *in memoriam*, pela oportunidade do estudo e ao meu esposo Jordney de Souza Cordeiro e filhas Bruna Fernanda Leite Cordeiro e Maria Eduarda Leite Cordeiro pela compreensão.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus que ilumina nossos caminhos todos os dias.

À minha família que pelo incentivo e apoio durante o andamento do Curso e por entenderem a ausência presencial e afetiva no período dedicado exclusivamente ao recolhimento de dados na floresta e no laboratório.

À Universidade Federal do Acre – UFAC e à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Acre pela realização do curso de mestrado.

À Secretaria de Estado de Extensão Agroflorestal e Produção Familiar – SEAPROF pela oportunidade.

À equipe do Projeto Safenut/STDF especialmente Monica Olsen (National Food Administration, Suécia), Catherine Jacqueline Brabet (Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement – CIRAD/França) e à equipe do Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA na orientação, supervisão e definição metodológica.

À Professora Maria Luzenira de Souza pela amizade, paciência e sábia orientação na finalização do trabalho.

Ao Prof. Jorge Ferreira Kusdra em especial, pelas sugestões valiosas e auxílio na análise estatística.

À Lauro Saraiva Lessa pela inestimável ajuda na análise estatística.

À todos os professores do curso, colegas de aula, funcionários da UFAC e Embrapa Acre pela assistência durante as atividades.

À Cleísa Brasil da Cunha Cartaxo pelo convite para participar do Projeto.

Às pesquisadoras Joana Maria Leite de Souza, Virgínia de Souza Álvares e aos funcionários Francisco de Sales, Raimundo Nonato Costa de Oliveira e Renato Teles do Nascimento, ambos da Embrapa Acre pelo empenho, confiança e companhia durante as longas caminhadas na floresta para coleta de amostras.

Aos produtores do Seringal Porongaba, Brasiléia, Acre, principalmente aos Senhores Francisco Soares de Melo e Jorge Lima da Silva, pelo acolhimento em suas residências, pela confiança e amizade.

À Cooperativa Central de Produtores e Extrativistas do Acre – COOPERACRE pela parceria.

“Leia o que está escrito, ouça o que é dito, e se não compreender, pergunte. Não tenha vergonha de perguntar o que não sabe. É assim que se aprende”.

Geraldo Eustáquio de Souza

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi monitorar a influência da aplicação das boas práticas extrativistas em condições da floresta e armazém comunitário na incidência de fungos aflatoxigênicos na castanha-do-brasil. De Janeiro a Julho do ano 2008, 84 amostras de castanha-do-brasil de três épocas de coleta (0 a 5, 15 a 20 e 60 dias após queda dos frutos), três tipos de seleção da amontoa (sem seleção prévia, selecionadas e descartadas) e de cinco tempos de armazenagem comunitária (0, 15, 30, 60 e 90 dias), foram coletadas no município de Brasiléia, Acre, Brasil. A temperatura e umidade relativa do ambiente foram aferidas durante as coletas. Aferições de atividade de água, temperatura da amêndoa e análises de identificação e quantificação de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, outros fungos e aflatoxina foram realizadas respectivamente no Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Embrapa Acre em Rio Branco e Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento em Belo Horizonte. Na floresta, as médias observadas de temperatura, umidade relativa, atividade de água e temperatura da amêndoa, foram de 24,6 a 25,4 °C, 96,98 a 100 % e 0,97 a 0,98, 24,2 a 25,1 °C. Na armazenagem os valores encontrados para essas variáveis foram 24,7 a 29,8 °C, 65,77 a 88,42 %, 0,63 a 0,93 e 24,2 a 25,11 °C. *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* foram identificados na floresta e armazenamento com frequência de 3,88 a 99,09 ufc.g⁻¹ e 0,8333 a 151,6666 ufc.g⁻¹ respectivamente. A presença de outros fungos nesta mesma sequência foi de 879,34 a 38.618,91 ufc.g⁻¹ e 855,8285 a 2.480,2905 ufc.g⁻¹. Aflatoxinas foram detectadas nas amostras da floresta onde os tipos e valores foram B₁ (0,04 a 115,69 μ.kg⁻¹), B₂ (0,01 a 0,1 μ.kg⁻¹), G₁ (0,03 a 0,74 μ.kg⁻¹) e G₂ (0,05 μ.kg⁻¹), exceto a aflatoxina G₂ não encontrada nas amostras da amontoa. Na armazenagem, os tipos e teores de aflatoxina foram B₁ (0,016 a 40,38 μ.kg⁻¹), B₂ (0,016 a 3,35 μ.kg⁻¹), G₁ (0,028 a 58,06 μ.kg⁻¹) e G₂ (3,88 μ.kg⁻¹). A temperatura, a umidade relativa do ambiente, a atividade de água e a temperatura das amêndoas das amostras coletadas na floresta estão dentro da faixa para germinação, crescimento e produção de aflatoxina. A coleta tardia favorece o crescimento de fungos aflatoxigênicos. *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e outros fungos foram encontrados nas amostras das três épocas de coleta como nos três tipos de seleção da amontoa. Aflatoxinas foram encontradas nas amostras descartadas da amontoa

sem o crescimento do *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. As boas práticas extrativistas aplicadas na floresta favorecem à menor incidência fungos aflatoxigênicos na castanha-do-brasil. As castanhas armazenadas não estavam com teor de atividade de água ideal para impedir o crescimento de fungos aflatoxigênicos e produção de suas toxinas. *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e aflatoxinas estiveram presentes em todo o período de armazenagem no armazém comunitário. A maior concentração de aflatoxina B₁ e G₁ foi encontrada aos 30 dias de armazenamento. O maior crescimento de fungos aflatoxigênicos não coincidiu com a maior produção de aflatoxina.

Palavras-chaves: Castanha-do-brasil, Armazenagem, Aflatoxina, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*.

ABSTRACT

The research aimed to monitoring the impact of applying good practices in extractive and storage conditions of the forest communitarian in the incidence of fungi aflatoxigenic in Brazil nut. From January to July of 2008, 84 samples of Brazil nut than three times of collection (0 to 5, 15 to 20 and 60 days after falling fruit), selection of three types of fruits accumulation stage (without prior selection, selected and discarded) and five times the communitarian storage (0, 15, 30, 60 and 90 days) were collected in the city of Brasiléia, Acre, Brazil. The temperature and relative humidity of the environment were assessed during the collections. Measurements of water activity, temperature of almonds and analysis for the identification and quantification from *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, other fungi and aflatoxin were held respectively at the Embrapa Food Laboratory of Technology in Rio Branco, Acre and Laboratory Quality Assurance and Food Security Department of Agriculture Livestock and Supply in Belo Horizonte. In the forest, the averages of observed temperature, relative humidity, water activity and temperature of almonds, were 24.6 to 25.4 °C, 96.98 to 100 % and 0.97 to 0.98, 24.2 to 25.1 °C. The values found in storage for these variables were 24.7 to 29.8 °C, 65.77 to 88.42%, 0.63 to 0.93 and 24.2 to 25.11 °C. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* were identified in the forest and storage with a frequency of 3,88 to 99,09 ufc.g⁻¹ and 0,8333 to 151,6666 ufc.g⁻¹ respectively. The presence of other fungi in the same sequence was 879,34 to 38.618,91 ufc.g⁻¹ and 855,8285 to 2.480,2905 ufc.g⁻¹. Aflatoxins were found in samples of the forest where the types and values were B₁ (0.04 to 115.69 µ.kg⁻¹), B₂ (0.01 to 0.1 µ.kg⁻¹), G₁ (0.03 to 0.74 µ.kg⁻¹) and G₂ (0.05 µ.kg⁻¹), except for aflatoxin G₂ not found in samples of amount. In storage, the types and levels of aflatoxin B₁ were (0.016 to 40.38 µ.kg⁻¹), B₂ (0.016 to 3.35 µ.kg⁻¹), G₁ (0.028 to 58.06 µ.kg⁻¹) and G₂ (3.88 µ.kg⁻¹). The temperature, relative humidity of the environment, water activity and temperature of almonds from samples collected in the forest are within the range for germination, growth and production of aflatoxin. In collects late favors the growth of fungi aflatoxigenic. *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* and other fungi were found in samples of the three times of collection as the selection of three types of amount. Aflatoxins were found in samples of amount discarded without the growth of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. The good practices applied in the extractive forest favor the lower incidence fungi aflatoxigenic in Brazil nut. The nuts were not stored with content in water activity ideal for preventing the growth of fungi aflatoxigenice and production of its toxins. *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* and aflatoxin were presented throughout the period of storage in a communitarian warehouse. The highest concentration of aflatoxin B₁ and G₁ was found after 30 days of storage. The biggest fungi growth of aflatoxigenic not coincided with the increased production of aflatoxin.

Key words: Brazil nuts, Community warehouse, Aflatoxin, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	Área de ocorrência da castanheira na Amazônia Brasileira.....	17
FIGURA 2 –	Castanheira, fruto, sementes e amêndoa.....	19
FIGURA 3 –	Mapa do Estado do Acre – áreas de ocorrência da castanheira..	22
FIGURA 4 –	Esquema de amostragem dentro de um lote para formação de uma amostra global.....	33
FIGURA 5 –	Estrutura de secagem de castanha-do-brasil.....	61
FIGURA 6 –	Quantificação de aflatoxinas em amostras de castanha-do-brasil coletadas durante armazenagem comunitária.....	74

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 –	Quantidade e número de amostras a serem coletadas em função do peso do lote.....	32
QUADRO 2 –	Síntese das etapas de coleta na floresta.....	35

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	Valores médios observados nas variáveis analisadas nas épocas de coleta na floresta.....	39
TABELA 2 –	Valores médios observados nas variáveis analisadas nas amontoas (tipos de seleção) na floresta.....	39
TABELA 3 –	Níveis de contaminação por <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Apergillus parasiticus</i> e níveis de aflatoxina em amostras de castanha-do-brasil coletadas na floresta em três épocas de coleta.....	44
TABELA 4 –	Níveis de contaminação por <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Apergillus parasiticus</i> e níveis de aflatoxina em amostras de castanha-do-brasil coletadas na floresta nos tipos de seleção da amontoa.....	50
TABELA 5 –	Médias observadas nas variáveis analisadas nas amostras de castanha-do-brasil provenientes da armazenagem comunitária..	65

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 –	Valores médios de temperatura e umidade relativa do ar na floresta durante a coleta de amostras nas três épocas.....	41
GRÁFICO 2 –	Crescimento médio de <i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> e outros fungos em castanhas coletadas nas três épocas.....	42
GRÁFICO 3 –	Valores médios de temperatura e umidade relativa do ar na floresta durante as coletas na amontoa.....	46
GRÁFICO 4 –	Crescimento de <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i> e outros fungos nas amostras coletadas na amontoa.....	47
GRÁFICO 5 –	Temperatura e umidade relativa do armazém comunitário durante o período de coleta.....	66
GRÁFICO 6 –	Umidade relativa e atividade de água da amêndoa no período de armazenamento.....	67
GRÁFICO 7 –	Temperatura do ambiente e da amêndoa coletada no período de armazenagem.....	68
GRÁFICO 8 –	Atividade de água das amêndoas de castanha-do-brasil durante armazenagem.....	69
GRÁFICO 9 –	Atividade de água e fungos aflatoxigênicos das amêndoas de castanha-do-brasil durante armazenagem comunitária.....	70
GRÁFICO 10 –	Crescimento de <i>Aspergillus flavus</i> e <i>Aspergillus parasiticus</i> e outros fungos em castanha-do-brasil durante armazenagem comunitária.....	71

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A – Fluxograma de produção identificado junto à comunidade.....	88
APÊNDICE B – Resumo da análise de variância para as épocas de coleta.....	90
APÊNDICE C – Resumo da análise de variância para os tipos de seleção na amontoa.....	91
APÊNDICE D – Correlação entre os resultados obtidos nas três épocas de coleta de castanha-do-brasil na floresta.....	92
APÊNDICE E – Correlação dos resultados e as variáveis analisadas da castanha-do-brasil na amontoa (tipos de seleção) na floresta....	93
APÊNDICE F – Resumo da análise de variância para os tipos de aflatoxina identificados nas amostras castanha-do-brasil coletadas nos três tipos de seleção da amontoa na floresta.....	94
APÊNDICE G – Resumo da análise de variância para as amostras coletadas no tempo de armazenagem comunitária.....	95
APÊNDICE H – Correlação dos resultados das variáveis analisadas na castanha-do-brasil na etapa de armazenagem comunitária.....	96
APÊNDICE I – Correlação dos resultados das análises de aflatoxina na castanha-do-brasil e variáveis obtidas na etapa de armazenagem comunitária.....	97

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS DA ESPÉCIE.....	18
2.2	SISTEMA DE PRODUÇÃO.....	20
2.3	ASPECTOS ECONÔMICOS DA CASTANHA-DO-BRASIL.....	21
2.4	CONTAMINAÇÃO DA CASTANHA POR FUNGOS PRODUTORES DE AFLATOXINA.....	23
3	CAPÍTULO I FUNGOS AFLATOXIGÊNICOS NA CASTANHA-DO-BRASIL SOB CONDIÇÕES DE FLORESTA	27
3.1	RESUMO.....	28
3.2	INTRODUÇÃO	30
3.3	MATERIAL E MÉTODOS	31
3.3.1	Caracterização do experimento.....	31
3.3.2	Coleta das amostras de castanha-do-brasil.....	32
3.3.3	Preparo da amostra para análise.....	33
3.3.4	Análise microbiológica para quantificação de fungos.....	36
3.3.5	Definição do modelo estatístico.....	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1	ÉPOCA DE COLETA DA CASTANHA.....	40
4.1.1	Análises das variáveis temperatura e umidade relativa do ar na floresta	40
4.1.2	Temperatura, atividade de água e quantificação de fungos na amêndoa	41
4.1.3	Análise de quantificação e identificação de aflatoxina.....	43

4.2	TIPOS DE SELEÇÃO DA CASTANHA-DO-BRASIL NA AMONTOA.....	45
4.2.1	Análises da temperatura e umidade relativa do ar na floresta.....	46
4.2.2	Temperatura, atividade de água, quantificação de fungos na amontoa.....	46
4.2.3	Análises de identificação e quantificação de aflatoxina na amontoa.....	49
5	CONCLUSÕES.....	51
	REFERÊNCIAS	52
6	CAPÍTULO II FUNGOS AFLATOXIGÊNICOS NA CASTANHA-DO-BRASIL EM CONDIÇÕES DE ARMAZENAGEM COMUNITÁRIA	55
6.1	RESUMO.....	56
6.2	INTRODUÇÃO.....	58
6.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	60
6.3.1	Caracterização do Experimento.....	60
6.3.2	Análise microbiológica para identificação de fungos.....	63
6.3.3	Definição do modelo estatístico.....	63
6.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
6.4.1	Temperatura e umidade relativa do ambiente	66
6.4.2	Temperatura e atividade de água da amêndoa e quantificação de fungos.	68
7	CONCLUSÕES.....	77
	REFERÊNCIAS	78
	APÊNDICES	87

1 INTRODUÇÃO

A Castanheira (*Bertholletia excelsa*, H. B. K.) pertence à família Lecythidaceae, originária da região Amazônica, onde se destaca na floresta pelo grande porte. Seu fruto chamado ouriço, abriga sementes de casca dura conhecidas como castanha-do-brasil, que por sua vez, contêm amêndoas comestíveis conhecidas na linguagem popular como castanha (CLEMENT et al., 2000; MULLER, et al., 1995).

A proteína da amêndoa é considerada completa por apresentar em quantidades superiores ou equivalentes todos os aminoácidos essenciais, com destaque para os sulfurados (metionina e cisteína) que são encontrados em menor teor em proteínas vegetais. Outros constituintes de importância são o selênio, as fibras e lipídios (SOUZA; MENEZES, 2004; SOUZA, 2003).

A castanha-do-brasil obtida naturalmente, em casca ou *in natura* é a mais procurada no mercado internacional. Este tipo de produto é obtido sem ter sido submetido a qualquer processo de desidratação artificial, apenas limpo e seco naturalmente. Nestas condições, o Brasil já chegou a abastecer 75 % do mercado mundial (PAS, 2004; MAPA, 1976).

O Acre é um dos principais produtores brasileiros com uma produção de 10.500 toneladas no ano de 2005, sendo que um estudo confirmou a existência de uma variação na produção individual a cada quatro anos, porém não foi verificado a tendência do ciclo de quatro anos. A cadeia produtiva da castanha-do-brasil constitui uma importante fonte de renda, com reflexo social significativo para a população extrativista no Estado (WADT et al., 2005a; SEPROF, 2000).

Sua exportação para outros países tem sido prejudicada pelo elevado índice de contaminação por aflatoxina, uma substância considerada cancerígena para humanos e animais, segundo a Agência Internacional de Pesquisa do Câncer – AIPC. Essa toxina é produzida principalmente pelos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, que são comuns na microbiota do ambiente de produção desse produto (FAO, 2006; FRANK; BETANCOURT, 1981).

A contaminação de alimentos por micotoxinas é uma preocupação para as unidades de produção em todo o mundo. Desde o ano de 2003 a Comunidade Européia estabeleceu princípios e normas gerais na legislação alimentar para a importação de castanha-do-brasil proveniente do Brasil, após a identificação de

vários lotes contaminados com teores excessivos de aflatoxinas B₁ e total (FERREIRA et al., 2006; CE, 2003).

O baixo nível tecnológico e as condições inadequadas de manejo e manuseio pós-colheita favorecem a contaminação por bactérias, leveduras e fungos filamentosos, sendo estes últimos os responsáveis pela presença de micotoxinas (OLIVEIRA et al., 2006).

A intensificação da coleta na floresta, o uso de equipamentos específicos para a quebra do ouriço (facão e lona plástica), a proteção contra chuva e contato da castanha com outros tipos de contaminações durante o transporte, e principalmente uma estrutura de armazenamento adequado, são recomendações feitas ao extrativista para melhorar a qualidade da castanha-do-brasil.

Neste contexto, o objetivo deste pesquisa foi monitorar a influência da aplicação das boas práticas extrativistas em condições da floresta e de armazém comunitário sobre a incidência de fungos aflatoxigênicos na castanha-do-brasil.

Este trabalho foi realizado no âmbito do Projeto Safenut (<http://www.stdf-safenutproject.com/>) financiado pelo programa Standards and Trade Development Facility – STDF (<http://www.standardsfacility.org/>).

2 REVISÃO DE LITERATURA

A castanheira (*Bertholletia excelsa*, Humb. and Bonpl.) é uma árvore pertencente à família Lecythidaceae, originária da região Amazônica, amplamente encontrada na floresta de terra firme da Amazônia Brasileira, Boliviana e Peruana. Desenvolve-se melhor em clareiras e em áreas não alagadas com solos argilosos ou argilo-arenosos. É uma das mais importantes espécies nativas de exploração extrativista encontrada em maiores concentrações na porção brasileira, principalmente nos estados da região norte, até o alto Beni na Bolívia (SHANLEY et al., 1998; MULLER et al., 1995). A região de ocorrência da castanha-do-brasil no Brasil e proximidades está destacada na FIGURA 1.



FIGURA 1 – Área de ocorrência de castanheiras na Amazônia Brasileira.
FONTE: WADT et al. (2005 a)

2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA ESPÉCIE

Mori e Prance¹ (1990) citados por Fernandes (2007) consideram a *Bertholletia excelsa* como única espécie do gênero. Referem, entretanto que no estado do Acre os extrativistas descrevem a existência de dois tipos de castanheiras: as brancas e as vermelhas. De acordo com as características citadas pelos produtores a diferença entre os dois tipos são: a cor da madeira, o potencial produtivo, o aspecto geral e o porte das árvores, além da forma e tamanho dos frutos e sementes.

A árvore destaca-se pelo grande porte, sobressaindo-se no dossel da floresta, onde pode alcançar até 50 m de altura e dois metros de diâmetro. Seu caule é cilíndrico, liso, desprovido de ramos até a fronde, copa densa, folhas esparsas, oblongas (PACHECO; SCUSSEL, 2006; WADT et al., 2005a).

A flor tem estrutura especial que só as abelhas grandes (gêneros *Xilocopa* e *Bombus*) conseguem polinizá-las. A floração ocorre entre os meses de outubro a dezembro e pode variar de acordo com a região. Na região Oeste do Brasil, mais especificamente, no estado do Acre as árvores florescem antes que na região Leste, no Pará, sendo de novembro a março o período em que os frutos caem da copa da castanheira, com o pico da queda nos meses de dezembro a janeiro. Os frutos (ouriços) contendo as sementes são grandes, constituindo-se de uma resistente cápsula esférica com diâmetro variável, de 8 a 16 cm, que não se abre espontaneamente e demoram 14 meses até o completo amadurecimento. As sementes apresentam casca dura e rugosa, denominadas castanhas e abrigam amêndoas comestíveis conhecidas mundialmente como castanha-do-brasil, Brazil nut ou castanha-do-pará (WADT, et al., 2005a; BRASIL, 2002; CAMARGO, et al., 2000). A árvore, o fruto, a semente e a amêndoa podem ser observadas na FIGURA 2.

Segundo Souza e Menezes (2004) e Souza (2003) a amêndoa apresenta em média 67,3% de lipídios, 14,3% de proteínas de alto valor biológico e 8% de fibras totais, é rica em cálcio, fósforo, ferro, vitaminas do complexo B e vitamina E. Além desses, há outro constituinte indispensável a uma boa alimentação, o selênio, antioxidante que vem sendo referido na prevenção de câncer.

¹ MORI, S.A.; PRANCE, G.T. Taxonomy, ecology and economic botany of the Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.: Lecythidaceae). **Advances in Economic Botany**. v.8, p. 130-150, 1990.



FIGURA 2. (a) castanheira (b) ouriços (c) sementes ou castanhas (d) amêndoas

2.2 SISTEMA DE PRODUÇÃO

Apesar de ser uma espécie protegida por lei, grandes concentrações de castanhais nativos foram dizimados para implantação de pastagens. Os castanhais remanescentes têm diminuído sua produção devido aos fragmentos florestais não comportarem condições ecológicas favoráveis a colonização (RIBEIRO; WANDELLI, 2002). Cotta et al (2008) constataram que o sistema de pousio na coleta poderia ser um reforço para aumentar a densidades de árvores na floresta, o que pode constituir uma oportunidade para uma maior renda para famílias extrativistas ao mesmo tempo que contribui para a sustentabilidade e conservação florestal, a longo prazo.

A produção de uma árvore varia em função de vários fatores, entre os quais se destaca o ano, a região, o diâmetro à altura do peito, a estrutura da copa e as características genéticas da planta, o que pode influenciar na alteração da produção de um castanhal de uma safra para outra (KAINER et al., 2007).

Os plantios nacionais de castanheiras no Brasil, localizados nos Estados do Amazonas e Pará, ainda são alvos de estudos para definição de sistemas de produção (PAS, 2004).

