



**THAIANA MARINHA DE ALMEIDA SOUSA**

**INCIDÊNCIA DE FUNGOS DOS GÊNEROS *Aspergillus* E  
*Penicillium* EM DIFERENTES GENÓTIPOS DE CASTANHA  
DO BRASIL E AVALIAÇÃO DOS ÓLEOS FIXOS NO  
CONTROLE DE *Aspergillus flavus* PRODUTOR DE  
AFLATOXINAS**

**LAVRAS - MG  
2018**

**THAIANA MARINHA DE ALMEIDA SOUSA**

**INCIDÊNCIA DE FUNGOS DOS GÊNEROS *Aspergillus* E *Penicillium* EM  
DIFERENTES GENÓTIPOS DE CASTANHA DO BRASIL E AVALIAÇÃO DOS  
ÓLEOS FIXOS NO CONTROLE DE *Aspergillus flavus* PRODUTOR DE  
AFLATOXINAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Doutora.

Orientador  
Dr. Luís Roberto Batista  
Coorientadora  
Dra. Fabiana Franca Reinis Passamani

**LAVRAS - MG  
2018**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha  
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados  
informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Sousa, Thaiana Marinha de Almeida.

Incidência de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em diferentes genótipos de castanha do Brasil e avaliação dos óleos fixos no controle de *Aspergillus flavus* produtor de aflatoxinas / Thaiana Marinha de Almeida Sousa. - 2018.

82 p.

Orientador(a): Luís Roberto Batista.

.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.  
Bibliografia.

1. *Bertholletia excelsa*. 2. Aflatoxinas. 3. *Aspergillus*. I.  
Batista, Luís Roberto. II. Título.

**THAIANA MARINHA DE ALMEIDA SOUSA**

**INCIDÊNCIA DE FUNGOS DOS GÊNEROS *Aspergillus* E *Penicillium* EM  
DIFERENTES GENÓTIPOS DE CASTANHA DO BRASIL E AVALIAÇÃO DOS  
ÓLEOS FIXOS NO CONTROLE DE *Aspergillus flavus* PRODUTOR DE  
AFLATOXINAS**

**INCIDENCE OF FUNGI FROM *Aspergillus* And *Penicillium* GENUS IN DIFFERENT  
BRAZIL NUTS GENOTYPES AND EVALUATION OF FIXED OILS IN THE  
CONTROL OF *Aspergillus flavus* AFLATOXIN PRODUCER**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 29 de junho de 2018.

Dra. Suzana Reis Evangelista	UFLA
Dra. Carolina Valeriano de Carvalho	UFLA
Dra. Michelle Ferreira Terra	EMATNE
Dra. Sara Maria Chalfoun	EPAMIG
Dr. Marcelo Magalhães	EMBRAPA

Dr. Luís Roberto Batista  
Orientador  
Dra. Fabiana Franca Reinis Passamani  
Coorientadora

**LAVRAS - MG  
2018**

*Aos meus pais, Gilberto e Isabel; ao meu esposo, Bruno; minha filha, Manuela e minhas  
irmãs, Andressa e Luiza,  
Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela dádiva da existência.

Ao meu orientador, Dr. Luís Roberto Batista, por ter me concedido a oportunidade de conduzir este trabalho da melhor maneira, pela confiança e pela amizade.

À Dra. Fabiana Passamani, minha coorientadora, pela amizade, por tratar sempre meus assuntos com pontualidade. Agradeço também por compartilhar sua sabedoria com paciência e generosidade.

Aos meus amigos e colegas de trabalho, Leonardo, Raul, Larissa, Nathasha, Sirlei e Michele, por todo companheirismo nesta caminhada.

Aos meus pais, Gilberto e Isabel, que sempre foram meus exemplos de honestidade e disciplina, foram responsáveis pela construção do meu caráter e me criaram com a maior dedicação e amor incondicional.

Às minhas queridas irmãs, Andressa e Luiza, minhas verdadeiras amigas, meu porto seguro.

Ao meu esposo, Bruno, pelo incentivo, companheirismo, paciência, compreensão e carinho nesta etapa de minha vida. Agradeço por seu imenso amor, presente em todos os momentos da minha vida e por ser meu grande incentivador.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), à Universidade Federal de Lavras (UFLA), ao Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA), à Empresa de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), pelo apoio financeiro e a oportunidade de fazer o doutorado e realizar o presente estudo.

Agradeço a todos que participaram, de forma direta ou indireta, desta conquista.

## RESUMO

A castanha-do-brasil representa a forma de subsistência de muitas famílias da região amazônica. A extração, o beneficiamento e o armazenamento são pontos críticos de controle importantes na produção. Devido ao fato de o substrato e as condições climáticas da região serem favoráveis ao desenvolvimento de fungos aflatoxigênicos e, conseqüentemente, à produção de aflatoxinas, tornam-se necessários estudos da microbiota presente nas castanhas. A utilização de agentes naturais no controle dessas espécies torna-se fundamental, visto que a castanha-do-brasil é considerada um produto orgânico. De forma a avaliar a distribuição das espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, bem como o potencial toxigênico, foram coletadas amostras de cinco genótipos diferentes de castanha-do-brasil no estado do Amazonas. As amostras foram analisadas por meio do plaqueamento direto, os fungos identificados por métodos morfológicos e o potencial toxigênico, pela cromatografia delgada. Espécies do gênero *Aspergillus* apresentaram maior incidência que espécies do gênero *Penicillium* em todos os genótipos, todavia, não houve diferença significativa na distribuição das espécies nem de isolados produtores entre os genótipos. Pela técnica de cromatografia gasosa foi avaliado o perfil dos ácidos graxos dos diferentes genótipos e foram detectadas diferenças entre os compostos determinados em cada genótipo. Ao testar-se a atividade antifúngica dos óleos extraídos no crescimento do *A. flavus*, observou-se diferença significativa entre os genótipos e as concentrações. Considerando o uso do óleo da castanha como agente natural no controle do crescimento de *A. flavus*, todos os genótipos avaliados obtiveram, em uma determinada concentração, efetividade. Dentre os resultados obtidos pôde-se observar a diferença no perfil de ácidos graxos; os genótipos 1 e 4, 5 e 3 foram agrupados por semelhança na composição e o genótipo 2 apresentou um perfil diferente dos demais genótipos. Os genótipos 1, 3 e 5 apresentaram o ácido henecosanoico como composto majoritário; o genótipo 2, o ácido tridecanoico e o genótipo 4, o ácido linolênico. Houve diferença estatística nos halos de inibição formados em cada genótipo, tendo os genótipos 1 e 2 apresentado maiores halos de inibição que os genótipos 3 e 5, e todos maiores halos que o óleo extraído do genótipo 4. A concentração interferiu no crescimento do *Aspergillus flavus*, tendo as concentrações de 250 µl, 62,5 µl, 7,81 µl e 3,91 µl sido mais eficientes do que as concentrações de 125µl, 31,25 µl e 15,63 µl, e todas mais eficazes do que a concentração de 500 µl. Os resultados obtidos reforçam a necessidade de estudos destes compostos isoladamente, a fim de identificar qual componente pode ter exercido maior atividade antifúngica.

**Palavras-chave:** *Bertholletia excelsa*. Aflatoxinas. *Aspergillus*. *Penicillium*. Antifúngico.

## ABSTRACT

Brazil nuts represent the subsistence form of many families in the Amazon region. Extraction, processing and storage are important critical control points in production. Due to the substrate and climatic conditions of the region favorable to the development of aflatoxigenic fungi and consequently the production of aflatoxins, it is necessary to study the mycobiota present in the nuts. The use of natural agents in the control of these species becomes fundamental, since Brazil nuts are considered an organic product. In order to evaluate the distribution of *Aspergillus* and *Penicillium* species, as well as the toxigenic potential, samples of 5 different genotypes of Brazil nuts were collected in the state of Amazonas. The samples were analyzed by direct plating, and the fungi identified by morphological methods and toxigenic potential by the thin chromatography, species of the genus *Aspergillus* presented higher incidence than species of the genus *Penicillium* in all the genotypes, however there was no significant difference in the distribution of the species nor of isolates between the genotypes. The fatty acid profile of the different genotypes was evaluated by the gas chromatography technique, and differences were detected between the compounds determined in each genotype. When testing the antifungal activity of the extracted oils on the growth of *A. flavus*, a significant difference was observed between the genotypes and the concentrations. Considering the use of chestnut oil as a natural agent in the control of *A. flavus* growth, all evaluated genotypes obtained a certain concentration, effectiveness. Among the results obtained we can observe the difference in the fatty acid profile, being genotypes 1 and 4, 5 and 3 grouped by similarity in the composition and the genotype 2 presented a different profile of the other genotypes. Genotypes 1, 3 and 5 presented heptacosanoic acid as the major compound, genotype 2 tridecanoic acid and genotype 4 linolenic acid. There was a statistical difference in the inhibition halos formed each by genotype, with genotypes 1 and 2 greater inhibition halos than genotypes 3 and 5 and both larger halos than oil extracted from genotype 4. Concentration interfered with the growth of *Aspergillus flavus*, with concentrations of 250  $\mu\text{l}$ , 62.5  $\mu\text{l}$ , 7.81  $\mu\text{l}$ , 3.91  $\mu\text{l}$  more efficient than the concentrations of 125  $\mu\text{l}$ , 31.25  $\mu\text{l}$  and 15.63  $\mu\text{l}$  and all other concentrations effective than the 500  $\mu\text{l}$  concentration. The results obtained reinforce the need for studies of these compounds alone in order to identify which compound may have exerted greater antifungal activity.

**Keywords:** *Bertholletia excelsa*. Aflatoxins. *Aspergillus*. *Penicillium*. Antifungus.



## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

Figura 1 - Fluxograma descritivo da etapa de pré-coleta. ....	18
Figura 2 - Fluxograma descritivo da etapa de pós-coleta.....	19
Figura 3 - Estrutura química planar das principais aflatoxinas. ....	25
Figura 4 - Estrutura química planar do metabolismo da aflatoxina B1. ....	26
Figura 5 - Fluxograma de fatores influenciadores da síntese de aflatoxinas. ....	28

### CAPÍTULO 2

Figura 1 - Distribuição de espécies do gênero <i>Aspergillus</i> , isoladas por amostra. ....	58
Figura 2 - Número de espécies do gênero <i>Penicillium</i> isoladas em cada genótipo de castanha-do-brasil avaliado. ....	59
Figura 3 - Distribuição das espécies produtoras de toxinas por genótipo. ....	61

### CAPÍTULO 3

Figura 1 - Análise dos componentes principais do perfil dos ácidos graxos entre os genótipos. ....	73
Figura 2 - Agrupamento dos genótipos de acordo com o perfil dos ácidos graxos determinado em cada genótipo. ....	74
Figura 3 - Halo de inibição, em cm, em função da concentração de óleo fixo. ....	76

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Produção nacional de castanha-do-brasil.....	17
Tabela 2 - Descrição das etapas de pós-colheita da castanha-do-brasil.....	20
Tabela 3 - Pontos críticos de controle na etapa de pós-colheita. ....	21
Tabela 4 - Pontos críticos de controle no beneficiamento. ....	22
Tabela 5 - Limite máximo de aflatoxina B1, B2, G1 e G2 em castanhas.....	31
Tabela 6 - Ingestão diária recomendada de vitaminas e minerais para adultos. ....	34
Tabela 7 - Composição da castanha-do-brasil crua, em 100 g de parte comestível: ácidos graxos (g) .....	34
Tabela 8 - Nomes comuns e sistemáticos dos ácidos graxos identificados na castanha-do-brasil.....	35
Tabela 9 - Composição da castanha-do-brasil crua, em 100 gramas de parte comestível: centesimal. ....	35
Tabela 10 - Composição da castanha-do-brasil crua, em 100 gramas de parte comestível: minerais.....	35

### CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Quantidade de isolados produtores por amostra.....	61
---	----

### CAPÍTULO 3

Tabela 1 - Caracterização de ácidos graxos presentes em cada genótipo de castanha-do-brasil avaliado. ....	75
Tabela 2 - Halo de inibição por concentração .....	76
Tabela 3 - Halo de inibição por genótipo.....	78

## LISTA DE ABREVIATURAS

AFLs	aflatoxinas
AFB1	aflatoxina B1
AFB2	aflatoxina B2
AFG1	aflatoxina G1
AFG2	aflatoxina G2
Aw	atividade de água
CCD	cromatografia em camada delgada
DNA	ácido desoxirribonucleico
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre o Cancêr
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IRD	ingestão diária recomendada
kg	quilograma
LMT	limites máximos toleráveis
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
ml	mililitro
µg	micrograma
OMS	Organização Mundial da Saúde
pH	potencial hidrogeniônico
PFNM	produtos florestais não madeireiros
Se	selênio
UR	umidade relativa
UV	ultravioleta

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1</b> .....	12
1	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	12
2	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	14
2.1	Castanha-do-brasil ( <i>Bertholettia excelsa</i> ) .....	14
2.2	Genótipos de castanha-do-brasil .....	15
2.3	Importância econômica da castanha-do-brasil .....	16
2.4	Produção da castanha-do-brasil .....	17
2.4.1	Pontos críticos de controle de microrganismos aflatoxigênicos na cadeia produtiva da castanha-do-brasil .....	20
2.5	Fungos produtores de aflatoxinas .....	22
2.5.1	Aflatoxinas .....	24
2.5.2	Fatores que influenciam a produção de aflatoxinas .....	27
2.6	Legislação nacional e internacional .....	30
2.7	Propriedades nutricionais da castanha-do-brasil .....	32
2.8	Benefícios do consumo de castanha-do-brasil na profilaxia de doenças .....	35
2.9	Utilização de óleos e extratos vegetais como agentes antimicrobianos .....	38
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	40
	<b>CAPÍTULO 2 INCIDÊNCIA DE FUNGOS DOS GÊNEROS <i>Aspergillus</i> E <i>Penicillium</i> EM DIFERENTES GENÓTIPOS DE CASTANHA-DO-BRASIL</b> ...	51
1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	53
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	55
2.1	Coleta e preparo das amostras .....	55
2.2	Isolamento e identificação dos fungos .....	55
2.3	Produção de micotoxinas .....	55
2.4	Análise estatística .....	56
3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	57
3.1	Distribuição das espécies do gênero <i>Aspergillus</i> .....	57
3.2	Distribuição das espécies do gênero <i>Penicillium</i> .....	59
3.3	Isolados produtores de toxina .....	60
4	<b>CONCLUSÃO</b> .....	63
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	64
	<b>CAPÍTULO 3 AVALIAÇÃO DOS ÓLEOS FIXOS EXTRAÍDOS DA CASTANHA-DO-BRASIL NO DESENVOLVIMENTO DE <i>Aspergillus flavus</i> PRODUTOR DE AFLATOXINAS</b> .....	67
1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	69
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	71
2.1	Extração dos óleos fixos .....	71
2.2	Preparo e esterificação dos ácidos graxos .....	71
2.3	Identificação e quantificação dos ácidos graxos .....	71
2.4	Atividade antifúngica .....	72
2.5	Análise estatística .....	72
3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	73
3.1	Análise do perfil dos ácidos graxos .....	73
3.2	Efeito antifúngico dos óleos .....	76
4	<b>CONCLUSÃO</b> .....	79
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	80

## CAPÍTULO 1

### 1 INTRODUÇÃO GERAL

A castanheira (*Bertholetia excelsa*) é uma espécie amplamente distribuída pela região amazônica, principalmente a Amazônia brasileira, peruana e boliviana. Devido ao importante perfil nutricional e ao sabor característico, a castanha-do-brasil ganhou relevância tanto no mercado nacional como no internacional.

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010), a castanha é o segundo produto florestal não madeireiro, em termos de importância comercial, na região norte do Brasil, perdendo somente para o fruto de açaí (*Euterpe* spp.). No ano de 2016, o Brasil produziu mais de 100.000 toneladas de castanha do Brasil (IBGE, 2016).

A obtenção dos frutos é realizada pelo método extrativista, e tal atividade gera o sustento de muitas famílias. A produção da castanha-do-brasil é considerada orgânica, uma vez que não são utilizados defensivos químicos e fertilizantes.

A coleta é iniciada a partir da queda dos ouriços da castanha, que acontece no período chuvoso, entre os meses de novembro e fevereiro. Após a coleta, os frutos são empilhados próximo à base das castanheiras, onde podem permanecer até o momento da comercialização (EMBRAPA, 2004).

Devido às características do substrato em si e às condições do ambiente em questão, a castanha se torna fonte de contaminação por fungos filamentosos importantes na produção de aflatoxinas, como as espécies *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nomius* e *Aspergillus parasiticus* (BAQUIÃO et al., 2012).

As aflatoxinas são metabólitos secundários produzidos por algumas espécies de fungos filamentosos e têm caráter carcinogênico, mutagênico, teratogênico e hepatotóxico, com efeitos crônicos ou agudos no organismo de humanos e de animais (INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCH ON CANCER - IARC, 1997).

Estes metabólitos são moléculas apolares, solúveis em clorofórmio, metanol e acetonitrila. São compostas por di-hidrofuranos unidos a anéis cumarínicos, instáveis à luz, degradáveis em elevadas temperaturas (YU et al., 2004).

Estes compostos foram descobertos quando detectados por cromatografia de camada delgada e emitiram fluorescência azul e verde, sob luz ultravioleta (UV), sendo denominados aflatoxina B (*blue*) e G (*green*), e suas frações B1, B2, G1 e G2, em que AFB1 é considerado o composto mais tóxico, classificado no grupo I do IARC (IARC, 2002).

Na floresta amazônica, vários fatores influenciam o crescimento, o desenvolvimento e a produção de aflatoxinas por espécies aflatoxigênicas. Os pontos críticos de controle estão desde a queda dos ouriços na floresta até o beneficiamento e o armazenamento. Portanto, são necessárias medidas profiláticas para não fornecer condições favoráveis ao crescimento dessas cepas aflatoxigênicas (EMBRAPA, 2004).

A falta de critérios na produção e o manejo inadequado podem gerar produtos fora dos padrões de qualidade e, conseqüentemente, se tornar uma barreira alfandegária na exportação da castanha-do-brasil.

Os óleos extraídos de plantas frequentemente exibem ação antimicrobiana, anti-inflamatória, antisséptica e apresentam atividade antioxidante (SERRA et al., 2018).

A Embrapa Acre, em parceria com a comunidade extrativista, desenvolveu e validou um manual de boas práticas para a produção da castanha-do-brasil, visando melhorar a qualidade do produto e minimizar os efeitos deletérios que o crescimento de fungos micotoxigênicos pode causar ao produto e à saúde do consumidor, além de fornecer segurança alimentar e aumento da renda do extrativista. Recomenda-se a implementação das boas práticas desde o planejamento antes da coleta, até a secagem, o armazenamento e o transporte do produto coletado (EMBRAPA, 2004).

Em vários estudos tem sido demonstrada a atividade inibitória do crescimento microbiano por meio do uso de óleos e extratos naturais extraídos de plantas (FERREIRA et al., 2017; SERRA et al., 2018; THERY; ARENDT, 2018). De acordo com Kabak, Dobson e Var (2006), óleos extraídos de plantas, em concentrações específicas, podem ser tóxicos aos fungos e ter a capacidade de inibir o crescimento e o desenvolvimento durante a colheita.

Diante do exposto, no presente estudo objetivou-se avaliar a distribuição das espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em cinco genótipos de castanha-dobrasil e identificar o potencial antifúngico do óleo extraído desses genótipos no crescimento de *Aspergillus flavus* produtor de aflatoxinas.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Castanha-do-brasil (*Bertholettia excelsa*)

*Bertholettia excelsa* é a árvore símbolo da Amazônia. Sua distribuição geográfica é ampla e abrange as florestas de Venezuela, Colômbia, Peru, Bolívia e Guiana. Porém, as formações de florestas mais densas ocorrem no Brasil (SALOMÃO, 2009).

Nativa da Amazônia, esta espécie é encontrada, principalmente, na porção brasileira, no planalto que divide a bacia formada pelos afluentes do baixo Amazonas, alto Tocantins e alto Moju. Também se difunde em terras altas ao norte do rio Jari, no estado do Pará e nos estados do Amazonas e do Acre, até o alto Beni, na Bolívia (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 1995).

A castanheira é a única espécie do gênero *Bertholettia* da família *Lecythidaceae*. Seu porte é arbóreo e seus frutos comestíveis fazem dessa espécie uns dos principais ícones vegetais da Floresta Amazônica. Distribui-se por toda a região de forma desigual, sendo abundante em algumas áreas e ausente em outras. A distribuição dessa espécie se estende de leste a oeste da bacia amazônica, ocorrendo de forma descontínua nas florestas de terra firme, entre as latitudes 5° S e 14°N (MORI; PRANCE, 1990).

Dentre as espécies dispersoras a cutia (*Dasyprocta* spp.) se destaca, pois é uma das únicas espécies capazes de abrir os frutos e, além de ser o principal predador, é também o principal dispersor não humano da castanha (YANG, 2009).

A coleta dos frutos de castanha-do-brasil é realizada nos meses de novembro a março, a partir de uma prática que sobrevive há décadas, “o extrativismo de coleta”. É uma espécie social com tendência à formação de aglomerações com alta densidade de indivíduos (MORI; PRANCE, 1990). Sua ecologia reprodutiva é dependente de polinização por abelhas robustas solitárias (MAUES, 2002) e de dispersão das sementes, seja por cutias e/ou por seres humanos (SCOLES; KLEIN; GRIBEL, 2011; TUCK et al., 2010, 2012).

Com relação ao aspecto físico da castanheira, observa-se caule cilíndrico, liso e sem ramos, com casca escura, com odor forte e ramos curvos nas extremidades (SERRANO, 2005). As plantas adultas chegam a medir 50 m de altura para emergir do dossel da floresta (PAIVA, 2009).

