



**DANIELI CRISTINA SCHABO**

**FUNGOS DO GÊNERO *Aspergillus* ISOLADOS  
DE AMÊNDOAS DE CACAU DO ESTADO DE  
RONDÔNIA**

**Lavras – MG  
2014**

**DANIELI CRISTINA SCHABO**

**FUNGOS DO GÊNERO *Aspergillus* ISOLADOS DE AMÊNDOAS DE  
CACAU DO ESTADODE RONDÔNIA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Microbiologia de Alimentos, para obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Luís Roberto Batista

Coorientadora

Dra. Rosane Freitas Schwan

**LAVRAS – MG**

**2014**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e Serviços  
da Biblioteca Universitária da UFLA**

Schabo, Danieli Cristina.

Fungos do gênero *Aspergillus* isolados de amêndoas de cacau do estado de Rondônia / Danieli Cristina Schabo. – Lavras : UFLA, 2014.

139 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Luís Roberto Batista.

Bibliografia.

1. Fungos filamentosos. 2. Amêndoas de cacau - Processamento primário. 3. Distribuição geográfica. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 589.23

**DANIELI CRISTINA SCHABO**

**FUNGOS DO GÊNERO *Aspergillus* ISOLADOS DE AMÊNDOAS DE  
CACAU DO ESTADO DE RONDÔNIA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Microbiologia de Alimentos, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 25 de Fevereiro de 2014.

Dra. Rosane Freitas Schwan	UFLA
Dr. Marcelo Ângelo Cirillo	UFLA
Dr. Rodrigo Luz da Cunha	EPAMIG

---

Dr. Luís Roberto Batista  
Orientador

**LAVRAS – MG  
2014**

*Aos meus pais, Osmundo Schabo e Celmira Walker Schabo,  
pela vida, apoio incondicional e pelo amor em seu pleno significado.  
As minhas irmãs, Roseli e Rosilane, meu porto seguro.  
Aos meus sobrinhos Fernando, Leonardo e Alexandre,  
pelas inúmeras alegrias e pela continuidade.*

**DEDICO.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, saúde e oportunidades.

Agradeço aos meus pais, Osmundo e Celmira, pelo apoio, confiança, amor e paciência ao esperar meu retorno a Rondônia.

As minhas irmãs, Roseli e Rosilane e aos meus cunhados, Hernandes e Dailton, pela sustentação psicológica e carinho.

Aos meus sobrinhos, Fernando, Leonardo e Alexandre, pelas alegrias nos reencontros.

Ao IFRO – Instituto Federal de Rondônia, em especial ao atual Diretor-Geral do Câmpus Colorado do Oeste, Carlos Henrique dos Santos e a minha Chefia imediata Flávio Araújo Teixeira pela liberação, compreensão e amizade.

Ao Prof. Dr. Luís Roberto Batista pela oportunidade, orientação, esclarecimentos e apoio emocional ao final de tudo e mesmo à distância.

À Profa. Dra. Rosane Freiras Schwan, pelo apoio, orientação e disponibilidade.

Ao Prof. Dr. Marcelo Ângelo Cirillo, pela paciência e disponibilidade com os dados estatísticos.

A Luísa Freire e Camila Alvarenga Freire, pela ajuda no desenvolvimento da pesquisa.

Aos membros do NETAX – Núcleo de Taxonomia Polifásica de Fungos *Aspergillus* e *Penicillium*: Fabiana Couto, Fabiana Reinis Passamani, Michelle Terra, Gislaine Oliveira, Priscilla Abreu, Abiah Abreu, Noelly Alves, Sirlei Oliveira, Thaiana Almeida, Vanessa Pereira e Nathasha de Azevedo Lira.

À CEPLAC – Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira do Estado de Rondônia, na pessoa de Antonio de Almeida Lima, pelo apoio e dedicação na coleta das amostras.

Aos proprietários das fazendas cacaeiras que permitiram a coleta das amêndoas no estado de Rondônia, pela disponibilidade e paciência ao responder ao questionário da pesquisa.

Aos funcionários, professores e pesquisadores da UFLA pela participação direta e indireta nessa conquista.

A Élide da Conceição Jorge e Cláudia Puerari por terem me acolhido e me dado sustentação psicológica ao chegar a Lavras e à Pensão da Dona Cidinha e moradores.

A Mariliana Luiza Ferreira Alves e Driene Gomes Gonzaga pela amizade, apoio, carinho e pelos inúmeros bons momentos em Minas Gerais. Sem vocês não teria sido tão fácil, afinal formamos “o trio”.

Ao Hélio Haddad Filho pela amizade e apoio psicológico desde o início quando me vi perdida em Lavras.

Ao Juliano Martins, Leonardo Milani, Paulo Santos e Thamyron Camilo Dias pela amizade e parceria.

Ao Predinho 69 por ter me acolhido na reta final.

A Giselly Mota, Mayara Fontes Dantas e Beatriz Rosa pelo suporte durante o período de defesa.

Aos amigos de Rondônia que acreditaram em mim, me apoiaram e aguardaram ansiosos o meu retorno: Viviane Lorena Nascimento, Paula Katrinne Santana, Gisselly Pinho, Grescyléia Ribas, Cristiani Aquino, Ronan Togo, Carina Rosarolla e Aline Magrinelli.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Ciência dos Alimentos pela oportunidade de realizar o Mestrado.

O meu muito obrigada.

“Se cheguei aonde cheguei e consegui fazer tudo o que fiz, foi porque tive a oportunidade de crescer bem, num bom ambiente familiar, de viver bem, de ser orientado por boas pessoas a trilhar o caminho certo nos momentos decisivos de minha vida.”

Ayrton Senna

## RESUMO GERAL

Os micro-organismos podem se desenvolver durante o processamento primário (colheita, quebra, fermentação, secagem e armazenamento) das amêndoas de cacau. Nas regiões tropicais os fungos do gênero *Aspergillus* são considerados importantes. Sua presença deve ser investigada por estar relacionada à diminuição da qualidade e, conseqüentemente, risco à saúde dos consumidores devido à possível produção de micotoxinas. Neste contexto, este estudo foi realizado com o objetivo de investigar a presença de espécies do gênero *Aspergillus* em amêndoas de cacau do estado de Rondônia; verificar o potencial toxigênico; estudar o efeito da origem geográfica sobre a incidência de espécies de fungos toxigênicos e não toxigênicos e analisar a incidência das espécies e sua relação com as práticas de fermentação, secagem e com o armazenamento. O isolamento dos fungos das amêndoas de cacau coletadas foi realizado por plaqueamento direto em meio DRBC. *Aspergillus carbonarius* foram avaliados para a quantificação de OTA pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Para estimar a probabilidade de ocorrência de espécies do gênero *Aspergillus* no estado de Rondônia foi utilizada a técnica de Regressão Logística. Um total de 185 fungos do gênero *Aspergillus* foram identificados pertencentes às Seções *Nigri* (*A. niger*, *A. carbonarius*, *A. niger* Agregado, *A. foetidus*, *A. japonicus*, *A. tubingensis* e *A. aculeatus*) e *Flavi* (*A. flavus* e *A. oryzae*). Dos *A. carbonarius* testados 79,41% produziram OTA em níveis que variaram de 0,08 a 44,09 µg/g e 3,13% dos *A. niger* apresentaram potencial para produzir OTA. Uma significativa porcentagem (83,33%) de *A. flavus* foi capaz de produzir AFs B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>. A ocorrência de espécies de fungos totais do gênero *Aspergillus* se difere em função das coordenadas geográficas e temperatura apresentando maior probabilidade de ocorrência em amêndoas de cacau dos municípios localizados ao sul do estado de Rondônia e as probabilidades de ocorrência de fungos toxigênicos foram similares em todas as regiões estudadas sendo que as práticas de processamento primário exercem efeito sobre a incidência de fungos toxigênicos em amêndoas de cacau.

Palavras-chave: Fungos filamentosos. Processamento primário. Distribuição geográfica.