O cultivo em condições sustentáveis deve ser melhor entendido, especialmente em sistemas agroflorestais - SAF implantados em áreas degradadas. Em relação ao crescimento em altura e diâmetro em condições de SAF, os resultados tem sido satisfatórios, porém para a exploração de frutos, não foi considerado viável economicamente, sendo necessários estudos sobre a redução do período de juvenilidade e aumento da produtividade da espécie (PIMENTEL et al., 2007; RIBEIRO; WANDELLI, 2002).

Segundo Fernandes (2007) a classificação popular da espécie deve ser considerada para o manejo, especialmente quando se tratar de estratégias que visem o aumento da produtividade como, por exemplo, o enriquecimento das populações naturais.

O sistema de produção da castanha por ser predominantemente extrativista em mata nativa, não envolve investimentos tecnológicos no processo de coleta, amontoa dos ouriços e quebra das castanhas na unidade produtiva e transporte imediato para armazéns adequados ou diretamente para a indústria de beneficiamento (PAS, 2004).

Para superar a tendência de instabilidade e declínio quanto à quantidade e valor da produção de castanha-do-brasil e estruturar o desenvolvimento de caráter sustentável em longo prazo, a introdução do fator tecnológico pode ser fundamental, dado que a renda da economia extrativa, nos últimos anos, tem decrescido pela diminuição da exportação (VILHENA, 2004).

De acordo com informações de produtores, *in locu*, na cadeia produtiva da castanha-do-brasil as comunidades do estado do Acre que já aplicam as boas praticas extrativistas - BPE apresentam como principais atividades a amontoa dos ouriços, a quebra dos ouriços e seleção das castanhas, descartando aquelas em estado de decomposição visível e cortadas e/ou quebradas, transporte para o armazém, secagem e seleção em secador de tela em aço galvanizado e armazenamento. A descrição do fluxograma de produção na base produtiva encontra-se no APÊNDICE A.

2.3 ASPECTOS ECONÔMICOS DA CASTANHA-DO-BRASIL

Segundo Gonzaga (2006), o estado do Acre tem aptidão e tradição no extrativismo da castanha-do-brasil, e toda sua produção é oriunda deste sistema, constituindo-se como principal atividade econômica para milhares de famílias que vivem na Amazônia.

A castanha-do-brasil é um produto conhecido nos EUA e na Europa. Os principais produtores são Brasil, Bolívia e Peru. Até recentemente o Brasil dominava o mercado, mas desde a década de 90 a Bolívia vem investindo na indústria e hoje detém 59% do mercado mundial da castanha sem casca, enquanto o Brasil é responsável apenas por 22%, mas ainda dominando o mercado de castanha com casca (WADT et al., 2005a). Segundo os mesmos autores, por se tratar de um produto sem padrões de mercado bem definidos, as variações de preço são imprevisíveis, onde a questão de qualidade passou a ser um aspecto determinante nas negociações de compra, principalmente na Europa, onde a amêndoa é consumida *in natura* e qualquer contaminação na origem pode ser levada até o consumidor final.

No Acre a coleta de castanha-do-brasil é considerada uma atividade econômica de grande potencialidade, tanto no mercado local quanto internacional, onde a castanha *in natura* e a castanha beneficiada são exportadas principalmente para a Europa, Bolívia e alguns estados brasileiros como o Amazonas, Pará, além de algumas regiões do Sul e Sudeste do Brasil e Europa, mas precisamente a Itália (SEBRAE, 1995).

Conforme a SEAPROF (2000) a região do Alto Acre é citada como a de maior produtividade, embora a castanheira esteja presente em todo o vale do rio Acre e parte do Purus, não ocorrendo no vale do rio Juruá. Na região do Alto Acre destacam-se os municípios de Xapuri e Brasiléia onde se encontram grandes concentrações de castanheiras, seguindo-se os municípios da Regional do Baixo Acre (FIGURA 3).

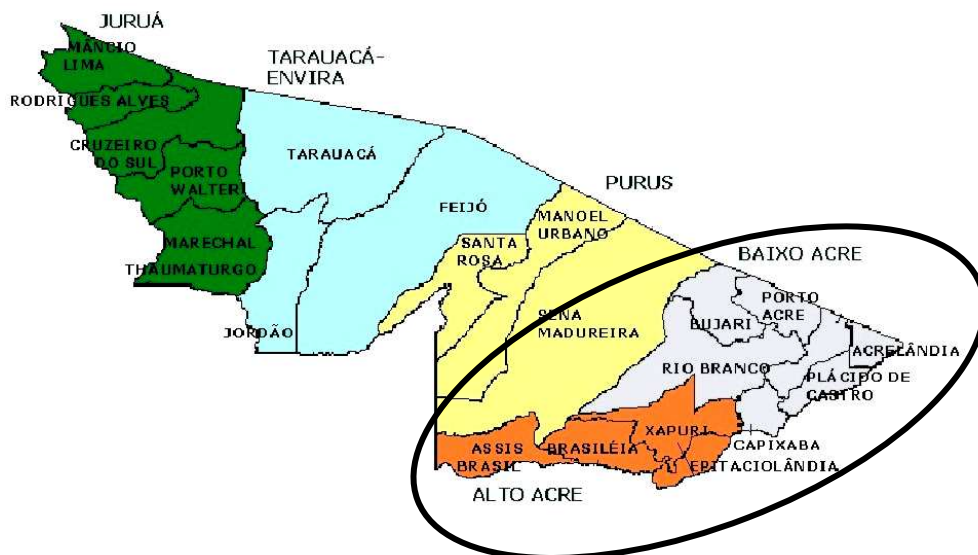


FIGURA 3. Mapa do estado do Acre – áreas de ocorrência de castanheiras.
FONTE: SEAPROF, 2000.

Segundo Dubois (1996), as atividades extrativistas resultaram num acúmulo de conhecimentos que possibilitaram uma evolução no manejo dos recursos naturais renováveis, que se tornou mais intensivo e abriu novas alternativas, entre as quais se destacam os tradicionais castanhais silvestres que integram um cenário de desenvolvimento sócio-econômico sustentável de maior importância para os estados produtores.

A elaboração de produtos enriquecidos com castanha-do-brasil em escala comercial e a difusão das suas propriedades nutritivas podem representar alternativa

de utilização da castanha no mercado interno além de diversificar os produtos no mercado e uma parte significativa da produção é exportada para os países desenvolvidos, onde se tornam matérias-primas para a elaboração de biscoitos (“cookies”), sorvetes, chocolates entre outros (SOUZA, et al., 2001).

O extrativismo representa uma atividade importante para as populações que habitam a floresta amazônica, estimulando o uso sustentável dos recursos naturais renováveis, bem como o desenvolvimento social com a preservação, evitando assim a destruição da floresta e a ameaça ao equilíbrio ecológico e do ambiente (FAO, 2008).

Dessa forma, Pimentel et al. (2007) citam que no caso da castanha-do-brasil ser comercializada *in natura*, políticas de preços mínimos devem ser implementadas, para promover a sustentabilidade da cadeia produtiva, além de outras políticas de incentivo à atividade, as quais possibilitariam a implantação de cultivos comerciais da castanheira.

A inserção econômica de produtos florestais não madeireiros, como a castanha-do-brasil, em um mercado mundial de estrutura monopolista, poderá ser alcançado pela implantação de atividades básicas e estruturais no sistema de produção, pesquisa, desenvolvimento de novos produtos e ampliação dos investimentos de microcréditos à pequenos e médios produtores, no sentido de capitalizar as diversas associações e/ou cooperativas e empreendedores particulares (VILHENA, 2004).

2.4 CONTAMINAÇÃO DA CASTANHA-DO-BRASIL POR FUNGOS PRODUTORES DE AFLATOXINA

Segundo Pas (2004) e Frank (1981) as castanhas-do-brasil podem ser atacadas por bolores já na árvore ou a partir do momento em que os ouriços entram em contato com o solo. Por apresentar um porte elevado (30 a 50 metros de altura) as árvores não permitem a colheita dos frutos que caem irregularmente. A umidade relativa do ar (UR) e temperaturas altas, bem como sistemas de armazenagem precários favorecem o desenvolvimento de fungos filamentosos que podem penetrar na casca em condições de UR superior a 75 %.

As espécies do gênero *Aspergillus*, são produtoras de micotoxinas, denominadas aflatoxinas. Esta informação é importante sob dois aspectos: o econômico, onde o alimento contaminado e deteriorado leva a perdas econômicas consideráveis, pela rejeição do produto no mercado interno ou externo e o de saúde pública, mais importante ainda, por ser um agente de toxinfecção alimentar a longo ou curto prazo. Porém a presença do fungo não implica, obrigatoriamente, em produção de micotoxina (LEITE; SOUZA, 2002; PEREIRA et al., 2002).

Aspergillus flavus e *Aspergillus parasiticus*, espécies mais importantes produtoras de aflatoxina, são saprófitas naturais do solo e ar, e em condições ideais são capazes de contaminar os alimentos. A ocorrência e magnitude da contaminação por essas micotoxinas variam de acordo com os fatores geográficos e sazonais, com as condições locais de crescimento do vegetal e ainda com as práticas de colheita e estocagem utilizadas. As culturas em áreas tropicais e subtropicais como o Brasil estão mais sujeitas a contaminação, pois as melhores condições para o desenvolvimento dos fungos e, conseqüentemente, para a produção das aflatoxinas são encontradas em áreas com alta temperatura (25 a 30°C) e umidade relativa elevada (80% a 90%) (BULLERMAN et al., 1984).

A aflatoxina é uma substância produzida principalmente pelos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, considerada cancerígena para humanos e animais, segundo a Agência Internacional de Pesquisa do Câncer - AIPC (FAO, 2006) e Oliveira e Germano (1997) citam que constituem importantes fatores de risco, com provável interação sinérgica com o vírus da hepatite B, para o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular em populações expostas.

As espécies *flavus*, *parasiticus* e *nomius* são as produtoras de aflatoxina, destacando-se as duas primeiras como mais importantes. O *Aspergillus flavus* produz apenas os tipos de aflatoxina B₁ e B₂ e o *Aspergillus parasiticus* produz os tipos B₁ e B₂ e G₁ e G₂ (JOHNSON, 2006). Dentre as micotoxinas existentes, as aflatoxinas são as que podem causar maiores danos aos seres humanos e animais, pela sua alta toxidez e ampla ocorrência, possuindo propriedades carcinogênicas, mutagênicas, teratogênicas (SYLOS; RODRIGUEZ-AMAYA, 1996) e imunossupressoras (NORDIN; LUCHESE, 1998). Estes efeitos sofrem influência do estado nutricional, sexo, idade, exposição a outros agentes químicos, dose e período de exposição à toxina, espécie, frequência e composição da dieta (AMADO, 1999).

São metabólitos secundários, aparentemente sem qualquer função no metabolismo normal dos fungos e produzidos, ainda que não exclusivamente, na medida que o fungo atinge a maturidade (FREIRE et al., 2007)

Esses fungos têm sido reconhecidos há muito tempo como contaminadores principais de produtos orgânicos. Por serem comuns do solo, pode contaminar uma larga escala de produtos agrícolas, cuja medida ideal de controle é a prevenção do crescimento do fungo e da produção da toxina (FERREIRA et al., 2006).

Para Taniwaki et al. (1993), a produção de toxina dá uma certa vantagem seletiva ao organismo produtor e está relacionada às condições ambientais, onde ocorre interação entre o ambiente e o microrganismo.

Ao detectar a presença de fungos nos alimentos, os países importadores, passaram a estabelecer padrões e níveis de contaminação aceitáveis quanto à presença de micotoxinas, instituídos por meio da elaboração de legislações cada vez mais rígidas, no que dizer respeito aos níveis máximos permitidos, onde os valores variam conforme o país, os quais flutuam para aflatoxinas totais de 1 µg/kg na França, 30 µg/kg no Brasil e em outros países (FREIRE et al., 2007; FAO, 2006; CASTRILLON; PURCHIO, 1988).

No Brasil a Legislação vigente para a castanha-do-brasil em casca e descascada para exportação ou importação ainda é a descrita na Resolução CNNPA/MS nº 34/76, que dispõe sobre os limites de aflatoxina para alimentos em geral destinados ao consumo humano, na qual é fixado pela Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos - CNNPA a tolerância de 30 ppb.kg⁻¹ para as aflatoxinas, resultado obtido pela soma dos conteúdos das aflatoxinas B₁ e G₁, determinadas segundo as técnicas que vierem a ser recomendadas pelo laboratório credenciado (BRASIL, 1977).

Em nível internacional, a Comissão do Codex Alimentarius tem colocado em discussão o problema da contaminação da castanha-do-brasil, tendo em vista que é a única árvore que produz nozes entre as principais culturas comercializadas que emprega o extrativismo como atividade de produção (FAO, 2008).

A contaminação é favorecida pelo clima da floresta amazônica (equatorial, quente e úmido, temperatura média de 26 °C e umidade relativa entre 80 a 95%), principalmente durante a estação chuvosa e na particularidade do extrativismo, estas condições não podem ser controladas, o que origina efeitos diretos ou indiretos sobre o crescimento de fungos toxigênicos e a produção de aflatoxina

(FAO, 2008; PACHECO; SCUSSEL, 2006; WADT et al., 2005; CARTAXO et al., 2003). Os fungos podem entrar em contato com a castanha a partir do momento em que os ouriços caem no solo, durante a coleta, quebra e transporte para o armazém (PAS, 2004).

Conforme Duarte (2006), os aspectos climatológicos no Leste do estado do Acre, área de maior concentração de castanheiras, demonstram que a estação chuvosa se estende de outubro a abril, sendo fevereiro o mês mais chuvoso. Durante a época das chuvas a umidade relativa é alta, em torno de 88 % e a oscilação diária varia entre 55 e 98 %. Nestes meses as temperaturas mínimas e máximas podem variar entre 30,9 a 32,7 °C.

Para Arrus et al. (2005) a umidade relativa de 97% e temperaturas na faixa de 25-30 °C promovem a produção de aflatoxina em castanha-do-brasil. Os autores ressaltam que infelizmente, estas condições são representativas da época da coleta.

O tratamento pós-colheita tem uma influência importante sobre a microflora de castanhas que são habitualmente colonizados por vários fungos e não por uma única espécie (BAYMAN et al., 2002).

No estudo conduzido por Marklinder et al. (2005) foi esclarecido que a castanha-do-brasil é um dos poucos frutos de casca endurecida que os consumidores podem visualmente separar as sadias das deterioradas antes de consumir e, portanto, proteger-se contra a exposição a níveis elevados de aflatoxinas.

Kumar et al. (2007) recomendam um sistema de gestão envolvendo estratégias de prevenção, controle, práticas de fabricação e de controle de qualidade em todas as fases de produção, desde o campo até o consumidor final para que o efeito em cada etapa da cadeia produtiva, ou seja, pré-colheita, colheita e processamento pós-colheita diminua os riscos de contaminação das amêndoas.

A preocupação com o desenvolvimento sustentável na Amazônia vem provocando uma ampla e heterogênea aliança em torno da defesa da floresta amazônica na construção de novas alternativas de desenvolvimento econômico por meio da gestão dos recursos naturais. No caso da castanha-do-brasil as atividades compatíveis com essa premissa são as inovações em manejo da castanheira, a regeneração, o armazenamento, o beneficiamento e formulação de produtos derivados (GONZAGA, 2006).

3 CAPÍTULO I

**FUNGOS AFLATOXIGÊNICOS NA CASTANHA-DO-BRASIL SOB CONDIÇÕES
DA FLORESTA**

3.1 RESUMO

A castanha-do-brasil é um produto extrativista importante para a economia da Amazônia. Entretanto, é susceptível à contaminação por fungos comuns a microbiota do ambiente de produção. O objetivo deste trabalho foi monitorar a influência da aplicação das boas práticas extrativistas em condições da floresta sob o crescimento de fungos aflatoxigênicos na castanha-do-brasil. Amostras de castanha provenientes de ouriços com 0 a 5, 15 a 20 e 60 dias após a queda e da etapa de amontoa e quebra foram coletadas em três castanhais para análises quanto à atividade de água, identificação e quantificação de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, outros fungos e aflatoxinas as quais foram realizadas respectivamente nos Laboratórios de Alimentos da Embrapa Acre em Rio Branco e de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar – LACQSA do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. A temperatura e umidade relativa do ambiente foram registradas durante as coletas. A atividade de água e temperatura da amêndoa foram aferidas após o descasque no laboratório. Um total de 54 amostras foram analisadas. As médias observadas de temperatura do ambiente, umidade relativa, atividade de água, temperatura da amêndoa, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, outros fungos e aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂, para as épocas de coleta foram respectivamente entre 24,65 a 25,38 °C, 96,98 a 100%, 0,97 a 0,98, 24,20 a 25,06 °C, 4,37 a 19,44 ufc.g⁻¹, 879,34 a 4.355,93 ufc.g⁻¹, 0,04 a 1,36 µg.kg⁻¹, 0,01 a 0,1 µg.kg⁻¹, 0,03 a 0,74 µg.kg⁻¹, 0,05 µg.kg⁻¹. Quanto aos tipos de seleção na amontoa os resultados encontrados foram de 24,85 a 25,05 °C, 99,17 a 99,54 %, 0,97, 24,10 a 24,54 °C, 3,89 a 99,09 ufc.g⁻¹, 3.528,16 a 38.618,91 ufc.g⁻¹, 0,05 a 115,69 µg.kg⁻¹, 0,01 a 0,09 µg.kg⁻¹, 0,06 µg.kg⁻¹. A temperatura, umidade relativa do ambiente, atividade de água e temperatura das amêndoas estão dentro da faixa para germinação, crescimento e produção de aflatoxina. O retardamento na coleta dos ouriços é favorável ao crescimento de fungos aflatoxigênicos. Aflatoxinas em baixos níveis foram detectadas nas condições de floresta, inclusive em amostras descartadas onde não houve o crescimento do *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*.

Palavras - chave: Castanha-do-brasil, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, Aflatoxina, boas práticas.

ABSTRACT

The Brazil nut is an important product for the extractive economy of the Amazon. However, it is susceptible to contamination by fungi common to the microbial production environment. The research aimed to monitor the impact of application of good practices in extrativism conditions of the forest in the fungi aflatoxigenic growth in Brazil nut. Samples of each fixed with 0 to 5, 15 to 20 and 60 days after the fall and the stage of fruits accumulation stages and drop in three nuts were collected for analysis on the water activity, identification and quantification of *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, other fungi and aflatoxins which were held respectively in the Embrapa Food Laboratories in Rio Branco, Acre and Quality Control and Safety – LACQSA the Department of Agriculture, Livestock and Supply. The temperature and relative humidity (rh) of the environment were recorded during the collections. The water activity and temperature of almonds were measured after peeling in the laboratory. A total of 54 samples were analyzed. The average temperature observed in the environment, relative humidity, water activity, temperature of almonds, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, other fungi and aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂, to the times of collection were respectively from 24.65 to 25.38 °C, 96.98 to 100 %, 0.97 to 0.98, 24.20 to 25.06 °C, 4,37 a 19,44 ufc.g⁻¹, 879.34 a 4355.93 ufc.g⁻¹, 0.04 to 1.36 µg.kg⁻¹, 0.01 and 0,1 mg.kg⁻¹, 0.03 to 0.74 µg.kg⁻¹, 0.05 µg.kg⁻¹. As for the types of of fruits accumulation stages in the selection results were 24.85 to 25.05 °C, 99.17 to 99.54 %, 0.97, 24.10 to 24.54 °C, 3.89 to 99.09 ufc.g⁻¹, 3528.16 to 38618.91 ufc.g⁻¹, 0.05 to 115.69 µg.kg⁻¹, 0.01 to 0.09 µg.kg⁻¹, 0.06 mg. kg⁻¹. The temperature and relative humidity of the environment, water activity and temperature of almonds are within the range for germination, of aflatoxin growth and production. The delay in collection of each fixed is favorable to the growth of fungi aflatoxigenic. Aflatoxins at low levels were detected under the conditions of forest, including discarded in samples where there were growth of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*.

Keys words: Brazil nut, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, Aflatoxin, Good practices.

3.2 INTRODUÇÃO

Nativa da região Amazônica, a castanheira (*Bertholletia excelsa*, H. B.K.) é considerada uma das maiores riquezas e responsável pelo sustento de aproximadamente 4000 mil famílias que residem na floresta (SEAPROF, 2000). Sua produção é extrativista contribuindo para a economia dos estados produtores por ser um produto que tem participação expressiva na geração de divisas para a região, com as exportações para os mercados interno e externo (SOUZA et al., 2004; MULLER, et al., 1995).

A amêndoa de castanha-do-brasil é muito apreciada no mercado internacional por apresentar características nutricionais importantes como: lipídios (67,3%), proteínas de alto valor biológico (14,3%) e de fibras totais (8%), além de outro constituinte indispensável a uma boa alimentação, o selênio, antioxidante que vem sendo referido na prevenção de câncer (SOUZA; MENEZES, 2004; SOUZA, 2003).

A contaminação por aflatoxina em castanha-do-brasil vem afetando diretamente a economia das regiões produtoras nos últimos anos. Desde 2003, a Comunidade Européia, um dos principais compradores de castanha-do-brasil proibiu a comercialização deste produto, por estar fora dos padrões de qualidade permitidos pela Europa (CE, 2003).

A aflatoxina é uma substância produzida principalmente pelos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, considerada cancerígena para humanos e animais, segundo a Agência Internacional de Pesquisa do Câncer - AIPC e a legislação sobre micotoxinas apresenta diferentes limites para aflatoxinas variando de 1 a 30 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, sendo que a França é um dos países com menor teor permitido de 1 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ e o Brasil é um dos países com maior limite de tolerância de aflatoxina em alimentos, 30 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (FAO, 2006). São compostos severamente tóxicos, imunossupressores, mutagênicos, teratogênicos e carcinogênicos. O principal órgão atingido pela toxicidade e carcinogenicidade é o fígado (AYCICEK; AKSOY; SAYGI, 2005).

Na produção extrativista da castanha não é possível o uso de tecnologias avançadas que possam melhorar ou garantir sua qualidade. Após a queda dos frutos na floresta, nos pontos de coleta e durante o transporte terrestre e fluvial, as condições são favoráveis ao crescimento de fungos, capazes de penetrar na amêndoa por meio da casca (FRANK, 1981).

Neste contexto o objetivo deste trabalho foi monitorar a influência da aplicação das boas práticas extrativistas em ambiente da floresta sob o crescimento de fungos aflatoxigênicos na castanha-do-brasil.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Embrapa, em Rio Branco, Acre, Brasil, localizada no Km 14, da BR 364. As amostras de castanha-do-brasil foram coletadas no Seringal Porongaba, no município de Brasiléia, Acre, localizado à 250 Km de Rio Branco.