O peso do fruto (ouriço) pode variar entre 200 g e 5 kg, aproximadamente. As sementes (castanha com casca) representam cerca de 25% do peso dos frutos e as amêndoas

(sementes sem a casca), 13%. O peso médio de uma semente gira em torno de 8,2 g. (EMBRAPA, 1995).

A espécie *Bertholetia excelsa* exibe bom desenvolvimento em áreas de terra firme, não se adaptando bem em terras alagadas ou de grande retenção de água. As populações nativas situam-se em solos argilosos ou argiloarenosos e, em sua maioria, ocorrem nos solos de textura média a pesada, podendo aparecer também em concrecionário laterítico (piçarra) (EMBRAPA, 1995).

Fatores abióticos, como tipo de solo, estresse hídrico, altitude e intensidade luminosa, e fatores bióticos, como polinizadores, dispersores, predadores e espécies competidoras, são algumas das variáveis capazes de afetar o padrão de distribuição espacial de uma espécie (BUDKE et al., 2004).

## **2.2 Genótipos de castanha-do-brasil**

Existem estudos da estrutura genética em populações naturais que analisam e quantificam a distribuição da variabilidade no tempo e no espaço, bem como dentro e entre populações, permitindo melhor entendimento de como a seleção está atuando em função da adaptabilidade e para delinear estratégias para a conservação da variabilidade genética na natureza, no manejo sustentável e no melhoramento genético (ROSSI et al., 2009).

A diversidade genética dentro de populações pode ser quantificada por meio de diferentes parâmetros, dos quais os principais são proporção de locos polimórficos, riqueza alélica e heterozigosidade média (ALLENDORF; LUIKART, 2007). Porém, a principal ferramenta para avaliar como esta variabilidade encontra-se distribuída dentro e entre as populações são os marcadores moleculares (TELLE et al., 2003).

Entre os marcadores moleculares baseados na técnica de reação de polimerização em cadeia (PCR), o método de sequências simples repetidas (ISSR) é amplamente utilizado em estudos de diversidade e variabilidade genética, por não necessitar de informação prévia da sequência de DNA. Os procedimentos laboratoriais podem ser transferidos para qualquer espécie de planta (SOUZA et al., 2005). Além disso, esta técnica pode resultar em elevado grau de polimorfismo, apresentar alta reprodutibilidade e ter baixo custo (BRAGA, 2013).

Têm sido realizados trabalhos, nos quais são utilizadas cultivares melhoradas, voltados para a seleção de plantas de alta produtividade, que vêm sendo clonadas em campos de prova. Os principais clones (matrizes selecionadas nos castanhais) utilizados em cultivos racionais



são os denominados Santa Fé I e II, M. Pedro I e II, C-606, C-609, C-612 e C-614 e os Abufaris 1, 2 e 3, que são as principais variedades utilizadas (EMBRAPA, 1995).

Devido às condições climáticas e às características de solos semelhantes às das áreas de populações nativas, torna-se adequada a implantação de cultivos racionais da espécie pelo método de enxertia, sendo, então, viável a utilização desses genótipos melhorados no cultivo da planta e não somente pela dispersão das sementes naturalmente (EMBRAPA, 1995).

### **2.3 Importância econômica da castanha-do-brasil**

A castanha-do-brasil é um dos produtos não madeireiros mais importantes da Amazônia, em virtude da sua importância social, ecológica e econômica para a região. Em termos comerciais, a maior parte das sementes é vendida para o mercado nacional e o internacional, sendo poucas comercializadas em âmbito local ou regional (CLAY, 1997; IBGE, 2010; MORI; PRANCE, 1990).

O extrativismo e o beneficiamento das amêndoas sustentam inúmeras comunidades da Amazônia e movimentam suas economias regionais, ao mesmo tempo em que promovem a conservação da floresta (HOMMA, 2012; SÁ; BAYAMA; WADT, 2008).

As sementes comestíveis da castanheira são de grande importância econômica para as comunidades locais, por serem uma das principais fontes de renda, especialmente durante o período chuvoso (CLAY, 1997; ORTIZ, 2002).

Geralmente, a comercialização das sementes e das amêndoas é feita com base em valores volumétricos. Assim, 1 litro possui, em média, 63 sementes ou 125 amêndoas de castanha-do-brasil. Um hectolitro de sementes pesa, aproximadamente, 48 kg, e de amêndoas, cerca de 95 kg (EMBRAPA, 1995).

Seu fruto tem elevado valor econômico como produto extrativo florestal, mas isso não impede seu plantio com a finalidade de reflorestamento, tanto em plantios puros quanto em sistemas consorciados (LOCATELLI et al., 2005).

A castanha do Pará é o fruto da castanheira e tem, entre outros produtos extrativos, grande importância na formação econômica, social e política da Amazônia, estando entre os produtos mais comercializados no mercado nacional e de exportação. Para Shackleton et al. (2007), a castanha, além de ser um alimento, tem outro ponto positivo; o excedente da coleta é comercializado, minimizando o avanço da pobreza. Fiedler, Soares e Silva (2008) destacam que o extrativismo é importante, pois, além de contribuir com a renda familiar, desacelera ou impede, em alguns locais, o avanço do desmatamento.

A produção da castanha é obtida quase exclusivamente de atividade extrativa florestal, sendo as plantações pouco significativas, em termos quantitativos (ZUIDEMA, 2003).

Os extrativistas que não se ocupam exclusivamente com a atividade durante todo o ano, podendo ser classificados como produtores pluriativos, pois diversificam as atividades de geração de renda para garantir a sua subsistência (SCHENEIDER, 2003). Em um estudo realizado por Silva et al. (2013), mais de 50% dos extrativistas entrevistados informaram que também trabalham na agricultura familiar, sendo, portanto, plurativos.

Na Tabela 1 observa-se a evolução da produção nacional de castanha-do-brasil no país.

Tabela 1 - Produção nacional de castanha-do-brasil.

<b>Ano</b>	<b>2011</b>	<b>2012</b>	<b>2013</b>	<b>2014</b>	<b>2015</b>	<b>2016</b>
<b>Toneladas</b>	69 404	68 437	72 055	9 565	107 443	110 091

Fonte: IBGE (2016).

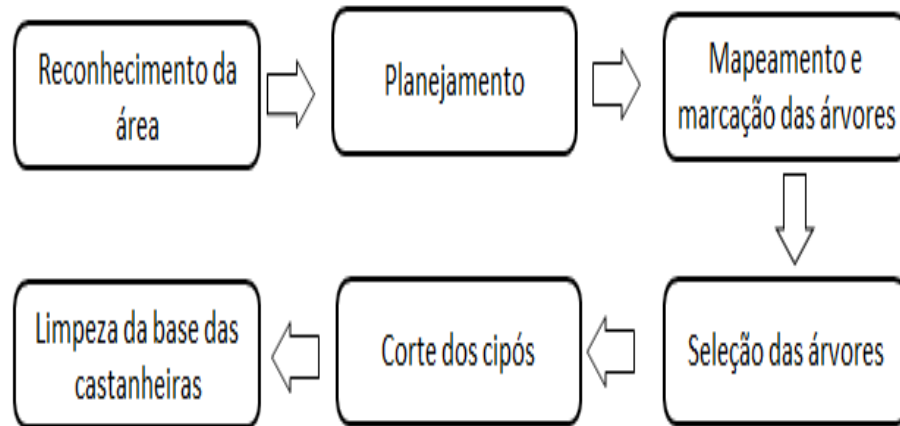
As castanhas de maior qualidade, com e sem casca, são destinadas para exportação, sendo bastante utilizadas como ingrediente na fabricação de produtos industrializados, como biscoitos, óleo, doces, cereais e produtos de panificação (SOUZA, 2003). O óleo extraído das castanhas tem aplicação na indústria farmacêutica na fabricação de cosméticos e fitoterápicos, e as cascas, na produção de biocombustível, de tapetes, de peças de artesanato e na composição de tintas (BRASIL, 2002).

## **2.4 Produção da castanha-do-brasil**

Na atividade extrativista, um dos grandes desafios é o de implementar técnicas para boas práticas de manejo florestal. O desafio é ainda maior quando se trata de produtos florestais não madeireiros (PFNM) (BRASIL, 2014).

Conforme se observa na Figura 1, a primeira etapa para o manejo sustentável das castanheiras é a fase de pré-coleta. Um bom planejamento facilitará o acesso, evitando acidentes e aumentando a produtividade (BRASIL, 2014). O processo de coleta e produção de castanha-do-brasil pelo método extrativista orgânico está representado por meio de fluxogramas, de acordo com Brasil (2014) e EMBRAPA (1995, 2004).

Figura 1 - Fluxograma descritivo da etapa de pré-coleta.

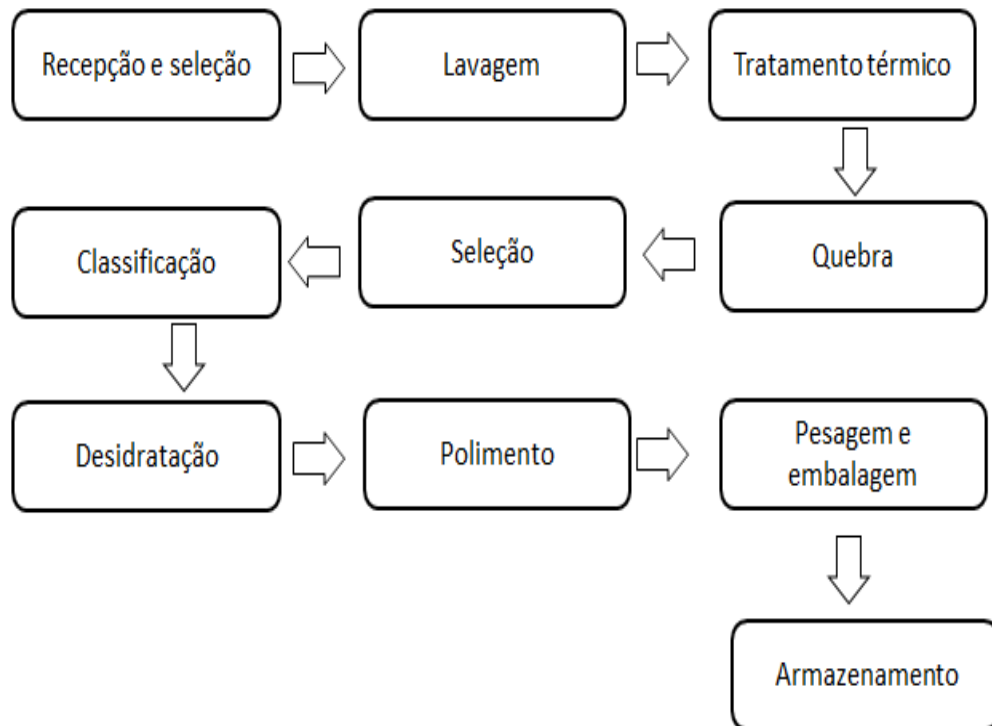


Fonte: Brasil (2014) e EMBRAPA (2014).

Segundo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2014), para evitar o desgaste da área e a diminuição da produtividade na coleta, é necessário respeitar o porte mínimo de 90 cm de diâmetro dos troncos das castanheiras. A escolha destas árvores é baseada na definição prévia de seleção e no registro da densidade de indivíduos na área a ser manejada (EMBRAPA, 2004).

Na Figura 2 observam-se o processo de pós-colheita e o elo exploratório da castanha-do-brasil. Esta é uma etapa muito importante no ciclo de produção, tendo muitos pontos críticos de controle, sendo, então, crucial a implementação de boas práticas em todo o processo. O elo de beneficiamento é o fim do ciclo de produção da castanha-do-brasil. Esta etapa exige cautela e critérios na separação e na classificação das castanhas, no polimento, na pesagem até o armazenamento do produto final.

Figura 2 - Fluxograma descritivo da etapa de pós-coleta.



Fonte: Brasil (2014) e EMBRAPA (2014).

Na Tabela 2 estão dispostas todas as etapas do elo de beneficiamento das castanhas, etapa muito importante na valorização do produto final.

Tabela 2 - Descrição das etapas de pós-colheita da castanha-do-brasil.

<b>Elo de beneficiamento</b>	
<b>Recepção e seleção</b>	Análise visual/castanhas em boa sanidade, isentas de matérias estranhas.
<b>Armazenamento na unidade de beneficiamento</b>	Janelas protegidas por telas. Controle da temperatura e umidade. Armazenamento em sacos de polipropileno. Lotes identificados por safra.
<b>Lavagem</b>	Remoção de excesso de matéria orgânica. Descarte de castanhas que flutuarem. Lavagem com água potável.
<b>Tratamento térmico</b>	Água em ebulição por 1 a 2 minutos ou autoclavada por 5 segundos
<b>Quebra</b>	Castanhas quentes, quebradas mecanicamente. Mesas e bancadas feitas de material impermeável de fácil sanitização.
<b>Seleção</b>	Feita manualmente, visando eliminar as deterioradas.
<b>Classificação</b>	Separadas por classificadores vibratórios ou manualmente. Higiene pessoal dos manipuladores. Classificadas por tamanho, peso, com casca e sem casca.
<b>Desidratação</b>	Estufas com circulação forçada, a 60 °C, ou até atingir 11% a 15% de U.
<b>Polimento</b>	Mecanicamente através de rolos ou escova com espuma.
<b>Pesagem e embalagem</b>	Pesadas e embaladas a vácuo em sacos aluminizados com capacidade para 20 kg.
<b>Armazenamento do produto final</b>	Sacos empilhados sobre estrados de madeira, com espaçamento entre as pilhas, em local arejado e limpo.

Fonte: Brasil (2014) e EMBRAPA (2004).

#### **2.4.1 Pontos críticos de controle de microrganismos aflatoxigênicos na cadeia produtiva da castanha-do-brasil**

Diante do excelente perfil nutricional da castanha-do-brasil, ela se tornou uma *commodity* importante para exportação. Todavia, no ano de 1995, observou-se uma queda na exportação, devido às barreiras fitossanitárias impostas pelos países importadores (EUROPEAN UNION - EU, 2003). Surgiu, então, a necessidade da implementação de boas práticas e pontos críticos de controle em toda a cadeia produtiva, a fim de minimizar os riscos fitossanitários provocados pela contaminação por fungos aflatoxigênicos (BRASIL, 2014; EMBRAPA, 2004).

Na Tabela 3 ilustram-se os principais pontos críticos de controle em toda a cadeia produtiva, de acordo com o manual de segurança e qualidade desenvolvido pela EMBRAPA (2004) e o Caderno de boas práticas na produção sustentável, elaborado por Brasil (2014).

Tabela 3 - Pontos críticos de controle na etapa de pós-colheita.

<b>Etapa de produção</b>	<b>Pontos críticos</b>
<b>Coleta e amontoa</b>	Longa permanência dos ouriços na floresta.
<b>Seleção</b>	Castanhas mofadas ou danificadas podem apresentar aflatoxinas
<b>Secagem</b>	Secagem inadequada favorece o desenvolvimento de microrganismos
<b>Armazenamento</b>	Condições de higiene inadequadas, presença de animais e umidade elevada podem propiciar o desenvolvimento de patógenos
<b>Transporte para a unidade de produção</b>	Reutilização de embalagens contaminadas. Transporte prolongado possibilita a alteração da umidade.

Fonte: Brasil (2014) e EMBRAPA (2004).

A coleta ocorre em período chuvoso, podendo propiciar a infecção de fungos filamentosos, quando os ouriços se desprendem das castanheiras. Para evitar a contaminação, a coleta deve ser realizada o mais próximo possível do momento da queda do fruto (EMBRAPA, 2004).

Nas localidades extrativistas, os métodos de manejo, transporte e quebra são artesanais, e as condições higiênicas, muitas vezes, precárias (BRASIL, 2002).

O processo de seleção e exclusão dos frutos contaminados irá diminuir o risco de micotoxinas (EMBRAPA, 2004). A quebra dos frutos deve ocorrer no mesmo dia em que eles serão transportados, para evitar o risco de contaminação. A primeira seleção é realizada para retirar as conchas quebradas e podres e as impurezas (BRASIL, 2014).

Em áreas de manejo de difícil acesso ou distantes da comunidade extrativista, realiza-se um pré-armazenamento em estruturas semelhantes a jirais, mas com cobertura e com telas de proteção contra insetos e roedores. O armazenamento deve ser feito no menor tempo possível, utilizando-se paneiros ou sacos de náilon ou estopa em boas condições de limpeza (BRASIL, 2014).

O produto é armazenado em barracões e levado aos portos primários de comercialização e daí até a sede do município, sendo o transporte feito por embarcações de pequeno porte. Nesta etapa, pode ocorrer o favorecimento da contaminação devido às chuvas ou às águas dos rios, que alteram a umidade das castanhas durante o transporte (PACHECO; SCUSSEL, 2006).

A armazenagem é considerada uma etapa crítica, pois, dependendo de sua duração e condução, poderão ocorrer o desenvolvimento do fungo e a produção de AFLs (EMBRAPA, 2004).

Na Tabela 4 apresenta-se a próxima etapa do processo de produção (beneficiamento), na qual existem vários pontos críticos de controle e, portanto, é uma etapa que deve ser muito bem executada, dentro dos padrões de boas práticas.

Tabela 4 - Pontos críticos de controle no beneficiamento.

<b>Etapa de produção</b>	<b>Pontos críticos de controle</b>
<b>Recepção e seleção</b>	Falta de inspeção pode resultar em lotes contaminados.
<b>Armazenamento</b>	Superfícies contaminadas por animais domésticos. Instalações físicas inadequadas. Controle integrado de pragas ineficiente. Temperatura e umidade elevadas podem favorecer o desenvolvimento de microrganismos aflatoxigênicos.
<b>Lavagem</b>	Uso de água imprópria pode favorecer a contaminação por patógenos
<b>Quebra</b>	Contaminação das castanhas por falhas no controle da higiene dos manipuladores, utensílios e superfícies.
<b>Seleção</b>	Recontaminação por falta de controle da higiene.
<b>Classificação</b>	Recontaminação por falhas no controle da higiene do processo
<b>Desidratação</b>	Umidade final fora da faixa de 11% a 15% pode favorecer o crescimento de espécies aflatoxigênicas.
<b>Polimento</b>	Recontaminação por utensílios, superfícies ou manipulador.
<b>Pesagem e embalagem</b>	Recontaminação por utensílios, superfícies ou manipulador contaminados. Embalagem inadequada com furos, permitindo entrada de insetos e desenvolvimento de microrganismos.
<b>Armazenamento do produto pronto</b>	Armazenamento fora dos padrões de empilhamento e espaçamento, em ambiente sujo e em não conformidade com as condições de temperatura e umidade estabelecidas.

Fonte: Brasil (2014) e EMBRAPA (2004).

## 2.5 Fungos produtores de aflatoxinas

A contaminação por fungos e seus metabólitos nos alimentos tem sido foco na ciência dos alimentos para identificar riscos e prevenir doenças (MARTINS et al., 2012).

Até o ano de 1999, mais de 100.000 fungos haviam sido identificados, sendo 400 espécies consideradas potencialmente toxigênicas e cerca de 5% são conhecidas por produzirem compostos tóxicos ou classes de compostos que causam efeitos deletérios à saúde de animais e humanos em diversas partes do mundo (BATA; LASZTITY, 1999).

Os problemas da sanidade da castanha-do-brasil e os perigos toxicológicos datam desde o início da década de 1960, com a “podridão da castanha”, causada por espécies de

fungos do gênero *Aspergillus* (ALMEIDA, 1963), bem como a associação de *A. flavus* com aflatoxinas na castanha-do-brasil na Inglaterra (MENESES, 1968).

Tempos depois, a partir de relatos de um surto grave de envenenamento agudo de perus e outros pássaros, conhecida como doença dos perus X, no Reino Unido (BLOUNT, 1960), e sua associação com a contaminação de amendoim por *Aspergillus flavus* (SARGEANT et al., 1961), foi constatado o caráter carcinogênico das AFLs, associado ao câncer de fígado em humanos (LEBRETON; FRAYSSINET; BOY, 1962).

O Brasil e boa parte da América do Sul, que é predominantemente um continente tropical e subtropical, provêm condições ambientais favoráveis para o desenvolvimento de fungos em diversas culturas alimentares. Dependendo das condições do substrato e do clima de certas regiões do continente, a síntese de elevadas concentrações de aflatoxinas, durante o período de colheita até o armazenamento, pode ser favorecida (SCUSSEL, 2008).

Três espécies do gênero *Aspergillus* recebem uma atenção considerável, devido à sua capacidade de produzir aflatoxinas. São elas *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus nomius* (BAQUIÃO et al., 2012; REIS et al., 2012).

Em um estudo da microbiota de castanha-do-brasil foi relatada a presença dos seguintes gêneros de fungos, em ordem decrescente de frequência: amêndoas - *Phialemonium* spp. (54%), *Penicillium* spp. (16%), *Fusarium* spp. (13%), *Phaeoacremonium* spp. (11%) e *Aspergillus* spp. (4%); cascas - *Phialemonium* spp. (62%), *Phaeoacremonium* spp. (11%), *Penicillium* spp. (10%), *Fusarium* spp. (9%) e *Aspergillus* spp. (5%) (REIS et al., 2012).

Em vários estudos sobre a distribuição das espécies em castanhas-do-brasil foram identificadas, com grande incidência, as espécies *Aspergillus flavus*, *A. nomius*, *A. pseudonomius*, *A. niger*, *A. tamaritii*, *Penicillium glabrum*, *P. citrinum*, *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp., *Fusarium oxysporum*, *Fusarium* spp., *Phialemonium* spp., *Phaeoacremonium* spp., *A. Bertholletius* e *P. Expansum*, entre outras (BAQUIÃO et al., 2012, 2013; CALDERARI et al., 2013; GONÇALVES et al., 2012; OLSEN et al., 2008; REIS et al., 2012; TANIWAKI et al., 2012).