## GENERAL ABSTRACT

Microorganisms can develop during primary processing (harvesting, breaking, fermentation, drying and storage) of cocoa beans. In tropical regions the fungi of the *Aspergillus* genus are considered important. Its presence should be investigated since it is related to the decrease in quality and, therefore, a health risk to consumers, due to the possible production of mycotoxins. In this context, this study was performed in order to investigate the presence of species of the *Aspergillus* genus in cocoa beans in the state of Rondônia, Brazil; verify the toxigenic potential; study the effect of geographical origin on the incidence of toxigenic and non-toxigenic fungi species; and analyze the incidence of the species and its relation with the practices of fermentation, drying and storage. Fungi isolation from the collected cocoa beans was performed by direct plating in DRBC medium. *Aspergillus carbonarius* were evaluated for the quantification of OTA by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). To estimate the probability of occurring species of the *Aspergillus* genus in Rondonia, we used the logistic regression technique. A total of 185 fungi of the *Aspergillus* genus were identified belonging to Sections *Nigri* (*A.niger*, *A. carbonarius*, *A. niger* Aggregate, *A. foetidus*, *A. japonicus*, *A. aculeatus* and *A. tubingensis*) and *Flavi* (*A. flavus* and *A. oryzae*). Of the *A. carbonarius* tested, 79.41% produced OTA at levels ranging from 0.08 to 44.09 µg/g and 3.13% of the *A. niger* showed potential to produce OTA. A significant percentage (83.33%) of *A. flavus* was capable of producing AFs B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub>. The total occurrence of fungi species of the *Aspergillus* genus differs depending on the geographical coordinates and temperature showing higher probability of occurrence in cocoa beans from the municipalities located south of the state of Rondônia, and the probabilities of occurring toxigenic fungi were similar in all studied regions with the primary processing practices exerting effect on the incidence of toxigenic fungi in cocoa beans.

Keywords: Filamentous fungi. Primary processing. Geographical distribution

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

Figura 1	Árvore de <i>Theobroma cacao</i> L. com frutos.....	18
Figura 2	Estrutura química da OTA.....	42

### CAPÍTULO 2

Figura 1	Localização dos municípios onde foram coletadas as amostras de amêndoas de cacau no estado de Rondônia.....	84
Figura 2	Infecção fúngica em amêndoas de cacau em meio DRBC. A) Gênero <i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigri</i> , B) Gêneros <i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigri</i> e <i>Aspergillus</i> Seção <i>Flavi</i> .....	92
Figura 3	Superfície de resposta para as probabilidades de ocorrência de fungos totais nas localidades caracterizadas por diferentes níveis faixas de longitude e latitude.....	104
Figura 4	Curvas de nível obtidas da superfície de resposta com as porcentagens da probabilidade de ocorrência de fungos totais.....	105
Figura 5	Localização dos municípios com maior probabilidade de ocorrência de fungos do gênero <i>Aspergillus</i> no estado de Rondônia: Cacoal, Colorado do Oeste, São Felipe d'Oeste, Urupá e Vilhena.....	106
Figura 6	Superfície de resposta para as probabilidades de ocorrência de fungos potencialmente toxigênicos nas localidades caracterizadas por diferentes níveis faixas de longitude e latitude.....	107
Figura 7	Curvas de nível para as probabilidades de ocorrência de fungos toxigênicos nas localidades caracterizadas por diferentes níveis faixas de longitude e latitude.....	107
Figura 8	Localização dos municípios onde foram isolados fungos toxigênicos do gênero <i>Aspergillus</i> : Ariquemes, Buritis, Cacoal, Colorado do Oeste, Governador Jorge Teixeira, Jaru, Machadinho d'Oeste, Ouro Preto do Oeste, São Felipe d'Oeste e Urupá.....	108
Figura 9	Práticas fermentativas de sementes de cacau no estado de Rondônia. A) Fermentação em sacos de polipropileno; B) Fermentação em caixas de madeira; C) Fermentação em lona; D) Fermentação em recipiente plástico; E) Fermentação em	116

	monte.....	
Figura 10	Práticas de secagem de amêndoas de cacau no estado de Rondônia. A) Secagem sobre lona; B) Secagem sobre concreto; C) Secagem sobre plataformas de madeira; D) Secagem sobre tela suspensa.....	119
Figura 11	Locais de armazenamento de amêndoas de cacau no estado de Rondônia. A) Em tulha de madeira. B) Em casa de alvenaria. C) Em estrado de madeira sobre chão batido.....	123
Quadro 1	Distribuição das espécies do gênero <i>Aspergillus</i> por amostra de amêndoas de cacau coletadas em municípios de Rondônia, as práticas de processamento primário realizadas para obtenção das amêndoas e as condições de armazenamento.....	113

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

Tabela 1	Produção de cacau por país no mercado global (mil toneladas)..	20
Tabela 2	Produção mundial de amêndoas de cacau 2010/12 (mil toneladas).....	20
Tabela 3	Situação da cultura do cacau (amêndoas) no Brasil – safra 2012.....	21
Tabela 4	Relação da ocorrência de ocratoxina A em amêndoas de cacau..	50
Tabela 5	Limites Máximos Tolerados (LMT) para micotoxinas em amêndoas e derivados de cacau.....	57

### CAPÍTULO 2

Tabela 1	Localização e dados meteorológicos das coletas de amêndoas de cacau realizadas em municípios de Rondônia.....	85
Tabela 2	Percentual de amêndoas contaminadas por amostra e município de coleta.....	93
Tabela 3	Gêneros de fungos filamentosos contados nas amêndoas de cacau por amostra e município de coleta.....	95
Tabela 4	Espécies do gênero <i>Aspergillus</i> isoladas de amêndoas de cacau processadas e armazenadas em propriedades cacauceiras do estado de Rondônia.....	96
Tabela 5	Potencial ocratoxigênico das espécies da Seção <i>Nigri</i> isoladas de amêndoas de cacau de Rondônia pelo método Plug Agar.....	98
Tabela 6	Produção de ocratoxina A por <i>Aspergillus carbonarius</i> em amêndoas de cacau do estado de Rondônia, por CLAE em meio CYA/10 dias.....	100
Tabela 7	Potencial aflatoxigênico das espécies da Seção <i>Flavi</i> isoladas de amêndoas de cacau de Rondônia pelo método Plug Agar.....	102
Tabela 8	Probabilidades de significância do teste Hosmer-Lemeshow para seleção do modelo logístico para espécies de fungos totais e toxigênicos, do gênero <i>Aspergillus</i> .....	103

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1</b> Introdução geral.....	14
1.	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
2.	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	17
2.1	<b>O cacau</b> .....	17
2.2	<b>Produção mundial e nacional de cacau</b> .....	19
2.3	<b>Microbiota do cacau no processamento primário</b> .....	22
2.3.1	<b>Colheita dos frutos de cacau</b> .....	23
2.3.2	<b>Fermentação das sementes de cacau</b> .....	24
2.3.3	<b>Secagem das amêndoas de cacau</b> .....	28
2.3.4	<b>Armazenamento das amêndoas de cacau</b> .....	30
2.4	<b>O gênero <i>Aspergillus</i></b> .....	32
2.5	<b>Espécies do gênero <i>Aspergillus</i> em cacau</b> .....	36
2.6	<b>Micotoxinas</b> .....	39
2.6.1	<b>Ocratoxina A</b> .....	41
2.7	<b>Ocorrência de ocratoxina A e fungos ocratoxigênicos em amêndoas de cacau e produtos de cacau</b> .....	46
2.8	<b>Fatores que afetam a presença de ocratoxina A em cacau</b> .....	52
2.9	<b>O cacau como fonte de ocratoxina A: a ingestão alimentar</b> .....	53
2.10	<b>Legislação dos níveis de ocratoxina A em cacau e produtos de cacau</b> .....	55
2.11	<b>Prevenção e redução de ocratoxina A em cacau e produtos de cacau</b> .....	58
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	63
	<b>CAPÍTULO 2</b> Distribuição de fungos toxigênicos e não toxigênicos em amêndoas de cacau do estado de Rondônia.....	77
1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	80
2	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	83
2.1	<b>Área de estudo</b> .....	83
2.2	<b>Amostras de amêndoas de cacau</b> .....	83
2.3	<b>Micobiota das amêndoas de cacau</b> .....	86
2.4	<b>Identificação de espécies do gênero <i>Aspergillus</i></b> .....	87
2.5	<b>Avaliação do potencial ocratoxigênico das espécies da Seção <i>Nigri</i> pelo método Plug Agar</b> .....	87
2.6	<b>Avaliação do potencial ocratoxigênico e quantificação da ocratoxina A produzida por <i>Aspergillus carbonarius</i> pelo método de CLAE</b> .....	88
2.6.1	<b>Preparo das amostras</b> .....	88
2.6.2	<b>Extração de OTA das amostras</b> .....	88
2.6.3	<b>Condições cromatográficas utilizadas na quantificação da</b>	