O Seringal Porongaba situa-se na área extrativista de conservação de uso sustentável, Reserva Chico Mendes, com acesso pelo do Km 5 da BR 317 (sentido Brasiléia/Assis Brasil). As coletas na floresta seguiram as etapas realizadas pelos extrativistas no sistema de produção atual.

3.3.1 Caracterização do experimento

Para a definição do local de estudo foram identificadas pela Embrapa Acre e Secretaria de Estado de Extensão Agroflorestal e Produção Familiar – SEAPROF comunidades que já aplicavam na coleta as boas práticas extrativistas (BPE) previamente recomendadas no Manual de Segurança e Qualidade para a castanha-do-brasil (PAS, 2004).

A amostragem seguiu os métodos contidos no Regulamento da Comunidade Européia N° 401/2006 (CE, 2006), onde são determinados o peso da amostra global² e número de amostras elementares³ a serem coletadas em função do peso do lote⁴, como exemplificado no QUADRO 1.

² Amostra global: a totalidade das amostras elementares colhidas no lote.

³ Amostra elementar: quantidade de material recolhido num só ponto do lote.

⁴ Lote: quantidade identificável entregue de uma vez, que apresenta características comuns e designada para efeitos da aplicação do método de amostragem.

QUADRO 1. Número e peso de amostras coletadas em função do volume do lote

Peso do lote (toneladas)	Número de amostras elementares	Peso da amostra global (kg)
≤ 0.1	10	3
$> 0.1 - \leq 0.2$	15	4.5
$> 0.2 - \leq 0.5$	20	6
$> 0.5 - \leq 1$	30	9

FONTE: Adaptado do Regulamento da Comunidade Européia N° 401/2006 (Jornal Oficial da União Européia, 2006).

3.3.2 Coletas das amostras de castanha-do-brasil

O plano de amostragem foi definido após a definição junto à comunidade, das etapas de produção existentes na base da cadeia produtiva ou Fluxograma de Produção na floresta (APÊNDICE A).

As amostras de castanha-do-brasil com casca ou *in natura* foram coletadas em três castanhais no período de Janeiro a Março de 2008. As coletas foram programadas conforme a disponibilidade dos extrativistas quanto ao volume de produção nos castanhais e sem alterações na sua rotina de trabalho. Na floresta acompanharam-se duas etapas de coleta assim consideradas:

Etapa 1 – Época de coleta de ouriços com até cinco dias após a queda (recém caídos), de ouriços com 15 a 20 dias de queda e de ouriços com 60 dias de permanência na floresta após a queda (2 meses), que respectivamente foram chamados épocas de coleta 1, 2 e 3.

Etapa 2 – Quebra dos ouriços na amontoa com coleta de três tipos de seleção que foram sem seleção prévia, selecionadas e descartadas que concomitantemente foram denominados tipos de seleção 1, 2 e 3.

Em cada ponto de coleta na floresta aferiu-se com um termohigrômetro digital a porcentagem da umidade relativa do ar (UR) e temperatura do ambiente em °C. Na medida em que se obtinha a amostra as aferições de temperatura e umidade relativa eram feitas.

A quantidade de ouriços coletados em cada castanhal e etapa na floresta foram definidas considerando-se o lote mínimo a ser trabalhado pelo produtor (< 100 kg) e que cada ouriço tem em média 150 g de castanha. Os produtores marcaram com tinta óleo e pincel os ouriços, após visitas diárias no castanhal. Para os ouriços com 0 a 5, 15 a 20 e sessenta dias de permanência no solo, consideraram-se lotes

de 20 ouriços (± 3 kg) e três repetições por castanhal. Na etapa de amontoa para obtenção das amostras sem seleção, foram retirados somente os pedaços de casca e opérculos (umbigos). Para obter castanhas selecionadas foram retiradas as castanhas que apresentavam aspecto visual que comprometiam sua qualidade como as podres, chochas, cortadas e com crescimento visível de mofos sendo considerados três lotes de 20 ouriços (± 3 kg), três lotes de 180 ouriços (± 27 kg) e três lotes de castanhas descartadas (≤ 3 kg) para cada tipo respectivamente, em cada castanhal. A FIGURA 4 ilustra a obtenção de uma amostra global nas etapas de coleta e o QUADRO 2, a síntese das etapas de coleta.

As amostras de castanha-do-brasil *in natura* com casca foram acondicionadas em sacos de poliestireno e envolvidas com saco plástico para proteção contra a ação da chuva durante o transporte até o laboratório.

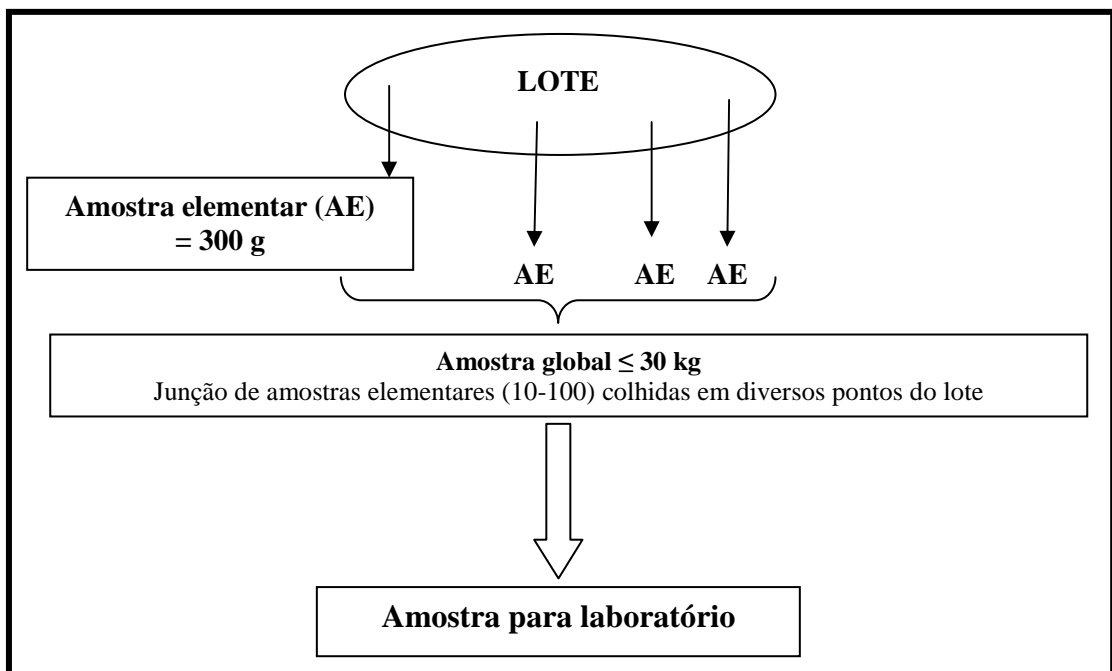


FIGURA 4 – Esquema de amostragem dentro de um lote para formação de uma amostra global.

3.3.3 Preparo da amostra para análise

No laboratório, as amostras foram homogeneizadas em caixa plástica e pesadas. O descascamento foi feito por meio de máquina de quebra manual, de forma asséptica, porém sem desinfecção superficial das castanhas, exceto aquelas que se encontravam com excesso de sujidades e muito úmidas que receberam uma

lavagem rápida com água deionizada e foram secadas imediatamente com papel absorvente. Depois de descascadas e sem a retirada das castanhas que apresentavam sinais de deterioração ou fungos visíveis, procedeu-se outra homogeneização manual e retirou-se três amêndoas para análise de atividade de água. Em seguida, foram moídas a seco em moinho tipo CAF, utilizando-se sequencialmente os discos de 5 e 3 mm para permitir uma melhor homogeneização da massa.

Depois de trituradas, retirou-se da amostra 100 g para análise microbiológica, sendo que 40 g foram destinadas à análise imediata para a quantificação de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e outros fungos. O restante da amostra foi armazenado em geladeira com temperatura entre 4 a 8 °C, para eventual confirmação dos resultados depois da leitura realizada entre 42 a 48 horas após incubação.

QUADRO 2. Síntese das etapas de coleta da castanha-do-brasil na floresta, Brasília, Acre, 2008.

Etapa de coleta	Descrição do estudo	População	Lote	Repetição por lote	Número de amostras coletadas
<p>3</p> <p>Etapa 1 :</p> <p>Época de coleta</p> <p>1.1: Ouriços com 0 a 5 dias após a queda (novos ou recém caídos)</p> <p>1.2: Ouriços com 15 a 20 dias após a queda (velhos)</p> <p>1.3: Ouriços com 60 dias (2 meses) após a queda</p>	Impacto da intensificação da coleta	3 castanhais diferentes	<p>1</p> <p>3 lotes por população (castanhal) e ponto</p> <p>1.1: lote = ouriços recém caídos de várias árvores próximas no castanhal</p> <p>1.2: lote = ouriços velhos caídos de várias árvores próximas no castanhal</p> <p>1.3: lote = ouriços caídos há 2 meses</p>	<p>1</p> <p>3 amostras globais por lote</p>	<p>27</p> <p>60 ouriços coletados por ponto</p>
<p>3</p> <p>Etapa 2 :</p> <p>Amontoa e quebra dos ouriços</p> <p>2.1: castanhas sem seleção</p> <p>2.2: castanhas selecionadas</p> <p>2.3: castanhas descartadas</p>	Impacto da seleção das castanhas	3 castanhais diferentes	<p>3</p> <p>3 lotes por população (castanhal) e ponto</p> <p>2.1: lote = 20 ouriços de cada lote antes da seleção</p> <p>2.2: lote = castanhas selecionadas</p> <p>2.3: lote = castanhas descartadas</p>	<p>1</p> <p>1 amostra global por lote</p>	<p>27</p> <p>3 amontoas de 150-200 ouriços por castanhal</p>

FONTE: Adaptado do Projeto Safenut/STDF, 2008.

Seguindo as recomendações de preparo da massa para análise de aflatoxina por Cromatografia Líquida de Alta Performance - HPLC e Imuno-solvente Ligado à Enzima - Elisa do Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar – LACQSA do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/MG, foi adicionada ao restante da massa de castanha água deionizada para facilitar a redução das partículas do material até atingir uma granulometria ≤ 20 mesh. A aferição do tamanho indicado de partícula foi feita por meio de uma peneira. O tipo de equipamento utilizado na trituração da massa foi de acordo com o peso da amostra:

Moinho Tecnal TE-631 para amostras < 150 g

Liquidificador Brastemp para amostras > 150 g e < 300 g

Liquidificador industrial para amostras > 300 g e $< 3,5$ kg

O tempo de homogeneização variou entre 15 a 35 minutos deixando um intervalo na metade do tempo (7 - 8 min) para homogeneizar a massa.

A temperatura da amostra foi verificada sempre na metade e no final do preparo, não podendo ultrapassar 60 a 70 °C, sendo a temperatura de 50 °C considerada como ótimo para a viabilidade do processo.

Alíquotas de 500g para análises de aflatoxinas por HPLC no LACQSA/MG foram retiradas aleatoriamente de diferentes pontos da massa e identificadas com etiqueta contendo o número da amostra e a data de coleta e armazenadas a $- 18$ °C.

3.3.4 Análise microbiológica para quantificação de fungos

A técnica utilizada para análise de fungos foi a de plaqueamento com diluição em superfície, de acordo com Pitt et al. (1983). Após a pesagem de 40 g da amostra, as diluições iniciais (10^{-1}) foram preparadas com água peptonada a 0,1 % e deixadas imersas por 30 minutos a temperatura ambiente antes da homogeneização para distribuição nas demais diluições (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}). Para inoculação em placas foi utilizado o meio seletivo Agar *Aspergillus flavus parasiticus* – AFPA (9 mL/placa) adicionado de antibióticos clorotetraciclina e cloranfenicol (1 mL da solução para 100 mL de meio).

Entre 42 a 48 horas após a incubação das placas em estufa (BOD) à temperatura de 30 °C foi realizada a leitura das placas, contando-se as colônias que apresentaram reverso de cor alaranjada como *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. As demais colônias foram consideradas como outros fungos e neste caso a maior contagem considerada foi $< 100 \text{ ufc.g}^{-1}$. De forma a detectar níveis $< 100 \text{ ufc}$ por grama, considerou-se na contagem a diluição inicial 10^{-1} . Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônia por grama do produto (ufc.g^{-1}).

3.3.5 Definição do modelo estatístico

Nos experimentos de época de coleta e de tipos de seleção na amontoa o delineamento estatístico utilizado foi em blocos ao acaso com três repetições (castanhais). Para a época de coleta, avaliaram-se três tempos em dias (0 a 5, 15 a 20 e 60). Já na amontoa foram avaliados os tipos de seleção (castanhas sem seleção, castanhas selecionadas e castanhas descartadas). Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000) e as médias comparadas por meio do teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para analisar as variáveis incidência de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e outros fungos observou-se a necessidade de transformação em raiz quadrada de $X + 1.0 - \text{SQRT} (X + 1.0)$ e $\text{Log}(X)$ respectivamente. Na análise dos resultados da quantificação de aflatoxina, considerou-se metade do limite de detecção encontrado, sendo que os valores obtidos foram transformados em raiz quadrada de $X + 1$. Avaliou-se, ainda, a correlação entre as variáveis por meio do coeficiente de Pearson, utilizando o programa SAS 9.1 (SAS INSTITUT, 2003).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nas análises da castanha da floresta estão apresentados nas TABELAS 1 e 2.

Não foram observadas diferenças significativas para as temperaturas do ambiente de coleta, da amêndoa, atividade de água e crescimento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* (AFPA) e outros fungos nas épocas de coleta, assim como nos pontos de seleção da amontoa (sem seleção, selecionadas e descartadas).

Entretanto observou-se efeito significativo ($p \leq 0,01$) para as épocas de coleta quanto à umidade relativa do ar (UR).

O coeficiente de variação foi baixo para as variáveis temperaturas, umidade relativa e atividade de água (APÊNDICE B), demonstrando a confiabilidade das informações geradas. No caso da presença de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* e outros fungos, observou-se coeficientes de elevado valor.

Nas amostras coletadas na amontoa, referentes às castanhas sem seleção, selecionadas e descartadas não foram encontradas diferenças significativas para nenhuma das variáveis analisadas (TABELA 2).

Quanto à quantificação e identificação de aflatoxina os resultados para as épocas de coleta e tipos de seleção na amontoa podem ser observados nas TABELAS 3 e 4.

TABELA 1 – Valores médios observados nas variáveis analisadas nas diferentes épocas de coleta de castanha-do-brasil na floresta, floresta, Brasiléia, Acre, Brasil, no período de janeiro a março do ano de 2008.

Tratamento	Época em dias após queda do ouriço	Variáveis analisadas									
		Temperatura ambiente (°C)	Umidade relativa (%)	Atividade de água	Temperatura da amêndoa (°C)	AFPA (ufc.g ⁻¹)	Outros fungos (ufc.g ⁻¹)	Aflatoxinas (µ.kg ⁻¹)			
								B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
1	0 a 5	25,38 a	96,98 a	0,97 a	24,32 a	13,8889 a	4.345,9338 a	0,1683 a	0,0155 a	0,0867 a	0,0100 a
2	15 a 20	24,70 a	98,11 ab	0,98 a	25,06 a	4,3750 a	4.209,6124 a	0,0220 a	0,0050 a	0,0081 a	0,0050 a
3	60	24,65 a	100,00 b**	0,98 a	24,20 a	19,4444 a	879,3430 a	0,0230 a	0,0055 a	0,0050 a	0,0050 a
Média		24,91	98,37	0,98	24,50	12,8846	3.231,7756	0,0728	0,0088	0,0342	0,0067
CV (%)		3,81	1,88	2,13	5,89	151,35	25,81	10,11	0,91	6,13	0,44

(i) Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade

(ii) Análise de variância apresentada no APÊNDICE B

(iii) ** significativo a 1%

TABELA 2 – Valores médios observados nas variáveis analisadas nos tipos de seleção da amontoa da castanha-do-brasil na floresta, Brasiléia, Acre, Brasil, no período de janeiro a março do ano de 2008.

Tratamento amontoa tipos de seleção das castanhas	Variáveis analisadas									
	Temperatura ambiente (°C)	Umidade relativa (%)	Atividade de água	Temperatura da amêndoa (°C)	AFPA (ufc.g ⁻¹)	Outros fungos (ufc.g ⁻¹)	Aflatoxinas (µ.kg ⁻¹)			
							B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
1 Sem seleção	25,05 a	99,17 a	0,97 a	24,54 a	3,8889 a	3.528,1645 a	0,0150 a	0,0050 a	0,0050 a	0,0050 a
2 Seleccionadas	25,03 a	99,54 a	0,97 a	24,29 a	99,0909 a	7.304,5838 a	0,0389 a	0,0089 a	0,0127 a	0,0050 a
3 Descartadas	24,85 a	99,46 a	0,97 a	24,10 a	5,5555 a	38.618,9124 a	16,5507 a	0,2221 a	0,0271 a	0,0050 a
Média	24,98	99,39	0,97	24,31	36,1784	16.483,8869	4,6536	0,0672	0,0140	0,0050
CV (%)	4,74	1,00	2,46	5,44	141,05	24,90	138,02	11,30	1,53	- (***)

(i) Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade

(ii) * Significativo a 5 % de probabilidade;

(iii) Análise de variância apresentada no APÊNDICE C;

(iv) (***) A análise de variância para os tipos de aflatoxina não detectou variação no teor de aflatoxina G₂ entre as amostras (APÊNDICE F).

4.1 ÉPOCAS DE COLETA DE CASTANHA NA FLORESTA

Atualmente, à forma tradicional e secular de coleta de castanhas, que na maioria das áreas produtoras ainda é realizada apenas no final da safra após a queda de todos os ouriços, pratica-se a colheita mais intensa efetuada conforme acúmulo no solo dos frutos que caem da árvore, resultando em atividades quinzenais ou mensais pelos extrativistas. Neste período, as chuvas são intensas e dificultam as atividades de coleta sendo necessária a adoção de manejo adequado para minimizar ou reduzir o crescimento microbiano na base da cadeia produtiva (etapas de amontoa, quebra, transporte da floresta para o armazém, etc).

As boas práticas extrativistas – BPE consistem nas recomendações e técnicas que devem ser aplicadas antes e depois da etapa de quebra do ouriço na floresta com objetivo de reduzir a carga microbiana que pode alcançar níveis muito elevados nas etapas seguintes de produção.

4.1.1 Análises das variáveis temperatura e umidade relativa do ar na floresta

As médias de temperatura ambiente não diferiram estatisticamente nas três épocas de coleta, não ocorrendo o mesmo quanto à umidade relativa do ar onde observou-se diferenças significativas ($p \leq 0,01$) aos 60 dias com acréscimo de 96,98 % para 100,00 % (GRÁFICO 1).

De acordo as leituras realizadas nos pontos de coleta de amostras, as médias de temperatura do ambiente e umidade relativa do ar, fatores ambientais críticos segundo informações de Arrus et al. (2005), se mantiveram dentro dos limites ideais para a produção de aflatoxina com 24,65 a 25,38 °C e 96,98 a 100%, respectivamente.

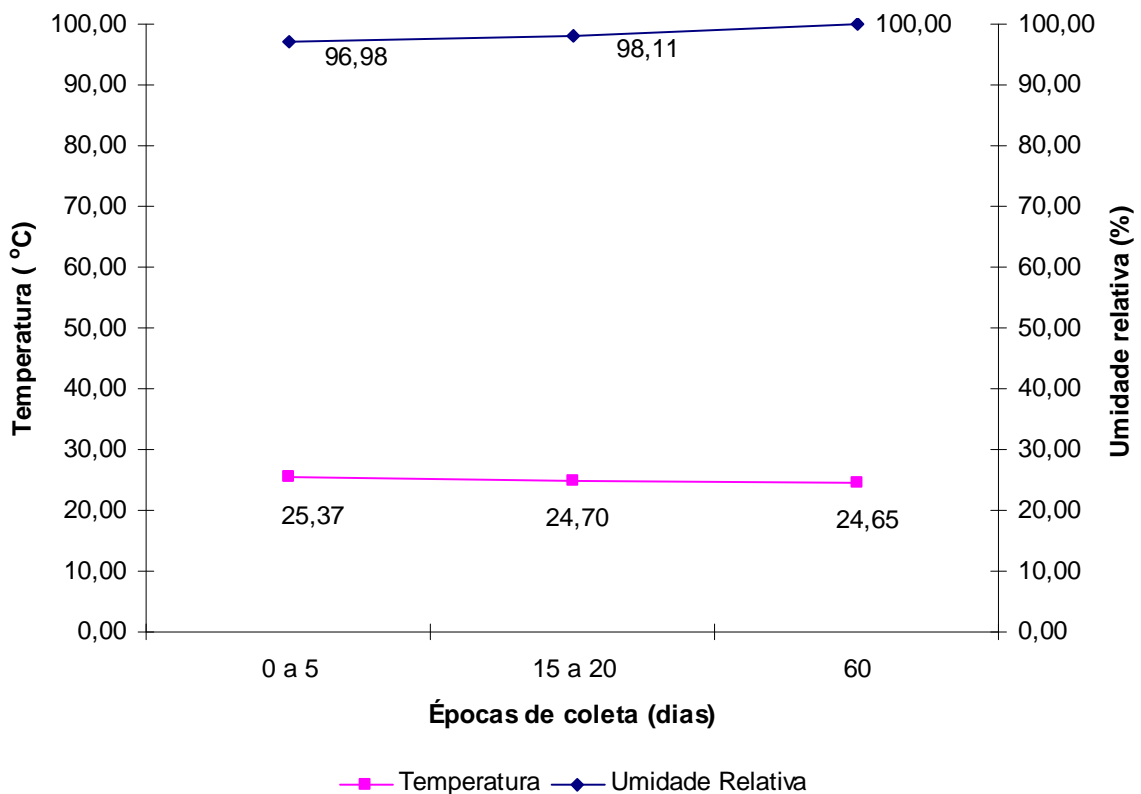


GRÁFICO 1 – Valores médios de temperatura e umidade relativa do ar na durante a coleta de amostras nas três épocas realizadas no município de Brasiléia - Acre, nos meses de janeiro a março de 2008. (Análise de Variância no APÊNDICE B).

Para Austwick e Ayerst⁵ (1963) citados por Baptista et al. (2004) a temperatura ótima para o crescimento de *Aspergillus flavus* situa-se entre 29 a 35°C e a produção máxima de aflatoxinas por essa espécie ocorre a 24°C, não havendo produção em temperaturas menores que 13 e maiores que 42°C.

Segundo Pas (2004) e Frank (1981) em umidade relativa acima de 75% os fungos podem penetrar na casca e contaminar a amêndoa.