Cepas de *Aspergillus* da seção *Flavi* isoladas foram identificadas por abordagem polifásica, como *A. nomius* (Acre, 56%; Amazonas, 81%; Amapá, 68% e Pará, 62%). *A. flavus* foi isolado em menor frequência em todas as regiões (Acre, 33%; Amazonas, 13%; Amapá, 29% e Pará, 35%). Espécies isoladas com menor incidência foram *A. parasiticus* (Acre, 2%; Amapá e Pará, 3%), *Aspergillus tamaritii* (Acre, 7% e Amazonas, 3%), *Aspergillus pseudotamaritii* (isolado apenas no Acre, 2%) e *Aspergillus caelatus* (Amazonas, 3% e Pará, 2%) (REIS et al., 2012).



Em um estudo da diversidade de espécies em amostras de castanhas-do-brasil coletadas no estado do Amazonas foram identificadas as espécies *Aspergillus flavus* (75,5%), *Aspergillus nomius* (22,3%) e *Aspergillus parasiticus* (2,2%). Todos os isolados de *A. nomius* e *A. parasiticus* produziram aflatoxinas B e G (BAQUIÃO et al., 2013).

### 2.5.1 Aflatoxinas

A contaminação por aflatoxina nos alimentos é um problema de saúde global, particularmente nos países em desenvolvimento, principalmente pela capacidade de causar câncer de fígado em animais e em seres humanos (LIU; WU, 2010).

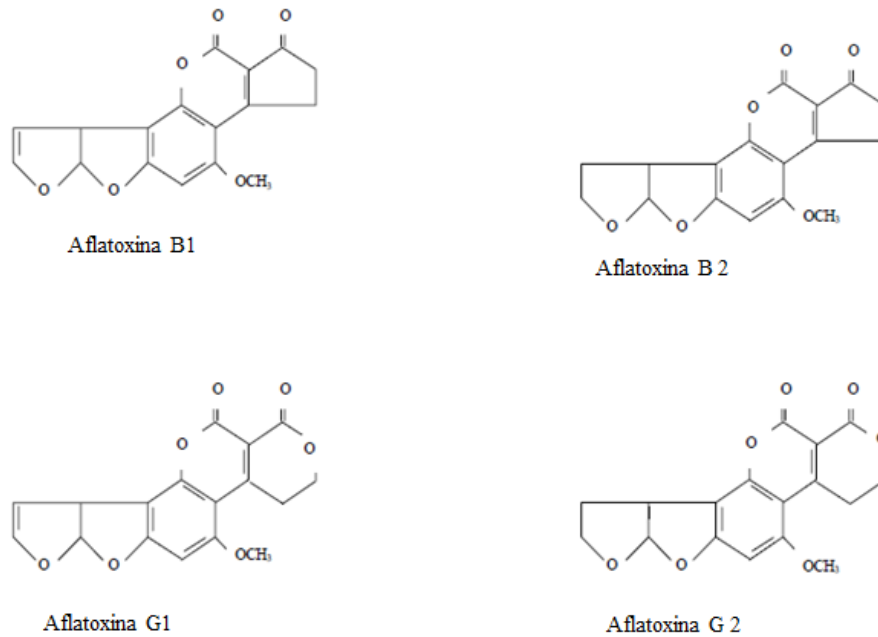
As aflatoxinas (AFLs) são micotoxinas resultantes do metabolismo secundário de fungos (MOLYNEUX et al., 2007). O termo micotoxina deriva do termo grego *mikes* (fungo) e do latim *toxicum* (veneno). AFLs são toxinas produzidas por fungos filamentosos em condições específicas (SCUSSEL, 1998) e que têm caráter carcinogênico, mutagênico e teratogênico, com efeitos crônicos ou agudos em animais e em humanos (BINDER et al., 2007; IARC, 1997).

A síntese das AFLs ocorre por uma cadeia metabólica de polipeptídios, resultante de reações enzimáticas que atuam na conversão de acetil coenzima A até o produto final AFL (MISHRA; DAS, 2007). A castanha-do-brasil e outras nozes foram estudadas por sua associação com fungos aflatoxigênicos, bem como os níveis de contaminação por aflatoxinas (SCUSSEL, 2004).

As aflatoxinas são substâncias carcinogênicas (IARC, 1997) derivadas do metabolismo secundário de fungos aflatoxigênicos. Pertencem a um grupo de, aproximadamente, 20 metabólitos produzidos por fungos filamentosos. As quatro principais aflatoxinas são conhecidas como B1, B2, G1 e G2. Aflatoxinas B2 e G2 são os di-hidroderivados dos compostos B1 e G1 (PITT; TOMASKA, 2001).

Estes compostos foram detectados por cromatografia de camada delgada e emitiram fluorescência azul e verde sob luz ultravioleta (UV), sendo denominados aflatoxina B (*blue*) e G (*green*) e suas frações B1, B2, G1 e G2 (IARC, 2002; KELLER; TURNER; BENNETT, 2005).

Figura 3 - Estrutura química planar das principais aflatoxinas.



Fonte: Diaz e Boemans (1994)

Na Figura 3 estão representadas as estruturas químicas das principais aflatoxinas, seguidas das letras que representam o spot de fluorescência que emitem, de acordo com Diaz e Boermans (1994).

Além do risco de mortalidade de animais que ingerem alimentos ou ração contaminada, quando os animais são destinados à produção leiteira, promove outro risco na cadeia produtiva de leite e derivados (STRONSNIDER et al., 2006).

Quando a AFB1 é ingerida por animais domésticos, entre eles o gado leiteiro, ela sofre biotransformação hepática e converte-se em aflatoxina M1 (AFM1), tornando-se uma forma hidroxilada da AFB1 excretada no leite, nos tecidos e nos fluidos biológicos desses animais (OATLEY et al., 2000).

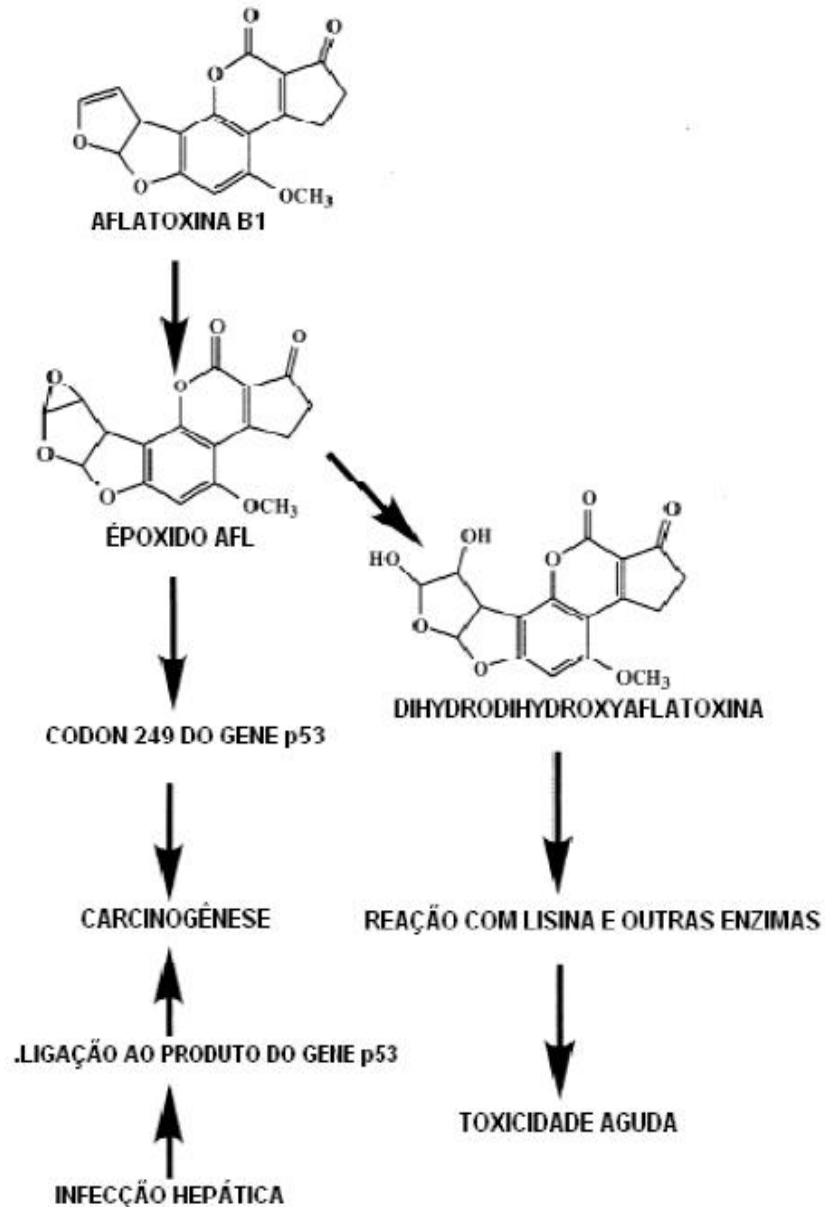
A toxicidade e a carcinogenicidade de AFB1 estão diretamente ligadas à bioativação de um composto altamente reativo denominado de AFB1 8,9-epóxido. A molécula apresenta dois sítios associados à toxicidade. O primeiro é ligado à posição da dupla ligação do anel furano e o segundo, à reatividade do grupo do anel lactona (facilmente hidrolisado e vulnerável à degradação) no meio da estrutura cumarina (LEE et al., 2001).

Diante de um crescente corpo de evidências circunstanciais de que a aflatoxina B1 é carcinogênica e altamente tóxica para humanos, em 1987, a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), da Organização Mundial da Saúde (OMS), a classificou

como um carcinógeno do Grupo 1, grupo dos compostos mais tóxicos (IARC, 2002; MOSS, 2002).

Na Figura 4 estão ilustrados o metabolismo da aflatoxina B1 e as reações tóxicas que provoca no organismo.

Figura 4 - Estrutura química planar do metabolismo da aflatoxina B1.



Fonte: Moss (2002).

A alta concentração do composto no fígado pode ser explicada pela alta permeabilidade da membrana do hepatócito, nos primeiros processos de biotransformação,

requisito para a sua carcinogenicidade e pela ligação covalente com macromoléculas hepáticas (MISHRA; DAS, 2007).

O efeito **agudo** da ingestão de alimentos contaminados por aflatoxinas é de percepção rápida e pode levar o animal à morte, por danos irreversíveis, ocasionados por altas doses da micotoxina. O efeito **subagudo** ocorre por ingestão de doses menores e causa distúrbios nos órgãos de seres humanos e de animais, especialmente no fígado. Dentre os distúrbios provocados estão cirrose, necrose do fígado, síndrome de Reye (degeneração gordurosa do cérebro), hemorragias nos rins e lesões na pele, e podem interferir no sistema imunológico, diminuindo a resistência a outras doenças (MOSS, 2002; RASTOGI et al., 2006).

Existe um grupo de enzimas, as P450, que pode ser responsável pela detoxificação de AFLs em organismos, formando compostos menos tóxicos que, assim como o composto epóxido, têm a capacidade de ser excretado do organismo, na forma conjugada com proteínas e/ou glutathione (MISHRA; DAS, 2007).

Estas enzimas podem transformar a aflatoxina em um metabólito (aflatoxina-8,9-epóxido) que pode, então, ligar-se a proteínas e causar toxicidade (aflatoxicose) ao DNA para causar lesões que, ao longo do tempo, aumentam o risco de câncer de fígado (GROOPMAN; KENSLER; WILD, 2008).

Os tratamentos de detoxificação para eliminação/redução de AFLs parecem remover a dupla ligação do anel furano terminal ou promover abertura do anel lactona. Com isso, outras reações poderão ocorrer e alterar a ligação de AFLs do anel furano terminal ao DNA e proteínas (BHATNAGAR et al., 2006).

Em estudos realizados na detoxificação da aflatoxina observou-se que os microorganismos, entre eles as bactérias ácido-láticas, apresentam grande potencial de aplicação para a degradação de aflatoxinas em alimentos (ALBERTS et al., 2009; BOVO et al., 2011).

A biodegradação das aflatoxinas pela utilização de microorganismos é uma forma alternativa de grande interesse para o controle ou a eliminação de toxinas em alimentos e rações, assegurando sua qualidade, além de poder ser utilizada com um apelo “natural” (ALBERTS et al., 2009; BATA; LASZTLEY, 1999).

### **2.5.2 Fatores que influenciam a produção de aflatoxinas**

Alguns fatores intrínsecos dos alimentos, como a composição nutricional, o teor de umidade e a atividade de água ( $a_w$ ), podem fornecer substratos para fungos produtores de AFLs. Outros fatores (externos), como temperatura, umidade relativa (UR %), tempo de

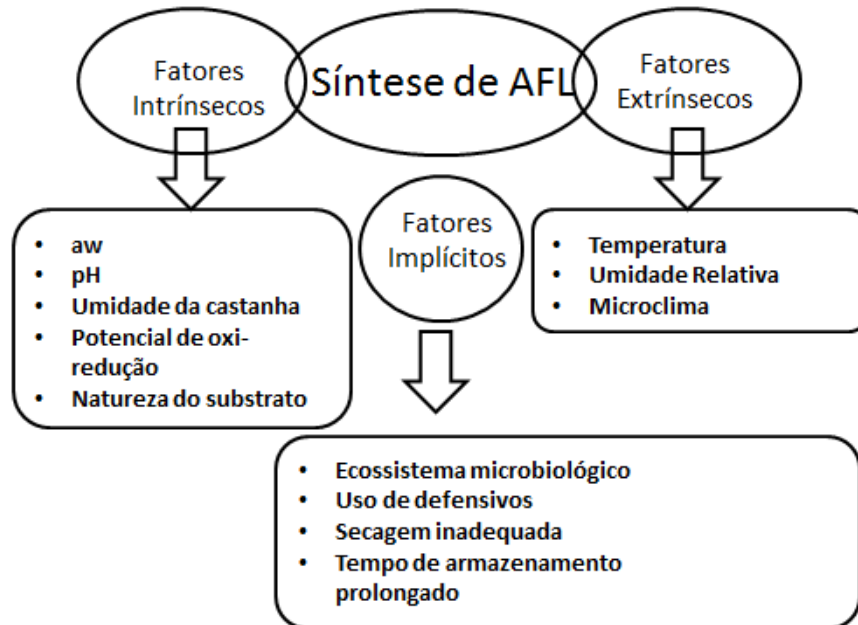
armazenagem, microclima, competição entre espécies de fungos e uso de fungicidas, também necessitam ser controlados para a segurança do alimento (KLISCH, 2007).

A atividade de água e a temperatura são os fatores mais importantes no controle do crescimento fúngico, existindo diferentes faixas de aw e temperatura ótimas para o desenvolvimento e a produção de aflatoxinas, diferindo de espécie para espécie (NORTHOLT; EGMO; PAULSCH, 1977).

Segundo Labuza (1980), o crescimento de microrganismos que influenciam a deterioração de alimentos e a produção de toxinas depende da atividade de água (aw) presente nesses alimentos. Em aw inferiores a 0,90, a maioria das leveduras não cresce, e os fungos em aw abaixo de 0,70. Com poucas exceções, é possível afirmar que um alimento é estável quando aw é inferior a 0,60 (alimentos desidratados). O produto, entretanto, não fica isento de reações químicas enzimáticas (NORTHOLT; EGMO; PAULSCH, 1977).

Na Figura 5 mostram-se os principais fatores que irão favorecer a síntese de aflatoxinas, tomando como base estudos realizados por Arora e Kaur (1999), Jay (2005) e Pitt e Hocking (1985).

Figura 5 - Fluxograma de fatores influenciadores da síntese de aflatoxinas.



Fonte: Arora e Kaur (1999), Jay (2005) e Pitt e Hocking (1985).

A produção de castanha-do-brasil ocorre em ambientes com temperaturas entre 30 e 35 °C e com alta umidade relativa (80%-95%), interferindo na atividade de água da castanha e propiciando o desenvolvimento de microrganismos (IAMANAKA; OLIVEIRA; TANIWAKI,

2010). As condições ambientais da região amazônica, bem como o método extrativista, favorecem a produção de aflatoxinas por algumas estirpes de fungos (FREITAS-SILVA; VÊNANCIO, 2011; JOHANSSON et al., 2008). Dentro da floresta, depois que os ouriços caem, eles ficam em contato direto com o solo durante vários dias antes da colheita, favorecendo a contaminação com espécies de fungos aflatoxigênicos (ARRUS et al., 2005).

O solo pode ser a principal rota de contaminação fúngica na castanha-do-brasil (BAQUIÃO et al., 2012). A infecção pode ocorrer devido à higroscopicidade das cascas em contato com o solo úmido ou por meio de injúrias provocadas pela ação de insetos, aves e outros danos mecânicos, e fatores associados com as condições climáticas da região, favorecendo a síntese de aflatoxinas (ARRUS et al., 2005; CASTRILLÓN; PURCHIO, 1988; SPENCER, 1921).

A temperatura é um fator importante no desenvolvimento das espécies e na produção de aflatoxinas. Para a produção de AFL B1 por *A. Parasiticus* e *A. Flavus*, a temperatura ótima concentra-se na faixa de 24 a 32 °C, variando de acordo com o substrato (MONTANI et al., 1988; PITT; HOCKING, 1997). Em alguns estudos foi observado que a faixa ótima de temperatura para a síntese de aflatoxinas variou entre 20 a 35 °C (NORTHOLT; EGMO; PAULSCH, 1977; PITT; HOCKING, 1997).

O teor de atividade de água (aw) pode interferir no desenvolvimento de fungos; ela é medida em escala de 0 a 1 (relação entre a pressão de vapor da água no alimento e a pressão de vapor da água pura) (CODEX ALIMENTARIUS, 2006). A aw ideal para a produção de aflatoxina B1 compreende a faixa de 0,95 a 0,99, dependendo do substrato (DIENER; DAVIS, 1967; NORTHOLT et al., 1976).

Outro fator determinante no desenvolvimento de fungos em alimentos é o conteúdo de umidade, que é, usualmente, expresso em termos de umidade absoluta do material e das necessidades fisiológicas das espécies para o seu desenvolvimento e a produção de toxinas. É fundamental manter um baixo teor de umidade (< 1%-2%) no armazenamento, realizar a secagem homogênea e a aeração das castanhas para diminuir o risco de contaminação e de produção de aflatoxinas (LORINI, 2002).

A umidade relativa (UR %), por sua vez, é a umidade de equilíbrio entre o ambiente e o alimento, e é expressa por  $UR = aw \cdot 100$ . Em condições de equilíbrio, relaciona-se aw com UR %, resultando em ganho ou perda de umidade do produto, favorecendo ou impedindo o desenvolvimento de fungos e a produção de micotoxinas (ARRUS et al., 2005).

O potencial de oxirredução, por sua vez, representa a disponibilidade de O<sub>2</sub> no alimento. Os microrganismos apresentam diferentes graus de sensibilidade ao potencial de

oxidação-redução (OIR, Eh) do seu meio de crescimento. O potencial OIR de um substrato pode ser definido, geralmente, como a facilidade com que o substrato perde ou ganha elétrons (JAY, 2005). Cepas de *A. flavus* demonstraram ser diretamente influenciadas pela associação de pH e aw, em temperaturas específicas, quanto à produção de AFLs (ARRUS et al., 2005).

Quanto ao pH, a faixa ótima para a formação das AFLs e o crescimento do fungo é, principalmente, de 5 a 6 (CODEX ALIMENTARIUS, 2006).

Um melhor entendimento das relações ecofisiológicas das espécies, bem como a combinação de pH, temperatura e atividade de água do alimento, é de grande benefício para os produtores, permitindo uma produção mais segura no aspecto toxicológico (GOK et al., 2003).

A adoção de boas práticas de fabricação torna-se importante, visto que, em más condições higiênicas e atividade de água descontrolada durante o processo de secagem e armazenamento, pode ocorrer o desenvolvimento de fungos que pertencem, principalmente, aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, representando um sério problema de deterioração e contaminação por micotoxinas (GAMBACORTA et al., 2018).

## 2.6 Legislação nacional e internacional

Em busca de assegurar o consumo e a comercialização de produtos e alimentos isentos de contaminação por micotoxinas, o Ministério da Saúde estabeleceu, em 1977, a Resolução nº 34/76, da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA), que determinava limite máximo aceitável de aflatoxinas em alimentos (BRASIL, 1977).

Diante dos embargos financeiros e do risco para a saúde de animais e humanos, em 2011, o Ministério da Saúde (MS) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio da RDC nº 7, estabeleceram que os níveis de micotoxinas deverão ser tão baixos quanto razoavelmente possível, devendo ser aplicadas as melhores práticas e tecnologias na produção, na manipulação, no armazenamento, no processamento e na embalagem, de forma a evitar que um alimento contaminado seja comercializado ou consumido (BRASIL, 2011).

Na Tabela 5 observam-se os limites máximos tolerados de aflatoxinas em diversas formas comerciais de castanha-do-brasil, segundo a RDC nº 7 (BRASIL, 2011).

Tabela 5 - Limite máximo de aflatoxina B1, B2, G1 e G2 em castanhas.

<b>Alimento</b>	<b>LMT (µg/kg)</b>
Castanhas, exceto castanha-do-brasil, incluindo nozes, pistachios, avelãs e amêndoas	<b>10</b>
Castanha-do-brasil com casca para consumo direto	<b>20</b>
Castanha-do-brasil sem casca para consumo direto	<b>10</b>
Castanha-do-brasil sem casca para processamento posterior	<b>15</b>

Fonte: Brasil (2011).

Em 1º de janeiro de 2017, o MS e a ANVISA alteraram a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011, que dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Todavia, não houve alterações nos limites para aflatoxinas, somente para as demais micotoxinas (BRASIL, 2017).