	OTA por CLAE.....	89
2.6.4	Quantificação da OTA por CLAE.....	90
2.7	Avaliação do potencial aflatoxigênico das espécies da Seção <i>Flavi</i> pelo método Plug Agar.....	90
2.8	Análises estatísticas.....	91
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	92
3.1	Contaminação fúngica das amêndoas de cacau.....	92
3.2	Identificação de fungos do gênero <i>Aspergillus</i> .....	94
3.3	Potencial ocratoxigênico de espécies da Seção <i>Nigri</i> .....	98
3.4	Produção de ocratoxina A por <i>Aspergillus carbonarius</i> isolados de amêndoas de cacau.....	99
3.5	Potencial aflatoxigênico da espécie da Seção <i>Flavi</i> isoladas de amêndoas de cacau.....	102
3.6	Probabilidade de ocorrência de espécies de fungos toxigênicos e não toxigênicos pertencentes ao gênero <i>Aspergillus</i> em função das coordenadas geográficas e temperatura.....	103
3.7	Influência do processamento primário na incidência de fungos do gênero <i>Aspergillus</i> em amêndoas de cacau do estado de Rondônia.....	111
4.	CONCLUSÃO.....	127
	REFERÊNCIAS.....	128
	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	136
	APÊNDICE.....	139

**CAPÍTULO I**  
**INTRODUÇÃO GERAL**

## 1 INTRODUÇÃO

A importância do cacau para a indústria deve-se ao fato de que a partir das suas amêndoas obtém-se o chocolate e outros subprodutos. A produção de cacau concentra-se nos países em desenvolvimento, principalmente na África Ocidental. O Brasil é o sexto maior produtor mundial de amêndoas de cacau (INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION, 2013c), destacando-se o estado de Rondônia entre os três maiores produtores nacionais (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2013). A maioria das amêndoas de cacau é exportada para a Europa e América do Norte para a obtenção final de cacau em pó e chocolate (INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION, 2013d).

A obtenção de amêndoas de cacau para a comercialização passa pelo processamento primário realizado nas propriedades cacaeiras. Os frutos são colhidos, abertos e as sementes colocadas em recipientes para que a fermentação aconteça durante aproximadamente 6 dias. Após a fermentação, as amêndoas são transferidas para plataformas de secagem ao sol onde ocorre a redução da umidade para 8%. Finalizada a secagem, as amêndoas são ensacadas e armazenadas para posterior comercialização (WOOD; LASS, 1985).

A fermentação de cacau no Brasil e a sucessão microbiana já foram estabelecidas e ocorre de forma natural. De acordo com Schwan e Wheals (2004) as sementes de cacau são contaminadas com micro-organismos, quando o fruto é aberto, a partir da ferramenta de corte, cestos utilizados para transportar as sementes e através de insetos.

Estes micro-organismos contribuem para o processo de fermentação espontânea que acontece em seguida (SCHWAN; WHEALS, 2004).

Pesquisas apontaram a presença de fungos durante a fermentação, secagem e armazenamento das amêndoas de cacau (ARDHANA; FLEET, 2003;

MOUNJOUENPOU et al., 2008; SÁNCHEZ-HERVÁS et al., 2008). Os fungos filamentosos ocupam uma posição importante durante a fermentação do cacau, podendo causar hidrólise da celulose, produção de ácidos e sabores desagradáveis nas amêndoas (SCHWAN; WHEALS, 2004). Além disso, algumas espécies de fungos podem produzir micotoxinas em amêndoas de cacau (COPETTI et al., 2010, 2011a,b; MOUNJOUENPOU et al., 2008; SÁNCHEZ-HERVÁS et al., 2008).

Uma das micotoxinas de maior interesse em amêndoas de cacau, produzida por espécies do gênero *Aspergillus* é a ocratoxina A (OTA), uma potente nefrotoxina, teratogênica e cancerígena (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1993; O'BRIEN; DIETRICH, 2005). Recentemente o Brasil regulamentou os limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos (BRASIL, 2011), incluindo a ocratoxina A em amêndoas de cacau (10 µg/kg).

As micotoxinas não são completamente destruídas durante o processamento na indústria podendo, assim, levar à contaminação dos alimentos prontos para consumo, portanto, o conhecimento da incidência de fungos do gênero *Aspergillus* e sua relação com as práticas de processamento são importantes para a criação de estratégias de controle durante o processamento primário das amêndoas de cacau para minimizar a exposição do consumidor às micotoxinas.

Com o presente estudo, objetivou-se investigar a presença de espécies do gênero *Aspergillus* em amêndoas de cacau cultivadas em municípios do estado de Rondônia; verificar o potencial toxigênico destas espécies; estudar o efeito da origem geográfica sobre a incidência de espécies de fungos toxigênicos e não toxigênicos; e analisar a incidência das espécies e sua relação com as práticas de fermentação, secagem e com o armazenamento.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 O cacauero

A árvore de cacau pertence ao gênero *Theobroma* e ocorre na Amazônia e em outras áreas tropicais da América do Sul e Central. Há mais de vinte espécies do gênero, mas a *Theobroma cacao* L. (Figura 1) é a única cultivada amplamente. As cabeceiras da bacia Amazônica têm sido descritas como o local de origem da árvore de cacau. Duas subespécies formam, desde 1882, a base da classificação de *T. cacao*, distinguidas em duas grandes classes: Criollo e Forastero. Existe ainda a variedade Trinitario considerada como pertencente ao Forastero, embora seja descendente de um cruzamento entre Criollo e Forastero (WOOD; LASS, 1985).

As variedades diferem quanto ao sabor final do chocolate. O grupo Criollo apresenta sementes arredondadas e de cor branca quando em corte transversal, produzem cacau de sabor fraco e especial e suas árvores tendem a ser mais sensíveis a doenças. As árvores das variedades do grupo Forastero são mais vigorosas e resistentes e, portanto a maior parte do cacau cultivado atualmente é Forastero. Comparado com o Criollo a semente é menor e mais lisa, os cotilédones são violeta e tem maior teor de gordura. O sabor obtido a partir delas é mais forte e constitui a base do chocolate ao leite. O cacau Trinitario costuma dar um bom sabor de chocolate juntamente com um sabor frutado (WOOD; LASS, 1985).

O cacau é produzido em países em um cinturão entre 10° N e 10° S da linha do Equador, onde o clima é apropriado para o cultivo de árvores de cacau. Essa cultura requer chuvas abundantes e bem distribuídas ao longo do ano com um nível de precipitação anual de 1.250-3.000 milímetros ao ano, ideal entre 1.500 e 2.000 mm. Períodos de seca, em que a precipitação é inferior a 100 mm

por mês, não devem exceder três meses. Plantas de cacau respondem bem a temperaturas relativamente altas, com média máxima entre 30 – 32°C, média mínima entre 18 – 21°C e temperatura mínima absoluta de 10°C. As árvores de cacau não resistem a ventos fortes (WOOD; LASS, 1985).