4.1.2 Temperatura, atividade de água e quantificação de fungos na amêndoa

Nas aferições de temperatura e atividade de água da amêndoa não foram encontradas diferenças significativas. As médias obtidas dessas variáveis para as três épocas de coleta da castanha podem ser observadas na TABELA 1.

⁵ AUSTWICK, P.K.C.; AYERST, G. Toxic products in groundnuts: groundnuts microflora and toxicity. **Chemistry and Industry**, v.2, p.55-63, 1963.

Os resultados das análises de quantificação de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* não apresentaram diferença significativa, porém observou-se uma maior contagem aos 60 dias, o que indica que a intensificação da coleta influencia na redução da população desses fungos. Observa-se uma possível relação de antagonismo entre a microbiota presente tendo em vista que nesta mesma época houve uma menor incidência de outros fungos nas amostras coletadas, com aumento, apesar de não significativo na população de fungos aflatoxigênicos como demonstrado no GRÁFICO 2.

Bayman et al. (2002) citam que uma explicação alternativa é que a contaminação por uma espécie de *Aspergillus* torna os frutos mais suscetíveis a outros *Aspergillus* e que existe um certo grau de antagonismo por exclusão competitiva entre *Penicillium* e os outros fungos.

A contaminação dos produtos agrícolas ocorre por meio do contato com os esporos do fungo presentes no ambiente, sobretudo no solo, durante os procedimentos de colheita e secagem (CHU, 1991). Possivelmente isto tenha favorecido à maior contaminação dos ouriços no solo.

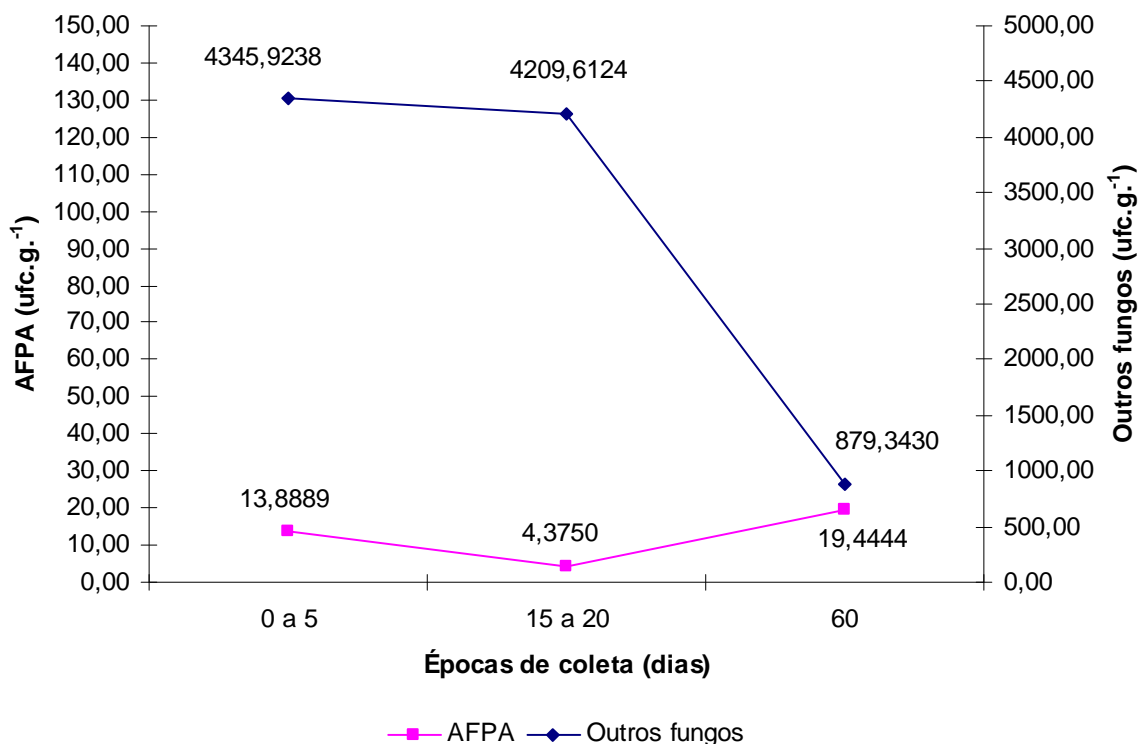


GRÁFICO 2 – Crescimento médio de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e outros fungos em castanhas coletadas após queda do ouriço na floresta, em Brasiléia, Acre, nos meses de janeiro a março de 2008. (Análise de Variância no APÊNDICE B).

Um estudo realizado por Simões (2004) mostrou que a presença fungos dos gêneros *Aspergillus* produtores de aflatoxina somente foi constatada em amostras provenientes de castanha sem manejo, com índice de contaminação das amostras por aflatoxina variando de 6,5 a 41,5 ppb e que a contaminação por outros microrganismos é muito maior e mais diversificada quando não há aplicação das boas práticas.

Os outros fungos estão relacionados com a deterioração da castanha e conseqüentemente na perda de volume da produção, e ao correlacionar os resultados encontrados para as variáveis analisadas, observou-se que o seu crescimento está diretamente relacionado com *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* e estes significativamente ($p \leq 0,05$) com a umidade relativa (APÊNDICE D).

4.1.3 Análises de quantificação e identificação de aflatoxina

Entre todas as amostras analisadas foram detectadas aflatoxinas nas três épocas de coleta, inclusive em amostras onde não houve crescimento de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* como pode ser observado na TABELA 3.

Olsen et al. (2008) estudando o relacionamento entre aflatoxina B₁ e G₁ em amostras de castanha-do-brasil com casca provenientes do Brasil, encontraram resultados que indicam que os grandes responsáveis pela produção de aflatoxina podem não ser fungos *Aspergillus flavus*, que produzem exclusivamente aflatoxinas do tipo B e sim o *Aspergillus nomius*, que são bons produtores de ambas as aflatoxinas B e G.

Os teores detectados foram abaixo do limite permitido pela Legislação de alimentos para consumo humano de alguns países como França (B₁ = 1 µg.kg⁻¹), Espanha (B₁ = 5 µg.kg⁻¹), União Européia (B₁+B₂+G₁+G₂=4 µg.kg⁻¹) e Brasil (B₁ + G₁ = 30 µg.kg⁻¹) (MICOTOXINAS, 2008; BRASIL, 1977).

TABELA 3 – Níveis de contaminação por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* (AFPA) e níveis de aflatoxina em amostras de castanha-do-brasil coletadas na floresta em três épocas de coleta após a queda do ouriço, nos meses de Janeiro a Março do ano de 2008, Brasiléia, Acre.

AFPA (ufc.g ⁻¹) e Tipos de aflatoxina (µg.kg ⁻¹)	Época (dias)								
	0 a 5								
	Repetições								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
AFPA	120,00	0,0	0,0	5,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
B ₁	0,05	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	1,36	<0,03	<0,03
B ₂	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,10	<0,01	<0,01
G ₁	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,74	<0,01	<0,01
G ₂	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,05	<0,01	<0,01
AFPA (ufc.g ⁻¹) e Tipos de aflatoxina (µg.kg ⁻¹)	15 a 20								
	Repetições								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
AFPA	0,00	0,00	0,00	0,00	15,00	NR	0,00	0,00	20,00
B ₁	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	0,07	NR	<0,03	<0,03	<0,03
B ₂	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	NR	<0,01	<0,01	<0,01
G ₁	0,03	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	NR	0,03	<0,01	<0,01
G ₂	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	NR	<0,01	<0,01	<0,01
AFPA (ufc.g ⁻¹) e Tipos de aflatoxina (µg.kg ⁻¹)	60 dias								
	Repetições								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
AFPA	0,00	0,00	0,00	175,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
B ₁	0,04	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	0,06
B ₂	<0,01	<0,01	<0,01	0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
G ₁	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
G ₂	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

NR = não realizada

Este resultados estão de acordo com Pitt e Hocking⁶ (1997) e Osborne⁷ (1982) citados por Ferreira et al. (2006) os quais citam que o crescimento de

⁶ PITT, J.L.; HOCKING, A. D. Fungi and food spoilage. **Blackie Academic e Professional**: London, 1997, 175p.

⁷ OSBORNE, B. G. Mycotoxins and the Cereal Industry - A Review. **Journal of Food Technology**, 1982, v 17: 1-9.

Aspergillus flavus e a biosíntese da aflatoxina depende do substrato, da umidade, da temperatura, do pH, da aeração local e da microflora competitiva, entretanto a ausência de fungos em alimentos suspeito, não significa ausência de micotoxinas, ou seja, o fungo pode estar ausente, mas a toxina pode estar presente e ativa.

Para Freire et al. (2000) é importante notar que as condições adequadas para o crescimento e germinação de fungos (atividade de água e temperatura) não são as mesmas para produção de micotoxinas. Dessa forma, efeitos sobre essas variáveis podem ser diferentes para duas toxinas produzidas pela mesma espécie e por uma toxina produzida por duas espécies diferentes.

Para Baptista et al. (2004), o crescimento de fungos toxigênicos e a produção de micotoxinas estão relacionados com fatores físico-químicos e biológicos.

Pacheco (2007) coloca que a presença de aflatoxina em castanha-do-brasil é heterogênea e diversos fatores podem agir isoladamente ou em associação para determinar as condições ideais de produção, principalmente onde as condições são extremamente dinâmicas a cada safra, sendo essencial os controles de caráter preventivo para diminuir a contaminação por fungo e produção da toxina.

Embora as condições de temperatura e umidade relativa tenham sido propícias à proliferação do fungo e produção de aflatoxina, a coleta de ouriços até 15 dias contribuíram para a menor incidência dos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*.

4.2 TIPOS DE SELEÇÃO NA AMONTOA DE CASTANHA-DO-BRASIL

As boas práticas extrativistas são recomendações feitas ao extrativista para melhorar a qualidade higiênico-sanitária da castanha. Devem ser aplicadas durante as etapas de coleta e quebra dos ouriços (frutos da castanheira). O uso de lona plástica ou sacos de nylon limpos para a quebra dos ouriços, a higienização dos instrumentos de corte dos ouriços, a seleção das castanhas no momento da quebra constituem as principais recomendações de práticas a serem realizadas no âmbito da floresta.

4.2.1 Análises da temperatura e umidade relativa na floresta

Nos castanhais onde foram realizadas as coletas na amontoa, durante o período do estudo, não foram verificadas diferenças significativas entre as variáveis do ambiente analisadas conforme TABELA 2.

Os valores de temperatura e umidade relativa mantiveram-se sempre próximos, conforme descrito no item 4.1.1, e se encontram dentro da faixa propícia ($\pm 24\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $> 75\%$) para crescimento e produção de aflatoxina. O GRÁFICO 3 ilustra as variáveis observadas.

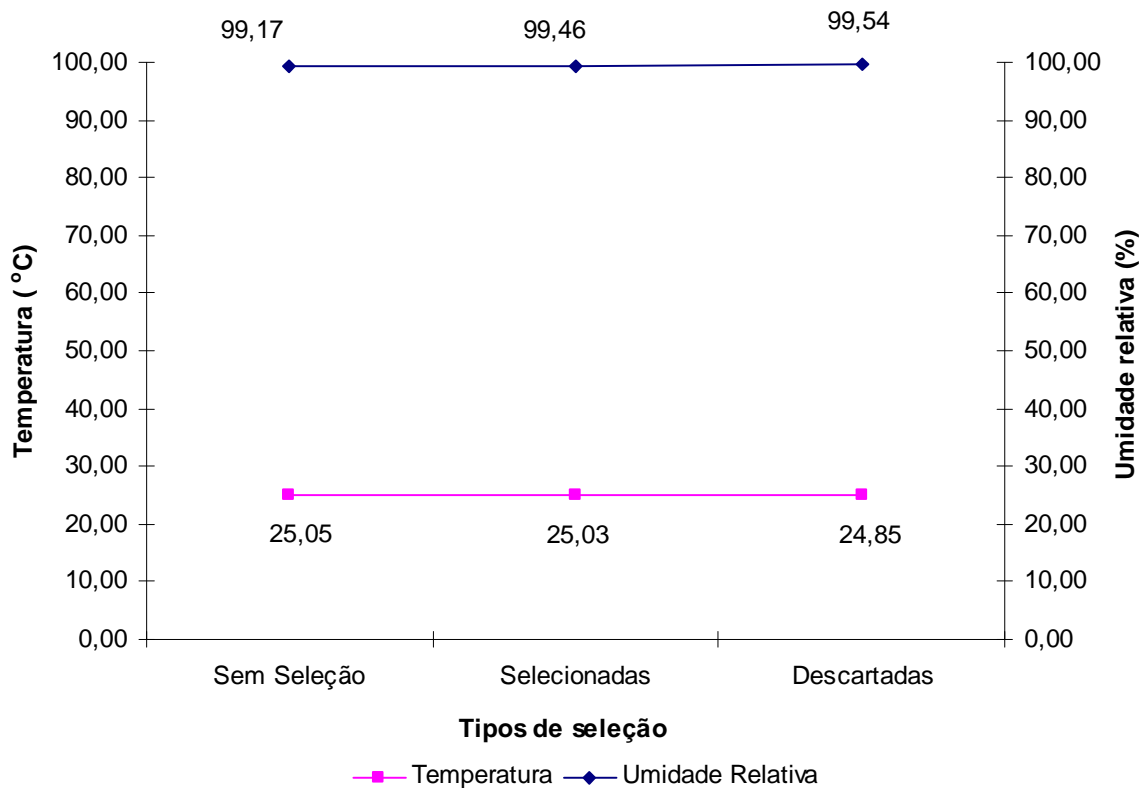


GRÁFICO 3 – Valores médios de temperatura e umidade relativa do ar na floresta durante a coleta na etapa de amontoa, em Brasília, Acre, nos meses de janeiro a março de 2008 (Análise de Variância no APÊNDICE C).

4.2.2 Temperatura, atividade de água da amêndoa, quantificação de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e outros fungos em amostras provenientes da etapa de amontoa na floresta

A TABELA 2 apresenta os valores de temperatura das amêndoas analisadas com pequena variação de $24,10\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $24,54\text{ }^{\circ}\text{C}$, porém não significativa. Já a atividade de água se manteve em torno de 0,97.

Para Pacheco (2006) temperaturas variando entre 10 °C a 35 °C, umidade relativa de 65% a maior que 90% e atividade de água de 0,80 a 0,86 os fungos intermediários, inclusive *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, crescem em condições de campo. Os fatores que influenciam o crescimento dos fungos não atuam sozinhos, mas em conjunto: quantidade de inóculo, temperatura, umidade do substrato, condições físicas do substrato, crescimento de outros fungos e umidade do ambiente (CARRILLO, 2008).

As médias observadas para a incidência de fungos aflatoxigênicos (AFPA) em amostras de castanha-do-brasil sem seleção prévia, selecionadas e descartadas foram de 3,8889, 99,0909 e 5,5555 ufc.g⁻¹, respectivamente. Conforme o GRÁFICO 4 na comparação de médias para contagem de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* não observou-se diferença significativa sendo o menor crescimento de fungos nas amostras de castanhas sem seleção (TABELA 2).

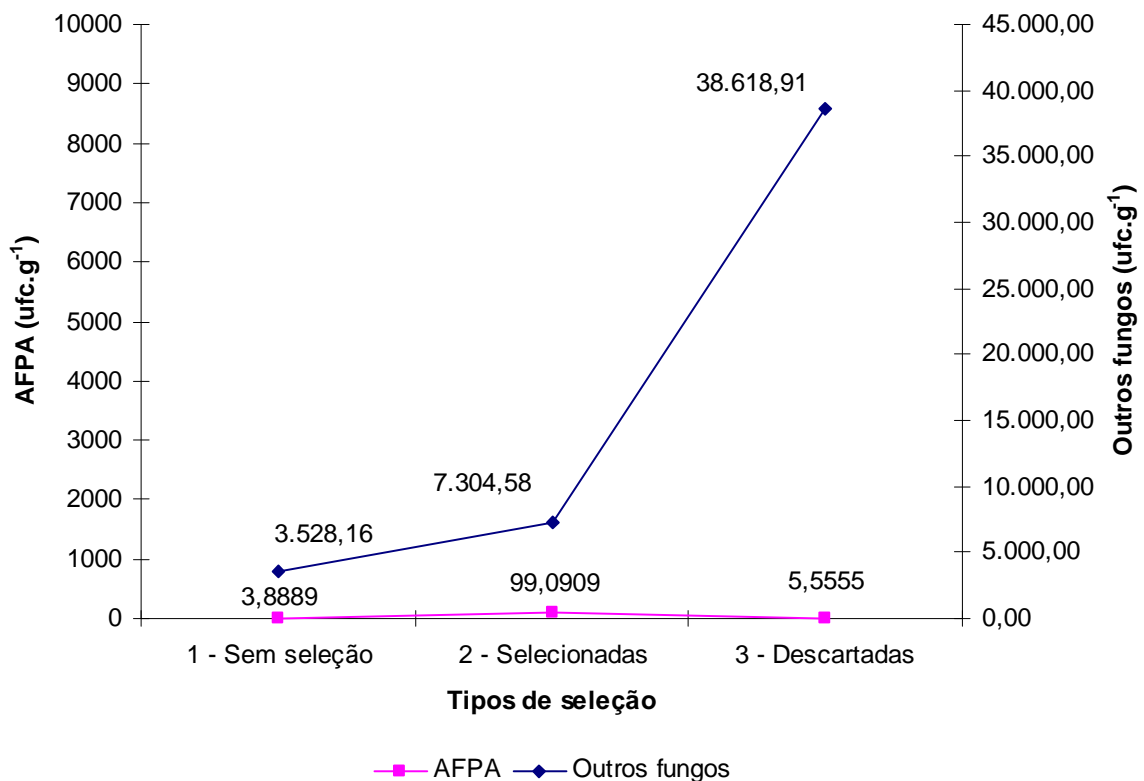


GRÁFICO 4 – Crescimento de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* e outros fungos nas amostras da amontoa, em Brasiléia, Acre, nos meses de janeiro a março de 2008. (Análise de Variância no APÊNDICE C).

O menor crescimento de fungos aflatoxigênicos nas amostras sem seleção prévia e do descarte pode ser explicado pelo antagonismo entre os microrganismos

(BAYMAN et al., 2002) onde se observa elevadas contagens de outros fungos e menor desenvolvimento de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Uma outra proposição incide na curva de crescimento dos microrganismos, na qual após a fase de intenso crescimento ou fase exponencial, existe a fase estacionária e de declínio ou morte. Na fase estacionária cessa a multiplicação por limitação de um fator ambiental como nutrientes, por exemplo, e na fase de morte, há redução do número de microrganismos também por falta de nutrientes vitais ou por substâncias tóxicas excretadas pelos próprios microrganismos, entre outros (PAS, 2000).

Também se ressalta que a amontoa dos ouriços nos castanhais foi realizada em três situações que foram: amontoa no mesmo dia da coleta de amostras (maior parte das amostras), amontoa com até sete dias antes da coleta de amostras e amontoa com 38 a 45 dia antes da coleta de amostras o que originou amostras descartadas que continham apenas castanhas cortadas no momento da quebra do ouriço.

Outro procedimento que possivelmente pode ter contribuído para este resultado foi a lavagem rápida no laboratório antes do descasque, das amostras coletadas em dois lotes que foram amontoados com antecedência de 38 a 45 dias, as quais apresentavam excesso de água turva e fétida além de sujidades. Sobre este aspecto é importante ressaltar que não se recomendada a prática de lavagem das castanhas na floresta devido a principalmente não se conhecer a qualidade da água utilizada, apesar de que é uma método comum em outros Estados da região norte.

A prática de selecionar visualmente as castanhas no momento da quebra depende do grau de entendimento e interesse do produtor em realizar a tarefa, existindo neste caso os extrativistas mais atentos e os mais displicentes.

Pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$) na comparação dos resultados das análises de outros fungos nos castanhais, não foi observado diferença significativa, porém eles estavam presentes em todas as amostras, e em maior quantidade nas amostras descartadas.

Na correlação entre os resultados encontrados (APÊNDICE E) foi observada significância ($p \leq 0,01$) entre o crescimento de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* e temperatura ambiente e uma relação inversa (-0,09) entre *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* e outros fungos.

4.2.3 Análises de identificação e quantificação de aflatoxinas das amostras da amontoa na floresta

Nas amostras de castanha-do-brasil onde não houve crescimento de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* foram detectadas aflatoxinas B₁, B₂, G₁, em níveis baixos, com exceção de uma amostra proveniente de descarte que alcançou 115,59 µg.kg⁻¹ de aflatoxina B₁ como mostra a TABELA 4. Segundo Freire et al. (2000) é comum encontrar micotoxinas em commodities sem os fungos associados estarem presentes. Sendo assim, a seleção das castanhas que visualmente apresentam sinais de deterioração, mofos e quebradas é importante no momento da quebra.

Aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ apresentam grande risco pela ampla contaminação de variedades de “commodities” da agricultura e de gêneros alimentícios, especialmente aqueles contendo alto teor de carboidratos e/ou gorduras, tais como nozes e seus produtos, amendoim, milho, cereais, trigo, óleo de grãos, figo e uva passa secos, entre outros (NILÜFER; BOYACIOGLU, 2002).

Neste trabalho, o resultado na amostra descartada, está de acordo com Arrus et al. (2005) que estudando diversas combinações de temperatura e umidade relativa na produção de toxina verificaram que castanhas com casca quebrada continham os mais elevados níveis de aflatoxina total e B₁ (6817 ng.g⁻¹ e 4483 ng.g⁻¹) e com Freire et al. (2000) que encontraram as aflatoxina B₁ e B₂ na casca de castanha de má qualidade nas concentrações de 27,1 µg.kg⁻¹ e 2,1 µg.kg⁻¹ respectivamente (total 29,2 µg.kg⁻¹).

Pereira et al. (2002) citam que uma vez o *Aspergillus* estando presente no alimento é essencial que medidas de controle sejam realizadas de forma a reduzir as possibilidades de ocorrer a produção de aflatoxinas. Na condição da floresta, como visto na análise para o tempo de permanência do ouriço após a queda, a não demora na coleta é uma das medidas a serem aplicadas com a finalidade de reduzir a incidência dos fungos aflatoxigênicos e o processo de seleção das castanhas na floresta não tem efeito sobre o nível de aflatoxinas e sim sobre o controle do fungo.

TABELA 4 – Níveis de contaminação da castanha-do-brasil por *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e aflatoxina em amostras coletadas na amontoa conforme três tipos de seleção durante os meses de janeiro a março do ano de 2008, Brasiléia, Acre.