Devido à importância como *commodity* para o Brasil e pela crescente demanda de exportação, a castanha-do-brasil se torna um alimento visado no aspecto sanitário, visto que apresenta risco de contaminação por micotoxinas. De acordo com Mídio, Campos e Sabino (2001), os níveis de aflatoxinas não são diminuídos com o fator de cocção doméstica e seus subprodutos passam por processos de aquecimento moderados. Diante disso, torna-se indispensável um monitoramento dos processos de produção para controlar os níveis de AFLs na alimentação (LEONG et al., 2010).

De acordo com dados publicados pela Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO, 2004a), o controle de limites máximos toleráveis de micotoxinas vigora em mais de 100 países, porém, não existe um consenso nas concentrações.

A União Europeia, por meio do Regulamento nº. 165/2010, de 26 de fevereiro de 2010, estabeleceu níveis máximos de aflatoxina para avelãs e castanhas-do-brasil destinadas ao consumo humano direto ou à utilização como ingrediente em gêneros alimentícios. Os limites são 5,0 µg/kg para AFB1 e 10,0 µg/kg para aflatoxinas totais AFB2 + AFG1 + AFG2 (EU, 2010).

Diversos países e o Mercosul estabeleceram valores de limites máximos toleráveis (LMT) para aflatoxinas nos alimentos voltados para o consumo humano. O Mercosul estabeleceu limites para AFB1 + AFB2 + AFG1 + AFG2 de 20 µg/kg; já para Japão, Canadá e Estados Unidos, o limite é de 10 µg/kg (FAO, 2004b; MERCADO COMUM DO SUL - MERCOSUL, 2002).



## 2.7 Propriedades nutricionais da castanha-do-brasil

A castanha-do-brasil é considerada um alimento rico em proteínas, lipídios e vitaminas, além de ser excelente fonte de minerais, e uma das maiores fontes de selênio (FERRANTI et al., 2017). É composta de, aproximadamente, 60% a 70% de lipídios, 15% a 20% de proteína, enxofre, vitamina E (MARTINS et al., 2012; UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP, 2011).

Os componentes mais abundantes são os lipídios, seguidos pelas proteínas, carboidratos e fibras, respectivamente, que tornam a castanha um alimento de valor energético bastante elevado (MOODLEY; KINDNESS; JONNALAGADDA, 2007; ROS, 2009).

Além do selênio, a castanha-do-Brasil contém compostos bioativos, como tocoferol, compostos fenólicos, ácido fólico, magnésio, potássio, cálcio, proteínas e ácidos graxos mono e poli-insaturados (ROS, 2009).

Diante do fato de o perfil do solo da região amazônica ser considerado rico em selênio, os moradores locais se beneficiam de uma dieta abundante deste mineral (LEMIRE et al., 2010).

De acordo com Dumont et al. (2006), a alta concentração de selênio encontrada em uma única castanha-do-brasil é suficiente para suprir as necessidades diárias do mineral. Porém, a biodisponibilidade varia de acordo com a fonte do alimento em conjunto com o estado nutricional do indivíduo (NAVARRO-ALARCON; CABRERA-VIQUE, 2008).

A amêndoa apresenta proteína completa, em que os valores dos escores químicos dos aminoácidos essenciais são superiores aos do padrão teórico da *Food and Agriculture Organization* (FAO). As proteínas encontradas nas castanhas-do-brasil correspondem a aminoácidos específicos contendo Se (selênio), principalmente Se-metionina (DUMONT et al., 2006). A proteína total pode ser dividida em três frações, 1S, 7S e 2S, e a fração 2S é a mais significativa (SUN; LEUNG; TOMIC, 1987). Dessa fração da proteína sulfurada, 18% são metionina e 8%, cisteína.

Os lipídios são compostos importantes para conferir propriedades organolépticas aos alimentos, no caso da castanha, o sabor característico. São misturas de glicerídeos oxidáveis em diferentes graus (SILVA; MARSAIOLI, 2003).

Metade da gordura total é composta de gordura insaturada, que inclui ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs; ácido oleico) na maioria das castanhas e, principalmente, ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), incluindo ácido linoleico e ácido  $\alpha$ -linolênico (ALA; 18: 3n - 3), o n-3 (ômega-3) (ROS; MATAIX, 2006).

O'Neil, Nicklas e Fulgoni (2015) observaram que os consumidores de castanhas foram associados com melhor adequação de nutrientes e qualidade da dieta do que os não consumidores. De acordo com King et al. (2008), indivíduos que consomem castanhas têm maior ingestão de vitaminas E, K, B12 e B6, além de tiamina, riboflavina, niacina, magnésio, fósforo, cobre, potássio, cálcio, e ferro, e níveis mais baixos de sódio do que indivíduos que não possuem o hábito de consumi-las.

A ingestão contínua de castanhas, mesmo em pequenas quantidades, fornece ao organismo vitamina A, vitamina C, cálcio, ferro, magnésio e zinco (O'NEIL et al., 2012; O'NEIL; NICKLAS; FULGONI, 2015).

De acordo com ANVISA (BRASIL, 2004), a ingestão diária recomendada (IRD) é a quantidade de proteína, vitaminas e minerais que deve ser consumida diariamente para atender às necessidades nutricionais da maior parte dos indivíduos e grupos de pessoas de uma população sadia.

A dose correta de ingestão diária de nutrientes é fundamental para evitar não só dosagens tóxicas, mas também o risco de deficiência. No caso do selênio, a ingestão deficiente foi reportada em áreas com solo pobre e é conhecida como doença de Keshan (HARTIKAINEN, 2005).

Na Tabela 6 expressam-se os valores recomendados pela ingestão diária recomendada IRD para adultos, em µg e mg/dia.

Tabela 6 - Ingestão diária recomendada de vitaminas e minerais para adultos.

Nutriente	Unidade	Quantidade
Proteína	G	50
Vitamina A	G	600
Vitamina D	µg /d	5
Vitamina C	µg /d	45
Vitamina E	mg/d	10
Tiamina	mg/d	1,2
Riboflavina	mg/d	1,3
Niacina	mg/d	16
Vitamina B6	mg/d	1,3
Ácido fólico	µg/d	400
Vitamina B12	µg/d	2,4
Biotina	µg/d	25
Acido oantotênico	mg/d	5
Vitamina K	µg/d	65
Cálcio	mg/d	1000
Ferro	mg/d	14
Magnésio	mg/d	260
Zinco	mg/d	7
Iodo	µg/d	130
Flúor	mg/d	700
Fósforo	mg/d	4
Cobre	µg/d	900
Selênio	µg/d	34
Molibidênio	µg/d	45
Cromo	µg/d	35
Manganês	mg/d	2,3
Colina	mg/d	550

Fonte: Brasil (2004).

Devido ao alto teor de ácidos graxos (Tabela 7), o óleo da castanha-do-Brasil pode ser instável, já que a estabilidade dos lipídios depende das condições de estocagem do alimento, assim como da área de coleta e do genótipo (HOLCAPEK et al., 2003).

Tabela 7 - Composição da castanha-do-brasil crua, em 100 g de parte comestível: ácidos graxos (g).

Sat.	Monoin.	Poli-in.	14:0	16:0	18:0	20:0	16:1	18:1	20:1	18:2 n-6	18:3 n-3
15,3	27,4	21,0	0,04	6,14	0,16	0,03	0,18	27,14	0,04	20,97	0,04

Fonte: UNICAMP (2011).

Tabela 8 - Nomes comuns e sistemáticos dos ácidos graxos identificados na castanha-do-brasil.

Ácidos graxos	Nome comum	Nome sistemático
<b>Saturados</b>		
14:0	Mirístico	Tetradecanoico
16:0	Palmítico	Hexadecanoico
18:0	Esteárico	Octadecanoico
20:0	Araquídico	Eicosanoico
<b>Monoinsaturados</b>		
16:1	Palmitoleico	Hexadecanoico
18:1	Oleico	Octadecanoico
20:1	Gadoleico	Eicosenoico
<b>Poli-insaturados</b>		
18:2	Linoleico	Octadecadienoico
18:3	Linolênico	Octadecatrienoico

Fonte: UNICAMP (2011).

A Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) caracteriza a castanha-do-brasil crua, em 100 g de matéria comestível, na composição centesimal, minerais, vitaminas e ácidos graxos (Taco, 2011), conforme se observa nas Tabelas 9 e 10.

Tabela 9 - Composição da castanha-do-brasil crua, em 100 gramas de parte comestível: centesimal.

U (%)	kcal	Proteína (g)	Lipídeos (g)	Carbo (g)	Fibra (g)	Cinzas (g)
3,5	643	14,5	63,5	15,1	7,9	3,4

Fonte: UNICAMP (2011).

Tabela 10 - Composição da castanha-do-brasil crua, em 100 gramas de parte comestível: minerais.

Ca (mg)	Mg (mg)	Mn (mg)	P (mg)	Fe (mg)	Na (mg)	K (mg)	Cu (mg)	Zn (mg)
146	365	1,10	853	2,3	1	651	1,79	4,2

Fonte: UNICAMP (2011).

Diante do alto valor nutricional que a castanha-do-brasil apresenta, ela é utilizada para enriquecer alguns alimentos. A proteína da castanha-do-brasil foi introduzida em alimentos geneticamente modificados, como o feijão (ARAGÃO et al., 1999).

## 2.8 Benefícios do consumo de castanha-do-brasil na profilaxia de doenças

Devido à excelente composição nutricional da castanha-do-Brasil, diversos estudos foram realizados sobre a ingestão contínua e a diminuição do risco de doenças crônicas (IP;

DJ, 1994; KOCYIGIT; KOYLU; KELES, 2006; KORNSTEINER; WAGNER; ELMADFA, 2006; O'NEIL; NICKLAS; FULGONI, 2015; ROSS et al., 2009).

Distúrbios metabólicos são caracterizados, principalmente, por obesidade, hipertensão, dislipidemia, hiperglicemia, hiperinsulinemia e diabetes tipo2 que, atuando sinergicamente, podem aumentar a morbidade e a mortalidade da população idosa (GROSSO; ESTRUCH, 2016).

Resultados obtidos em estudos têm indicado que o consumo de castanhas exerce efeitos metabólicos benéficos devido à sua ação na glicemia pós-prandial e sensibilidade à insulina (BRANDT; CSHOUTEN, 2015; JENKINS et al., 2006).

Reconhecidamente ricas pelo seu excelente perfil lipídico, estudos sugerem que pode haver relação entre a frequência de consumo de oleaginosas e a redução da incidência de doenças do coração (KOCYIGIT; KOYLU; KELES, 2006).

O perfil de ácidos graxos, provavelmente, contribui para os efeitos benéficos do consumo de castanhas observados em estudos epidemiológicos (prevenção de doenças coronarianas e diabetes) e testes de alimentação (redução do colesterol) (ROS, 2009).

O consumo regular dessas castanhas melhora o perfil lipídico e a função cardiovascular, reduz o estresse oxidativo em adolescentes obesos e em indivíduos com síndrome metabólica, e reduz o risco do processo aterosclerótico em mulheres obesas, devido ao aumento da atividade da glutathiona-peroxidase (COMINETTI et al., 2012; LÓPEZ-URIARTE et al., 2010).

Por ser rica em vitamina A, a castanha pode contribuir para a prevenção de xerofthalmia e, ainda, contribuir para a diminuição de morbidade em mulheres grávidas, bem como diminuir o risco de doenças infecciosas, visto que contribui positivamente com o sistema imunológico (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA, 2010).

A lesão renal induzida por insuficiência renal promove a liberação de mediadores pró-inflamatórios e o recrutamento de moléculas de adesão e leucócitos que, em conjunto, induzem disfunção renal e mortalidade (WAN et al., 2014). Em um estudo sobre lesão renal induzida, observou-se que uma baixa ingestão de castanha-do-brasil, antes da lesão, melhora a função renal pela inibição da infiltração de macrófagos e do estresse oxidativo (ANSELMO et al., 2018).

Os tocoferóis associados aos compostos fenólicos presentes na castanha podem agir como compostos funcionais, com efeito preventivo contra câncer e doenças coronarianas em populações que a consomem com frequência (KORNSTEINER; WAGNER; ELMADFA,

2006). A função protetora contra o câncer deve-se à diminuição do estresse oxidativo e da inflamação (IP; DJ, 1994).

A ingestão de uma única porção de 20 a 50 g de castanha-do-brasil pode reduzir os marcadores da inflamação, como IL-1 (interleucina 1), IL-6, TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa) e IFN- $\gamma$  (interferon gama) (COLPO et al., 2014).

A castanha apresenta 365 mg/100 g de magnésio (UNICAMP, 2011), o que a torna um alimento rico neste micronutriente, colaborando na prevenção de doença cardiovascular, hipertensão, diabetes mellitus tipo 2, síndrome metabólica e osteoporose (ROSANOFF; WEAVER; RUDE, 2012). O magnésio ainda é um cofator essencial para mais de 350 reações enzimáticas, especialmente aquelas que envolvem ligações de fosfato de alta energia (AGARWL et al., 2012).

O cálcio é outro mineral presente na castanha de suma importância, associado à estrutura de ossos e dentes e à condução nervosa (AGARWL et al., 2012).

O selênio é um nutriente essencial para a saúde humana, e suas funções biológicas são mediadas pela expressão de cerca de 20 selenoproteínas que têm selenocisteína em seus centros ativos (NOGUEIRA; ROCHA, 2011). O selênio tem grande importância porque faz parte do sítio catalítico da enzima antioxidante glutathione peroxidase (GPx) (COMINETTI et al., 2012).

Além de atuar na detoxificação do peróxido de hidrogênio e de outros peróxidos orgânicos, a glutathione peroxidase atua também na manutenção de grupos sulfidrilas vitais na forma reduzida, na síntese de hormônios derivados do ácido araquidônico e no metabolismo de compostos tóxicos ao organismo (FERREIRA et al., 2002).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 1998), o selênio é um constituinte da 5'-iodinase, enzima atuante no metabolismo dos hormônios da tireoide; as síndromes de deficiência de iodo são mais graves quando há deficiência simultânea de selênio.

Os fitosteróis, compostos naturais dos alimentos, com estrutura semelhante à do colesterol e propriedade de aumentar a função imune, dentre outras, também foram detectados em castanha-do-brasil, com 95% (92-101) de fitosteróis totais, sendo este um valor alto em relação ao de outros alimentos (PHILIPS; RUGGIO; ASHRAF-KHORASSANI, 2005).

Uma abordagem profilática é crucial para lidar com uma população envelhecida com o objetivo de reduzir as injúrias das doenças crônicas (GROSSO; ESTRUCH, 2016). Diante dessa problemática, a ingestão de castanha-do-brasil torna-se um hábito que trará benefícios para a saúde da população, de maneira a prevenir as doenças crônicas não transmissíveis.

## 2.9 Utilização de óleos e extratos vegetais como agentes antimicrobianos

A crescente demanda por alimentos seguros, bem como a preocupação com o uso de conservantes sintéticos, promoveu a realização de pesquisas para investigar os efeitos de compostos naturais em microrganismos (MARTINS; KLUSCZCOVSKI; SCUSSEL, 2014).

Os compostos orgânicos sintetizados ou transformados pelos vegetais que não apresentam ação direta conhecida em seus processos vitais, como fotossíntese, respiração, transporte de solutos, translocação, assimilação, diferenciação ou síntese de carboidratos, proteínas e lipídeos, são classificados como metabólitos secundários (GUIMARÃES, 2007).

Diante da diversidade de compostos derivados de plantas, muitos são utilizados nas formulações de fármacos e são testados como protótipos de importantes agentes terapêuticos sintéticos (SIMÕES; SPITZEER, 2004).

Um exemplo clássico de agente natural são os óleos essenciais, que desenvolvem funções relacionadas com sua volatilidade, agindo como inibidores da germinação, na proteção contra predadores, na atração de polinizadores, na proteção contra a perda de água e o aumento da temperatura, entre outras (CRAVEIRO et al., 1981).

A concentração dos óleos e extratos vegetais é de suma importância na efetividade como antimicrobiano. A concentração do óleo para inibir o crescimento microbiano necessariamente deve ser mais elevada do que as utilizadas para realçar o sabor e o aroma dos alimentos (SHELEF, 1983).

A ação antifúngica ou antibacteriana dos óleos pode ter associação com o caráter lipofílico dos compostos que, normalmente, se integram às membranas celulares dos microrganismos, causando aumento da permeabilidade celular, extravazamento de componentes intracelulares e inativação de enzimas (BAKKALI et al., 2008; SIKKEMATB; DE BONTT, 1994; YOON et al., 2018).

Possivelmente, outro mecanismo de ação dos compostos naturais compreende a desintegração de membranas citoplasmáticas, a desestabilização do fluxo de elétrons, o transporte e a coagulação do conteúdo celular (DUARTE, 2006).

Muitos compostos naturais extraídos de plantas apresentam, em sua composição, substâncias das classes dos alcaloides, terpenos, flavonoides e lactonassessquiterpênicas, caracterizados com eficiência na atividade antimicrobiana (WYK, 2009).

De acordo com Yoon et al. (2018), ácidos graxos naturais e sintéticos são agentes antimicrobianos que desestabilizam as membranas celulares, causando uma ampla gama de efeitos diretos e indiretos.

O óleo da castanha-do-brasil obtido através da prensagem das sementes, ou pela utilização de solvente, também tem sido utilizado no enriquecimento de alimentos industrializados (SOLIS, 2001).

A utilização do óleo em adição a meios específicos, como fonte de carbono para microrganismos, propicia a produção de substâncias biosurfactantes que, devido à importância ecológica, são mais aceitas que os surfactantes sintéticos (COSTA et al., 2006).

Extratos da castanha-do-brasil são utilizados como fitoterápicos e também na ação de redução do *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas (CAMPOS et al., 2005).

Em um estudo realizado por Martins, Kluszczowski e Scussel (2014) foi demonstrada a possibilidade de usar o óleo da castanha como alternativa aos pesticidas para controlar crescimento de fungos e aflatoxinas. O óleo inibiu substancialmente o crescimento e a produção de aflatoxina por *A. Parasiticus*.

Diante do problema na segurança alimentar acarretado pelo desenvolvimento de fungos filamentosos em alimentos e a subsequente contaminação por micotoxinas, o emprego destes agentes naturais tem sido utilizado como um método alternativo para reduzir a contaminação de alimentos (SANTIAGO et al., 2018).



## REFERÊNCIAS

- AGARWL, R. et al. Magnesium deficiency: does it have a role to play in cataractogenesis? **Experimental Eye Research**, London, v. 101, p. 82-89, 2012.
- ALBERTS, J. F. et al. Degradation of aflatoxin B1 by fungal laccase enzymes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 135, p. 47-52, 2009.
- ALLENDORF, F. W.; LUIKART, G. **Conservation and the genetics of populations**. [S.l.]: Blackwell, 2007. 642 p.
- ALMEIDA, C. P. **Castanha do Pará: sua exportação e importância na economia Amazônica**. Rio de Janeiro: Serviço de Informação Agrícola, 1963. 34 p. (Estudos Brasileiros, 19).
- ANSELMO, N. A. et al. A ingestão prévia de castanha-do-brasil atenua a lesão renal induzida por isquemia e reperfusão. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, São Paulo, v. 40, n. 1, p. 10-17, 2018.
- ARAGÃO, F. J. L. et al. Expression of a methionine rich storage albumin from the Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K Lecythidaceae) in transgenic bean plants (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 223, p. 445-449, 1999.
- ARORA, D.; KAUR, J. Antimicrobial activity of spices. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Bethesda, v. 12, p. 257-262, 1999.
- ARRUS, K. et al. Microbiological and aflatoxin evaluation of Brazil nut pods and the effects of unit processing operations. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 68, p. 1060-1065, 2005.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, p. 446-475, 2008.
- BAQUIÃO, A. C. et al. Polyphasic approach to the identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts. **Food Chemistry**, London, v. 139, p. 1127-1132, 2013.
- BAQUIÃO, A. C. et al. Mycoflora and mycotoxins in field samples of Brazil nuts. **Food Control**, Guildford, v. 28, p. 224-229, 2012.
- BATA, A.; LASZTITY, R. Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 10, p. 223-228, 1999.
- BHATNAGAR, D. et al. Understanding the genetics of regulation of aflatoxin production and *Aspergillus flavus* development. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 162, p. 155-166, 2006.
- BINDER, E. M. et al. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 137, p. 265-282, 2007.
- BLOUNT, W. P. Disease of turkey poults. **Veterinary Record**, London, v. 72, p. 786, 1960.

- BOVO, F. et al. Eficiência de bactérias ácido-láticas para descontaminação de aflatoxina M1 em solução tampão fosfato. **Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 13, p. 151-156, 2011.
- BRAGA, I. **Discriminação varietal de cultivares em *Urochloa brizantha* por marcador molecular ISSR**. 2013. 52 f. Dissertação (Mestrado de Agronomia)-Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2013.
- BRANDT, P. A. van den; SCHOUTEN, L. J. Relationship of tree nut, peanut and peanut butter intake with total and cause-specific mortality: a cohort study and meta-analysis. **International Journal of Epidemiology**, Oxford, v. 44, n. 3, p. 1038-1049, 2015.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Castanha-do-pará, castanha, castanha-do-brasil, *Bertholletia excelsa* H.B.K.** Brasília, DF, 2014. 41 p. (Série Cadernos de Boas Práticas para o Extrativismo Sustentável Orgânico).
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeto de monitoramento da castanha do Brasil**: relatório de atividades. Brasília, DF, 2002. 110 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 46, p. 66-67, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 216**: cartilha sobre boas práticas para serviço de alimentação. 3. ed. Brasília, DF, 2004. 44 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 138, de 8 de fevereiro de 2017. Altera a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011, que dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos, para alterar os LMT da micotoxina deoxinivalenol (DON) em trigo e produtos de trigo prontos para oferta ao consumidor e os prazos para sua aplicação. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução nº 34/76. Fixa padrões de tolerância para as AF em alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, pt. I, p. 710, 19 jan. 1977. Seção I.
- BUDKE, J. C. et al. Distribuição espacial de *Mesadenella cuspidata* (Lindl.) Garay (Orchidaceae) em uma floresta ribeirinha em Santa Maria, RS, Brasil. **Acta Botanica Brasílica**, Porto Alegre, v. 18, p. 31-35, 2004.
- CALDERARI, T. O. et al. The biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in Brazil nuts: from rainforest to consumer. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 160, p. 267-272, 2013.
- CAMPOS, F. R. et al. Trypanocidal activity of extracts and fractions of *Bertholletia excelsa*. **Fitoterapia**, Milano, v. 76, p. 26-29, 2005.