Figura 1 Árvore de *Theobroma cacao* L. com frutos

Para o desenvolvimento ideal de cacauzeiros é essencial um ambiente quente e úmido. Nos países produtores de cacau, a umidade relativa é geralmente elevada. A árvore de cacau tem sido tradicionalmente cultivada sob sombra, pois seu ambiente natural é a floresta amazônica, que fornece sombra das árvores naturais. O sombreamento faz-se indispensável nos primeiros anos de cultivo (INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION, 2013b).

A colheita de cacau está espalhada por vários meses, uma ou duas vezes por ano. O momento da colheita de cacau depende do clima e da variedade de cacau. Em países com uma estação chuvosa e seca pronunciada, a safra principal ocorre 5-6 meses após o início da estação chuvosa. O percentual de safra colhido pode variar de país para país (WOOD; LASS, 1985).

## **2.2 Produção mundial e nacional de cacau**

A produção de cacau concentra-se nos países em desenvolvimento, principalmente na África Ocidental. A África Ocidental, Costa do Marfim e Gana são responsáveis pela maior parte do total global da produção de cacau. Em outras regiões, como Vietnã e República Dominicana têm crescido rapidamente a produção, embora os volumes sejam pequenos em comparação com a Costa do Marfim e Gana (Tabela 1) (BASSO et al., 2013).

Aproximadamente 71% da oferta mundial de cacau vêm da África Ocidental, principalmente da Costa do Marfim, Gana e Nigéria, porém o cacau também é produzido na Ásia e na América Latina. O Brasil é o sexto maior produtor mundial de amêndoas de cacau, com 4,64% (200 mil toneladas), atrás de Costa do Marfim, Gana, Indonésia, Nigéria e Camarões (Tabela 2) (INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION, 2013c).

Tabela 1 Produção de cacau por país no mercado global (mil toneladas)

Países produtores de cacau	2006	2007	2008	2009	2010	2011	TC
	2007	2008	2009	2010	2011	2012	
Costa do Marfim	1229,3	1382,4	1223,2	1242,3	1511,3	1410	3%
Gana	614,5	729	662,4	632	1024,6	890	8%
Vietnã	0,2	0,4	0,5	2	2,5	5	109%
R. Dominicana	42,2	45,3	55	58,3	54,3	60	7%
Libéria	1,7	4	4,6	6,3	12	8	38%
Camarões	166,1	181,8	223,6	208,5	228,5	210	4%
Brasil	126,2	170,5	157	161,2	199,8	190	7%
Indonésia	545	485	490	550	440	500	-1%
Equador	124,5	118	135	149,8	160,5	175	9%
Nigéria	220	220	250	235	240	220	0%

<sup>TC</sup>Taxa de Crescimento: média dos três anos em movimento-médias (ponto médio) para o período 2006/07-2011/12

Fonte: Basso et al. (2013)

Tabela 2 Produção mundial de amêndoas de cacau 2010/12 (mil toneladas)

País	Produções 2010/11		Estimativas 2011/12		Previsões 2012/13	
<b>África</b>						
Camarões	229		207		210	
Costa do Marfim	1511		1486		1470	
Gana	1025	<b>74,80%</b>	879	<b>71,30%</b>	820	<b>69,80%</b>
Nigéria	240		230		210	
Outros	221		104		86	
<b>América</b>						
Brasil	200		220		230	
Equador	161	<b>13,00%</b>	190	<b>15,70%</b>	190	<b>16,10%</b>
Outros	201		229		224	
<b>Ásia e Oceania</b>						
Indonésia	440		450		475	
Papua Nova Guiné	48	<b>12,20%</b>	45	<b>13,00%</b>	45	<b>14,10%</b>
Outros	39		36		43	
<b>Total mundial</b>	<b>4314</b>		<b>4075</b>		<b>4003</b>	

Nota: Os totais podem diferir da soma dos constituintes, devido a arredondamentos.

Fonte: International Cocoa Organization, (2013c)

De acordo com a ICCO (The International Cocoa Organization), o cacau é uma cultura de grande importância para a economia dos países produtores, de rendimento valioso e produzido por pequenos agricultores. Do cacau produzido internamente, aproximadamente 40% fica no próprio país e o restante é exportado. A maioria das amêndoas de cacau é exportada para a Europa e América do Norte para fabricação de liquor de cacau, manteiga de cacau e torta de cacau, que posteriormente será transformada em cacau em pó e chocolate (INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION, 2013d). A cacauicultura brasileira está distribuída nas regiões Nordeste (Bahia), Sudeste (Espírito Santo), Centro-Oeste (Mato Grosso) e Norte (Pará, Rondônia e Amazonas) (Tabela 3).

Tabela 3 Situação da cultura do cacau (amêndoas) no Brasil – safra 2012

Estados	Safra 2012				Participação (%)		
	Área total plantada (ha)	Área a ser colhida (ha)	Produção esperada (t)	Rendimento médio esperado (kg/ha)	Área total plantada (ha)	Área a ser colhida (ha)	Produção esperada (t)
<b>Norte</b>							
Rondônia	40.757	30.241	16.418	543	5,5	4,4	6,4
Amazonas*	12.920	10.712	4.606	430	1,7	1,6	1,8
Pará	122.574	88.267	67.299	762	16,5	12,9	26
<b>Nordeste</b>							
Bahia	540.383	532.074	159.432	300	72,9	77,8	62
<b>Sudeste</b>							
Espírito Santo	23.328	22.086	8.309	376	3,1	3,2	3,2
<b>Centro Oeste</b>							
Mato Grosso	871	871	576	661	0,1	0,1	0,2
<b>TOTAL GERAL</b>	<b>748.833</b>	<b>684.251</b>	<b>256.640</b>	<b>375</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

\* Os dados apresentados para o Amazonas referem-se a valores já obtidos, ou seja, área colhida e produção e rendimento obtidos, e não a valores esperados como os demais estados.

Fonte: Adaptado de Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2013).

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) a produção brasileira de cacau na safra de 2012 apresentou um volume de 256,6 toneladas. Dentre as regiões brasileiras, a região Nordeste vem sendo a maior produtora e fechou a safra de 2012 com 159,4 toneladas (62,1%) de cacau. Na sequência encontram-se as regiões Norte e Sudeste com, respectivamente, 88,3 (34,4%) e 8,3 toneladas (3,2%). Os 4 estados que mais produzem cacau no Brasil são Bahia, Pará, Rondônia e Espírito Santo. A Bahia destacou-se como o maior produtor com 159,4 toneladas (62,1%) de cacau em 2012; o Pará fechou a safra de 2012 com uma produção de 67,3 toneladas (26,2%); Rondônia com 16,4 (6,4%) e Espírito Santo com 8,3 toneladas (3,2%) de cacau (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2013).

Rondônia ocupa o terceiro lugar na produção nacional de amêndoas de cacau, mas não possui processamento agroindustrial de beneficiamento dos derivados do cacau e, portanto, toda a produção primária deste produto é direcionada a indústrias processadoras na Bahia e no Sudeste. Com condições edafoclimáticas adequadas a cacauicultura é uma das principais potencialidades do estado de Rondônia, mas o seu pleno aproveitamento exige a implantação de projetos empresariais de agroindustrialização.

### **2.3 Microbiota do cacau no processamento primário**

O processamento do cacau é iniciado nas propriedades cacaueiras, através do processamento primário. De maneira geral, os frutos recém-colhidos são abertos e as sementes colocadas em caixas de madeira para que a fermentação natural aconteça durante aproximadamente 6 dias. Após a fermentação as amêndoas são transferidas para plataformas de secagem ao sol com o intuito de reduzir a umidade para 8%. Em seguida as amêndoas são ensacadas e armazenadas para posterior comercialização (WOOD; LASS, 1985).

A semente do cacau, quando sai do fruto, apresenta coloração púrpura, sabor amargo e odor adstringente. Quando cortadas, os cotilédones são compactos e quase unidos à testa (casca da amêndoa). Após a fermentação, as amêndoas apresentam cor marrom, sabor e odor típicos de chocolate (AQUARONE et al., 2001).