AFPA (ufc.g ⁻¹) e Tipo de aflatoxina (µg.kg)	Amontoa (Tipo de seleção)								
	Sem seleção								
	Repetições								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
AFPA	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,04	30,00	0,00	0,00
B1	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03
B2	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
G1	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
G2	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
AFPA (ufc.g ⁻¹) e Tipo de aflatoxina (µg.kg)	Selecionadas								
	Repetições								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
AFPA	0,00	80,00	0,00	331,8182	445	0,00	30,00	5,00	0,00
B1	<0,03	<0,03	0,05	<0,03	<0,03	0,15	<0,03	<0,03	0,06
B2	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
G1	<0,01	<0,01	0,06	<0,01	<0,01	0,06	<0,01	<0,01	0,02
G2	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
AFPA (ufc.g ⁻¹) e Tipo de aflatoxina (µg.kg)	Descartadas								
	Resultados								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
AFPA	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	50,00	0,00	0,00
B1	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	0,09	115,69	NR	NR	<0,03
B2	<0,01	<0,01	,0,01	<0,03	0,01	1,52	NR	NR	<0,01
G1	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,16	NR	NR	<0,01
G2	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	NR	NR	<0,01

NR – Não Realizada

5 CONCLUSÕES

A temperatura, a umidade relativa do ambiente da floresta no local de estudo, a atividade de água e temperatura das amêndoas estão dentro da faixa para germinação, crescimento e produção de aflatoxina;

Aspergillus flavus, *Aspergillus parasiticus* e outros fungos foram encontrados na floresta tanto nas amostras provenientes das épocas de coleta como nos tipos de seleção na amontoa;

Aflatoxinas em baixos níveis foram detectadas nas condições de floresta;

Aflatoxinas foram encontradas em maior teor nas amostras descartadas sem o crescimento do *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*;

A coleta de castanha tardiamente na floresta indica maior crescimento de fungos aflatoxigênicos o que sugere que as boas práticas extrativistas quando aplicadas de forma eficiente na coleta favorecem à menor incidência de fungos aflatoxigênicos na castanha-do-brasil.

REFERÊNCIAS

- ARRUS, K.; BLANK, G.; ABRAMSON, CLEARC, D. R.; HOLLEY, R.A. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. **Journal of Stored Products Research**, Canadá, v. 41: 513–527, 2005.
- AYCICEK, H.; AKSOY, A.; SAYGI, S. Determination of aflatoxin levels in some dairy and food products which consumed in Ankara, Turkey. **Food Control**, v. 16, p. 263-266, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - Resolução CNNPA/MS nº 34/76 de 19 de janeiro de 1977. Dispõe sobre teores de aflatoxina em alimentos para consumo humano.
- BAPTISTA, A. S.; HORII, J.; BAPTISTA, A. S. Fatores físico-químicos e biológicos ligados à Produção de micotoxinas. **B.CEPPA**, Curitiba, V. 22, n. 1, 1- 14, 2004.
- BAYMAN, P; BAKER, J. L.; MAHONEY, N. E. *Aspergillus* on tree nuts: incidence and associations. **Mycopathologia**, Buchanan St., v. 155, p. 161–169, 2002.
- CARRILLO, L. **Microbiologia Agrícola**. Disponível em: <<http://www.unsa.edu.ar/matbib/hongos/01htextomohos.pdf>> Acesso em:30 abr. 2008
- CE. REGULAMENTO Nº 401/2006 DA COMISSÃO DE 23 DE FEVEREIRO DE 2006. **Jornal Oficial da União Européia**, 2006, p. 12 – 34.
- CE. DECISÃO DA COMISSÃO 2003/493/CE DE 4 DE JULHO DE 2003. Regulamenta as condições especiais na importação de castanhas com casca originadas de ou consignadas do brasil. Disponível em <http://www.opsi.gov.uk/legislation/scotland/ssi2003/20030396.htm>.> Acesso em 09 de jan. 2003.
- CHU, F. S. Mycotoxins: food contaminations, mechanism, carcinogenic potential and preventive measures. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 259, n. 3-4, p. 291-306, 1991.
- FAO. Legislação para micotoxinas. Disponível em <<http://www.fao.org.br/.pdf>> Acesso em 29 abril, 2006, 20:20:30.
- FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., São Carlos, 2000. **Resumos**. São Carlos: UFSCAR, 2000. p. 255 – 258.
- FERREIRA, H.; PITTNER, E; SANCHES, H. F.; MONTEIRO, M. C. Aflatoxinas: um risco a saúde humana e animal. **Ambiência**: Guarapuava, v.2 n.1 p. 113-127, 2006.

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

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

MICOTOXINAS, Legislação sobre micotoxinas. **Alimentos para consumo humano**. Disponível em <<http://www.micotoxinas.com.br/legisla.html>. Acesso em 17 de ago. 2008.

MULLER, C.H.; FIGUEIREDO, F.J.C.; KATO, A.K.; CARVALHO, J.E.U. DE. **A cultura da castanha-do-brasil**. Brasília: Embrapa-SPI, 65p, 1995.

NILÜFER, D.; BOYACIOGLU, D. Comparative study of three different methods for the determination of aflatoxins in Tahini. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 12, p. 3375-3379, 2002.

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

PACHECO, A. M.; SCUSSEL, V. M. **Selênio e aflatoxinas em castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* h.b.k.) e qualidade de produtos derivados**. 2007. 144 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

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

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

PAS. Programa de alimentos seguros. Elementos de apoio para o Sistema APPCC. 2ª edição, Brasília:Embrapa, 361p, 2000.

PEREIRA, M. M. G.; CARVALHO, E. P. DE; PRADO, G. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. **B.Ceppa**, Curitiba, v 20, v 1, p. 114-156, 2002.

PITT, J .I.; HOCKING, AILSA D.; GLENND, IANNRE. An improved medium for the detection of *Aspergillus fravus* and *A. parasiticus*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 54, 109-114. 1983.

SAS Institute Inc., Cary - NC, USA. 2003.

SEPROF. Secretaria de Extrativismo e Produção Familiar. Gerência da modernização e Industrialização da castanha-do-brasil. Relatório Técnico. 2000.

SIMÕES, A. V. **Impactos de tecnologias alternativas e do manejo da castanha-do-brasil (*Bertholettia excelsa*, HUMB. & BONPL., 1808) no controle da contaminação por aflatoxinas em sua cadeia produtiva.** 2004. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias, Área de concentração: Sistemas Agroflorestais.) - Universidade Federal do Amazonas.

SOUZA, J. M. L.; CARTAXO, C. B. DA C.; LEITE, F. M. N; REIS, F. DA S. **Avaliação microbiológica de amêndoas de castanha-do-brasil em usinas de beneficiamento no Acre.** Rio Branco, 2004.

SOUZA, M. L. DE; MENEZES, H. C. DE. Processamentos de amêndoa e torta de castanha-do-brasil e farinha de mandioca: parâmetros de qualidade. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 1, p. 120-128, 2004.

SOUZA, M. L. de. **Processamento de cereais matinais extrusados de castanha-do-brasil e com mandioca.** 2003. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de engenharia de alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

6 CAPÍTULO II

FUNGOS AFLATOXIGÊNICOS NA CASTANHA-DO-BRASIL EM CONDIÇÕES DE
ARMAZÉM COMUNITÁRIO

6.1 RESUMO

O objetivo deste trabalho foi monitorar as condições em que a castanha-do-brasil é armazenada a nível comunitário e o crescimento de fungos aflatoxigênicos. Castanhas-do-brasil secadas naturalmente a sombra em secador de tela galvanizada foram analisadas durante os tempos 0 (zero), 15, 30, 60 e 90 dias de armazenagem. As aferições de temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa no ambiente (%) de armazenagem foram feitas no momento da coleta por meio de um termohigrômetro digital. A atividade de água e temperatura da amêndoa foram aferidas por meio de leitura direta em aparelho medidor de atividade de água portátil após o descasque. Nos Laboratórios de Tecnologia de Alimentos da Embrapa Acre em Rio Branco e de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento de Belo Horizonte em Belo Horizonte, realizou-se a identificação e quantificação de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, outros fungos e os níveis e tipos de aflatoxinas respectivamente. As médias observadas para a temperatura e umidade relativa no ambiente de armazenagem nos cinco tempos acompanhados variaram de 24,71 a 29,81 $^{\circ}\text{C}$ e 65,77 a 88,42 %. A atividade de água e temperatura da amêndoa na mesma sequência foram de 0,76 a 0,93 e 24,17 a 25,11 $^{\circ}\text{C}$. O crescimento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e outros fungos nos tempos de armazenamento considerados foram de 0,8333 a 151,6666 ufc.g⁻¹ e 855,8285 a 2.480,2905 ufc.g⁻¹. Foram detectados os quatro tipos de aflatoxina, porém os níveis mais elevados foram de aflatoxina B₁ e G₁ com 40,38 e 58,06 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ aos 30 dias, apresentando-se acima do limite máximo permitido pela legislação brasileira (B₁ e G₁ = 30 $\mu\text{g.kg}^{-1}$). As castanhas armazenadas não estavam com teor de atividade de água ideal para impedir o crescimento de fungos aflatoxigênicos e produção de suas toxinas. *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e aflatoxinas estiveram presentes em todo o período de armazenagem no armazém comunitário. O maior crescimento de fungos aflatoxigênicos não coincidiu com a maior produção de aflatoxina.

Palavras - chave: Castanha-do-brasil, Fungos aflatoxigênicos, Aflatoxina, Armazém comunitário.

ABSTRACT

The research aimed to monitor the conditions under which Brazil nut is stored at communitarian level and of fungi aflatoxigenic the growth. Brazil nuts dried naturally in the shadow dryer screen galvanized were analyzed during the times 0 (zero), 15, 30, 60 and 90 days of storage. The measurements of temperature ($^{\circ}\text{C}$) and relative humidity in the environment (%) of storage were made at collection through a digital termohigrometer. The water activity and temperature of almonds were measured by means of direct reading activity gauge of portable water after peeling. In the Embrapa Food Laboratories in Rio Branco, Acre and Quality Control and Safety of the Agriculture Livestock Department and Supply of Belo Horizonte, Minas Gerais, there was the identification and quantification of *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, other fungi and the levels and types of aflatoxins respectively. The averages for the observed temperature and relative humidity in the environment of storage within five days accompanied ranged from 24.71 to 29.81 $^{\circ}\text{C}$ and 65.77 to 88.42%. The water activity and temperature of almonds in the same sequence were 0.76 to 0.93 and 24.17 to 25.11 $^{\circ}\text{C}$. The growth of *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* and other fungi in storage periods were considered 0.8333 to 151.6666 ufc.g^{-1} and 855.8285 to 2480.2905 ufc.g^{-1} . We found the four types of aflatoxin, but the higher levels were aflatoxin B₁ and G₁ with 40.38 and 58.06 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ at 30 days, giving itself above the maximum allowed by Brazilian legislation (B₁, G₁ = 30 $\mu\text{g.kg}^{-1}$). The nuts were not stored with content in water activity ideal for preventing the growth of fungi aflatoxigenic and production of its toxins. *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* and aflatoxin were present throughout the period of storage in a warehouse community. The biggest growth of fungi aflatoxigenic did not coincid with the increased production of aflatoxin.

Key words: Brazil nuts, Fungi aflatoxigenic, Aflatoxin, Communitarian warehouse.

6.2 INTRODUÇÃO

A castanheira-do-brasil ou simplesmente castanheira (*Bertholletia excelsa* H. & B. k, família Lecythidaceae) apresenta o tronco mais grosso entre todas as espécies da floresta amazônica e é considerada espécie social, pois produz frutos e renda para a população local (SALOMÃO et al., 2006).

É uma árvore que pode atingir até 50 m, ocorre em toda a região amazônica, sendo característica das matas altas de terra firmes não inundável. Produz ouriços, que após a retirada das sementes, podem ser usados na confecção de peças de artesanato ou como combustível. Suas castanhas ou sementes são muito apreciadas e conhecidas internacionalmente, sendo um dos principais produtos de exportação da Amazônia. Possui também alto valor protéico devido à quantidade e à qualidade dos aminoácidos contidos nas amêndoas (SANTOS et al., 2006; MÜLLER, 1995).

A amêndoa da castanha-do-brasil pode ser consumida sob várias formas, seja *in natura*, desidratada, salgada, tostada, coberta com chocolate, caramelo, açúcar, mel ou outras coberturas. Também tem sido utilizada como cobertura crocante em sorvetes, chocolates, bolos, doces e biscoitos ou tradicionalmente com farinha ou “leite” de castanha (FERBERG, 2002).

O mercado é centralizado em dois tipos: castanha com casca ou descascada. Tradicionalmente, cerca de 60% do valor de exportação tem sido de castanhas descascadas (LAFLEUR, 1992).

A castanha-do-brasil, uma das riquezas da floresta Amazônica, é importante componente de exportação da região. Sua exploração desempenha papel fundamental na organização socioeconômica de grandes áreas extrativistas da floresta Amazônica (SILVA, 2002).

A contaminação por aflatoxina trouxe prejuízos para a exportação da castanha com casca brasileira. Esta toxina é um metabólito produzido por espécies de fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* comuns do ambiente natural de produção. No ano de 2003 após a detecção de elevados teores de micotoxina nos lotes de castanha exportada para a Europa, houve necessidade de uma regulamentação em nível internacional, baseada em dados científicos, tendo em

vista a proteção da saúde humana, com um mínimo impacto sobre o comércio internacional (FAO, 2008; FERREIRA et al., 2006; CE, 2003; FRANK, 1981).

Na Amazônia, a importância social e econômica dos produtos florestais não madeireiros (PFNM) é secular. O desenvolvimento inicial desta região teve como modelo o extrativismo, que foi durante séculos a atividade econômica predominante e apesar deste setor vir perdendo em importância econômica para outras atividades de uso do solo, ainda continua sendo um importante gerador de renda na região amazônica (TONINI et al., 2007).

O nível tecnológico e as condições inadequadas de manejo pós-colheita favorecem a contaminação por vários microrganismos. Os fungos filamentosos são responsáveis pela presença de micotoxinas (OLIVEIRA et al., 2006). As boas práticas de manejo contribuem para a redução da contaminação da castanha-do-brasil por aflatoxina na floresta. O mesmo autor cita que coloca que as instalações de armazenamento necessitam de mecanismos de maior controle de umidade e temperatura para que seja evitada a proliferação fúngica no armazém (SIMÕES, 2004).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar incidência de fungos aflatoxigênicos e de aflatoxinas na castanha-do-brasil em condições de armazém comunitário.

6.3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Embrapa, em Rio Branco, Acre, Brasil, localizada no Km 14, da BR 364. As amostras de castanha-do-brasil utilizadas foram coletadas no Seringal Porongaba, no município de Brasiléia, Acre, localizado a 250 Km de Rio Branco.

O Seringal Porongaba situa-se na área extrativista de conservação de uso sustentável, Reserva Chico Mendes, com acesso por meio do Ramal do Km 05 da BR 317 (sentido Brasiléia/Assis Brasil).

6.3.1 Caracterização do experimento

Para a escolha do local de estudo foram obtidas informações por meio da Embrapa Acre e Secretaria de Estado de Extensão Agroflorestal e Produção Familiar – SEAPROF de comunidades que já aplicavam na coleta da castanha-do-brasil as boas práticas extrativistas (BPE) previamente recomendadas no Manual de Segurança e Qualidade (PAS, 2004).

A estrutura de secagem e armazenagem comunitária tem capacidade para armazenar aproximadamente 20 toneladas de castanha-do-brasil ensacada sendo esta inferior à produção atual da comunidade e, por conseguinte, castanhas vindas da floresta aguardam a etapa de secagem na mesma área onde são armazenadas as que já foram secas.

O secador foi construído em madeira, conjugado ao armazém, com parede até um metro de altura e com tela de malha de 1 mm até a cobertura. O piso foi feito com de tela em aço galvanizado de malha de 5 mm onde as castanhas são depositadas e revolvidas diariamente (FIGURA 5). Após 7 ou 15 dias de secagem à sombra são ensacadas e armazenadas em sacos de nylon. Este período depende das condições em que a castanha vem da floresta, enxuta ou molhada.



FIGURA 5. Estrutura de secagem para castanha-do-brasil, Brasiléia, Acre, 2008.

As amostras de castanha-do-brasil com casca *in natura* foram coletadas no período de fevereiro a julho do ano de 2008. As coletas foram programadas conforme as castanhas da floresta (amontoa) saíam da etapa de secagem por 15 dias no secador.

A amostragem seguiu a metodologia aplicada no CAPÍTULO I deste trabalho.

A coleta foi realizada no tempo 0 (zero), após homogeneização dos lotes 1 e 2 coletados em cada castanhal depois da secagem. As demais coletas foram nos intervalos de 15, 30, 60 e 90 dias de armazenamento em armazém comunitário.

Aferiu-se com um termohigrômetro digital a umidade relativa do ar (%) e a temperatura do ambiente em °C no momento da coleta. As amostras de castanha foram retiradas com auxílio de uma jarra plástica pré-tarada para mais ou menos 300 g e de cada lote foi retirado mais ou menos 3 kg.

As amostras de castanha-do-brasil *in natura* com casca foram acondicionadas em sacos de poliestireno e envolvidas com saco plástico para proteção contra a chuva durante o transporte até o laboratório de processamento e análises.

No laboratório, as amostras foram homogeneizadas em caixa plástica e pesada. O descascamento foi feito por meio de máquina de quebra manual, de

forma asséptica, porém sem desinfecção superficial das castanhas. Depois de descascadas e sem a retirada das castanhas que se apresentavam deterioradas ou com fungos visíveis, procedeu-se outra homogeneização manual e retiraram-se três amêndoas para análise de atividade de água. Em seguida, foram moídas a seco em moinho tipo CAF, utilizando-se seqüencialmente os discos de 5 e 3 mm para permitir uma melhor homogeneização da massa.

Depois de trituradas, alíquotas de 100 g foram retiradas e encaminhadas para análise microbiológica, de onde se retiraram 40 g destinadas à análise imediata para a identificação e quantificação de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* e 60g para armazenamento, visando à necessidade de eventual re-análise.

Seguindo as recomendações de preparo da amostra para análise de aflatoxinas por Cromatografia Líquida de Alta Performance - HPLC e Imuno-solvente Ligado à Enzima - Elisa do Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar – LACQSA do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/MG, foi adicionada ao restante da massa de castanha água deionizada para facilitar a redução das partículas do material até atingir uma granulometria ≤ 20 mesh. A aferição do tamanho das partículas foi feita por meio de uma peneira. O tipo de equipamento utilizado para trituração da massa foi de acordo com o peso da amostra:

Moinho Tecnal TE-631 para amostras <150 g

Liquidificador Brastemp para amostras > 150 g e < 300 g

Liquidificador industrial para amostras > 300 g e < 3,5 kg

A proporção de massa de castanha e água deionizada utilizada foi de 1:1,25 a 1:1,5. O tempo de homogeneização variou entre 15 a 35 minutos deixando um intervalo na metade do tempo (7- 8 minutos) para a mistura da massa.

A temperatura da amostra foi verificada sempre na metade e no final do preparo e não ultrapassou a temperatura de 60 a 70 °C com o ótimo de 50 °C.

As alíquotas de 500 g para as análises de aflatoxinas por HPLC no LACQSA foram retiradas aleatoriamente de diferentes pontos da pasta, embaladas e identificadas com etiqueta contendo o número de identificação da amostra, o número de divisão e a data da coleta conforme as análises a serem realizadas e, armazenadas a – 18 °C.

6.3.2 Análise microbiológica para quantificação de fungos

A técnica utilizada para análise de fungos foi a de plaqueamento com diluição em superfície, de acordo com Pitt et al. (1983). Após a pesagem da amostra de 40 g, as diluições iniciais (10^{-1}) foram preparadas com água peptonada a 0,1 % e deixadas imersas 30 minutos a temperatura ambiente antes da homogeneização para distribuição nas demais diluições (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}). Para inoculação em placas foi utilizado o meio seletivo ágar *aspergillus flavus parasiticus* – AFPA (9 a 10 mL/placa) adicionado de antibióticos clorotetraciclina e cloranfenicol (1 mL para 100 mL de meio).

Entre 42 a 48 horas de incubação em estufa (BOD) à temperatura de 30 °C foi realizada a leitura das placas, contando-se as colônias que apresentaram reverso de cor alaranjada e os resultados expressos em unidades formadoras de colônia por grama do produto (ufc.g^{-1}).

6.3.3 Definição modelo estatístico

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso com três repetições (castanhais) e cinco tempos de avaliação (0, 15, 30, 60 e 90 dias de armazenagem após a secagem). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e para os efeitos significativos dos tratamentos, foram ajustados modelos de regressão linear, utilizando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000). Para a análise das variáveis *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e outros fungos observou-se a necessidade de transformação em $\text{Log}(x)$. Nos resultados da quantificação de aflatoxinas, considerou-se metade do limite de detecção encontrado, sendo que os valores obtidos foram transformados em raiz quadrada de $X + 1$. Avaliou-se a correlação entre as variáveis por meio do coeficiente de Pearson, utilizando o programa SAS 9.1 (SAS INSTITUT, 2003).

6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias dos resultados das variáveis obtidas no experimento podem ser observadas na TABELA 5.

Não foram observadas diferenças significativas para as temperaturas do ambiente de produção, da amêndoa, umidade relativa do ar, crescimento de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* (AFPA) e outros fungos (OF).

No entanto observou-se efeito significativo ($p \leq 0,05$) quanto à atividade de água da amêndoa. Para as variáveis onde não foram observadas significâncias, não houve ajuste de equação, sendo os resultados apresentados por meio das médias do maior valor do coeficiente de determinação.

TABELA 5 – Médias observadas nas variáveis analisadas na castanha-do-brasil coletada no armazém comunitário, localizado em Brasília-AC, nos meses de fevereiro a julho do ano de 2008.

Tratamento Tempo (dias)	Variáveis analisadas									
	Temperatura ambiente (°C)	Umidade Relativa (%)	Aw	Temperatura amêndoa (°C)	AFPA (ufc.g ⁻¹)	Outros fungos (ufc.g ⁻¹)	Aflatoxina (µg.kg ⁻¹)			
							B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
0	29,81	65,77	0,93	25,11	17,5000	1.490,5132	9,8085	0,0167	0,0000	0,0000
15	28,55	75,70	0,91	24,73	151,6666	855,8285	2,2625	0,1720	0,0283	0,0000
30	24,71	76,45	0,87	24,95	80,8333	3.389,4476	40,3850	3,3500	58,0633	3,8800
60	25,83	75,47	0,76	24,63	3,3333	2.480,2906	0,0200	0,0000	0,0133	0,0000
90	27,03	88,42	0,63	24,17	0,8333	2.407,0434	10,2575	0,1170	0,0000	0,0000
Média	27,19	76,36	0,82	24,72	50,8333	2.124,6246	10,5906	0,7378	13,9345	0,7956
CV (%)	14,91	20,44	9,95	5,27	117,97	14,53	88,00	29,13	126,58	48,43

(i) Aw = atividade de água; CV = coeficiente de variação; AFPA = *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*;

(ii) Análise de variância apresentada no APÊNDICE G

6.4.1 Temperatura e umidade relativa do ambiente

Nas condições de armazenamento estudadas os valores de temperatura e umidade relativa do ambiente apresentaram pequena variação, porém sem significância quando feita análise de regressão.