CASTRILLÓN, A. L.; PURCHIO, A. Ocorrência de fungos contaminantes e produtores de aflatoxinas em castanha do Pará (*Bertholletia excelsa*, Humb and Bonpl, 1808). **Acta Amazônica**, Manaus, v. 18, p. 173-183, 1988.

CLAY, J. W. Brazil nuts: the use of a keystone species for conservation and development. In: FREESE, C. H. (Ed.). **Harvesting wild species: implications for biodiversity conservation**. Baltimore: The John Hopking University Press, 1997. p. 246-282.

CODEX ALIMENTARIUS. **Code of practice for the prevention and reduction of aflatoxin contamination in tree nuts: CAC/RCP 59-2005, Rev. 1-2006**. 2006.

COLPO, E. et al. Brazilian nut consumption by healthy volunteers improves inflammatory parameters. **Nutrition**, London, v. 30, p. 459-65, 2014.

COMINETTI, C. et al. Brazilian nut consumption improves selenium status and glutathione peroxidase activity and reduces atherogenic risk in obese women. **Nutrition Research**, Tarrytown, v. 32, p. 403-407, 2012.

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

CRAVEIRO, A. A. et al. **Óleos essenciais de plantas do nordeste**. Fortaleza: Ed. UFC, 1981. 210 p.

DIAZ, G. J.; BOERMANS, H. J. Fumonisin toxicosis domestics toxicology animals: a review. **Veterinary and Human Toxicology**, London, v. 36, p. 548-555, 1994.

DIENER, U. L.; DAVIS, N. D. Limiting temperature and relative humidity for growth and production of aflatoxin and free fatty acids by *Aspergillusjlavus* in sterile peanuts. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, New York, v. 44, p. 259-263, 1967.

DUARTE, T. C. M. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista Multi Ciência**, São Paulo, n. 7, out. 2006. Disponível em: <[http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos\\_07/a\\_05\\_7.pdf](http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_05_7.pdf)>. Acesso em: 10 mar. 2017.

DUMONT, E. et al. Speciation of Se in *Bertholletia excelsa* (Brazil nut): a hard nut to crack? **Food Chemistry**, London, v. 95, n. 4, p. 684-692, 2006.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Manual de segurança e qualidade para a cultura da castanha do Brasil**. Brasília, DF, 2004. (Série Qualidade e Segurança dos Alimentos).

EMPRESA BRASILEIRA DE PEAQUISA AGROPECUÁRIA. Centro de Pesquisa Agrofloreslal da Amazônia Oriental. **A cultura da castanha do Brasil**. Brasília, DF, 1995.

EUROPEAN UNION. Commission Regulation nº 165/10 of Feb 2010 amending Regulation no 1881/06, setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. **Official Journal of the European Communities**, Brussels, n. 50, p. 8-12, 2010.

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

FERRANTI, L. S. et al. Occurrence and fumonisin B<sub>2</sub> producing potential of *Aspergillus* section *Nigri* in Brazil nuts. **Mycotoxin Research**, Oxford, v. 33, n. 1, p. 49-58, 2017.

FERREIRA, K. S. et al. Concentrações de selênio em alimentos consumidos no Brasil. **Revista Panamericana de Salud Publica**, Washington, v. 11, n. 3, p. 172-177, 2002.

FERREIRA, T. P. et al. Influence of seasonality on the yield and composition of the essential oil of *Siparuna guianensis* Aublet. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 16, n. 29, p. 1611-1618, 2017.

FIEDLER, N. C.; SOARES, T. S.; SILVA, G. F. Produtos florestais não madeireiros: importância e manejo sustentável da floresta. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, Guarapuava, v. 10, n. 2, p. 264-274, 2008.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Almacenaje**. Rome, 2004a.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003**. Rome, 2004b. (FAO Food and Nutrition Paper, 81).

FREITAS-SILVA, O.; VENÂNCIO, A. Brazil nuts: benefits and risks associated with contamination by fungi and mycotoxins. **Food Research International**, Barking, v. 44, n. 5, p. 1434-1440, 2001.

GAMBACORTA, L. et al. Co-occurrence of toxigenic moulds, aflatoxins, ochratoxin A, *Fusarium* and *Alternaria* mycotoxins in fresh sweet peppers (*Capsicum annuum*) and their processed products. **World Mycotoxin Journal**, Wageningen, v. 11, n. 1, p. 159-173, 2018.

GOK, M. A. et al. Influence of temperature, water activity and pH on growth of some xerophilic fungi. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 1, p. 11-20, 2003.

GONÇALVES, J. S. et al. Molecular analysis of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 28, p. 1817-1825, 2012.

GROOPMAN, J. D.; KENSLER, T. W.; WILD, C. P. Protective interventions to prevent aflatoxin-induced carcinogenesis in developing countries. **Annual Review of Public Health**, Palo Alto, v. 29, p. 187-203, 2008.

GROSSO, G.; ESTRUCH, R. Nut consumption and age-related disease. **Maturitas**, Amsterdam, v. 84, p. 11-16, 2016.

GUIMARÃES, L. G. L. **Estudo da estabilidade e do efeito fungitóxico do óleo essencial de capim-limão (Cymbopogon citratus (DC) Stapf)**. 2007. 72 p. Dissertação (Mestrado em Agrquímica/Agrobioquímica)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

HARTIKAINEN, H. Biogeochemistry of Selenium and its impact on food chain quality and human health. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, Stuttgart, v. 18, p. 309-318, 2005.

HOLCAPEK, M. et al. Characterization of triacylglycerol and triacylglycerol composition of plants oils using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1010, p. 195-215, 2003.

HOMMA, A. K. O. Extrativismo vegetal ou plantio: qual a opção para a Amazônia? **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 26, n. 74, p. 167-186, 2012.

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da extração vegetal e silvicultura 2009**. Rio de Janeiro, 2010. 45 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da extração vegetal e silvicultura 2016**. Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pevs/quadros>>. Acesso em: 8 mar. 2018.

INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCH ON CANCER. Evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances: aromatic amines and mycotoxins. **IARC Monographs**, Lyon, v. 56, p. 245-395, 1997.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Who IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some traditional herbal medicines, some mycotoxins naphthalene and styrene: aflatoxins 82**. Lyon, 2002. 556 p.

IP, C.; LISK, D. J. Bioactivity of selenium from Brazil nut for cancer prevention and selenoenzyme maintenance. **Nutrition and Cancer**, London, v. 21, p. 203-212, 1994.

JAY, M. J. **Microbiologia de alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JENKINS, D. J. et al. Almonds decrease postprandial glycemia, insulinemia, and oxidative damage in healthy individuals, **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 136, p. 2987-2992, 2006.

JOHNSSON, P. et al. Growth of aflatoxigenic moulds and aflatoxin formation in Brazil nuts. **World Mycotoxin Journal**, Wageningen, v. 1, p. 127-137, 2008.

KABAK, D.; DOBSON, A. D.; VAR, I. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v. 46, p. 596-619, 2006.

KELLER, N. P.; TURNER, G.; BENNETT, J. W. Fungal secondary metabolism-from biochemistry to genomics. **Nature Reviews**, London, v. 3, p. 937-947, 2005.

KING, J. C. et al. Tree nuts and peanuts as components of a healthy diet. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 138, p. 1736-1740, 2008.

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

KOCYIGIT, A.; KOYLU, A. A.; KELES, H. Effects of pistachio nuts consumption on plasma lipid profile and oxidative status in healthy volunteers. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, New York, v. 16, p. 202-209, 2006.

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

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

LEBRETON, E.; FRAYSSINET, C.; BOY, J. Sur l'apparition d'hépatomes "spontanés" chez le Rat Wistar: rôle de la toxine de l'*Aspergillus flavus*: intérêt en pathologie humaine et cancérologie expérimentale. **Comptes Rendus Académie Scientifique**, Paris, v. 225, p. 784-786, 1962.

LEE, S. et al. Inhibitory effects of naturally occurring compounds on Aflatoxin B1 biotransformation. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 49, p. 5171-5177, 2001.

LEMIRE, M. et al. Elevated levels of selenium in the typical diet of Amazonian riverside populations. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 408, n. 19, p. 4076-4084, 2010.

LEONG, Y. et al. Aflatoxin occurrence in nuts and commercial nutty products in Malaysia. **Food Control**, Guildford, v. 21, p. 334-338, 2010.

LIU, Y.; WU, F. Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 118, p. 818-824, 2010.

LOCATELLI, M. et al. **Cultivo da Castanha-do-Brasil em Rondônia**. Porto Velho: EMBRAPA, 2005. (Sistemas de Produção, 7).

LÓPEZ-URIARTE, P. et al. Effect of nut consumption on oxidative stress and the endothelial function in metabolic syndrome. **Clinical Nutrition**, Philadelphia, v. 29, p. 373-380, 2010.

LORINI, I. **Armazenagem de grãos**. Campinas: IBG, 2002. 1000 p.

MARTINS, A.; KLUSCZCOVSKI, A. M.; SCUSSEL, V. M. In vitro activity of the Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) oil in aflatoxigenic strains of *Aspergillus parasiticus*. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 239, p. 687-693, 2014.

MARTINS, M. et al. Brazil nuts: determination of natural elements and aflatoxin. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 42, n. 1, p. 157-164, 2012.

MAUES, M. M. Reproductive phenology and pollination of the Brazil nut tree (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bompl. Lecythidaceae) in eastern Amazonia. In: KEVAN, P.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. (Ed.). **Pollination bees: the conservation link between agriculture and nature**. Brasília, DF: MMA, 2002. p. 245-254.

MENESES, T. Castanha-do-Pará na indústria de alimentos. **Revista Alimentos e Bebidas**, Botucatu, v. 4, p. 42-43, 1968.

MERCADO COMUM DO SUL. **Resolução nº 25**, de 2002. Regulamento Técnico Mercosul sobre limites máximos de AF admissíveis no leite, amendoim e milho. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/resol/2002/274\\_02rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/resol/2002/274_02rdc.htm)>. Acesso em: 20 abr. 2018.

MÍDIO, A. F.; CAMPOS, R. R.; SABINO, M. Occurrence of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in cooked food components of whole meals marketed in fast food outlets of the city of Sao Paulo, SP, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 18, p. 315-319, 2001.

MISHRA, H. N.; DAS, C. **A review on biological control and metabolism of aflatoxin**. Boca Raton: CRC, 2007.

MOLYNEUX, R. J. et al. Mycotoxins in edible tree nuts. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, p. 72-78, 2007.

MONTANI, M. L. et al. Water activity influence on aflatoxin accumulation in corn. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 6, p. 349-353, 1988.

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

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

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

NAVARRO-ALARCON, M.; CABRERA-VIQUE, C. Selenium in food and the human body: a review. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 400, p. 115-141, 2008.

NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. T. Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. **Archives of Toxicology**, New York, v. 85, n. 11, p. 1313-1359, 2011.

NORTHOLT, M. D.; EGMO, H. P. van; PAULSCH, W. E. Differences between *Aspergillus flavus* strains in growth and Aflatoxin 81 production in relation to water activity and temperature. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 40, n. 11, p. 78-81, 1977.

- NORTHOLT, M. D. et al. Effect of water activity and temperature on aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Journal of Milk and Food Technology**, Champaign, v. 39, p. 170-174, 1976.
- OATLEY, J. T. et al. Binding of aflatoxin B1 to bifidobacteria in vitro. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 63, n. 8, p. 1133-1136, 2000.
- OLSEN, M. et al. *Aspergillus nomius*, an important aflatoxin producer in Brazil nuts? **World Mycotoxin Journal**, Wageningen, v. 1, p. 123-126, 2008.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Elementostraco na nutrição e saúde humanas**. São Paulo: Roca, 1998.
- O'NEIL, C. E. et al. Out-of-hand nut consumption is associated with improved nutrient intake and health risk markers in US children and adults: National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2004. **Nutrition Research**, Tarrytown, v. 32, n. 3, p. 185-194, 2012.
- O'NEIL, C. E.; NICKLAS, T. A.; FULGONI, V. L. Tree nut consumption is associated with better nutrient adequacy and diet quality in adults: National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2010. **Nutrients**, Basel, v. 7, n. 1, p. 595-607, 2015.
- ORTIZ, E. G. Brazil nuts (*Bertholletia excelsa*). In: SHANLEY, P. et al. (Ed.). **Tapping the Green Market: certification & management of non-timber forest products**. London: Earthsan, 2001. p. 61-74.
- PACHECO, A. M.; SCUSSEL, V. M. **Castanha-do-brasil da floresta tropical ao consumidor**. Florianópolis: Editograf, 2006. 173 p.
- PAIVA, P. M. V. A. **Coleta intensiva e a agricultura itinerante são ameaças para os castanhais da reserva extrativista do rio Cajari, Macapá**. 2009. 106 p. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Tropical)-Universidade Federal do Amapá, Macapá, 2009.
- PHILIPS, K.; RUGGIO, D. M.; ASHRAF-KHORASSANI, M. Phytosterol composition of nuts and seeds commonly consumed in the United States. **Journal of Agriculture Food and Chemistry**, Easton, v. 53, p. 9436-9445, 2005.
- PITT, J. I.; TOMASKA, L. Are mycotoxins a health hazard in Australia? **Food Australian**, Sydney, v. 53, n. 12, p. 545-559, 2001.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. Sydney: Academic, 1985.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2<sup>nd</sup> ed. London: Blackie Academic & Professional, 1997. 593 p.
- RASTOGI, S. et al. Skin tumorigenic potential of aflatoxin B1 in mice. **Food and Chemistry Toxicology**, London, v. 44, p. 670-677, 2006.
- REIS, T. A. et al. Mycobiota and mycotoxins in Brazil nut samples from different states of the Brazilian Amazon region. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 159, p. 61-68, 2012.



- ROS, E. Nuts and novel biomarkers of cardiovascular disease. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 89, p. 1649S-1656S, 2009.
- ROS, E.; MATAIX, J. Fatty acid composition of nuts: implications for cardiovascular health. **British Journal of Nutrition**, London, v. 96, p. S29-S35, 2006. Supplement 2.
- ROSANOFF, A.; WEAVER, C. M.; RUDE, R. K. Suboptimal magnesium status in the United States: are the health consequences underestimated? **Nutrition Reviews**, New York, v. 70, p. 153-164, 2012.
- ROSSI, A. A. B. et al. Genetic diversity and geographic differentiation of disjunct Atlantic and Amazonian populations of *Psychotria ipecacuanha* (Rubiaceae). **Genetics**, Wageningen, v. 136, p. 57-67, 2009.
- SÁ, C. P.; BAYAMA, M. M. A.; WADT, L. H. O. **Coefficientes técnicos, custo e rentabilidade para a coleta de castanha-do-brasil no Estado do Acre: sistema de produção melhorado**. Rio Branco: EMBRAPA Acre, 2008. 4 p. (Comunicado Técnico, 168).
- SALOMÃO, R. P. Densidade, estrutura e distribuição espacial de castanheira-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H. & B.) em dois platôs de floresta ombrófila densa na Amazônia setentrional brasileira. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**. Ciências Naturais, Belém, v. 4, n. 1, p. 11-25, 2009.
- SANTIAGO, J. A. et al. Effect of the essential oils from *Melaleuca alternifolia*, *Melaleuca quinquenervia* and *Backhousia citriodora* on the synthesis of ochratoxin A by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* isolated from tropical wine grapes. **Journal of Food Science and Technology**, Trivandrum, v. 55, p. 418-423, 2018.
- SARGEANT, K. et al. Toxicity associated with certain samples of groundnuts. **Nature**, London, v. 192, p. 1096, 1961.
- SCHENEIDER, S. **A pluriatividade na agricultura familiar**. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2003. 253 p.
- SCOLES, R.; KLEIN, G. N.; GRIBEL, R. Crescimento e sobrevivência de *Bertholletia excelsa* Bonpl. (castanheira) em diferentes condições ambientais na região do rio Trombetas, Oriximiná, Pará. **Boletim Museu Paraense Emílio Goeldi**. Ciências Naturais, Belém, v. 6, n. 3, p. 273-293, 2011.
- SCUSSEL, V. M. Aflatoxin and food safety: recent South American perspectives. **Journal of Toxicology, Toxin Reviews**, New York, v. 23, p. 179-216, 2004.
- SCUSSEL, V. M. Aflatoxin and food safety: recent south american perspectives. **Journal of Toxicology, Toxin Reviews**, New York, v. 23, n. 2/3, p. 179-216, 2008.
- SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998.
- SERRA, E. et al. Antifungal activity of commercial essential oils. **Pathogens**, San Francisco, v. 7, p. 15, 2018.

- SERRANO, R. O. P. **Regeneração e estrutura populacional de *Bertholletia excelsa* h. B. K. Em áreas com diferentes históricos de ocupação, no vale Do Rio Acre (Brasil)**. 2005. 59 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Manejo de Recursos)-Universidade Federal do Acre, Rio Branco, 2005.
- SHACKLETON, C. M. et al. The importance of dry woodlands and forests in rural livelihoods and poverty alleviation in South Africa. **Forest Policy and Economics**, London, v. 9, n. 5, p. 558-577, 2007.
- SHELEF, L. A. Antimicrobial effects of spices. **Journal Food Safety**, Trumbull, v. 1, n. 6, p. 29-44, 1983.
- SIKKEMATB, J.; DE BONTT, J. A. M. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 269, p. 8022-8028, 1994.
- SILVA, A. A. et al. Potencial do extrativismo da castanha-do-pará na geração de renda em comunidades da Meso-região Baixo Amazonas, Pará. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 4, p. 500-509, 2013.
- SILVA, F. A.; MARSAIOLI, A. J. R. Atividade de água em amêndoas de castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*) secas por microondas e convencionalmente. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, Guarapuava, v. 5, n. 1, p. 23-32, 2003.
- SIMÕES, C. M.; SPITZEER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2004. p. 468-495.
- SOLIS, V. E. S. **Modificações no óleo da castanha do Pará**. 2001. 105 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos)-Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- SOUZA, M. L. **Processamento de cereais matinais extrusados de castanha-do-Brasil com mandioca**. 2003. 191 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.
- SOUZA, V. Q. et al. Dissimilaridade genética em mutantes da aveia tolerantes e sensíveis a ácidos orgânicos. **Bragantia**, Campinas, v. 64, n. 4, p. 569-575, 2005.
- SPENCER, E. R. Decay of Brazil nuts. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 72, p. 265-288, 1921.
- STRONSNIDER, H. et al. Workgroup report: public health strategies for reducing aflatoxin exposure in developing countries. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 114, p. 1898-1903, 2006.
- SUN, S.; LEUNG, F.; TOMIC, J. Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) proteins: fractionation, composition and identification of a sulfur-rich protein. **Journal of Agriculture Food and Chemistry**, Easton, v. 35, p. 232-235, 1987.
- TANIWAKI, M. H. et al. *Aspergillus bertholletius* sp. nov. from Brazil nuts. **PloS One**, San Francisco, v. 7, p. 1-7, 2012.

TELLES, M. P. C. et al. Caracterização genética de populações naturais de araticunzeiro (*Annona crassiflora* Mart. - Annonaceae) no Estado de Goiás. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, p. 123-129, 2003.

THERY, T.; ARENDET, E. K. Antifungal activity of synthetic cowpea defensin Cp-thionin II and its application in dough. **Food Microbiology**, London, v. 73, p. 111-121, 2018.

TUCK, J. M. T. et al. Fruit removal and natural seed dispersal of the Brazil nut tree (*Bertholletia excelsa*) in Central Amazonia, Brazil. **Biotropica**, Washington, v. 44, n. 2, p. 205-210, 2012.

TUCK, J. M. T. et al. Seed dispersal of the Brazil nut tree (*Bertholletia excelsa*) by scatter-hoarding rodents in a central Amazonian Forest. **Journal of Tropical Ecology**, Cambridge, v. 26, n. 3, p. 251-262, 2010.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Dietary guidelines for Americans**. 2010. Disponível em: <<http://www.cnpp.usda.gov/dgas2010-policydocument.htm>>. Acesso em: 1 abr. 2018.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS. **Tabela brasileira de composição de alimentos**. 4. ed., rev. e ampl. Campinas, 2011.

WAN, X. et al. IL-10 deficiency increases renal ischemia-reperfusion injury. **Nephron Experimental Nephrology**, Oxford, v. 128, p. 37-45, 2014.

WYK, C. van. Drug resistant tuberculosis in South Africa: what level of risk justifies isolation? **Medical Law**, New York, v. 28, n. 2, p. 211-220, 2009.

YANG, J. Brazil nuts and associated health benefits. **Food Science and Technology**, Trivandrum, v. 42, n. 10, p. 1573-1580, 2009.

YOON, B. K. et al. Antibacterial free fatty acids and monoglycerides: biological activities, experimental testing, and therapeutic applications. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 19, p. 1114, 2018.