O processamento primário do cacau visa à obtenção de um produto comercial de qualidade constituído de amêndoas fermentadas, secas, com no máximo 8% de umidade, com aroma natural, não contaminadas por odores estranhos e livre de matérias estranhas, admitindo-se alguns defeitos (GRAMACHO et al., 1992). Esse processamento é executado em 3 etapas: colheita, fermentação e secagem, e por fim o armazenamento (AQUARONE et al., 2001; GRAMACHO et al., 1992; WOOD; LASS, 1985).

### **2.3.1 Colheita dos frutos de cacau**

O fruto de cacau cresce no tronco e nos ramos da árvore. A colheita corresponde à remoção dos frutos maduros das árvores e abertura dos mesmos para extrair as sementes. Os frutos são colhidos manualmente, com uma lâmina bem afiada que faz um corte próximo ao caule. Para frutos no alto da árvore, é utilizado um tipo de ferramenta que consiste em uma vara comprida com um gancho na extremidade. Ao empurrar ou puxar de acordo com a posição do fruto, as lâminas superior e inferior da ferramenta permitem o corte da haste do fruto sem danificar o ramo que o carrega (WOOD; LASS, 1985).

Os frutos colhidos são reunidos em montes distribuídos dentro da plantação, geralmente abertos no mesmo local e as cascas são descartadas e distribuídas no campo para que os nutrientes retornem ao solo. Dentro de uma semana a 10 dias, após a colheita, os frutos são abertos para remover as sementes. Para abrir os frutos é indicada a utilização de um taco de madeira que,

ao atingir a área central do fruto, divide este ao meio. Ferramentas de corte, como facão, também são utilizadas, porém podem danificar as sementes (INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION, 2013b).

A etapa entre a colheita dos frutos e a fermentação das sementes é considerada um ponto crítico para a contaminação por fungos filamentosos. Mounjouenpou et al. (2008) relataram, em um estudo com amêndoas de cacau, que espécies fúngicas foram mais abundantes em frutos colhidos no final da época de colheita. Os autores também relacionaram a presença de *Aspergillus carbonarius*, espécie capaz de produzir ocratoxina A (OTA), em grãos fermentados de frutos danificados com abertura após 10 dias, o que, segundo os autores, pode estar relacionado ao contato das sementes de cacau com o ar e o solo, uma vez que os frutos estavam parcialmente abertos.

Após aberto o fruto, as sementes são removidas com a mão e submetidas aos processos de fermentação e secagem antes de serem ensacadas para comercialização (WOOD; LASS, 1985).

### **2.3.2 Fermentação das sementes de cacau**

As duas principais fases do processamento primário das sementes de cacau são a fermentação e a secagem. Diferentes métodos de fermentação e secagem podem ser utilizados. A fermentação é iniciada logo após a abertura dos frutos que contêm sementes envoltas por uma polpa mucilaginosa, sujeitas a fermentação microbiana. Essa fermentação das sementes de cacau depende de diversos fatores como os métodos de produção, tamanho dos lotes, maturação das sementes, armazenamento e das condições ambientais (WOOD; LASS, 1985; INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION, 2013b).

Após a remoção das sementes dos frutos, o primeiro passo no processamento do cacau é a fermentação espontânea das sementes com polpa

podendo ser realizada em montes, caixas, cestos, ou bandejas. Todos os métodos dependem de remover as sementes dos frutos e empilhá-las em montões ou em caixas para permitir que os micro-organismos se desenvolvam e iniciem a fermentação da polpa que envolve as sementes (WOOD; LASS, 1985; INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION, 2013b). De acordo com Schwan e Wheals (2004), as sementes de cacau são contaminadas com micro-organismos, quando o fruto é aberto, a partir da ferramenta de corte, cestos utilizados para transportar as sementes, insetos e esses micro-organismos contribuem para o processo de fermentação espontânea que acontece em seguida.

A técnica mais utilizada na fermentação de cacau no Brasil é a que utiliza caixas retangulares (cochos de fermentação) de madeira de boa qualidade, que não transmita odores nem pigmentos ao cacau. O fundo do cocho deve ser provido de orifícios ou confeccionado em ripas para drenagem do exsudato durante a fermentação. A massa de cacau deve ser mantida coberta com sacos de juta ou folha de bananeira para evitar a perda de calor e o ressecamento da camada superficial e, assim, permitir a elevação da temperatura no interior da massa (AQUARONE et al., 2001; GRAMACHO et al., 1992). As pilhas são cobertas por folhas de bananeira e a maioria dos agricultores revolvem as sementes no 2º ou 3º dia. O tempo de fermentação é de 4 a 7 dias (WOOD; LASS, 1985; INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION, 2013b).

A fermentação ocorre na polpa que envolve as sementes de cacau que é rica em glicose, frutose e sacarose, o pH inicial é baixo, em torno de 3,3-4,0 devido à elevada concentração de ácido cítrico que é de 1-3% (ARDHANA; FLEET, 2003; CAMU et al., 2007; SCHWAN; WHEALS, 2004). A mucilagem é viscosa, pois apresenta elevado teor de pectina e outros polissacarídeos, 1-2%, o que limita a difusão do ar (SCHWAN; WHEALS, 2004).

A fermentação de cacau no Brasil e a sucessão microbiana já foram estabelecidas e ocorre de forma natural, sem adição de inóculo. Inicialmente, inúmeras espécies de leveduras proliferam, levando à produção de etanol e secreção de enzimas pectinolíticas. Segue-se a fase na qual há uma elevação no número de bactérias, especialmente as do ácido láctico e produtoras do ácido acético, seguidas pelas formadoras de esporos. Nos últimos dias da fermentação, podem ser visualizados fungos filamentosos na superfície das amêndoas (SCHWAN; WHEALS, 2004). As leveduras e bactérias do ácido láctico também desempenham um importante papel na degradação da polpa por meio da secreção de enzimas pectinolíticas (NIELSEN, 2006; SCHWAN; WHEALS, 2004).

Nas primeiras 24-36h, há um alto conteúdo de açúcares, baixo pH devido ao ácido cítrico e uma condição limitada em oxigênio na polpa o que favorece o crescimento de leveduras, cuja função primária é a produção de etanol a partir da fermentação dos carboidratos. Consequentemente ocorre aumento na concentração de etanol e diminuição na de açúcares fermentáveis durante as primeiras 24-36 horas. Nestas primeiras horas de fermentação, também ocorre intensa proliferação de bactérias lácticas que fermentam açúcares até ácido láctico (ARDHANA; FLEET, 2003; CAMU et al., 2007; NIELSEN, 2006).

As principais espécies de micro-organismos isoladas de cacau da Indonésia, durante a fermentação natural, foram *Penicillium citrinum*, *Kloeckera apis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus plantarum* e *Acetobacter pasteurianus* (ARDHANA; FLEET, 2003). Na República Dominicana, as leveduras dos gêneros *Kloeckera* e *Candida* predominaram no início da fermentação, seguido de *Lactobacillus paracasei paracasei* ssp. e *Lactobacillus brevis* como as principais bactérias

láticas e *Acetobacter lovaniensis* a principal bactéria produtora do ácido acético (GÁLVEZ et al., 2007).

Com o revolvimento da massa e a degradação da polpa, ocorre um aumento na aeração durante a fermentação, o que favorece a multiplicação das bactérias produtoras do ácido acético. As bactérias produtoras do ácido acético utilizam o etanol, produzido pelas leveduras, gerando ácido acético em uma reação exotérmica, atingindo 45 – 50°C. O etanol e os ácidos são absorvidos pelos cotilédones e junto da elevação da temperatura da massa ocorre a morte do embrião da semente, eliminando o poder de germinação e assim, as sementes passam a ser chamadas de amêndoas. Esse aumento na temperatura, junto do etanol e ácido acético são fatores limitantes ao desenvolvimento bacteriano, levando a inativação das células vegetativas, o que predispõe a seleção de bactérias formadoras de esporos (SCHWAN; WHEALS, 2004).