Para Pacheco e Scussel (2006) a temperatura interfere diretamente no desenvolvimento fúngico sendo menos restritiva que a umidade e, durante a armazenagem em regiões tropicais a maioria das espécies cresce em temperaturas em torno de 30°C.

Neste caso, observa-se que a temperatura se manteve na faixa ideal de crescimento para microrganismos mesófilos conforme GRÁFICO 5.

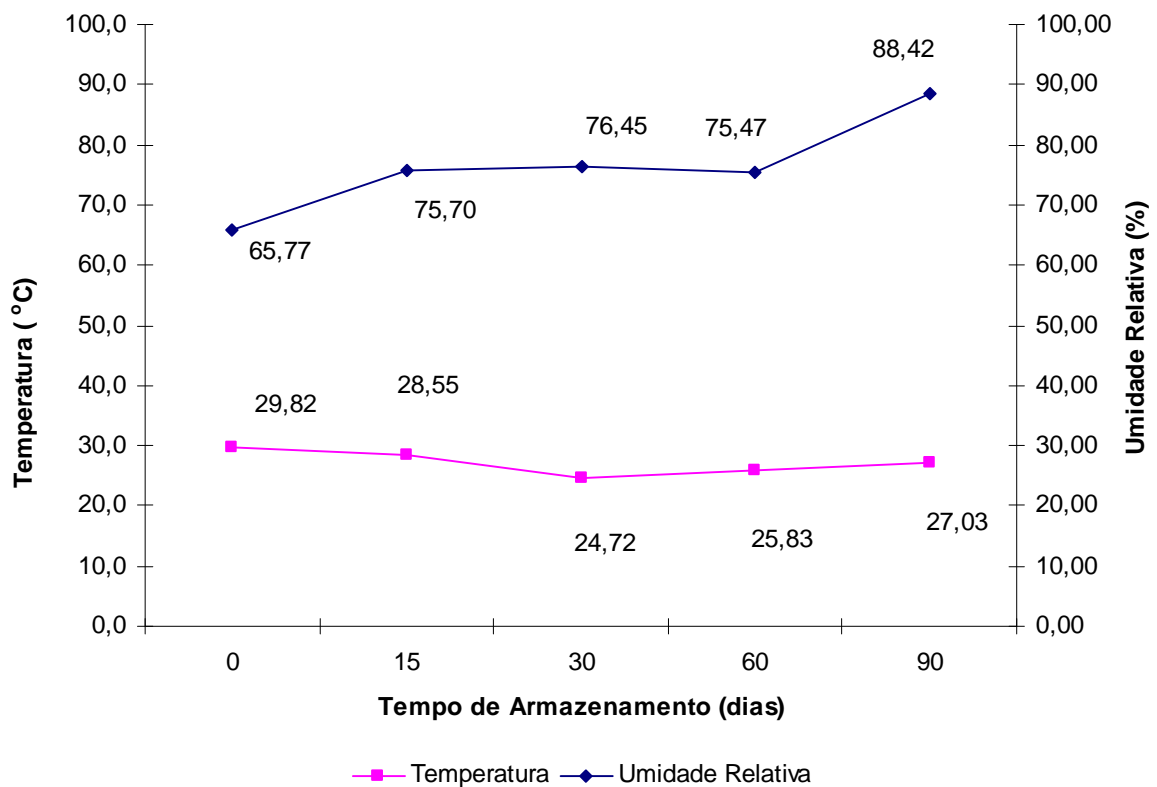


GRÁFICO 5 – Temperatura e umidade relativa do armazém comunitário durante o período de coleta, em Brasiléia, Acre, Brasil, nos meses de Fevereiro a Julho do ano de 2008. (Análise de variância no APÊNDICE G)

Segundo Freire et al. (2000) desde que as condições de umidade do ambiente sejam mantidas abaixo 10 a 11% (equivalente a 70% UR) a castanha-do-

brasil pode ser armazenada de forma segura. Contudo, atualmente, o que se encontra são condições de alta umidade do ambiente durante o armazenamento, aliado a falta ou ventilação insuficiente, o que explica, em parte, as altas taxas de deterioração e a produção de aflatoxina na castanha-do-brasil.

Em conformidade com as observações de Freire et al. (2000), observou-se que nos primeiros quinze dias, houve um aumento na umidade relativa de 65,77% para 75,70%, onde a atividade de água da castanha era de 0,93 a 0,91 (GRÁFICO 6), justamente neste intervalo, também houve um aumento na população de fungos aflatoxigênicos com posterior decréscimo. Observa-se também que ocorreu uma oscilação da umidade relativa com decréscimo da atividade de água até o final da armazenagem e diminuição da carga microbiana. Esta redução da população é justificada pela correlação com a redução da atividade de água encontrada, ou seja, atividade de água de 0,93 baixou para 0,63 linearmente (TABELA 5).

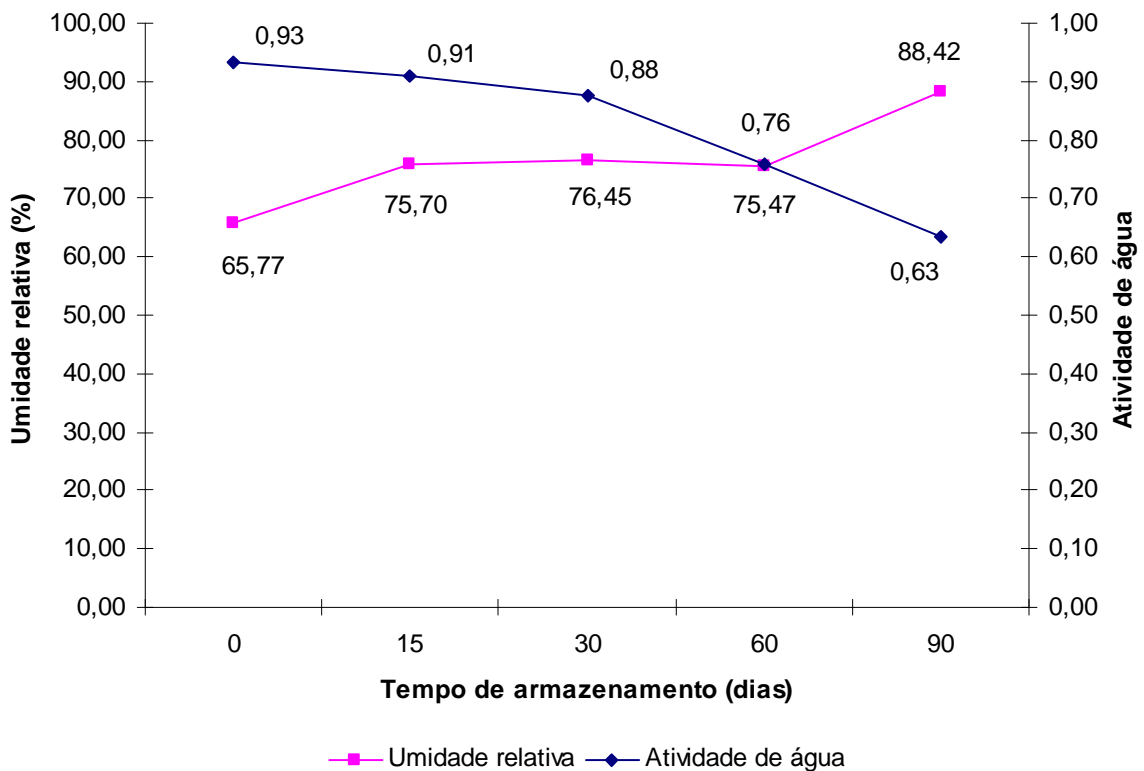


GRÁFICO 6 – Umidade relativa e atividade de água da amêndoa no período de armazenamento, em Brasília, Acre, nos meses de Fevereiro a Julho do ano de 2008. (Análise de variância no APÊNDICE G)

6.4.2 Temperatura, atividade de água e quantificação de fungos aflatoxigênicos e outros fungos na amêndoa da castanha-do-brasil

As amêndoas apresentaram temperaturas médias que variaram entre 25,11 a 24,17 °C em temperatura ambiente após refrigeração no laboratório. Apesar de não encontrado em literatura esta variável aferida diretamente na amêndoa, é importante considerar sua relação aos demais fatores que interferem no crescimento dos fungos e produção de aflatoxina.

Ao comparar os valores encontrados com os resultados de temperatura ambiente (GRÁFICO 7), observa-se que a temperatura da amêndoa manteve-se logo abaixo. Como há possibilidade da estrutura da casca, influenciar na estabilidade da castanha (ARRUS et al., 2005), estes resultados podem servir de suporte para estudos posteriores.

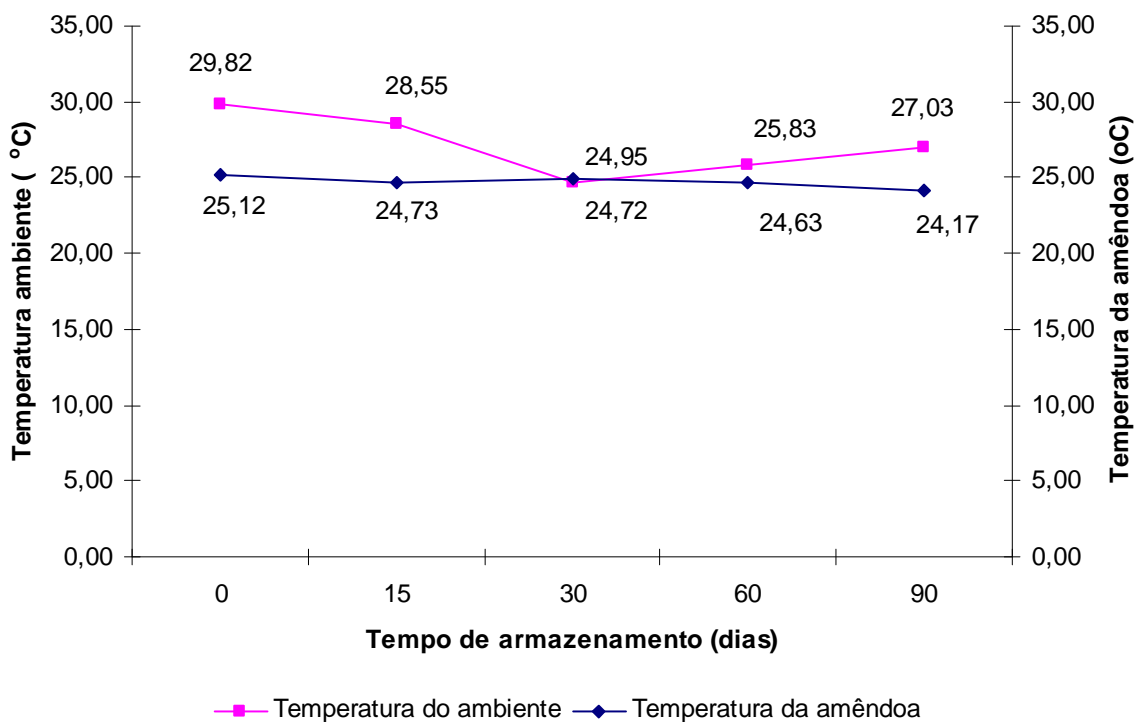


GRÁFICO 7 – Temperatura do ambiente e da amêndoa coletada no período de armazenagem, Brasiléia, Acre, Brasil, nos meses de fevereiro a Julho do ano de 2008. (Análise de variância no APÊNDICE G).

Com relação aos resultados de atividade de água encontrados na amêndoa, estes demonstraram um decréscimo linear de 0,93 a 0 (zero) dia para 0,63 a 90 dias como podemos observar no GRÁFICO 8.

Segundo Córdova (2006), a disponibilidade de água do alimento deve ser abaixada para um nível onde não exista perigo de crescimento microbiano. Para Carrillo (2003), o desenvolvimento ótimo de *Aspergillus flavus* ocorre a 36°C com uma atividade de água de 0,95, porém o crescimento de *Aspergillus* é encontrado não necessariamente no ponto ótimo.

Arrus et al. (2005) trabalhando com castanha citam que nas duas primeiras semanas de armazenamento, não foi observado o crescimento de fungo em nenhuma das amostras e o baixo teor de umidade inicial (3,5%) e atividade de água (0.75) pode ter inibido o crescimento e que em temperatura de 30 °C, típica de armazenamento em áreas de processamento na Amazônia, as castanhas devem ser mantidas em níveis de umidade e atividade de água de 4,5% e 0,68 e de 5,0% 0,75 respectivamente, sendo considerado o procedimento mais rápido após colheita para controlar a produção de aflatoxina a um limite de 4ng/g por um período de até 60 dias.

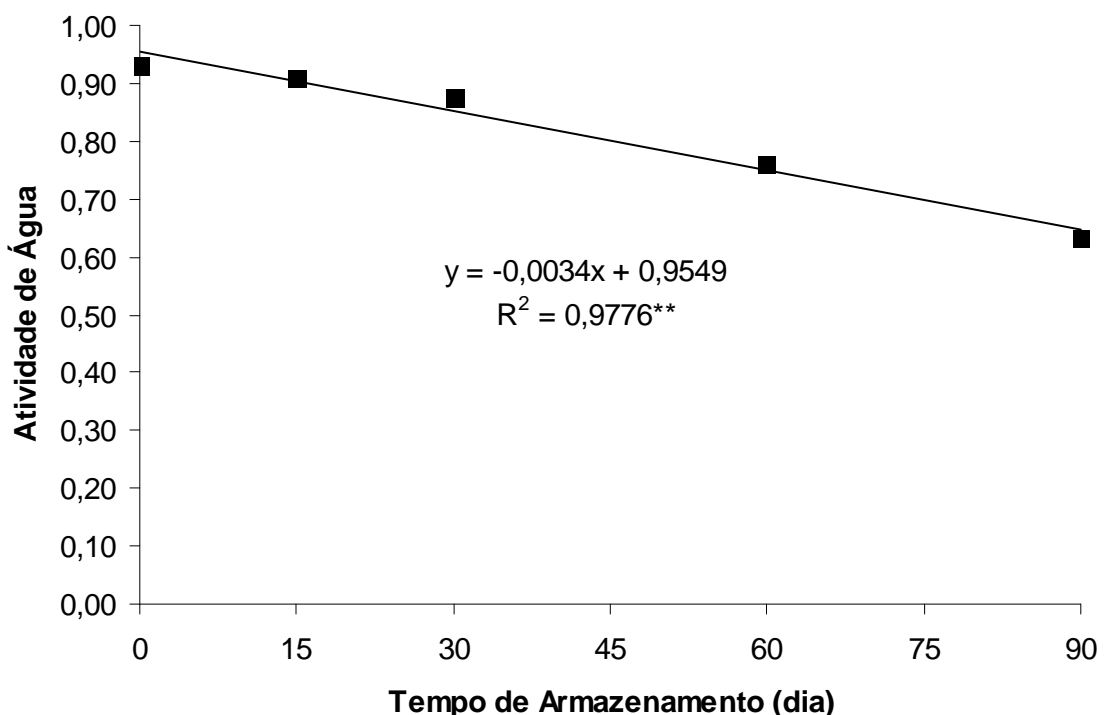


GRÁFICO 8 – Atividade de água das amêndoas de castanha-do-brasil durante armazenagem, em Brasiléia, Acre, nos meses de Fevereiro a Julho do ano de 2008. Análise de variância no APÊNDICE G)

No presente estudo houve crescimento do fungo em todos os tempos de armazenamento, porém observa-se que a partir de 30 dias existe uma tendência

para o decréscimo significativa ($p \leq 0,01$), quando a atividade de água é de 0,87. Isso confirma a correlação de atividade de água alta com o alto crescimento da população e atividade de água baixa para o decréscimo da população de fungos como se observa no GRÁFICO 9.

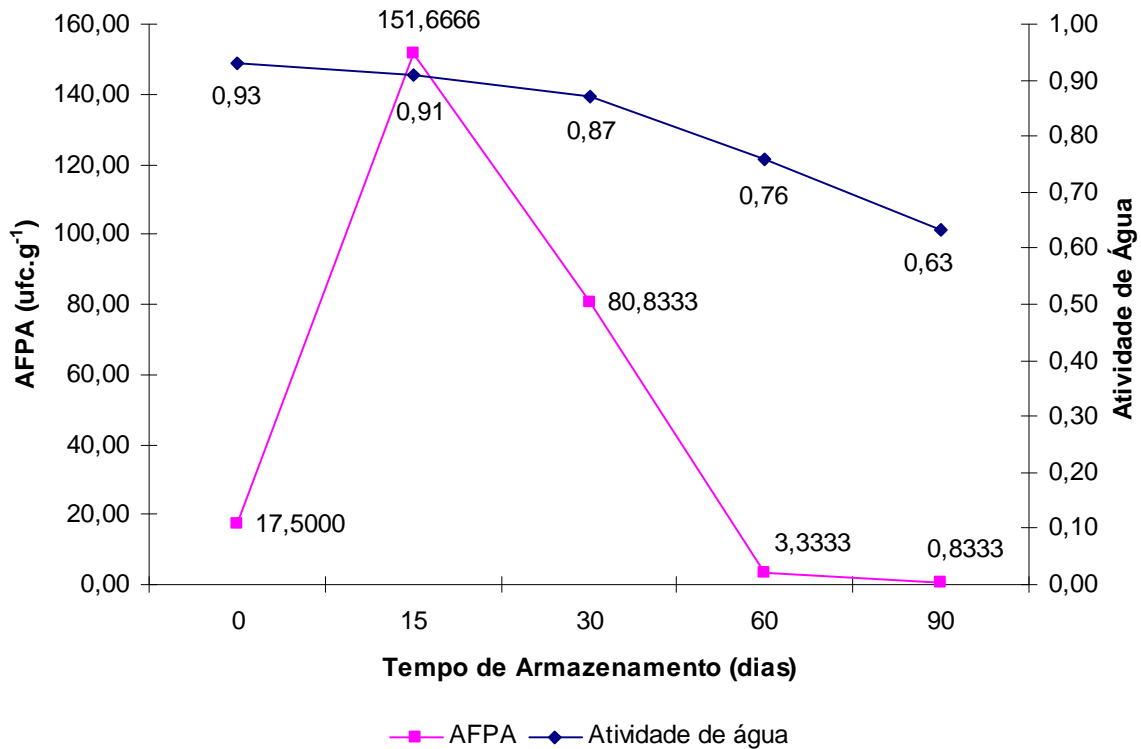


GRÁFICO 9 – Atividade de água e fungos aflatoxigênicos das amêndoas de castanha-do-brasil durante armazenagem comunitária, em Brasiléia, Acre, nos meses de Fevereiro a Julho do ano de 2008. (Análise de variância no APÊNDICE G)

A presença de fungos aflatoxigênicos na castanha-do-brasil foi detectada em condições de armazenagem comunitária, corroborando com outros achados em estudos de Pacheco (2007), Simões (2004) e Cartaxo et al. (2003).

O armazenamento em locais úmidos e sem ventilação bem como o transporte inadequado favorece não apenas a contaminação com esporos, mas também o crescimento fúngico nos produtos já contaminados (CHU, 1991). Neste caso, o atraso na coleta dos ouriços, pode ter favorecido a uma maior contaminação pelo contato com o solo na época chuvosa.

Independente da contaminação advinda de etapas anteriores para o crescimento de fungos aflatoxigênicos e consequente produção de aflatoxina, a temperatura e umidade relativa nas condições de armazenamento se mostraram dentro da faixa ideal para o crescimento de fungos e produção de aflatoxinas, de acordo com Pas (2004), onde a umidade da amêndoa acima de 16 % e temperaturas entre 27 e 30 °C são propícios para a produção de toxinas.

Nas condições de armazenamento estudadas houve crescimento de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* desde os primeiros dias de armazenamento em temperaturas que variaram de 24,7 a 29,8 até o final do período de estocagem com uma variação no decorrer do processo, porém não significativa. Também foi observado que no período antes do armazenamento, tempo 0 (zero), a contagem de outros fungos foi elevada, com redução aos 15 dias de armazenamento seguindo-se um acréscimo e estabilidade até o tempo de 90 dias. Mesmo assim, manteve-se em níveis superiores aos de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* como se observa no GRÁFICO 10.

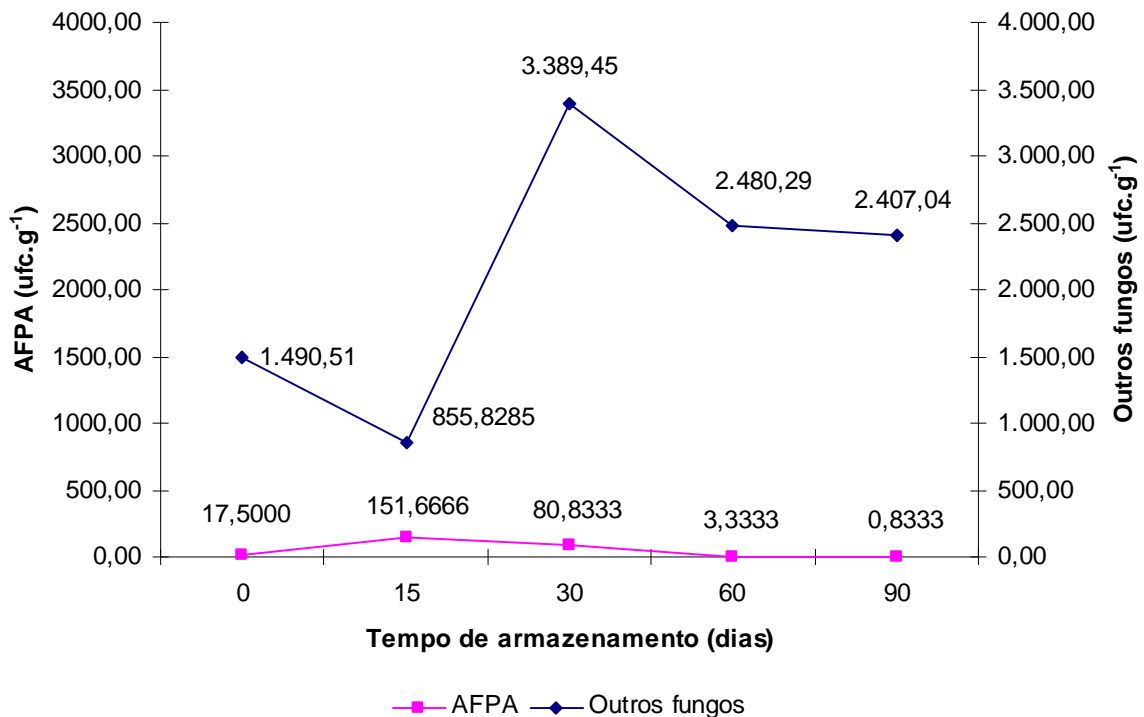


GRÁFICO 10 – Crescimento de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* e outros fungos em castanha-do-brasil durante armazenagem comunitária, em Brasiléia, Acre, nos meses de Fevereiro a Julho do ano de 2008. (Análise de variância no APÊNDICE G)

Em estudo realizado com castanha-do-brasil por Arrus et al. (2005), na terceira e quarta semana de armazenamento foi observado o crescimento de fungos à temperatura entre 25 e 30 °C e umidade relativa 85 e 97% e entre 15 °C a 30 °C e 80% UR e 97% UR concomitantemente. Estes resultados coincidem com o maior valor de aflatoxinas encontradas aos 30 dias de armazenagem em armazém comunitário.