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

ZUIDEMA, P. A. **Demografía y manejo del árbol de castaña (*Bertholletia excelsa*): 1-117**. Riberalta: PROMAB, 2003. (Serie Científica, 6).

## CAPÍTULO 2

### INCIDÊNCIA DE FUNGOS DOS GÊNEROS *Aspergillus* E *Penicillium* EM DIFERENTES GENÓTIPOS DE CASTANHA-DO-BRASIL

#### RESUMO

O valor nutricional associado às características organolépticas da castanha-do-Brasil a torna uma importante *commodity* brasileira para exportação. Portanto, medidas de manejo adequadas são indispensáveis na produção e no armazenamento para evitar a contaminação. Espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* produtoras de aflatoxinas são os maiores contaminantes bióticos do produto. O presente estudo foi realizado com os objetivos de identificar as espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* isoladas dos cinco genótipos de castanha-do-brasil avaliados, o potencial toxigênico das estirpes e avaliar a relação da distribuição das espécies entre os genótipos, bem como o genótipo mais susceptível à contaminação por cada gênero. Foram coletadas amostras de cinco genótipos de castanha-do-brasil na fazenda Arapuã, no estado de Amazonas. O isolamento, a identificação e o potencial toxigênico das espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram realizados no Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (DAE/UFLA). Houve prevalência de espécies do gênero *Aspergillus* em todos os genótipos, sendo a espécie *A. niger* a mais incidente, seguida de *A. parasiticus*. Dentre as espécies do gênero *Penicillium*, a mais incidente foi *Penicillium* sp1, seguida de *P. citrinum*. Não houve diferença significativa na distribuição das espécies entre os genótipos. Foram isolados de *A. parasiticus* e *A. flavus* produtores de aflatoxinas em todos os genótipos avaliados e *P. citrinum* produtor de citrinina em dois dos genótipos. Também não ocorreu diferença significativa entre a quantidade de isolados produtores e genótipo. O genótipo 3 – Manoel Pedro I foi o mais susceptível à contaminação por espécies do gênero *Aspergillus* e o genótipo 1- C 606, o que obteve maior número de isolados e maior diversidade de espécies do gênero *Penicillium* que os demais genótipos de castanha-do-brasil avaliados.

**Palavras-chave:** *Aspergillus*. *Penicillium*. Aflatoxina. Castanha-do-brasil.

## ABSTRACT

The nutritional value associated with the organoleptic characteristics of Brazilian nuts makes it an important export commodity in Brazil. Therefore, adequate management measures are indispensable in production and storage. Species of the *Aspergillus* and *Penicillium* genera producing aflatoxins are the major biotic contaminants of the product. The objective of this study was to identify the species of *Aspergillus* and *Penicillium* genera isolated from the 5 genotypes evaluated, as well as the toxigenic potential of the strains and to evaluate the relation of the distribution of the species between the genotypes. Samples of 5 brazil nut genotypes were collected at Arapuã farm in the state of Amazonas. The distribution of species of the *Aspergillus* and *Penicillium* genera and the toxigenic potential of the isolates were evaluated in the Department of Food Science of the Federal University of Lavras UFLA. There was a prevalence of species of the genus *Aspergillus* in all the genotypes, being the *A. niger* species the most incident, followed by *A. parasiticus*. Among the species of the genus *Penicillium* the most incident was *P. sp 01*, followed by *P. multicolor*, there was no significant difference in the distribution of the species among the genotypes.

**Keywords:** *Aspergillus*. *Penicillium*. Aflatoxins. Brazil nut. Genótipos.

## 1 INTRODUÇÃO

A castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) é uma planta nativa da região Amazônica e é uma das fontes alimentares mais ricas em selênio, sendo uma única castanha composta por 187 µg, capaz de suprir a necessidade diária do mineral que é de 55 µg/dia. Além de um excelente perfil de ácidos graxos, representado por 27% de ácidos graxos monoinsaturados e 21% ácidos graxos poli-insaturados, ainda apresenta um relevante conteúdo de micronutrientes, como o magnésio, o cobre e o zinco (CARDOSO et al., 2017; UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP, 2011).

Assim como a castanha-decaju, as castanhas-do-brasil são coletadas manualmente por extrativistas da região, após os ouriços maduros caírem no solo. Como a queda ocorre em época chuvosa, este contato com o solo por um período prolongado pode expor a infecções fúngicas (LUO et al., 2014).

A contaminação com espécies do gênero *Aspergillus* está diretamente relacionada às condições climáticas na floresta amazônica. Devido ao fato de o hábitat principal dessas espécies ser o solo, as médias de temperatura e umidade durante o período da colheita podem favorecer o desenvolvimento desses fungos. As médias de temperaturas da região ficam em torno de 30 a 35 °C e a umidade relativa entre 80% a 95%, fornecendo condições favoráveis ao desenvolvimento de espécies aflatoxigênicas (INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA - INMET, 2018; JOHNSON et al., 2008; OLSEN et al., 2008; PACHECO; SCUSSEL, 2006).

Estudos sobre a contaminação fúngica da castanha-do-brasil têm sido realizados desde o início do século passado, a maioria utilizando a taxonomia polifásica para a identificação das espécies (CASTRILLÓN; PURCHIO, 1988; REIS et al., 2014; SAMSON et al., 2014; SPENCER, 1921; TANIWAKI et al., 2017). Conforme estudos realizados por Freitas-Silva e Venâncio (2011) e Gonçalves et al. (2012), as espécies que mais acometem as castanhas-do-brasil são *Aspergillus flavus*, *A. nomius*, *A. parasiticus*, *A. niger*, *A. tamaritii*, *A. pulverulentus*, *Penicillium glabrum*, *P. citrinum*, *Rhizopus* spp. e *Fusarium oxysporum*. Em estudos realizados por Taniwaki et al. (2012, 2015) foram descritas duas novas espécies isoladas de castanha-do-brasil, *Aspergillus berthollettii* e *Penicillium excelsum*.

Devido ao caráter tóxico atribuído às aflatoxinas e os efeitos mutagênicos, teratogênicos e hepatotóxicos, em animais, a sua incidência nos produtos alimentícios pode acarretar em perdas econômicas consideráveis, visto que tanto os países importadores quanto

o Brasil se respaldam em uma legislação que determina limites máximos permitidos dessas micotoxinas na castanha-do-brasil (BRASIL, 2011).

No intuito de prevenir e controlar a contaminação por fungos filamentosos, métodos de manejo adequados, bem como a adoção de boas práticas, são fundamentais em todas as etapas de produção, desde a coleta, o beneficiamento, o armazenamento e a comercialização da castanha.

Devido à importância econômica e nutricional e para a comercialização de um produto seguro, o presente estudo foi realizado com os objetivos de determinar a distribuição e o potencial toxigênico das espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* presentes em cinco genótipos de castanha-do-brasil, avaliar o potencial toxigênico dos isolados e identificar qual dos genótipos é mais susceptível à contaminação por espécies de fungos dos gêneros avaliados.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Coleta e preparo das amostras

Na fazenda Arapuã, no estado do Amazonas, foi coletado 1 kg de cinco diferentes genótipos de castanha-do-brasil, em maio de 2015, os quais foram denominados G1- C- 606, G2- C- 609, G3-Manoel Pedro I, G4-Manoel Pero II e G5-Santa Fé. As amostras de castanha-do-brasil foram beneficiadas no laboratório de bromatologia, no Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA) da Universidade Federal de Lavras (UFLA). O processamento consistiu na pesagem prévia das amostras e secagem em forno, a 60 °C, por 7 dias, até atingir o peso constante.

### 2.2 Isolamento e identificação dos fungos

De cada amostra de castanha foram selecionadas oito castanhas inteiras, que foram desinfetadas superficialmente com álcool a 70% (1 minuto) e hipoclorito de sódio a 1% (30 segundos), e lavadas com água destilada estéril, por três vezes consecutivas, para a identificação dos fungos presentes no interior dos grãos, conforme descrito por Samson et al. (2000). Após a desinfecção, as castanhas foram plaqueadas em meio de cultura dicloran rosa bengal cloranfenicol (DRBC), em triplicata. As placas foram incubadas, a 25 °C, por sete dias, conforme Pitt e Hocking (1997). As colônias foram transferidas para meio de cultura ágar extrato de malte (MA) e incubadas, a 25 °C, por um período de sete dias. A partir das culturas puras, os fungos foram incubados em meio ágar czapeck levedura (CYA), à temperatura de 25 °C e 37 °C, por sete dias e ágar extrato de malte (MEA), a 25 °C, por sete dias. Após o crescimento, foram observadas as características macroscópicas e microscópicas, descritas conforme Klich (2002).

### 2.3 Produção de micotoxinas

Após a obtenção de culturas puras em malte ágar (MA), os isolados fúngicos foram inoculados em meio *yeast extract sucrose agar* (YES), a 25 °C. Após sete dias de incubação foi feito o teste de toxinas em placa de cromatografia de camada delgada, conforme a técnica de Plug-agar descrita por Filtenborg e Frisvad (1980). O teste qualitativo quanto à produção de metabólitos secundários foi realizado sob a emissão de luz ultravioleta com comprimento



de onda entre 264 nm e 366 nm, em um cromatovisor CAMAG (UF-BETRACHTER). Os isolados considerados produtores de Aflatoxina B1, B2, G1, G2, Ocratoxina A e Citrinina apresentaram fator de retenção (RF) e um spot de fluorescência semelhantes aos respectivos padrões. Os isolados analisados foram agrupados com base nos perfis de metabólitos observados.

#### **2.4 Análise estatística**

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, para avaliar a possível diferença na distribuição das espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, e quantidade de espécies produtoras de micotoxinas entre os genótipos estudados.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

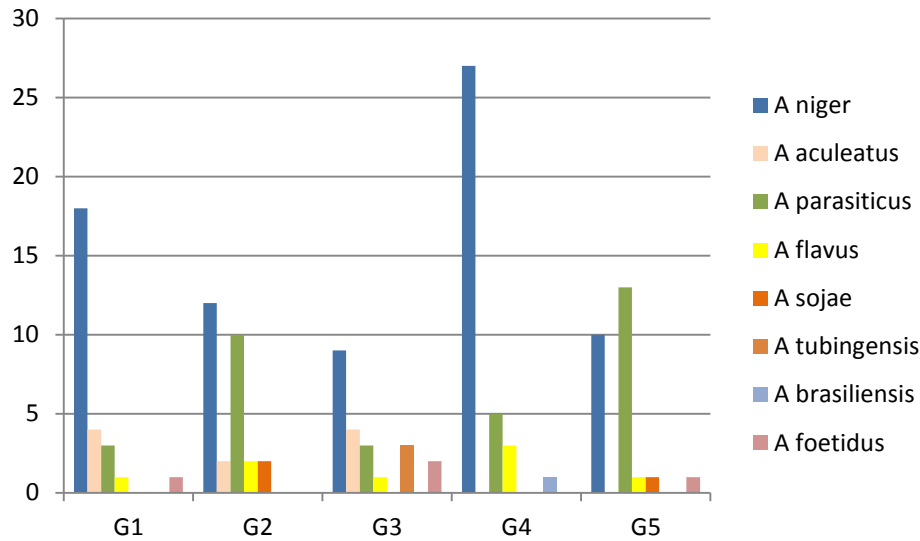
#### 3.1 Distribuição das espécies do gênero *Aspergillus*

Dentre a quantidade de isolados pertencentes ao gênero *Aspergillus*, 19,8% foram isolados do genótipo 1 G1, 20,6% do genótipo 2 G2, 14% do genótipo 3 G3, 24% do genótipo 4 G4 e 19,8% do genótipo 5 G5. O genótipo 3 foi o que apresentou maior diversidade de espécies do gênero *Aspergillus* e o genótipo 4, o maior número de isolados, podendo-se sugerir que são os genótipos mais susceptíveis à contaminação por *Aspergillus*.

Foram isoladas as espécies *A. niger*, *A. parasiticus*, *A. flavus*, *A. tubingensis*, *A. brasiliensis*, *A. tubingensis*, *A. aculeatus* e *A. foetidus* das amostras avaliadas. A quantidade de isolados por espécie está representada na Figura 1. Pode-se observar que a espécie mais incidente foi *Aspergillus niger*, seguida de *Aspergillus parasiticus*. Observou-se também uma maior diversidade de espécies no genótipo 3. Freire, Kozakiewicz e Paterson (2000) observaram predominância de espécies do gênero *Aspergillus* em castanhas-do-brasil, corroborando o encontrado no presente estudo, no qual ocorreu predominância de espécies do gênero *Aspergillus* em relação ao outro gênero estudado.

Nos estudos realizados por Freitas-Silva e Amancio (2012) e Gonçalves et al. (2012), a maioria das espécies encontradas é de *Aspergillus flavus*, *A. nomius*, *A. parasiticus*, *A. niger*, *A. tamarii*, *A. pulverulentus*, *A. flavo-furcatis*, *Penicillium glabrum*, *P. citrinum*, *Rhizopus* spp. e *Fusarium oxysporum*, bem como as espécies *Aspergillus bertholletius* e *Penicillium excelsum* (TANIWAKI et al., 2012, 2015).

Figura 1 - Distribuição de espécies do gênero *Aspergillus*, isoladas por amostra.



Fonte: Da autora (2018).

Em estudos da micobiota em castanha-do-brasil foi identificada a espécie *A. nomius* em maior incidência dentre as demais espécies do gênero (OLSEN et al., 2008; REIS et al., 2012). As espécies do gênero *Aspergillus* mais isoladas em castanhas por Calderari (2011) foram *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nomius* e *Aspergillus tamaritii*.

Três espécies da seção Flavi são consideradas importantes, devido à capacidade de produzir aflatoxinas. São elas *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius* (REIS et al., 2012); no presente estudo, as espécies *A. flavus* e *A. parasiticus* foram isoladas de todos os genótipos.

Apesar de a castanha-do-brasil apresentar menor quantidade de carboidrato do que as demais nozes e castanhas, o teor de açúcar presente pode favorecer o desenvolvimento destas espécies, podendo ser um dos fatores que determinam a presença de fungos aflatoxigênicos (CARDOSO et al., 2017; PACHECO, 2007).

Contaminação por espécies do gênero *Aspergillus* está relacionada também às condições climáticas durante o período da colheita (OLSEN et al., 2008). A contaminação por *Aspergillus* ocorre com grande frequência, pois eles estão distribuídos pelo solo, ar, matéria orgânica e partes aéreas das plantas (COTTY; CARDWELL, 1999).

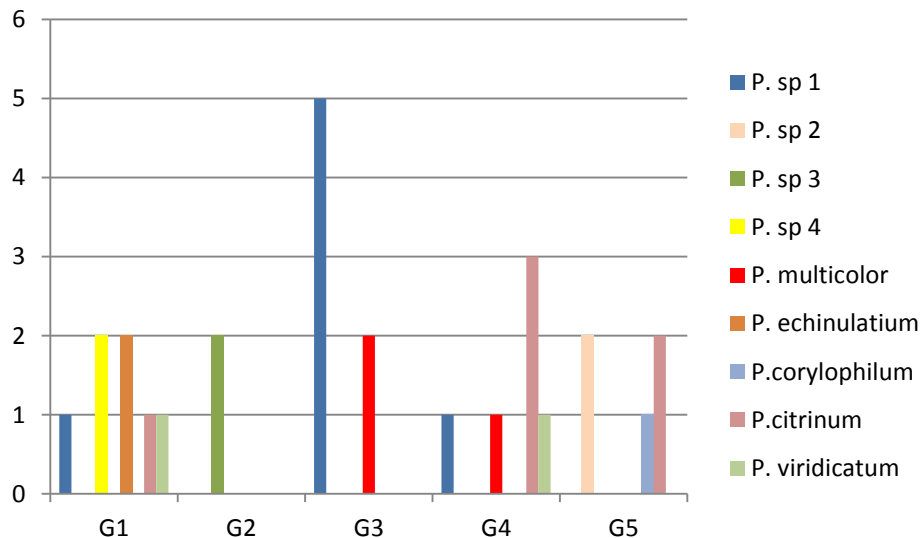
### 3.2 Distribuição das espécies do gênero *Penicillium*

Na distribuição das espécies do gênero *Penicillium* foram isolados 38% dos isolados do genótipo 1 G1- C 606, 5,5% do genótipo 2 G2- C 609, 27% do genótipo 3 G3- Manoel Pedro I, 16% do genótipo 4 G4- Manoel Pedro II e 11,1% do genótipo 5 G5- Santa Fé. O genótipo 1 apresentou maior número de isolados e diversidade de espécies do gênero *Penicillium* que os demais genótipos, podendo-se supor que seja a variedade de castanha avaliada mais susceptível à contaminação por espécies do gênero *Penicillium*.

Foram identificadas as espécies *P. sp1*, *P. sp2*, *P. sp3*, *P. sp4*, *P. Multicolor*, *P. echinulatum*, *P. Corylophilum*, *P. Citrinum* e *P. Viridicatum*. A identificação molecular dos isolados *P. sp1*, *P. sp2*, *P. sp3* e *P. sp4* deve ser realizada para a identificação das espécies.

Na Figura 2 está representada a incidência destas espécies do gênero *Penicillium* entre os genótipos de castanha do Brasil estudados. Observa-se que o genótipo 1 obteve maior diversidade de espécies, seguido do genótipo 4. A espécie *P. sp1* foi a mais incidente, seguida de *Penicillium citinum*, como se observa na Figura 2.

Figura 2 - Número de espécies do gênero *Penicillium* isoladas em cada genótipo de castanha-do-brasil avaliado.



Fonte: Da autora (2018).

A busca por espécies do gênero *Penicillium* ocorre em grande frequência devido ao seu potencial bioprospector, para a utilização de seus metabólitos na indústria de alimentos e farmacêutica, além de serem importantes no processo de reciclagem natural (PITT; HOCKING, 2009; TANIWAKI et al., 2015).

Em um estudo realizado por Reis et al. (2012) com castanhas advindas do Amazonas, do Acre, do Amapá e do Pará, 16% da micobiota foram representados por espécies pertencentes ao gênero *Penicillium*.

Foram analisadas amostras de castanha-do-brasil coletadas na parte amazônica do Peru e ocorreu predominância de *Penicillium* spp. (ARRUS et al., 2005). A espécie *Penicillium* spp. também foi isolada em todas as amostras de solo, cascas, ouriços e castanhas-do-brasil coletadas em diferentes épocas do ano, no estado do Amazonas (BAQUIÃO et al., 2012).

A espécie *P. excelsum* foi isolada de cascas das castanhas, de castanhas, de flores das castanheiras, de abelhas e formigas da região onde foram coletadas as amostras (TANIWAKI et al., 2012). Goncalves et al. (2012) observaram o crescimento da espécie *P. citrinum* em castanhas-do-brasil, assim como no presente estudo.

Possivelmente, a contaminação das castanhas ocorra ainda no campo, pela penetração nas flores, quando os esporos, através do ar, atingem o estigma e os grãos de pólen (COSTA et al., 2009; FREIRE; KOZAKIEWICZ, 2005).

A infecção dos fungos aflatoxigênicos em castanhas do Brasil pode ocorrer devido às condições climáticas do ambiente tropical, com chuvas fora de época, altas temperaturas e umidade relativa elevada (BHAT; VASANTHI, 2003). Devido às características higroscópicas da casca da castanha, o ambiente se torna influente e pode favorecer o desenvolvimento destas espécies (REIS et al., 2012).

Falta de manejo na produção, além de condições de armazenamento e transporte inadequados pode contribuir para o desenvolvimento e a produção de toxinas por esses fungos (BATH; VASANTHI, 2003).

Mesmo que as vias de contaminação não sejam elucidadas com clareza, as infecções e, consequentemente, a produção de toxinas podem iniciar-se devido a injúrias causadas por insetos, seca e altas temperaturas (MOLYNEUX et al., 2007).

### **3.3 Isolados produtores de toxina**

Das espécies isoladas e testadas quanto ao potencial toxigênico, somente as espécies *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus flavus* produziram aflatoxinas. Não foi encontrado nenhum isolado produtor de ocratoxina A e, dentre os *P. citrinum* isolados, todos produziram citrinina.

Na Tabela 1 apresentam-se os resultados estatísticos, sendo possível observar que não houve diferença significativa entre a incidência de isolados produtores por genótipo.

Tabela 1 - Quantidade de isolados produtores por amostra

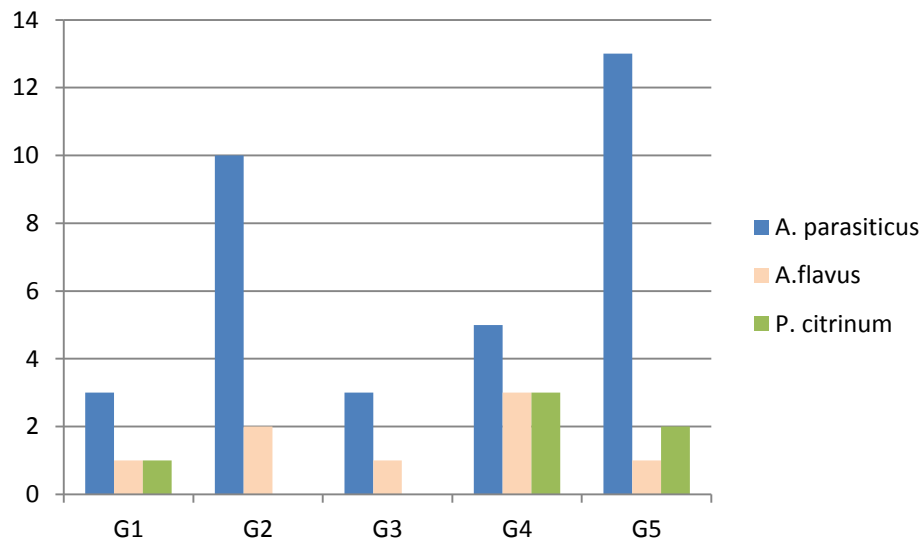
Genótipo	Isolados
G1	1,66 a
G2	4 a
G3	1 a
G4	3,66 a
G5	5 a

\* As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Da autora (2018).