Ao final da fermentação, podem ser visualizados fungos filamentosos na parte superior das pilhas de amêndoas de cacau. O papel dos fungos filamentosos na fermentação do cacau não é muito bem esclarecido, porém algumas espécies de fungos podem produzir micotoxinas nas amêndoas de cacau (COPETTI et al., 2010, COPETTI et al., 2011a; COPETTI et al., 2011b).

Pesquisas mostram a presença de fungos durante todas as etapas do processamento primário das amêndoas de cacau: fermentação, secagem e armazenamento (ARDHANA; FLEET, 2003; MOUNJOUENPOU et al., 2008; SÁNCHEZ-HERVÁS et al., 2008).

Ardhana e Fleet (2003) relataram a presença de diferentes espécies de fungos filamentosos com intensa atividade de lise e em quantidades significativas também no início do processo fermentativo (24-36 horas).

Em um estudo realizado em Camarões, Mounjouenpou et al. (2008) processaram cacau em condições controladas e descreveram a presença de fungos no final da fermentação não relatando diferença entre os fungos isolados

quando a fermentação foi realizada em caixas ou montões. Estes autores relataram abundante presença de fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri*: *A. niger* e *A. carbonarius*. Os principais fungos isolados por estes autores foram *A. fumigatus*, *A. tamarii*, *A. versicolor*, *A. carbonarius*, *A. niger*, *P. crustosum*, *Rhizopus* sp., *Fusarium* sp. e *Trichoderma* spp. Copetti et al. (2011b) realizaram um estudo semelhante no Brasil e também isolaram algumas espécies mencionadas no estudo acima, como *Aspergillus versicolor*, *A. fumigatus* e *A. niger*.

### 2.3.3 Secagem das amêndoas de cacau

Após a fermentação, as amêndoas são secas, geralmente, por secagem natural, ao sol, e técnicas artificiais utilizando ar quente. Pequenos agricultores preferem secar ao sol enquanto em plantações maiores o método artificial utilizando ar quente é o preferido (HII; LAW; CLOKE, 2009). A secagem é normalmente concluída quando o teor de umidade seguro das amêndoas secas atinge 8%.

Durante a secagem menos micro-organismos são capazes de se desenvolver com o passar dos dias, pois há uma diminuição na quantidade de água disponível, devido à redução da atividade de água ( $a_w$ ) das amêndoas (SCHWAN; WHEALS, 2004).

Com a diminuição da  $a_w$ , é interrompido o desenvolvimento das leveduras e bactérias, mas a água ainda existente é suficiente para o desenvolvimento de fungos. A multiplicação de *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus* e *A. parasiticus* já foi verificada com uma  $a_w$  mínima de 0,78 e alguns gêneros de fungos xerofílicos como o *Xeromyces* sp. podem se desenvolver em  $a_w$  de 0,61 (PITT; HOCKING, 1997).

Nessa fase do processamento do cacau, importantes grupos de fungos potencialmente produtores de ocratoxina A e aflatoxinas, do gênero *Aspergillus* Seções *Nigri* e *Flavi*, respectivamente, foram identificados por Copetti et al. (2011b). Mounjouenpou et al. (2008) e Copetti et al. (2010) relacionaram a presença de *A carbonarius* com a maior quantidade de ocratoxina A em amêndoas de cacau de Camarões e do Brasil, respectivamente.

A secagem deve ser realizada com cuidado para garantir que sabores desagradáveis não sejam desenvolvidos. Esta deve ocorrer lentamente, pois se os grãos são secos muito rapidamente algumas das reações químicas iniciadas no processo de fermentação não são concluídas e os grãos tornam-se ácidos, com sabor amargo. No entanto, se a secagem for muito lenta, fungos e sabores desagradáveis podem se desenvolver. Vários estudos indicam que a temperatura das amêndoas durante a secagem não deve ultrapassar 65°C (INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION, 2013b).

Para a secagem natural, ao sol, as amêndoas são espalhadas sobre tapetes, bandejas ou em pisos de concreto. Em alguns países, na Índia Ocidental e América do Sul, a secagem ocorre em pisos de madeira com telhados móveis (barcaças). As amêndoas precisam ser cobertas quando chove e durante a noite. Com luz do sol adequada e pouca chuva, a secagem ao sol pode demorar cerca de uma semana e se o tempo estiver chuvoso demora mais tempo (INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION, 2013b).

A secagem artificial é utilizada em países onde não há períodos de seca pronunciada depois da colheita e fermentação. Amêndoas provenientes de secagem artificial podem ser de má qualidade devido à contaminação por fumaça ou porque o cacau é seco muito rapidamente se não houver controle da temperatura (INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION, 2013b, GRAMACHO, 1992).

#### **2.3.4 Armazenamento das amêndoas de cacau**

Após a secagem, as amêndoas de cacau secas são geralmente colocadas em sacos de juta limpos ou sacos apropriados feitos de material não tóxico, isentos de hidrocarbonetos, que não atraiam insetos e roedores e que resistam ao armazenamento por longos períodos. Esses sacos são armazenados em locais construídos com o objetivo de manter o teor de umidade das amêndoas baixo e dentro do limite aceitável (8%), a prova de intempéries, bem arejados, livre de pragas e insetos e longe de fumaça ou outros odores que possam contaminar as amêndoas de cacau. Por causa da elevada umidade, as condições de armazenamento de amêndoas de cacau nos trópicos não são geralmente ideais e, a menos que sejam tomadas precauções especiais, o tempo de armazenamento fica restrito a 3 meses. Devem ser evitados longos períodos de armazenamento das amêndoas de cacau (INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION, 2013b). Wood e Lass (1985) recomendam que as amêndoas de cacau, em países tropicais, sejam armazenadas seguramente apenas durante 2 ou 3 meses. As amêndoas de cacau secas podem absorver a umidade e se o teor de umidade for acima de 8%, fungos podem se desenvolver nas amêndoas. O cacau ensacado, quando bem armazenado, pode ser mantido por períodos entre 9 e 12 meses.

As amêndoas devem ser armazenadas com aproximadamente 8% de umidade e permanecerem em um ambiente com umidade relativa entre 65 e 70% para manterem a umidade inicial e resistirem, assim, ao ataque por fungos (WOOD; LASS, 1985). Em baixa  $a_w$ , condição não favorável ao desenvolvimento de fungos, esporos fúngicos presentes podem permanecer viáveis por longos períodos. Ambientes de estocagem de cacau com alta umidade relativa ou que apresentem flutuações de temperatura que permitam migração da umidade para as amêndoas, podem propiciar condições adequadas para germinação dos esporos, crescimento fúngico e deterioração das amêndoas

(química, sensorial e toxicológica), provocando alterações irreversíveis na qualidade do produto a ser processado industrialmente (COPETTI, 2009).

Sánchez-Hervás et al. (2008) avaliaram a micobiota de amostras de cacau armazenadas em Serra Leoa, Guiné Equatorial e Equador e detectaram a predominância de *Aspergillus* Seções *Flavi* (*A. flavus* e *A. tamarii*) e *Nigri* (*A. niger* Agregado e *A. carbonarius*), micobiota semelhante à encontrada por Copetti et al. (2011b) em um estudo realizado no Brasil, porém a frequência de ocorrência das espécies foi diferente.

Oyetunji (2006) isolou *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Aspergillus* de bebidas à base de cacau.

Segundo Magan e Aldred (2006), nos países tropicais, não são estritamente controladas as condições do processamento e armazenamento do cacau o que torna possível a contaminação fúngica em muitos pontos críticos da cadeia produtiva de cacau.