Johnsson et al. (2008), verificaram em umidade relativa de 97% ocorreu rapidamente a formação de aflatoxina e aos 90% de umidade relativa resultou numa formação de aflatoxina mais lenta e com a umidade relativa de 80%, a formação de aflatoxina ocorreu esporadicamente. Estes autores observaram que o crescimento de fungos aflatoxigênicos e formação de aflatoxina aumentou rapidamente entre 40 e 90 dias após a coleta de castanhas.

Os padrões de colonização por fungos na castanha-do-brasil e a íntima relação entre estes, pode ter profundas implicações para a contaminação de aflatoxina, uma vez que as castanhas estão expostas a níveis elevados do inóculo durante a colheita ou processamento (BAYMAN et al., 2002).

Com relação à aflatoxina ocorreu efeito significativo entre os tratamentos, no entanto, não houve ajuste de equação, em que teores de aflatoxina comportaram-se como demonstrado na FIGURA 6. Foi observado os tipos B₁ e B₂ em duas amostras de castanha coletadas antes do armazenamento (tempo 0) sendo que no tempo de 15 dias os níveis ainda se mantiveram baixos $\leq 2,26$ ($\mu\text{g.kg}^{-1}$). Aos 30 dias, os valores de aflatoxinas aumentaram significativamente ($p \leq 0,01$) para aflatoxinas B₁ (40,3850), B₂ (3,3500), G₁ (58,0633) e G₂ (3,8800) em concentrações expressas $\mu\text{g.kg}^{-1}$ conforme TABELA 5. Os teores de aflatoxina B₁ + G₁ (98,4483 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) encontrados ultrapassam em 3,3 vezes o limite permitido pela Legislação brasileira que é de 30 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

Neste trabalho foi encontrada a maior produção de aflatoxina em temperatura ambiente, umidade relativa e atividade de água de 24,7 °C, 76,4 % e 0,87 respectivamente aos 30 dias de armazenagem da castanha. Estes resultados são diferentes dos valores encontrados por Arrus et al. (2005) que citam a umidade relativa de 97 % e temperaturas na faixa de 25 a 30 °C para a produção de aflatoxina em castanha-do-brasil e dos observados por Carrillo (2003) que encontrou aflatoxinas em temperatura de 33°C e atividade de água de 0,99.

Saleemullah et al. (2005) citam que quanto maior a umidade mais rápido ocorre o crescimento de *Aspergillus* sp e superior é a produção de toxinas. Esta

informação está em desacordo com os encontrados neste trabalho. Contudo, pode ser explicado pela linhagem do fungo contaminante: existem linhagens de fungos que produzem maiores quantidades de toxinas, entretanto esta eficiência está na dependência da temperatura, substrato, umidade e microrganismos capazes de degradar a toxina. Segundo Carrillo (2008), os fatores que influenciam o crescimento dos fungos não atuam sozinhos, mas em conjunto, entre eles podem ser citados a quantidade de inóculo, a temperatura, a umidade do substrato, as condições físicas do substrato, o crescimento de outros fungos e a umidade do ambiente.

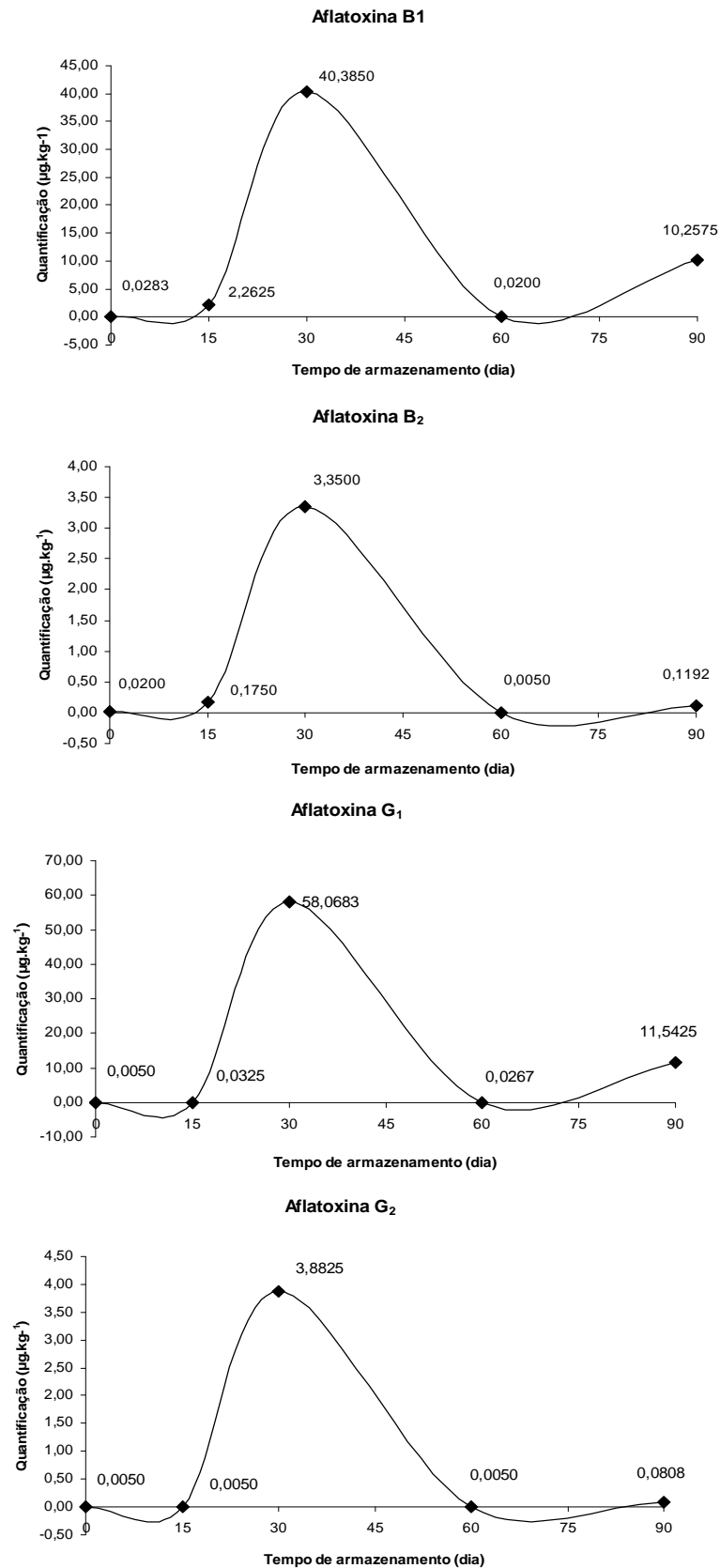


FIGURA 6 – Quantificação de aflatoxinas em amostras de castanha-do-brasil coletadas durante armazenagem comunitária, em Brasília, Acre nos meses de fevereiro a Julho do ano de 2008. (Análise de variância no APÊNDICE G)

A presença de aflatoxina em amostras de armazenamento onde não houve crescimento de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* é mais um acontecimento. No estudo realizado por Olsen et al. (2008), os isolados de *Aspergillus nomius* foram bons produtores das aflatoxinas tipo B e G, enquanto as cepas de *Aspergillus flavus* produziram apenas aflatoxinas tipo B, o que sugere a presença deste tipo de fungo e a possível causa da detecção das micotoxinas citadas em nosso estudo. Para Carrillo (2003), tanto em campo como em armazenamento os fatores ambientais não são constantes e por isso pode ocorrer que no crescimento fúngico apreciável não se encontre a quantidade de micotoxina esperada, ou que devido sua estabilidade, as micotoxinas podem persistir quando os esporos morrem.

Segundo Peterson et al. (2000)⁸ e Ito et al. (2001)⁹ citados por Carrilo (2003) *Aspergillus flavus* produzem aflatoxinas B₁ e B₂, enquanto *Aspergillus parasiticus* aflatoxinas G₁ e G₂, sendo que Olsen et al. (2008), sugerem que *Aspergillus nomius* é um importante produtor de aflatoxinas em castanha-do-brasil e que a sua ocorrência e de outros produtores aflatoxina B e G, deve ser melhor analisada, com objetivo de definir estratégias de prevenção e controle de aflatoxinas neste produto.

Para Arrus et al. (2005) uma importante estratégia para evitar aflatoxina em castanha-do-brasil é o controle do desenvolvimento do fungo após a coleta por meio de um controle adequado de temperatura e atividade da água durante o armazenamento, tendo em vista que a 10 ° C (97 % UR) ou a 30 ° C (75 % UR) não há produção de aflatoxina. Ainda que o fungo possa ser inativado ou retirado durante o processamento e não estar presente no produto manufaturado, as toxinas podem permanecer viáveis, pois não são facilmente degradáveis (NUNES et al., 2003).

Ao correlacionar as variáveis (APÊNDICE H) observaram-se a relação entre crescimento de outros fungos e atividade de água ($p \leq 0,05$). Na correlação dos resultados das análises de aflatoxina durante o armazenamento observou-se que os quatro tipos são inversamente proporcionais à temperatura do ambiente, ou seja, à

⁸ PETERSON, S. W. et al Genetic variation and aflatoxin production in *Aspergillus tamaritii* and *A. caelatus*. In: Integration of Modern Taxonomic Methods for *Penicillium* and *Aspergillus* Classification. p. 447-458, 2000.

⁹ ITO Y et al. *Aspergillus pseudotamaritii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*. **Mycological Research**, v. 105: 233-239, 2001.

medida que a temperatura se distancia da faixa ideal para a síntese a produção é diminuída e vice-versa (APÊNDICE I).

A castanha-do-brasil para ser armazenada na floresta necessita de uma estrutura de secagem que permita uma rápida redução da atividade de água para teor seguro (menor que 0,70). Caso contrário a armazenagem prolongada só é recomendada se houver possibilidade de controle local quanto à umidade relativa e temperatura do ambiente de armazenamento.

A qualidade microbiológica da castanha-do-brasil na base da cadeia produtiva depende exclusivamente da ação do extrativista, sendo necessário um trabalho de sensibilização eficiente para que as boas práticas extrativistas sejam aplicadas não como recomendação técnica, mas como um ato consciente do produtor e que a melhor qualidade contribui para a manutenção da sua comercialização, seja ela em casca ou descascada, para a melhoria da economia como um todo e conseqüentemente para a manutenção da sustentabilidade da floresta.

7 CONCLUSÕES

O processo de secagem utilizado pelos extrativistas resulta em castanhas com atividade de água média de 0,82, acima do valor ideal para armazenamento e, portanto propício ao crescimento de fungos aflatoxigênicos e para a produção aflatoxinas;

As castanhas armazenadas não estavam com teor de atividade de água ideal para impedir o crescimento de fungos aflatoxigênicos e produção de suas toxinas;

Aspergillus flavus, *Aspergillus parasiticus* e aflatoxinas estiveram presentes em todo o período de armazenagem;

A maior concentração de aflatoxina B₁ e G₁ foi encontrada aos 30 dias de armazenamento;

O maior crescimento de fungos aflatoxigênicos não coincidiu com a maior produção de aflatoxina.

REFERÊNCIAS

- ARRUS, K.; BLANK, G.; ABRAMSON, CLEARC, D. R.; HOLLEY, R.A. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. **Journal of Stored Products Research**, n. 41, p. 513–527, 2005.
- BAYMAN, P; BAKER, J. L.; MAHONEY, N. E. ***Aspergillus* on tree nuts: incidence and associations**. Mycopathologia v. 155, p. 161–169, 2002.
- CARRILLO, L. **Microbiologia Agrícola**. Disponível em: <<http://www.unsa.edu.ar/matbib/hongos/01htextomohos.pdf>> Acesso em: 30 abr. 2008
- CARRILLO, L. Los hongos de los alimentos y forrajes. **Universidad Nacional de Salta**, 2003.
- 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: **CONGRESO LATINOAMERICANO DE MICOTOXICOLOGIA**, 4., 2003, Havana.
- CE. REGULAMENTO Nº 401/2006 DA COMISSÃO DE 23 DE FEVEREIRO DE 2006. **Jornal Oficial da União Européia**, 2006, p. 12 – 34.
- CE. Decisão da Comissão 2003/493/CE de 4 de julho de 2003. Regulamenta as condições especiais na importação de castanhas com casca originadas de ou consignadas do Brasil. OJL 168 de 5 de julho de 2003, p. 33-38. Disponível em <<http://europa.eu.int/eurx/lex/LexUriServ/LexUriServ.do?uri.>> Acesso em 09 de jan. 2003.
- CHU, F. S. Mycotoxins: food contaminations, mechanism, carcinogenic potential and preventive measures. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 259, n. 3-4, p. 291-306, 1991.
- CÓRDOVA, K. R. V. 2006. 141 f. **Desidratação osmótica e secagem convectiva de maçã fuji comercial e industrial**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Paraná, PR, 2006.
- FAO. Codex committee on contaminants in food. Discussion paper on aflatoxin contamination in brazil nuts second session. Agenda item 11e Netherlands, 31 march/04 april, 2008.
- FERBERG, I; CABRAL, L. C.; GONÇALVES, E. B.; ELIZA, R. Efeito das condições de extração no rendimento e qualidade do leite de castanha-do-brasil despelucada. **B.Ceppa**, Curitiba, v. 20, n. 1, p. 75 – 88, 2002.

- FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., São Carlos, 2000. **Resumos**. São Carlos: UFSCAR, p. 255 – 258, 2000.
- FRANK, H. K.; BETANCOURT, L. A Castanha-do-pará I: Origem, Produção e Características Físicas e Químicas. **Boletim SBCTA**, Campinas, v. 15, n. 4, p. 351-365, 1981.
- FREIRE, F. DAS C. O.; KOZAKIEWICZ, Z; PATERSON, R. R. M. Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. **Mycopathologia**, n. 149, p. 13–19, 2000.
- JOHANSSON, P.; LINDBLAD, M.; THIM, A. M.; JOHANSSON, N.; VARGAS, E. A.; MEDEIROS, N. L.; BRABET, C.; DE ARAÚJO, Q. M.; OLSEN, M. Growth of aflatoxigenic and aflatoxin formation in Brasil nuts. **World Mycotoxin Journal**, v 1, n. 2, p. 127-137, 2008.
- LAFLEUR, J. R. **O mercado da castanha do Pará no Brasil**. Recife: Sociedade para o Desenvolvimento tecnológico (EOCTEC), 1992.
- MULLER, C.H.; FIGUEIREDO, F.J.C.; KATO, A.K.; CARVALHO, J.E.U. DE. **A cultura da castanha-do-brasil**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1995. 65p.
- NUNES, I. L.; MAGAGNIN, G.; BERTOLIN, T. E.; FURLONG, E. B. Arroz comercializado na região Sul do Brasil: aspectos micotoxicológicos e microscópicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 190-194, 2003.
- OLIVEIRA, B. R. DE; ALCÂNTARA, E. M.; PICCOLI, R. H.; BATISTA, L. R. Ocorrência *Aspergillus carbonarius* produtor de ocratoxina A. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**, 20., 2006, Curitiba. Microbiologia, Micotoxicologia e Biotecnologia.
- OLSEN, M.; JOHANSSON, P.; MOLLER, T.; PALADINO, R.; LINDBLAD, M. *Aspergillus nomius*, an important producer in Brazil nuts? **World Mycotoxin Journal**, v 1, n. 2, p. 123-126, 2008.
- PACHECO, A. M.; SCUSSEL, V. M. **Castanha-do-brasil: da floresta tropical ao consumidor**. Florianópolis: Editograf, 2006, 176 p. il.
- PACHECO, A. M.; SCUSSEL, V. M. **Selênio e aflatoxinas em castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* h.b.k.) e qualidade de produtos derivados**. 2007. 144 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.
- PAS. PROGRAMA DE ALIMENTOS SEGUROS. Manual de segurança e qualidade para a cultura da castanha-do-brasil. 62 p. Brasília: 2004

PITT, J. I.; HOCKING, AILSA D.; GLENN, IAN R. An improved medium for the detection of *Aspergillus fravus* and *A. parasiticus*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 54, 109-114. 1983.

SALEEMULLAH, A. I., KHALIL, I. A.; SHAH, H. **Aflatoxin contents of stored and artificially inoculated cereals and nuts**. Food Chemistry, Peshawar, v. 98, p. 699–703, 2005.

SALOMÃO, R. DE P.; ROSA, N. A.; CASTILHO, A.; MORAIS, K. A. C. Castanheira-do-brasil recuperando áreas degradadas e provendo alimento e renda para comunidades da Amazônia Setentrional. **Ciências Naturais**, Belém, v. 1, n. 2, p. 65-78, 2006.

SANTOS, J. U. M. DOS; BASTOS, M. DE N. DO C.; GURGEL, E. S. C.; CARVALHO, A. C. M. *Bertholletia excelsa* Humboldt & Bonpland (Lecythidaceae): aspectos morfológicos do fruto, da semente e da plântula. **Ciências Naturais**, Belém, v. 1, n. 2, p. 103-112, 2006.

SAS Institute Inc., Cary - NC, USA. 2003.

SILVA, F.A. **Aplicação de microondas no processo de beneficiamento de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*)**. 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos) - Universidade de Campinas.

SIMÕES, A. V. **Impactos de tecnologias alternativas e do manejo da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*, HUMB. & BONPL., 1808) no controle da contaminação por aflatoxinas em sua cadeia produtiva**. 2004. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias, Área de concentração: Sistemas Agroflorestais.) - Universidade Federal do Amazonas.

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

REFERÊNCIAS

- AMADO, M. A. Métodos imunológicos na detecção e determinação de aflatoxinas em alimentos: vantagens e inconvenientes. **Millenium - Revista do ISPV**, v. 26, 2002.
- ARRUS, K.; BLANK, G.; ABRAMSON, CLEARC, D. R.; HOLLEY, R.A. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. **Journal of Stored Products Research**, v. 41, p. 513–527, 2005.
- AYCICEK, H.; AKSOY, A.; SAYGI, S. Determination of aflatoxin levels in some dairy and food products which consumed in Ankara, Turkey. **Food Control**, v. 16, p. 263-266, 2005.
- BAPTISTA, A. S.; HORII, J.; BAPTISTA, A. S. Fatores físico-químicos e biológicos ligados à Produção de micotoxinas. **B.CEPPA**, Curitiba, V. 22, n. 1, 1- 14, jan/Jun, 2004.
- BAYMAN, P; BAKER, J. L.; MAHONEY, N. E. *Aspergillus* on tree nuts: incidence and associations. **Mycopathologia**, v. 155, p. 161–169, 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - Resolução CNNPA/MS nº 34/76 de 19 de janeiro de 1977. Dispõe sobre teores de aflatoxina em alimentos para consumo humano.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Projeto de Monitoramento da Castanha do Brasil. Relatório de Atividades . 2002. Brasília/DF: 2002. p.110.
- BULLERMAN, L. B.; SCHOEREDER, L. L.; PARK, K. Y. Formation and control of mycotoxins in food. **Journal of Food Protection**, v. 47, n. 8, p. 637-646, 1984.
- CAMARGO, I. P. DE; CASTRO, E. M. DE; GAVILANES, M. L. Aspectos da anatomia e morfologia de amêndoas e plântulas de castanheira-do-brasil. **Rev. Cerne**, V.6, n.2, p. 11-018, 2000.
- CARRILLO, L. Microbiologia Agrícola. Disponível em: <<http://www.unsa.edu.ar/matbib/hongos/01htextomohos.pdf>> Acesso em: 30 abr. 2008
- CARRILLO, L. **Los hongos de los alimentos y forrajes**. Universidad Nacional de Salta, 2003.
- 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: **IV Congresso Latinoamericano de Micotoxicologia. Havana, Centro Nacional de Sanidad Agropecuária**, 2003.

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

CE. Decisão da Comissão 2003/493/CE de 4 de julho de 2003. Regulamenta as condições especiais na importação de castanhas com casca originadas de ou consignadas do Brasil. OJL 168 de 5 de julho de 2003, p. 33-38. Disponível em <<http://europa.eu.int/eurx/lex/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=>> Acesso em 09 de jan. 2003

CLEMENT, C. R.; CLAY, J. W.; SAMPAIO, P. T. B. **Biodiversidade amazônia: exemplos e estratégias de utilização**. Manaus: PDET, 2000.1ª Edição.

CÓRDOVA, K. R. V. 2006. 141 f. **Desidratação osmótica e secagem convectiva de maçã fuji comercial e industrial**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Paraná, PR, 2006.

COTTA, J. N.; KAINER, K. A; WADT, L. H.O.; STAUDHAMMER, C. L. Shifting cultivation effects on Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) regeneration. **Forest Ecology and Management**, v. 256, p. 28–35, 2008.

DUARTE, A. F. ASPECTOS DA CLIMATOLOGIA DO ACRE, BRASIL, COM BASE NO INTERVALO 1971 – 2000. **Revista Brasileira de Meteorologia**, v.21, n.3b, 308-317, 2006.

DUBOIS, J. C. L. Utilização do Potencial Extrativista das Florestas Amazônicas: Soluções Encontradas pelo Homem na Amazônia. Conteúdo de palestra apresentada no Depto de Fitotecnia, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. **Seropédica**, 1996.

FAO. Legislação para micotoxinas. Disponível em <<http://www.fao.org.br/.pdf>> Acesso em 29 abril, 2006, 20:20:30.

FAO. Codex committee on contaminants in food. Discussion paper on aflatoxin contamination in brazil nuts second session. Agenda item 11e Netherlands, 31 march/04 april, 2008.

FERNANDES, E. T. M. B. **Diversidade morfológica e produção de *Bertholletia excelsa* H.B.K. (LECYTHIDACEAE) no sudeste do estado do Acre – Brasil**. Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, 23 a 28 de Setembro de 2007, Caxambu – MG.

FERREIRA, H.; PITTNER, E; SANCHES, H. F.; MONTEIRO, M. C. **Aflatoxinas: um risco a saúde humana e animal**. Ambiência Guarapuava, PR v.2 n.1 p. 113-127 jan./jun. 2006.