Observa-se, na Figura 3, que *Aspergillus parasiticus* foi a espécie produtora mais incidente, com maior número de isolados e foi isolada de todos os genótipos avaliados.

Figura 3 - Distribuição das espécies produtoras de toxinas por genótipo.



Fonte: Da autora (2018).

O crescimento e a proliferação de espécies toxigênicas do gênero *Aspergillus*, bem como a contaminação por aflatoxinas nas culturas que são produzidas em climas tropicais, ocorrem devido ao fato de a temperatura e a umidade relativa do ar serem elevadas, tornando-se um problema econômico e de saúde pública (GONÇALEZ et al., 2013; RUDREW; CRAFT; AIDOO, 2013).

Alguns fatores intrínsecos, como a composição nutricional, a umidade e a atividade de água ( $a_w$ ), podem fornecer condições ótimas para a produção de micotoxinas (KLISH, 2007). A produção desses metabólitos também está associada a fatores externos, como o tempo de armazenamento e a competição entre espécies de microorganismos, sendo, então, a espécie, o

substrato e o ambiente fatores combinados que irão determinar a produção das aflatoxinas (GOURAMA; BULLERMAN, 1995; KLISCH, 2007).

A faixa de valores de  $a_w$  requeridas pelo *A. flavus* para a produção da aflatoxina está entre de 0,82 a >0,99, todavia, a  $a_w$  considerada ótima para a síntese situa-se entre 0,95 a 0,99 (INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS - ICMSF, 1996).

Em estudos da contaminação das castanhas por espécies do gênero *Aspergillus* foi encontrado elevado percentual de *A. flavus* e *A. parasiticus* produtores de aflatoxinas (BAQUIÃO et al., 2013; COSTA et al., 2009).

De acordo com ICMSF (1996), a temperatura ótima para a produção de aflatoxina pelo *A. flavus* é de 33 °C e, pelo *A. parasiticus*, de 25 °C. Tendo em vista que as médias de temperatura anual do estado do Amazonas, segundo o INMET (2018), tenham sido de mínima de 24,7 °C e máxima de 31,4 °C, a temperatura pode ter influenciado a produção de aflatoxinas por estas estirpes. No entanto, existem outros fatores, como o tipo de substrato, a umidade e a  $a_w$ , que podem influenciar a produção da micotoxina (GONÇALEZ; FELÍCIO; PINTO, 2001).

A composição do alimento é um dos fatores determinantes na produção de aflatoxinas (GOURAMA; BULLERMAN, 1995). A espécie *A. parasiticus* se desenvolve bem mediante elevado teor de proteínas e baixo teor de carboidratos, porém, não produz altos níveis de aflatoxina, diferentemente da espécie *Aspergillus flavus* que, em substratos com baixa quantidade de carboidratos, tem sua produção de aflatoxinas otimizada (PARK; BULLERMAN, 1983).

#### 4 CONCLUSÃO

Foram identificadas as espécies *A. niger*, *A. parasiticus*, *A. flavus*, *A. aculeatus*, *A. tubingensis*, *A. brasiliensis*, *A. sojae*, *A. foetidus*, *P. sp1*, *P. sp2*, *P. sp3*, *P. sp4*, *P. citinum*, *P. corylophilum*, *P. multicolor* e *P. vitidicatum*. Não houve diferença significativa na distribuição das espécies por genótipo.

A incidência de isolados produtores de aflatoxinas e citrinina foi semelhante entre os genótipos.

O genótipo de castanha-do-brasil Manuel Pedro I foi mais susceptível à contaminação por espécies do gênero *Aspergillus* e o genótipo C-606, por espécies do gênero *Penicillium*.



## REFERÊNCIAS

- ARRUS, K. et al. Microbiological and aflatoxin evaluation of Brazil nut pods and the effects of unit processing operations. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 68, p. 1060-1065, 2005.
- BAQUIÃO, A. C. et al. Mycoflora and mycotoxins in field samples of Brazil nuts. **Food Control**, Guildford, v. 28, p. 224-229, 2012.
- BAQUIÃO, A. C. et al. Polyphasic approach to the identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts. **Food Chemistry**, London, v. 139, p. 1127-1132, 2013.
- BHAT, R. V.; VASANTHI, S. Food safety in food security and food trade. Mycotoxin food safety risk in developing countries. **International Food Policy Research Institute**, Focus, v. 10, p. 3-17, 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 7, de 18 do fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 46, p. 66-67, 2011.
- CALDERARI, T. O. **Biodiversidade de fungos aflatoxigênicos e aflatoxinas em castanha do Brasil**. 2011. 145 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.
- CARDOSO, B. R. et al. Brazil nuts: nutritional composition, health benefits and safety aspects. **Food International**, Chicago, v. 100, p. 2.9-18, 2017.
- CASTRILLÓN, A. L.; PURCHIO, A. Ocorrência de fungos contaminantes e produtores de aflatoxinas em castanha do Pará (*Bertholletia excelsa*, Humb and Bonpl, 1808). **Acta Amazônica**, Manaus, v. 18, p. 173-183, 1988.
- COSTA, A. K. F. et al. Fungos associados à castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bompl) e ao amendoim (*Arachis hypogaea* L.) comercializados em Fortaleza (Ceará). **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 40, n. 3, p. 455-460, 2009.
- COTTY, P. J.; CARDWELL, K. F. Divergence of West African and North American communities of *Aspergillus* section *Flavi*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 2264-2266, 1999.
- FILTENBORG, O.; FRISVAD, J. C. A simple screening method for toxigenic moulds in pure cultures. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**, London, v. 13, n. 3, p. 128-130, 1980.
- FREIRE, F. C. O.; KOZAKIEWICZ, Z. Filamentous fungi, bacteria and yeasts associated with cashew kernels in Brazil. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 36, n. 2, p. 249-254, 2005.
- FREIRE, F. C. O.; KOZAKIEWICZ, Z.; PATERSON, R. R. M. Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 149, p. 13-19, 2000.

- FREITAS-SILVA, O.; VENÂNCIO, A. Brazil nuts: benefits and risks associated with contamination by fungi and mycotoxins. **Food Research International**, Barking, v. 44, n. 5, p. 1434-1440, 2011.
- GONÇALEZ, E. et al. Produção de aflatoxinas e ácido ciclopiazônico por cepas de *Aspergillus flavus* isoladas de amendoim. **Arquivos do Instituto de Biologia**, São Paulo, v. 80, n. 3, p. 312-317, 2013.
- GONZALEZ, E.; FELÍCIO, J.; PINTO, M. Biflavonoids inhibit the production of aflatoxin by *Aspergillus flavus*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 34, p. 1453-1456, 2001.
- GONÇALVES, J. S. et al. Molecular analysis of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 28, p. 1817-1825, 2012.
- GOURAMA, H.; BULLERMAN, L. B. Detection of molds in foods and feeds: potential rapid and selective methods. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 58, n. 12, p. 1389-1394, Dec. 1995.
- INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/>>. Acesso em: 1 maio 2018.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microorganismos de los alimentos: características de los patógenos microbianos**. Zaragoza: Acribia, 1996.
- JOHANSSON, P. et al. Growth of aflatoxigenic moulds and aflatoxin formation in Brazil nuts. **World Mycotoxin Journal**, Wageningen, v. 1, p. 127-137, 2008.
- KLICH, M. A. **Identification of Common Aspergillus species**. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultuur, 2002.
- KLISCH, M. A. Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Mycoscience**, Tokyo, v. 48, p. 71-80, 2007.
- KLISH, S. M. A bimodular polyconvex anisotropic strain energy function for articular cartilage. **Journal of Biomechanical Engineering**, Champaign, v. 129, p. 250-258, 2008.
- LUO, J. et al. Application of loop-mediated isothermal amplification assays for direct identification of pure cultures of *Aspergillus flavus*, *A. nomius*, and *A. caelatus* and for their rapid detection in shelled Brazil nuts. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 172, p. 5-12, 2014.
- MOLYNEUX, R. J. et al. Mycotoxins in edible tree nuts. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, p. 72-78, 2007.
- OLSEN, M. et al. *Aspergillus nomius*, an important aflatoxin producer in Brazil nuts? **World Mycotoxin Journal**, Wageningen, v. 1, p. 123-126, 2008.

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

PACHECO, A. M.; SCUSSEL, V. M. **Castanha-do-brasil da floresta tropical ao consumidor**. Florianópolis: Editograf, 2006. 173 p.

PARK, K. Y.; BULLERMAN, L. Effects of substrate and temperature on aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 46, n. 3, p. 178-184, Mar. 1983.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2<sup>nd</sup> ed. London: Blackie Academic & Professional, 1997. 593 p.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Springer, 2009.

REIS, T. A. et al. Characterization of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from organic Brazil nuts using a polyphasic approach. **Food Microbiology**, London, v. 42, p. 34-39, 2014.

REIS, T. A. et al. Mycobiota and mycotoxins in Brazil nut samples from different states of the Brazilian Amazon region. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 159, p. 61-68, 2012.

RUDREW, S.; CRAFT, J.; AIDOO, K. Occurrence of toxigenic *Aspergillus* spp. and aflatoxins in selected food commodities of Asian origin in the west of Scotland. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 55, p. 653-658, 2013.

SAMSON, R. A. et al. **Introduction to food-borne fungi**. 4<sup>th</sup> ed. Centraalbureau: Voor Schimmelcultures Baarn Delft, 2000.

SAMSON, R. A. et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, Berlin, v. 78, p. 141-173, 2014.

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

TANIWAKI, M. H. et al. *Aspergillus bertholletius* sp. nov. from Brazil nuts. **PloS One**, San Francisco, v. 7, p. 1-7, 2012.

TANIWAKI, M. H. et al. Biodiversity of mycobiota throughout the Brazil nut supply chain: from rainforest to consumer. **Food Microbiology**, London, v. 61, p. 14-22, 2017.

TANIWAKI, M. H. et al. *Penicillium excelsum* sp. nov. from the Brazil nut tree ecosystem in the Amazon basin. **PloS One**, San Francisco, v. 7, p. 1-7, 2015.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS. **Tabela brasileira de composição de alimentos**. 4. ed., rev. e ampl. Campinas, 2011.

### CAPÍTULO 3

## AVALIAÇÃO DOS ÓLEOS FIXOS EXTRAÍDOS DA CASTANHA-DO-BRASIL NO DESENVOLVIMENTO DE *Aspergillus flavus* PRODUTOR DE AFLATOXINAS

### RESUMO

A castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) é considerada um alimento de especial em valor nutritivo, devido à sua composição nutricional e aos altos níveis de aminoácidos essenciais, incluindo metionina e cisteína, minerais como o selênio e ácidos graxos mono e polii-nsaturados. São utilizados extratos e óleos extraídos de plantas no controle do crescimento de microrganismos. No presente estudo objetivou-se caracterizar os ácidos graxos presentes em cinco genótipos diferentes de castanha-do-brasil e avaliar o efeito antifúngico dos óleos extraídos de cada genótipo, em diferentes concentrações, no crescimento de *A. flavus*. Por sistema de refluxo foi extraído o óleo fixo das amostras, esterificado no Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Lavras (UFLA). A caracterização do perfil dos ácidos graxos foi realizada no Departamento de Química da UFLA. A atividade antifúngica dos óleos foi observada sob o crescimento de *Aspergillus flavus*, pelo método de mínima concentração inibitória (MIC). Dentre os resultados obtidos pôde-se observar a diferença no perfil de ácidos graxos presentes nos genótipos. Os genótipos G1- C-606 e G4- Manoel Pedro II, G3- Manoel Pedro I e G5- Santa Fé foram agrupados por semelhança na composição e o genótipo G2- C-609 apresentou um perfil diferente dos demais genótipos. Os genótipos G1, G3 e G5 apresentaram o ácido henecosanoico como composto majoritário; o G2, o ácido tridecanoico e o G4, o ácido linolênico. Houve diferença estatística nos halos de inibição por genótipo, tendo os genótipos G1- C-606 e G2- C-609 sido mais eficientes no controle do crescimento do *A. flavus*. A concentração interferiu no crescimento do *Aspergillus flavus*. As concentrações de 250 µl, 62,5 µl, 7,81 µl e 3,91 µl foram mais eficientes do que as concentrações de 125 µl, 31,25 µl e 15,63 µl, e todas foram mais eficazes do que a concentração de 500 µl.

**Palavras-chave:** Castanha-do-brasil. Genótipos. Óleo fixo. Antifungico. *Aspergillus flavus*.

## ABSTRACT

Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) is considered a special food in nutritional value, due to its nutritional composition, composed of high levels of essential amino acids, including methionine and cysteine, minerals such as selenium and monounsaturated and polyunsaturated fatty acids. Extracts and oils extracted from plants are used to control the growth of microorganisms. The present study aimed to characterize the fatty acids present in 5 different genotypes of brazil nuts, to evaluate the antifungal effect of the oils extracted from each genotype at different concentrations on the growth of *A. flavus*. By reflux system the fixed oil of the samples was extracted, esterified in the Department of Veterinary Medicine of UFLA. The profile characterization of fatty acids was carried out at the Department of Chemistry of UFLA. The antifungal activity of the oils was observed under the growth of *Aspergillus flavus* by the method of minimum inhibitory concentration (MIC). Among the results obtained, it is possible to observe the difference in the profile of fatty acids present in the genotypes, genotypes 1 and 4, 3 and 5 were grouped by similarity in the composition and genotype 2 presented a different profile of the other genotypes. Genotypes 1, 3 and 5 presented heptacosanoic acid as the major compound, genotype 2 tridecanoic acid and genotype 4 linolenic acid. There was a statistical difference in genotype inhibition halos, with genotypes 1 and 2 being more efficient in controlling *A. flavus* growth. Concentration interfered in the growth of *Aspergillus flavus*, concentrations of 250  $\mu\text{l}$ , 62.5  $\mu\text{l}$ , 7.81  $\mu\text{l}$ , 3.91  $\mu\text{l}$  more efficient than the concentrations of 125  $\mu\text{l}$ , 31.25  $\mu\text{l}$  and 15.63  $\mu\text{l}$  and all the most effective than the concentration of 500  $\mu\text{l}$ .

**Keywords:** Brazil nut. Fixed oil. Antifungal. *Aspergillus flavus*.

## 1 INTRODUÇÃO

A castanheira (*Bertholletia excelsa*) é uma planta encontrada, em sua maioria, em estado nativo na Amazônia, com algumas tentativas de plantio, e localiza-se em maiores concentrações na porção brasileira (PACHECO; SCUSSEL, 2007).

Em algumas áreas de produção de castanha-do-brasil, o extrativismo é a principal atividade, gerando recurso e subsidiando várias famílias na região amazônica brasileira.

Seu fruto constitui-se de um alimento bastante apreciado, não só pelo seu sabor, como também por seu valor nutricional. Sua composição tem sido amplamente estudada e é popularmente chamada de “carne vegetal”, por ser um alimento energético, rico em proteínas e aminoácidos essenciais, e valorizado pela presença de antioxidantes e selênio (COZZOLINO, 2001).

Os lipídios são compostos presentes em abundância em castanha do Brasil e são importantes, pois agregam no sabor, odor e cor dos alimentos. Compostos por glicerídeos (mono, di e triglicerídeos) e oxidáveis em diferentes graus (SILVA; MARSAIOLI, 2003) e oriundos da associação química entre o glicerol e molécula(s) de ácidos graxos (HOLCAPEK et al., 2003), classificados em saturados e insaturados (mono e poli-insaturados), dependendo do número de duplas ligações em sua estrutura química.

O óleo extraído da castanha-do-brasil pode ser obtido através de prensagem das sementes, ou pelo uso de solventes. Sua utilização é difundida amplamente na indústria farmacêutica, também no enriquecimento de alimentos industrializados, adicionado a meios específicos, como fonte de carbono para microrganismos e propiciando a produção de substâncias biosurfactantes que, devido à importância ecológica, são mais aceitas que os surfactantes sintéticos (COSTA et al., 2006; SOLIS, 2001).

Os metabólitos secundários são caracterizados por compostos orgânicos sintetizados ou transformados pelos vegetais que não têm ação direta conhecida em seus processos vitais, como fotossíntese, respiração, transporte de solutos, translocação, assimilação, diferenciação ou síntese de carboidratos, proteínas e lipídeos (GUIMARÃES, 2007).

Muitos compostos naturais extraídos de plantas apresentam, em sua composição, substâncias das classes dos alcaloides, terpenos, flavonoides e lactonassesquiterpênicas, e têm efetiva atividade antimicrobiana (WYK et al., 2009).

De acordo com Yoon et al. (2018), ácidos graxos naturais e sintéticos são agentes antimicrobianos que desestabilizam as membranas celulares, causando uma ampla gama de efeitos diretos e indiretos.

A crescente demanda por alimentos seguros promoveu pesquisas para investigar os efeitos de compostos naturais no crescimento de microrganismos (MARTINS; KLUSZCZOVSKI; SCUSSEL, 2014).

Uma das formas de minimizar essa contaminação é por meio do uso de óleo e extratos naturais de plantas, até como alternativa ao uso de defensivos sintéticos, pois em alguns estudos foi demonstrado que esses óleos podem apresentar propriedades antifúngicas (SANTIAGO et al., 2018). Por se tratarem de compostos lipofílicos, os óleos se integram às estruturas da membrana celular do microrganismo, causando aumento da permeabilidade celular, podendo ocorrer lixiviação de componentes intracelulares e inativação de enzimas, levando à morte do microrganismo (SIKKEMATB; BONTT, 1994).

Diante da variedade de genótipos de castanha-do-Brasil, o presente estudo foi realizado com o objetivo de caracterizar o perfil dos ácidos graxos encontrados em cada genótipo, assim como a capacidade antifúngica dos óleos extraídos de cada genótipo em diferentes concentrações no crescimento de *Aspergillus flavus*.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Extração dos óleos fixos**

A extração dos óleos foi realizada no laboratório de Química Orgânica, no Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras (UFLA). O método utilizado foi o sistema de refluxo (ANVISA, 2010). Em um balão volumétrico de 250 mL foram colocados 50 g de cada amostra macerada, junto com 100 mL de hexano. O tempo de extração foi de 6 horas, a partir do momento da ebulição. O conteúdo do balão foi submetido à filtração a vácuo e, depois, rotoevaporado sob rotaevaporador a 500 mmHg, a 37 °C. O filtrado foi, então, armazenado em um recipiente estéril, protegido da luz e envolto em parafilme com pequenos orifícios para a evaporação total do solvente. Após evaporação completa do solvente, os óleos foram armazenados a -80 °C.

### **2.2 Preparo e esterificação dos ácidos graxos**

A esterificação de óleos de cada amostra e a determinação da composição de ácidos graxos foram realizadas no Departamento de Medicina Veterinária da UFLA. A esterificação foi realizada por saponificação com solução de hidróxido de sódio em metanol 0,5 M, seguida de metilação com cloreto de amônio, metanol e ácido sulfúrico, segundo metodologia de Hartman e Lago (1973). Após a metilação, as amostras foram submetidas à cromatografia gasosa.

### **2.3 Identificação e quantificação dos ácidos graxos**

A análise dos ácidos graxos foi realizada por cromatografia gasosa em um cromatógrafo Shimadzu GC 2010 (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, EUA), equipado com detector de ionização de chama, injeção de separação a uma taxa de 1:50 e Supelco SPTM. Coluna capilar 2560, 100 m x 0,25 mm x 0,20 m (Supelco Inc., Bellefonte, PA, EUA). As condições cromatográficas foram as seguintes: temperatura da coluna inicial 140 °C/5 minutos; aumentando 4 °C/minuto a 240 °C e mantida por 30 minutos, por um total de 60 minutos. A temperatura do injetor e detector foi de 260 °C e gás hélio foi utilizado como transporte. Os ácidos graxos foram identificados por comparação com os tempos de retenção



apresentados pela mistura padrão Supelco TM37 FAME (Supelco Inc., Bellefonte, PA, EUA) e expressos como uma porcentagem (%) do total de ácidos graxos identificados.

#### **2.4 Atividade antifúngica**

A avaliação da atividade antifúngica dos óleos fixos (da castanha-do-brasil, *Bertholletia excelsa*) foi realizada no Laboratório de Micotoxinas, no Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA. A espécie de fungo utilizada foi *A. flavus*, isolado CCDCA-10515 da coleção de cultura do laboratório de micologia do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA. A sensibilidade do fungo aos óleos fixos foi determinada pelo teste de difusão em disco, após ativação do isolado em meio de cultura *malt extract agar* (MA). Para avaliar o efeito inibitório sobre fungos filamentosos, foi utilizado o teste de difusão em disco, aceito pela Food and Drug Administration (FDA) e estabelecido pelo Comitê Nacional de Padrões Clínicos Laboratoriais. Foi utilizada uma concentração de esporos de  $10^6$  mL<sup>-1</sup>, obtida por contagem em uma câmara de Neubauer. Este inóculo foi transferido para um prato contendo ágar de extrato de malte (MEA), utilizando a técnica de dispersão superficial. Discos de papel filtro de 6 mm de diâmetro foram colocados em pontos equidistantes no meio de cultura e foram embebidos com 10 µL de óleos essenciais ou padrões diluídos em DMSO nas concentrações de 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81 e 3,91 mL • mL<sup>-1</sup>. Como controle positivo, foram utilizados 10 µL de hipoclorito a 2% (1 g • L<sup>-1</sup>), enquanto a mesma quantidade de DMSO foi utilizada como controle negativo. As placas foram incubadas em BOD, a 25 °C, por 72 horas e, então, a concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração de óleo fixo na qual a presença de um halo de inibição pode ser identificada.