De acordo com a ICCO alguns fatores devem ser considerados na área de armazenamento, a fim de minimizar os riscos: (a) o armazém deve ser de piso de cimento ou não inflamável, sem rachaduras e fendas para evitar insetos; (b) o piso deve ser mais alto que o terreno circundante para evitar inundações; (c) as paredes devem ser de material não inflamável, sem fendas e fissuras; (d) a ventilação deve ser adequada para evitar mofo; (e) o telhado deve ser isolado e não deve ser feito de madeira; (f) os sacos podem ser empilhados, mas de preferência a camada inferior deve ser em estrados, permitindo um espaço de ar de 5 a 10 cm entre as pilhas e a camada superior deve ser de, pelo menos, 1 metro de distância a partir do telhado, as pilhas devem ser posicionadas afastadas das paredes; (g) fumigação e outras formas de controle de insetos podem ser utilizadas para assegurar que as amêndoas fiquem livres de pragas; (h) o cacau deve ser inspecionado regularmente; (i) nenhum outro produto deve ser armazenado com o cacau para evitar a contaminação; e (j) o acesso às áreas

de armazenamento deve ser controlado (INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION, 2013a).

#### **2.4 O gênero *Aspergillus***

O gênero *Aspergillus* pertence à família *Trichocomaceae*, Ordem *Eurotiales*, e pode ser encontrado no solo, em matérias orgânicas em decomposição, grãos estocados, alimentos, rações e outros materiais. São mais comumente encontrados em regiões de clima quente e suportam baixa atividade de água. Algumas espécies podem produzir metabólitos secundários tóxicos, as micotoxinas, altamente nocivos para a saúde do homem e de animais, como a ocratoxina A (CHALFOUN; BATISTA, 2003).

Dentro do gênero *Aspergillus*, existem espécies capazes de realizar reprodução sexuada que pertencem à família *Tricholomataceae* dos Ascomycota, e fazem parte de pelo menos 8 diferentes gêneros caracterizados pela formação de ascos que contêm ascósporos. Destes, apenas 3 gêneros, *Eurotium*, *Neosartorya* e *Emericella*, ocorrem em alimentos. As espécies de *Eurotium* são as mais comuns e importantes dentre os gêneros que possuem *Aspergillus* como anamorfo. Todas as espécies são xerofílicas e apresentam importância na deterioração de alimentos com baixa atividade de água e *commodities* agrícolas estocadas (HOCKING, 2006).

A temperatura ótima de crescimento é de 30 – 40°C para a maioria dos fungos do gênero *Aspergillus*. O gênero *Aspergillus* é um gênero anamórfico e compreende aproximadamente 250 espécies conhecidas (SAMSON; VARGA, 2007). Pertence à classe dos hifomicetos, apresenta colônias em diferentes colorações a partir das quais podem ser observadas estruturas de frutificação diferenciadas. Os conidióforos emergem de hifas grandes e com parede espessa, e terminam na forma de vesícula em geral esférica, de onde surgem métulas ou

métulas e fiálides que originarão esporos fúngicos, neste caso, conídios (KLICH; PITT, 1988).

Os guias de identificação de espécies comuns de *Aspergillus* baseados em morfologia e nas características das colônias vêm sendo publicados por Klich e Pitt (1988), Pitt e Hocking (1997) Pitt e Hocking (1999), Samson et al. (2000), Samson et al. (2002).

Alguns fungos são responsáveis pela produção de metabólitos secundários, compostos químicos produzidos por um número limitado de espécies em um gênero e que possui um alto poder de diferenciação. Em um perfil de metabólitos secundários incide todos os compostos que um fungo pode produzir em um determinado substrato, incluindo antibióticos e micotoxinas (FRISVAD; ANDERSEN; THRANE, 2008).

Espécies de *Aspergillus* possuem perfis altamente específicos de metabólitos secundários que remetem a mesma espécie indicada através da morfologia, fisiologia e dados de sequência de DNA. Por exemplo, isolados de *Aspergillus* das Seções *Flavi*, *Nigri* e *Circumdati*, no qual se encontram as principais espécies produtoras de ocratoxina A e aflatoxinas, produzem um grande número de metabólitos o que permite a identificação correta ao nível de espécie (FRISVAD; SAMSON; SMEDSGAARD, 2004; FRISVAD et al., 2004).

O gênero *Aspergillus* compreende fungos com grande utilização na indústria como, por exemplo, na produção de ácido cítrico e enzimas amilases por *A. niger* e molho de soja por *A. oryzae*. Porém o *A. flavus* é um tóxico deteriorante de alimentos e rações e existem, também, algumas espécies patogênicas para o homem e animais, como o *A. fumigatus* (PITT; HOCKING, 1997).

Juntamente com as espécies de *Penicillium* e *Fusarium*, *Aspergillus* estão presentes em alimentos e culturas agrícolas, porém cada um com suas

particularidades. *Aspergillus* sp. crescem em temperaturas mais elevadas e em atividades de água mais baixas que os *Penicillium* sp, necessitam de maior tempo para esporular e produzem esporos mais resistentes à luz e substâncias químicas (HOCKING, 2006). Sendo assim as espécies do gênero *Aspergillus* são mais comumente encontradas deteriorando alimentos nos trópicos e as espécies de *Penicillium* são mais comuns em zonas temperadas (SAMSON et al., 2002).

O crescimento de *P. verrucosum* ocorre em temperaturas abaixo de 30°C e atividade de água superior a 0,80 por isso a sua ocorrência se dá em regiões temperadas e frias sendo fonte de OTA em cereais e produtos de cereais no Canadá e na Europa onde os cereais são muito utilizados na produção de rações para animais e, portanto a OTA é encontrada em alguns produtos de origem animal, como rim e fígado de porco. O *P. verrucosum* não ocorre em regiões tropicais e subtropicais, já o *A. ochraceus* cresce a temperaturas moderadas e com atividade de água superior a 0,8, é encontrado às vezes em vários produtos alimentares armazenados, dentre eles os cereais, mas raramente é considerado fonte de quantidade preocupante de OTA. É fonte de OTA em grãos de café verde e pode infectar também grãos de café durante a secagem ao sol.

Inúmeras espécies de *Aspergillus* têm sido listadas como capazes de produzir metabólitos tóxicos (FRISVAD; SAMSON; SMEDSGAARD, 2004; FRISVAD; SKOUBOE; SAMSON, 2005; HONG et al., 2005; SAMSON; VARGA, 2007; SAMSON et al., 2002; SAMSON et al., 2004), dentre os quais a aflatoxina é a mais conhecida. A existência de espécies toxigênicas mostra que uma correta identificação de isolados a partir de alimentos e o conhecimento da ecologia destes fungos é particularmente importante (HOCKING, 2006).

O gênero *Aspergillus* é dividido em Seções: *Flavi*, *Circumdati*, *Nigri*, *Restricti*, *Fumigati*, *Cervini*, *Clavati*, *Nidulantes*, *Flavipedes*, *Versicolores*, *Usti*, *Terrei*, *Candidi*, *Cremeri*, *Sparsi* e *Wentii* (KLICH, 2002). Ater-nos-emos às

Seções *Nigri* e *Flavi* devido à relevância destes fungos em amêndoas de cacau e produção de micotoxinas.

As espécies da Seção *Flavi* possuem conídios em tons verde-amarelados e escleródios marrons (KLICH, 2002). As principais espécies produtoras de aflatoxinas desta Seção são o *A. flavus* e *A. parasiticus* (PITT; HOCKING, 1997; VARGA et al., 2003).

*Aspergillus flavus* é, provavelmente, a espécie mais relacionada com deterioração de alimentos de origem tropical, sendo uma das espécies mais importantes do gênero, devido à produção de aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, formadas por cerca de 40% dos isolados. Alguns isolados também produzem ácido ciclopiazônico (KLICH; PITT, 1988).