FRANK, H. K.; BETANCOURT, L. A Castanha-do-pará I: Origem, Produção e Características Físicas e Químicas. **Boletim SBCTA**, Campinas, v. 15, n. 4, p. 351-365, 1981.

FREIRE, F. DAS C. O.; KOZAKIEWICZ, Z; PATERSON, R. R. M. **Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts**. Centro Nacional de Pesquisa de Agroindústria Tropical, 2000.

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

GONZAGA, D. S. DE O. M. **Considerações sobre inovações na cadeia produtiva da castanha-do-brasil no Estado do Acre**. 2008. 39 f. Monografia (Especialização em Inovação e difusão Tecnológica) - Associação Brasileira de Pesquisa Tecnológica. Rio Branco, 2006.

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

KAINER, K. A.; WADT, L. H. O.; STAUDHAMMER, C. L. Explaining variation in Brazil nut fruit production. **Forest Ecology and Management**, V. 250, p. 244–255, 2007.

KUMAR, V.; BASU, M.S.; RAJENDRAN, T.P. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. **Crop Protection**, v. 27, p. 891–905, 2007.

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

MARKLINDER, I.; LINDBLAD, M.; GIDLUND, A.; OLSEN, M. Consumers' ability to discriminate aflatoxincontaminated Brazil nuts. **Food Add.** v. 22 (1), p. 56-64. 2005.

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA GABINETE DO MINISTRO PORTARIA Nº 846, DE 08 DE NOVEMBRO DE 1976. Especificações para padronização, classificação e comercialização interna da Castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.), aprovadas pela portaria Ministerial nº 846 de 08 de 11 de 1976,

MULLER, C.H.; FIGUEIREDO, F.J.C.; KATO, A.K.; CARVALHO, J.E.U. DE. **A cultura da castanha-do-brasil**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1995.. 65p.

NILÜFER, D.; BOYACIOGLU, D. Comparative study of three different methods for the determination of aflatoxins in Tahini. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 12, p. 3375-3379, 2002.

NORDIN, N.; LUCHESE, R. H. Detecção de aflatoxina e zearalenona em milho (*Zea mays*), destinado à alimentação animal. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 32, n. 1, p. 35-39, 1998.

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

OLIVEIRA, B. R. DE; RESENDE, D. B.; PICCOLI, R. H.; BATISTA, L. R. Identificação de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger* produtores de micotoxinas em castanha-do-brasil comercializada no município de Lavras/mg. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**, 11^o, 2006, Curitiba, Resumos... Área: Microbiologia, Micotoxicologia e Biotecnologia.

OLIVEIRA, C. A. F. DE; GERMANO, P M LEAL. Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular. **Rev. Saúde Pública**, v. 31, n. 4, p. 417-24, 1997.

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

PACHECO, A. M.; SCUSSEL, V. M. **Selênio e aflatoxinas em castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* h.b.k.) e qualidade de produtos derivados**. 2007. 144 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

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

PAS. PROGRAMA DE ALIMENTOS SEGUROS. Manual de segurança e qualidade para a cultura da castanha-do-brasil. 62 p. Brasília: 2004

PAS. Programa de alimentos seguros. Elementos de apoio para o Sistema APPCC. 2^a edição, Brasília:Embrapa, 361p, 2000.

PEREIRA, M. M. G.; CARVALHO, E. P. DE; PRADO, G. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. **B.Ceppa**, Curitiba, v 20, v 1, p. 114-156, 2002.

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

PITT, J .I.; HOCKING, AILSA D.; GLENN, IANNRE. An improved medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 54, 109-114. 1983.

RIBEIRO, F. V.; WANDELLI, E. Castanheira (*Bertholletia excelsa*) em sistemas agroflorestais implantadas em áreas de pastagens degradadas na Amazônia Ocidental. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE SISTEMAS AGROFLORESTAIS**, 4., 2002, Ilhéus. Sistemas Agroflorestais, tendência da agricultura ecológica nos trópicos: sustento da vida e sustento de vida.

SALEEMULLAH, A. I., KHALIL, I. A.; SHAH, H. **Aflatoxin contents of stored and artificially inoculated cereals and nuts**. Food Chemistry, Peshawar, V. 98, p. 699–703, 2005.

SAS Institute Inc., Cary - NC, USA. 2003.

SEPROF. Secretaria de Extrativismo e Produção Familiar. Gerência da modernização e Industrialização da castanha-do-brasil. Relatório Técnico. 2000.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESA -SEBRAE / MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA – MCT: Projeto Centro de Ciência: Programa Piloto para Proteção das Florestas Tropicais do Brasil-PPG-7 . Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA. Co-Edição-SEBRAE. Apoio:PPG-7, 1995.

SHANLEY, P.; CYMERYS, M.; GALVÃO, J. **Frutíferas da mata na vida amazônica**. Belém: 1998. 127 p. il. P 21-28.

SILVA, F.A. **Aplicação de microondas no processo de beneficiamento de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*)**. 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos) - Universidade de Campinas.

SYLOS, C. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; CARVALHO, P. R. N. Occurrence of aflatoxin M₁ in milk and dairy products commercialized in Campinas, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v. 13, n. 2, p. 169-172, 1996.

SIMÕES, A. V. **Impactos de tecnologias alternativas e do manejo da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*, HUMB. & BONPL., 1808) no controle da contaminação por aflatoxinas em sua cadeia produtiva**. 2004. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias, Área de concentração: Sistemas Agroflorestais.) - Universidade Federal do Amazonas.

SOUZA, J. M. L.; CARTAXO, C. B. DA C.; LEITE, F. M. N; REIS, F. DA S. **Avaliação microbiológica de amêndoas de castanha-do-brasil em usinas de beneficiamento no Acre**. Rio Branco, 2004.

SOUZA, M. L. DE; MENEZES, H. C. DE. **Processamentos de amêndoa e torta de castanha-do-brasil e farinha de mandioca: parâmetros de qualidade**. Ciência Tecnologia de Alimentos, Campinas, 24(1): 120-128, jan.-mar. 2004.

SOUZA, M. L. DE. **Processamento de cereais matinais extrusados de castanha-do-brasil e com mandioca**. Campinas:UNICAMP, 2003. Tese de doutorado, Faculdade de engenharia de alimentos da Universidade Estadual de Campinas, 2003.

SOUZA, M. L. DE; RODRIGUES, R. DA S.; FURQUIM, M. F. G.; EL-DASH, A.A. **Processamento de “cookies” de castanha-do-brasil**. B.CEPPA, Curitiba, v.19, n. 129, p. 328,2001.

SYLOS, C. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; CARVALHO, P. R. N. Occurrence of aflatoxin M₁ in milk and dairy products commercialized in Campinas, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v. 13, n. 2, p. 169-172, 1996.

TANIWAKI, M.H.; FONSECA, H.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. Variabilidade de produção de aflatoxinas por linhagens de *Aspergillus flavus* em diferentes tempos de manutenção. **Scientia Agrícola**, v. 50, n. 1, p. 140-150, 1993.

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

VILHENA, M. R. **Ciência, Tecnologia e Desenvolvimento na Economia da castanha-do-brasil: A transformação industrial da Castanha-do-brasil na COMARU - Região Sul do Amapá**. Campinas, 2004. 159 p. Dissertação (Mestrado em Política Científica e Tecnológica), Universidade estadual de campinas.

WADT, L. H. de O.; KAINER, K. A.; NUNES, G. M.; LEITE, F. M. N. E OUTROS. **Manejo da castanheira (*Bertholletia excelsa*) para a produção de castanha-do-brasil**. Rio Branco: Secretaria de Extrativismo e Produção Familiar. 42p il. Seprof documento técnico, n. 3. 2005a.

WADT, L. H. DE O.; K. A. KAINER; D. A. P. GOMES-SILVA. Population structure and nut yield of a *Bertholletia excelsa* stand in Southwestern Amazonia. **Forest Ecology and Management**, v. 211, p. 371-384, 2005b.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Fluxograma de produção na floresta identificado junto à comunidade do Seringal Porongaba, Brasiléia, Acre, Brasil, 2007.

LIMPEZA DA ÁREA, COLETA E AMONTOA DOS OURIÇOS

1. **Limpeza da área** – é feito o corte da vegetação rasteira e cipós ao redor da castanheira que impede o acesso aos ouriços. É realizada com uso de facão e/ou foice;
2. **Amontoa** – consiste no recolhimento dos ouriços de forma manual à medida que caem das árvores e juntam um número mínimo de 180 a 200 em média. É feita dispendo os ouriços diretamente sobre o solo não utilizando nenhuma proteção, ou em alguns casos, utiliza-se uma camada de folhas de palmeira;
3. **Quebra** – dependendo da quantidade que de ouriços a quebra é realizada no mesmo dia; quando não, leva uma semana ou até 15 dias para retornar no local para quebrar; o facão ou foice são os equipamentos utilizados. Corta-se a área superior (região do opérculo) do ouriço e chamada de chapéu, colocam-se as castanhas diretamente no saco retirando-se os pedaços de ouriço, os umbigos, as castanhas cortadas, podres e chochas, antes de colocarem no saco.
4. **Transporte para o paiol** – é realizado manualmente (costa do produtor) ou no lombo de animal (burro, jumento, boi) com cangalha ou zorra. Dependendo do volume e da distância deste para o armazém da Associação os produtores transportam no mesmo dia. Existe um controle e cronograma de coleta para uso do comboio de animais (FIGURA 1).

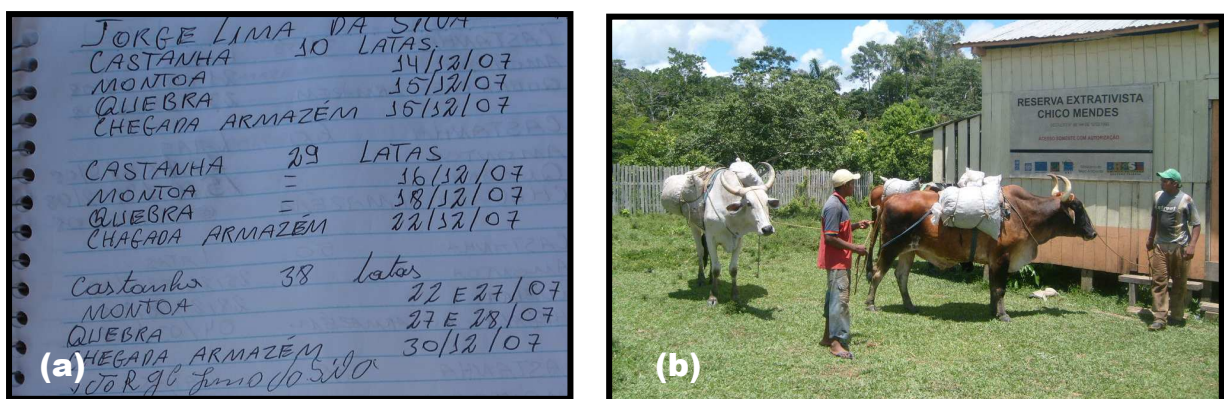


FIGURA 1 – Controle e cronograma de coleta: (a) Anotações da Associação e (b) Comboio de animais.

5. Armazenamento no paiol comunitário – o armazenamento é feito a granel, porém separado por produtor, antes da secagem e depois nos sacos; cada produtor é responsável pelo revolvimento da sua produção dentro do armazém (FIGURA 2)



FIGURA 2 – Sistema de armazenagem comunitária (a) separação individual e (b) secagem da castanha-do-brasil em secador de tela

6. Transporte para o armazém da Associação – os produtores mais próximos transportam as castanhas para o armazém de animal ou manualmente; outros de locais mais distantes (um a dois dias de viagem de barco) utilizam animais que transportam em média 200 kg.

7. Armazenamento no armazém da Associação – na recepção da castanha, é realizado o corte¹, para verificar questão de qualidade para fins de pagamento do produto. O responsável avalia também a aparência e aspecto geral da castanha. O armazenamento é feito a granel, separando-se as castanhas mais molhadas/úmidas das que estão com aparência mais secas.

8. Transporte para a Cooperativa central em Rio Branco – é feito em caminhões, assim que a estrada permite acesso (abril e maio). Os produtores cujas colocações estão localizadas em pontos do riozinho muito abaixo do armazém, transportam a castanha para Rio Branco (armazém Cooperacre) de barco, pois os custos são menores.

APÊNDICE B – Resumo da análise de variância das variáveis analisadas do ambiente e da castanha-do-brasil das amostras coletadas em três épocas de coleta na floresta, Brasiléia, Acre, Brasil, no período de Janeiro a Março do ano de 2008.

Fonte de Variação	GL	Temperatura ambiente (°C)	Umidade Relativa (%)	Atividade de água	Temperatura da amêndoa (°C)	<i>Aspergillus flavus/Aspergillus parasiticus</i> (ufc.g ⁻¹)	Outros Fungos (ufc.g ⁻¹)	Aflatoxina (µ.kg ⁻¹)			
								B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
Castanhal (Bloco)	2	0,5879 ^{ns}	41,133 ^{**}	0,002480 ^{ns}	0,8506 ^{ns}	1040,6116 ^{ns}	22.823.805,6207 ^{ns}	0,0641 ^{ns}	0,0003 ^{ns}	0,0209 ^{ns}	0,000074 ^{ns}
Época de coleta	2	1,4513 ^{ns}	20,8042 ^{**}	0,000649 ^{ns}	1,8120 ^{ns}	487,8388 ^{ns}	34.213.325,0908 ^{ns}	0,0627 ^{ns}	0,0003 ^{ns}	0,0189 ^{ns}	0,000074 ^{ns}
Resíduo	21	0,9019	3,4138	0,000435	2,0815	1823,8934	32.521.511,1114	0,0702	0,0003	0,0208	0,000079
Total	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Média	-	24,91	98,37	0,98	24,50	12,8648	3.231,7756	0,0728	0,0088	0,0342	0,0067
Coefficiente de variação	-	3,91	1,88	2,13	5,89	151,35	17,86	10,11	0,91	6,13	0,44

(i) ^{ns} – não significativo, ^{**} - significativo a 1 % de probabilidade

APÊNDICE C – Resumo da análise de variância das variáveis analisadas nas amostras de castanha-do-brasil coletadas em três tipos de seleção da amontoa na floresta, Brasília, Acre, Brasil, no período de Janeiro a Março do ano de 2008.

Fonte de Variação	de GL	Quadrado Médio					
		Temperatura ambiente	Umidade Relativa	Atividade de água	Temperatura da amêndoa	<i>Aspergillus flavus/Aspergillus parasiticus</i>	Outros Fungos
Castanhal (Bloco)	2	1,5181 ^{ns}	1,4048 ^{ns}	0,0013 ^{ns}	4,0033 ^{ns}	17.378,1536 ^{ns}	2,6501 ^{ns}
Tipo de seleção	2	0,1081 ^{ns}	0,3359 ^{ns}	0,000078 ^{ns}	0,4477 ^{ns}	26.722,5883 ^{ns}	3,3393 ^{ns}
Resíduo	22	1,4031	0,9912	0,000571	1,7511	8.878,9565	2,5031
Total	26	-	-	-	-	-	-
Média	-	24,98	99,39	0,97	24,31	36,1784	16.483,8869
Coefficiente de variação	-	4,74	1,00	2,46	5,44	141,05	24,90

(i)^{ns} – não significativo

APÊNDICE D – Correlação entre os resultados obtidos nas três épocas de coleta de castanha-do-brasil na floresta

Correlação	Temperatura do ambiente (°C)	Umidade relativa (%)	Atividade de água	Temperatura da amêndoa (°C)	<i>Aspergillus flavus / parasiticus</i>	Outros fungos
Temperatura do ambiente (°C)	1.000	-0.073	-0.206	-0.747	-0.264	-0.192
		0.715	0.301	<.0001	0.183	0.336
Umidade relativa (%)	0.073	1.000	-0.281	-0.399	0.031*	-0.308
	0.715		0.155	0.039	0.875	0.060
Atividade de água	-0.206	-0.281	1.000	0.103	0.163	0.193
	0.301	0.155		0.608	0.416	0.334
Temperatura da amêndoa (°C)	-0.747	-0.399	0.103	1.000	0.470	0.180
	<.0001	0.039	0.608		0.013	0.368
<i>A. flavus/parasiticus</i>	-0.264	0.031*	0.163	0.470	1.000	-0.075
	0.183	0.875	0.416	0.013		0.708
Outros fungos	-0.192	-0.308	0.193	0.180	-0.075	1.000
	0.336	0.117	0.334	0.368	0.708	

* Significativo a 5%

APÊNDICE E – Correlação dos resultados e as variáveis analisadas da castanha-do-brasil na amontoa (tipos de seleção) na floresta, durante os meses de Fevereiro a Março do ano de 2008.

Correlação	Temperatura ambiente (°C)	URA (%)	Aw	Temperatura da amêndoa (°C)	<i>A. flavus/parasiticus</i>	Outros fungos
Temperatura ambiente (°C)	1.000	-0.242	-0.290	-0.440	-0.017**	-0.286
URA (%)	0.233	1.000	0.150	0.024	0.930	0.165
Aw	-0.242	-0.077	1.000	-0.030*	0.154	-0.147
Temperatura da amêndoa (°C)	0.233	0.708	0.708	0.882	0.450	0.482
<i>A. flavus/parasiticus</i>	-0.290	-0.077	1.000	0.328	-0.122	0.112
Outros fungos	0.150	0.708	0.328	0.101	0.550	0.593
	-0.440	-0.030*	0.328	1.000	0.100	0.380
	0.024	0.882	0.101		0.625	0.060
	-0.017*	0.154	-0.122	0.100	1.000	-0.092
	0.930	0.450	0.550	0.625		0.659
	-0.286	-0.147	0.112	0.380	-0.092	1.000
	0.165	0.482	0.593	0.060	0.659	

* Significativo a 5%

** Significativo a 1%

APÊNDICE F – Resumo da análise de variância para os tipos de aflatoxina identificados nas amostras castanha-do-brasil coletadas nos três tipos de seleção da amontoa na floresta, Brasília, Acre, Brasil, no período de Janeiro a Março do ano de 2008.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio			
		Aflatoxina ($\mu\text{.kg}^{-1}$)			
		B ₁	B ₂	G ₁	G ₂ *
Castanhal (Bloco)	2	477,1166 ^{ns}	0,080063 ^{ns}	0,001454 ^{ns}	-
Tipo de seleção	2	688,0494 ^{ns}	0,116736 ^{ns}	0,000976 ^{ns}	-
Resíduo	20	525,6242	0,090308	0,001020	-
Total	24	-	-	-	-
Média	-	4,6536	0,0672	0,0140	0,0050
Coefficiente de variação	-	138,02	11,30	1,53	-

(i) ^{ns} – não significativo

(ii) * A análise de variância não detectou variação no teor de aflatoxina G₂ entre as amostras.

APÊNDICE G – Resumo da análise de variância para as amostras coletadas no tempo de armazenagem comunitária, Brasília, Acre, durante meses de Fevereiro a Julho do ano de 2008.

Fonte de Variação	de GL	Quadrado Médio						Aflatoxina ($\mu\text{.kg}^{-1}$)			
		Temperatura ambiente	Umidade Relativa	Atividade de água	Temperatura da amêndoa	<i>Aspergillus flavus</i> / <i>Aspergillus parasiticus</i>	Fungos Totais	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
Castanhal (Bloco)	2	76,8250 [*]	330,1000 ^{ns}	0,0136 ^{ns}	3,4902 ^{ns}	45.185,8333 ^{ns}	1.924.511,1651 ^{ns}	1.035,5038 [*]	4,1504 ^{ns}	2.665,7273 ^{ns}	5,4257 ^{ns}
Tempo de armazenagem	4	25,0971 ^{ns}	388,2355 ^{ns}	0,0930 ^{**}	0,7751 ^{ns}	24.402,0833 ^{ns}	5.726.965,1028 ^{ns}	1.770,7103 ^{**}	12,8627 ^{**}	3.801,0397 [*]	17,8725 [*]
Resíduo	23	16,4360	243,4960	0,0066	1,6955	22.974,9637	3.706.346,8348	407,9949	1,7494	1.542,2495	7,1847
Total	29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Média	-	27,19	76,36	0,8220	24,7213	50,8333	2.124,6246	10,5903	0,7338	13,9345	0,7957
Coeficiente de variação	-	14,91	20,44	9,95	5,27	117,97	14,53	88,00	29,13	126,58	48,43

(i) ^{ns} – não significativo, * Significativo a 5 % de probabilidade, ** Significativo a 1 % de probabilidade

APÊNDICE H – Correlação dos resultados das análises realizadas e as variáveis obtidas para a castanha-do-brasil na etapa de armazenagem comunitária no período de 0 a 90 dias, durante meses de Fevereiro a Julho do ano de 2008.

Correlação	Temperatura ambiente (°C)	Umidade relativa (%)	Atividade de água	Temperatura da amêndoa (°C)	<i>A. flavus/parasiticus</i>	Outros Fungos Aflatoxina
Temperatura ambiente (°C)	1.000	-0.565	0.349	0.564	-0.285	-0.473
Umidade relativa (%)	0.001	1.000	0.058	0.001	0.126	0.008
Atividade de água	-0.565	0.001	1.000	-0.454	0.261	0.121
Temperatura da amêndoa (°C)	0.001	0.020	0.058	1.000	0.163	0.523
<i>A. flavus/parasiticus</i>	0.349	-0.422	0.020	0.353	1.000	-0.057*
Outros Fungos Aflatoxina	0.058	0.020	0.055	0.055	0.264	0.762
	0.564	-0.454	0.353	1.000	-0.210	-0.113
	0.001	0.011	0.055		0.264	0.550
	-0.285	0.261	0.213	-0.210	1.000	0.340
	0.126	0.163	0.256	0.264		0.065
	-0.473	0.121	-0.057*	-0.113	0.340	1.000
	0.008	0.523	0.762	0.550	0.065	

* Significativo a 5%

APÊNDICE I – Correlação dos resultados das análises de aflatoxina e as variáveis obtidas para a castanha-do-brasil na etapa de armazenagem comunitária no período de 0 a 90 dias, durante meses de Fevereiro a Julho do ano de 2008.

Correlação	Temperatura ambiente (°C)	URA (%)	Aw	Temperatura da amêndoa (°C)
Aflatoxina B ₁	-0.3665 0.0463	-0.0497* 0.7939	0.0339* 0.8585	-0.1317 0.4876
Aflatoxina B ₂	-0.3654 0.0470	-0.2443 0.1931	0.1277 0.5011	-0.1295 0.4950
Aflatoxina G ₁	-0.3695 0.0445	0.0633 0.7395	0.0868 0.6481	-0.1411 0.4568
Aflatoxina G ₂	-0.3511 0.0571	-0.0394* 0.8361	0.1494 0.4304	-0.1381 0.4666

(*) Significativo a 5 % de probabilidade