#### **2.5 Análise estatística**

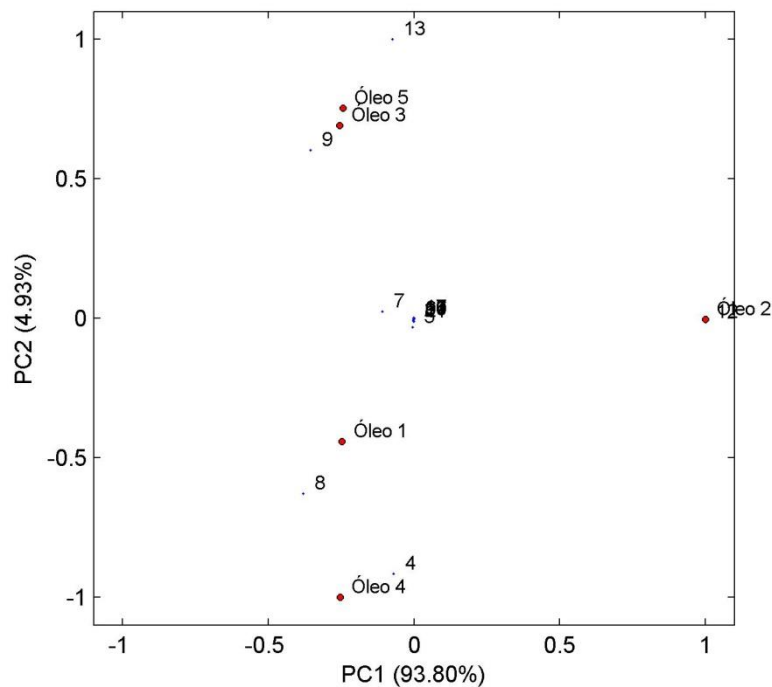
Para agrupar os genótipos em relação aos compostos detectados, foi realizada a análise dos componentes principais e foi testada por um binômio negativo e qui-quadrado. A análise da atividade antifúngica dos óleos extraídos dos diferentes genótipos e, de acordo com as concentrações e os genótipos, foi realizada análise de variância entre as médias, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Análise do perfil dos ácidos graxos

Na Figura 1 apresentam-se os resultados encontrados na Análise de Componentes Principais do perfil de ácidos graxos caracterizados a partir das amostras de óleo de castanha-do-brasil. O biplot apresentado explica 98,73% dos efeitos, o componente principal 2 (PC2), 4,93% e o componente principal 1 (PC1), 93,80%. Portanto, é possível verificar a formação de três grupos diferentes. O primeiro foi formado pelo genótipo G2- C-609, que concentra a maior proporção de ácido tridecanoico e o dispersou dos demais. Os genótipos G3-Manoel Pedro I e G5- Santa Fé formam o segundo grupo, apresentando um perfil semelhante de ácidos graxos, com ênfase na concentração do ácido e linoleico. O último grupo é formado pelos genótipos G1- C-606 e G4- Manoel Pedro II, que apresentam o perfil semelhante, apresentando o ácido linolelaídico em porcentagens semelhantes.

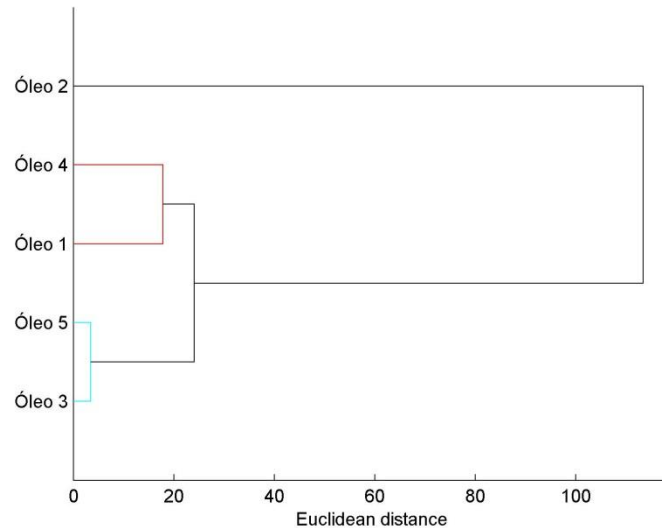
Figura 1 - Análise dos componentes principais do perfil dos ácidos graxos entre os genótipos.



Fonte: Da autora (2018).

Na Figura 2 apresentam-se os agrupamentos via dendrograma. Isso reforça claramente os resultados observados na Figura 1, em que os genótipos G1 e G4 e G3 e G5 são agrupados por semelhança e, finalmente, o G2 em outro grupo, de acordo com os compostos determinados.

Figura 2 - Agrupamento dos genótipos de acordo com o perfil dos ácidos graxos determinado em cada genótipo.



Fonte: Da autora (2018).

Por meio dos dados da Tabela 1, pode-se observar o perfil dos ácidos graxos encontrados em cada genótipo. O G2 apresentou a maior diversidade ácidos graxos e foi o único em que o ácido tridecanoico foi caracterizado e superior a 99%. Na caracterização do G4, o ácido linolênico foi determinado com maior porcentagem que os demais ácidos graxos identificados, assim como em um estudo realizado por Saraiva (2009), e o único que apresentou traços de ácido palmítico em sua composição.

Tabela 1 - Caracterização de ácidos graxos presentes em cada genótipo de castanha-do-brasil avaliado.

Ácidos graxos	Genótipos				
	1	2	3	4	5
Mirístico	0,050	-	0,032	0,055	-
Estearico	0,058	0,001	-	0,183	-
Oleico	0,289	0,003	0,340	0,434	0,192
Linolelaídico	14,841	-	-	13,103	-
Arachidico	0,292	0,003	-	1,026	0,603
Y- linolênico	0,085	0,005	-	-	-
Eicosanoico	11,329	0,096	9,956	10,344	11,907
Linolênico	34,667	0,308	35,675	<b>48,066</b>	33,508
Henecosanoico	<b>38,111</b>	0,388	<b>39,692</b>	26,474	<b>38,240</b>
cis, 11 eicosanoisco	0,182	-	-	-	-
cis 11,14,17 – Eicosatrienoico	0,096	0,001	-	0,303	0,113
Tridecanoic	-	<b>99,058</b>	-	-	-
Linoleico	-	0,136	14,305	-	15,350
cis 11, 14, eicosanoico	-	0,001	-	-	-
Palmítico	-	-	-	0,012	-
Behenico	-	-	-	-	0,052
Eurucico	-	-	-	-	0,034

Fonte: Da autora (2018).

Em estudo *in vitro* da eficiência do óleo da castanha sob o crescimento de linhagens aflatoxigênicas foram detectados ácidos linolênico, linoleico, oleico, palmítico e estearico em óleo de castanha-do-brasil (MARTINS; KLUSCZCOVSKI; SCUSSEL, 2014).

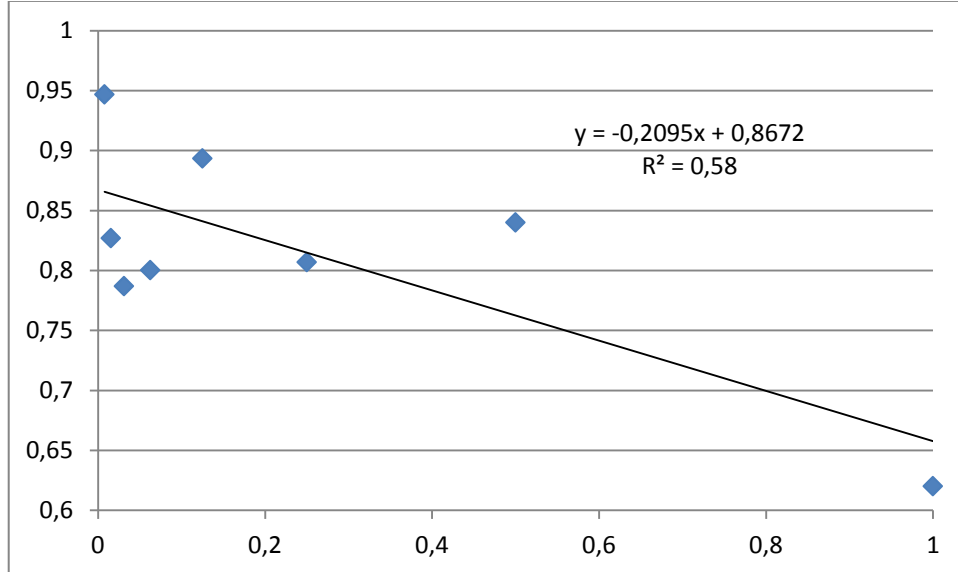
Ferreira et al. (2006) identificaram 85% de ácidos graxos insaturados, sendo 34% representados pelo ácido graxo poli-insaturado linoleico e 51% pelo ácido graxo monoinsaturado oleico e 13% de ácidos graxos saturados no óleo da castanha-do-brasil; o ácido graxo oléico foi determinado como composto majoritário. De acordo com os dados da Tabela 3, no presente estudo foram determinados compostos majoritários diferentes em cada genótipo, sendo o ácido henecosanoico o composto majoritário nos genótipos G1- C-606, G3- Manoel Pedro I e G5- Santa Fé, o ácido tridecanoico majoritário no G2- C-609 e o ácido linolênico o componente majoritário no G4- Manoel Pedro I.

Diante dos resultados apresentados, observa-se que existe diferença na composição dos ácidos graxos por genótipo, o que pode determinar uma ação antifúngica diferente entre os genótipos avaliados.

### 3.2 Efeito antifúngico dos óleos

Na Figura 3 observa-se que a concentração foi determinante na eficiência do óleo da castanha-do-brasil no crescimento do *A. flavus*, sendo a maior concentração a menos efetiva, com halos de inibição menores, independente do genótipo avaliado.

Figura 3 - Halo de inibição, em cm, em função da concentração de óleo fixo.



Fonte: Da autora (2018).

Na Tabela 2 estão dispostos os resultados avaliados entre concentração e halo de inibição. Houve uma diferença significativa entre as concentrações estudadas, sendo as de 250, 62,5, 7,81, 3,91  $\mu\text{l}$  superiores às de 125, 31,25 e 15,63  $\mu\text{l}$  e todas as demais concentrações superiores aos efeitos antifúngicos apresentados na concentração de 500  $\mu\text{l}$ , que obteve menores halos de inibição, representando, então, uma menor atividade antifúngica do que as demais concentrações.

Tabela 2 - Halo de inibição por concentração.

[ ]*	3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500
	0,94a	0,82a	0,78ab	0,8ab	0,89a	0,80ab	0,84a	0,62b

\* As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Da autora (2018).

A ação antifúngica ou antibacteriana dos óleos pode ter associação com o caráter lipofílico dos compostos que normalmente se integram às membranas celulares dos

microrganismos, causando aumento da permeabilidade celular, extravazamento de componentes intracelulares e inativação de enzimas (BAKKALI et al., 2008; SIKKEMATB; BONTT, 1994; YOON et al., 2018). Possivelmente, outro mecanismo de ação dos compostos naturais compreende desintegração de membranas citoplasmáticas, desestabilização do fluxo de eletrons, transporte e coagulação do conteúdo celular (DUARTE, 2006).

Muitos compostos naturais extraídos de plantas apresentam, em sua composição, substâncias das classes dos alcaloides, terpenos, flavonoides e lactonassesquiterpênicas, caracterizados com eficiencia na atividade antimicrobiana (WYK et al., 2009).

De acordo com Yoon et al. (2018), ácidos graxos naturais e sintéticos são agentes antimicrobianos que desestabilizam as membranas celulares, causando uma ampla gama de efeitos diretos e indiretos.

O ergosterol é o principal componente esteroide presente na membrana celular dos fungos, responsável por manter a integridade e a função celular (RODRIGUEZ et al., 1985). De acordo com Cardoso et al. (2016), compostos naturais extraídos de plantas podem diminuir a biosíntese de ergosterol em fungos, mesmo em concentrações subinibitórias (LOPES et al., 2009).

A farmacodinâmica de compostos com propriedades antifúngicas envolve caracterizar as relações entre as concentrações, o tempo e os efeitos antimicrobianos (GROLL et al., 2001).

Em um estudo realizado por Martins, Kluszczowski e Scussel (2014) foi observado que o efeito antifúngico do óleo de castanha-do-brasil no crescimento de *A. parasiticus* dependia da concentração. A concentração de vários compostos naturais foi determinante para o efeito antimicrobiano sob várias espécies estudadas (ANDRADE et al., 2012; MAMPRIM et al., 2013; SOARES et al., 2015).

De acordo com Serra et al. (2018), a ação antifúngica de óleos essenciais comerciais sob o crescimento de *Candida Albicans* foi inversamente proporcional ao crescimento; menores concentrações se mostraram mais eficazes, corroborando o resultado do presente estudo.

A atividade *in vitro* do óleo de castanha-do-brasil, em função das concentrações e dos genótipos avaliados, pode ser observada na Tabela 3.

Não houve diferença significativa entre os genótipos G1, G2, G3 e G5. Os halos de inibição foram maiores nos genótipos G1 e G2 do que os demais genótipos.

Tabela 3 - Halo de inibição por genótipo.

[ ]*	G1	G2	G3	G4	G5
	0,87a	0,84a	0,80ab	0,71b	0,83ab

\* As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Da autora (2018).

Existem estudos da estrutura genética em populações de castanha-do-Brasil nos quais se analisa e quantifica a distribuição da variabilidade no tempo e no espaço, bem como dentro e entre populações (ROSSI et al., 2014).

Foram observadas diferenças entre 21 genótipos de castanha-do-brasil em relação ao número de frutos e massa de sementes dos frutos e, portanto, uma possível explicação para a diferença no perfil de ácidos graxos entre os genótipos avaliados no presente estudo. Entre outros fatores, diferenças na produção e na composição de frutos por populações nativas, por exemplo, podem ser explicadas pela idade das plantas (TEIXEIRA et al., 2015).

Observou-se um alto nível de variação genética nas populações de castanha-do-brasil como consequência da alta taxa de cruzamento entre os indivíduos nativos (BUCKLEY; PASS; PRESCOTT, 1988; O'MALLEY et al., 1988). Pesquisas indicam que ácidos graxos de cadeia longa, como ácido oleico e ácidos graxos de cadeia média, como o ácido láurico, podem ser responsáveis pela ação antimicrobiana, devido à capacidade de causar rompimento da membrana celular e lise (ISAACS et al., 1990; ISAACS; LITOV; THORMAR, 1995). Portanto, a composição de ácidos graxos entre os genótipos pode interferir na atividade antifúngica.

Apesar de os genótipos G1- C-606 e G2- C-609 terem apresentado maior efetividade na atividade antifúngica que os demais, pode-se observar, na Tabela 3, que não existe semelhança no perfil dos ácidos graxos identificados.

É válido ressaltar que os ácidos graxos extraídos das amostras não foram isolados, podendo os efeitos destas substâncias serem modificados quando avaliados de forma individual.

#### 4 CONCLUSÃO

Existe diferença no perfil de ácidos graxos entre os genótipos. Os genótipos C-606 e Manoel Pedro II, Manoel Pedro I e Santa Fé foram agrupados por semelhança na composição e o C-609 apresentou um perfil diferente dos demais genótipos.

Os óleos extraídos dos genótipos C-606, Manoel Pedro I e Santa Fé apresentaram como composto majoritário o ácido henecosanoico; o óleo extraído do genótipo C-609 teve como majoritário o ácido tridecanoico e do genótipo Manoel Pedro II, o ácido linolênico.

Os óleos extraídos de todos os genótipos avaliados têm ação inibitória no crescimento de *A. flavus*.

O óleo extraído dos genótipos C-606 e C609 foi mais eficaz no controle do crescimento do *Aspergillus flavus*.

A concentração interferiu no crescimento do *Aspergillus flavus*, sendo as concentrações de 250 µl, 62,5 µl, 7,81 µl e 3,91 µl mais eficientes do que as concentrações de 125 µl, 31,25 µl e 15,63 µl e todas mais eficazes do que a concentração de 500 µl.



## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, M. A. et al. Essential oils of *Cymbopogon Nardus*, *Zingiber officinale* *Cinnamomum zeylanicum*: composition, antioxidant and antibacterial activities. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 43, n. 2, p. 399-408, 2012.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, p. 446-475, 2008.
- BUCKLEY, P. J.; PASS, C. L.; PRESCOTT, K. Measures of international competitiveness: a critical survey. **Journal of Marketing Management**, Oxford, v. 4, n. 2, p. 175-200, 1988.
- CARDOSO, N. N. R. et al. Synergism effect of the essential oil from *Ocimum basilicum* var. Maria Bonita and its major components with fluconazole and its influence on ergosterol biosynthesis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Thousand Oaks, v. 2016, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27274752>>. Acesso em: 10 mar. 2017.
- COSTA, S. et al. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. **Process Biochemistry**, London, v. 41, p. 483-488, 2006.
- COTTY, P. J.; CARDWELL, K. F. Divergence of West African and North American communities of *Aspergillus* section *Flavi*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 2264-2266, 1999.
- COZZOLINO, S. M. F. **Usos e aplicações das dietary reference intake: DRIs**. São Paulo: ILSI BRASIL, 2001.
- DUARTE, T. C. M. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista Multi Ciência**, São Paulo, n. 7, out. 2006. Disponível em: <[http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos\\_07/a\\_05\\_7.pdf](http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_05_7.pdf)>. Acesso em: 10 mar. 2017.
- FERREIRA, E. S. et al. Characterization physicist-chemistry almond, residue and composition fatty acid majority of the oil brute of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 17, n. 2, p. 203-208, 2006.
- GROLL, A. H. et al. Antifungal pharmacodynamics: concentration-effect relationships in vitro and in vivo. **Pharmacotherapy**, Paris, v. 21, n. 8 Pt 2, p. 133S-148S, 2001.
- GUIMARÃES, L. G. L. **Estudo da estabilidade e do efeito fungitóxico do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf)**. 2007. 72 p. Dissertação (Mestrado em Agrquímica/Agrobioquímica)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.
- HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acids methyl esters. **Laboratory Practice**, London, v. 22, p. 475-476, 1973.
- HOLCAPEK, M. et al. Characterization of triacylglycerol and triacylglycerol composition of plants oils using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1010, p. 195-215, 2003.

ISAACS, C. E. et al. Antiviral and antibacterial lipids in human milk and infant formula feeds. **Archives of Disease in Childhood**, London, v. 65, p. 861-864, 1990.

ISAACS, C. E.; LITOV, R. E.; THORMAR, H. Antimicrobial activity of lipids added to human milk, infant formula, and bovine milk. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 6, p. 362-366, 1995.

LOPES, E. B. et al. Efeito do óleo de laranja no controle do pulgão da erva-doce. **Engenharia Ambiental**, Espírito Santo do Pinhal, v. 6, n. 2, p. 636-643, 2009.

MAMPRIM, A. P. et al. Effect of natural pesticides and plant extracts on biological parameters of *Metarhizium manisopliae* (Metsch.) Sorok. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 4, p. 1451-1466, 2013.

MARTINS, A.; KLUSCZCOVSKI, A. M.; SCUSSEL, V. M. In vitro activity of the Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) oil in aflatoxigenic strains of *Aspergillus parasiticus*. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 239, p. 687-693, 2014.

O'MALLEY, D. M. et al. Genetics of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.: Lecythidaceae). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 76, p. 929-932, 1988.

PACHECO, A. M.; SCUSSEL, V. M. Selenium and aflatoxin levels in raw Brazil nuts from the Eastern and Western Amazon basin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 26, p. 11087-11092, 2007.

ROSSI, F. S. et al. Diversidade genética em populações naturais de *Mauritia flexuosa* L. f. (Arecaceae) com uso de marcadores ISSR. **Science Forestry**, Piracicaba, v. 42, n. 104, p. 631-639, 2014.

SANTIAGO, J. A. et al. Effect of the essential oils from *Melaleuca alternifolia*, *Melaleuca quinquenervia* and *Backhousia citriodora* on the synthesis of ochratoxin A by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* isolated from tropical wine grapes. **Journal of Food Science and Technology**, Trivandrum, v. 55, p. 418, 2018.

SILVA, F. A.; MARSAIOLI, A. J. R. Atividade de água em amêndoas de castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*) secas por microondas e convencionalmente. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, Guarapuava, v. 5, n. 1, p. 23-32, 2003.

SERRA, E. et al. Antifungal activity of commercial essential oils. **Pathogens**, San Francisco, v. 7, p. 15, 2018.

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

TEIXEIRA, R. A. et al. Correlações e divergência fenotípica entre genótipos cultivados de castanha-do-Brasil. **Scientia Forestales**, Piracicaba, v. 43, n. 107, p. 523-531, 2015.

RODRIGUEZ, R. J. et al. Multiple functions for sterols in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Alberta, v. 837, p. 336-343, 1985.

SARAIVA, R. A. **Efeito do óleo fixo do mesocarpo interno de Caryocar Coriaceum Wittm. em modelos animais de inflamação induzida por agentes flogísticos.** 2009. Dissertação (Mestrado)-Universidade Regional do Cariri, Crato, 2009.

SIKKEMATB, J.; DE BONTT, J. A. M. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 269, p. 8022-8028, 1994.

SOARES, A. N. R. et al. Physiological and sanitary potential of peanut seed treated with cinnamon powder. **African Journal of Microbiology Research**, Nairobi, v. 9, n. 33, p. 1921-1927, 2015.

WYK, C. van. Drug resistant tuberculosis in South Africa: what level of risk justifies isolation? **Medical Law**, New York, v. 28, n. 2, p. 211-220, 2009.

YOON, B. K. et al. Antibacterial free fatty acids and monoglycerides: biological activities, experimental testing, and therapeutic applications. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 19, p. 1114, 2018.