A temperatura ótima de crescimento do *A. flavus* encontra-se entre 30 e 42°C, com mínima de 12°C e máxima próxima de 48°C. O pH ótimo para crescimento é 7,5 (PITT; HOCKING, 1997) e a a<sub>w</sub> mínima para crescimento é próxima de 0,80. As culturas economicamente mais importantes atingidas por *A. flavus* são o amendoim, o milho e o algodão, porém condimentos, alimentos preparados a partir de cereais, as farinhas e o pão também sofrem contaminação por essa espécie (PITT; HOCKING, 1997).

Dentre as espécies da Seção *Nigri*, encontra-se a espécie *A. niger* que cresce otimamente em temperaturas relativamente elevadas com máxima entre 45 – 47°C e condições ótimas entre 35 – 37°C. Esta espécie tem sido relatada como uma xerófila com germinação em a<sub>w</sub> 0,77 a 35°C (PITT; HOCKING, 1997).

Palacios-Cabrera et al. (2005) estudaram a influência de três meios de cultura com diferentes atividades de água, tempos de incubação e temperaturas sobre o crescimento de *A. ochraceus*, *A. carbonarius* e *A. niger*. A melhor temperatura para o crescimento de *A. carbonarius* foi 30°C, já para o *A. niger* temperaturas acima de 30°C foram melhores. *A. ochraceus* apresentou bom

crescimento a 25 e 30°C, porém a 35°C o crescimento foi mais lento. A 41°C, *A. ochraceus* não cresceu e *A. carbonarius* foi inibido significativamente. *A. niger* cresceu a 41°C e foi demonstrado ser o mais xerofílico fungo em comparação com *A. carbonarius* e *A. ochraceus*.

Vários estudos trazem dados sobre as condições de crescimento para *A. niger* e *A. ochraceus*, no entanto, pouco tem sido publicado sobre *A. carbonarius*. As informações sobre a sua fisiologia são baseadas em *A. niger*, devido à sua semelhança. As duas espécies podem estar estreitamente relacionadas, mas a mais notável diferença do *A. carbonarius* para o *A. niger* é a produção de esporos de maiores dimensões pelo *A. carbonarius* (KLICH; PITT, 1988) além da capacidade do *A. carbonarius* produzir a ocratoxina A, que é muito maior do que a de *A. niger*.

O *A. carbonarius* está associado a frutas, em especial uvas. Seus esporos pretos o tornam altamente resistente à luz solar fazendo com que sobreviva à secagem ao sol e tornar-se assim fonte de OTA em uvas frescas, uvas passas, vinho e café (JECFA, 2001). Em um estudo realizado por Cabañes, Brabulat e Castellá (2013), *A. carbonarius* alcançaram níveis máximos de produção de ocratoxina A após 15 dias de incubação a 15°C. De acordo com mais estudos, as temperaturas ideais para a produção de OTA por *A. carbonarius* são de 15 – 20°C (ESTEBAN et al., 2004), temperaturas menores do que as reportadas para o crescimento do fungo (30 – 35°C) (MITCHELL et al., 2004).

## 2.5 Espécies do gênero *Aspergillus* em cacau

Os fungos filamentosos ocupam uma posição importante durante a fermentação do cacau, podendo causar hidrólise da celulose, produção de ácidos, sabores desagradáveis e alterar o sabor das amêndoas de cacau (SCHWAN; WHEALS, 2004). Além disso, algumas espécies de fungos podem produzir

micotoxinas em amêndoas de cacau (COPETTI et al., 2010; COPETTI et al., 2011a,b; MOUNJOUENPOU et al., 2008; SÁNCHEZ-HERVÁS et al., 2008). Em estudos anteriores, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Fusarium* e especialmente *Aspergillus* foram os fungos mais frequentemente isolados a partir de amêndoas de cacau (COPETTI et al., 2011; MOUNJOUENPOU et al., 2008; OYETUNJI, 2006; SÁNCHEZ-HERVÁS et al., 2008). Diversos estudos recentes avaliaram a ocorrência de fungos em cacau e relataram a presença de *Aspergillus* sp. (AMÉZQUETA et al., 2008; COPETTI et al., 2011b; MOUNJOUENPOU et al., 2008; SÁNCHEZ-HERVÁS et al., 2008). Copetti et al. (2011b) e Mounjouenpou et al. (2008) relataram a ocorrência de espécies de *Aspergillus* em todas as fases de processamento primário das amêndoas de cacau, destacando as espécies produtoras de ocratoxina A da Seção *Nigri* (*A. niger* e *A. carbonarius*) cujo número aumentou após a fermentação.

Os principais fungos isolados por Sánchez-Hervás et al. (2008), em amêndoas de cacau de Serra Leoa, Guiné Equatorial e Equador pertenciam às Seções *Nigri* e *Flavi*. É conhecido que algumas espécies destas duas Seções de *Aspergillus* são consideradas os mais importantes fungos toxigênicos (MOSS, 1996; SAMSON et al., 2004). As espécies pertencentes à *Aspergillus* Seção *Circumdati*, como *A. ochraceus*, são tradicionalmente consideradas ocratoxigênicas (PITT; HOCKING, 1997), porém, Sánchez-Hervás et al. (2008) relataram baixa incidência de espécies pertencentes à *Aspergillus* Seção *Circumdati* em amêndoas de cacau, sendo apenas uma das duas espécies de *A. ochraceus* isoladas produtora de OTA. Os autores consideraram que provavelmente *A. ochraceus* é uma fonte relativamente sem importância de OTA em produtos de cacau.

A espécie *A. niger* predomina entre os *Aspergillus* Seção *Nigri* em estudos realizados com cacau (COPETTI et al., 2011b; MOUNJOUENPOU et al., 2008). Mounjouenpou et al. (2008) processaram cacau em condições

controladas em Camarões e isolaram as espécies *A. carbonarius*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. tamarii* e *A. versicolor*. Copetti et al. (2011b) realizaram um estudo semelhante e também isolaram algumas espécies mencionadas no estudo acima, como *A. versicolor* e *A. fumigatus*, bem como *A. clavatus*, *A. niger*, *A. ochraceus* e *A. parasiticus*. Algumas espécies conhecidas por produzir micotoxinas (*A. carbonarius*, *A. niger* e *A. flavus*) confirmam a existência de uma microbiota toxigênica associada à cultura do cacau, bem como o risco da produção de ocratoxina A e aflatoxinas.

No estudo realizado por Sánchez-Hervás et al. (2008) em amêndoas fermentadas e secas da Serra Leoa, Guiné Equatorial e Equador, o gênero *Aspergillus* correspondeu a 88% dos fungos isolados. Os membros da seção *Flavi* foram os que apresentaram maior prevalência (51%), seguidos pelos representantes da Seção *Nigri* (32,8%), espécies produtoras de aflatoxinas e ocratoxina A, respectivamente. Neste estudo o fungo pertencente à *Aspergillus* Seção *Flavi* mais isolado foi *A. flavus*. Copetti et al. (2011b) relataram um aumento da ocorrência de espécies da Seção *Flavi* no decurso da secagem das amêndoas de cacau.

A espécie *A. oryzae*, da Seção *Flavi*, não é relatada como toxigênica (MAGAN; OLSEN, 2004).

A ocorrência de aflatoxinas já foi relatada contaminando *commodities* agrícolas como cacau, café, amendoim e milho (BATISTA et al., 2009; COPETTI et al., 2011b; FERNÁNDEZ-PINTO et al., 2001; GIORNI et al., 2007). Uma elevada percentagem de *A. flavus*, aproximadamente 60%, tem sido relatada como positiva para a capacidade de produção de aflatoxinas em amêndoas de cacau (COPETTI et al., 2011a; SÁNCHEZ-HERVÁS et al., 2008).

As aflatoxinas são metabólitos altamente tóxicos, com comprovadas propriedades mutagênicas e carcinogênicas (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1993) que podem ser produzidas por espécies

pertencentes à Seção *Flavi*, principalmente *A. flavus* e *A. parasiticus* (FRISVAD; SKOUBOE; SAMSON, 2005).

Sánchez-Hervás et al. (2008) obtiveram como espécie predominante, da Seção *Nigri*, *A. niger* Agregado, porém relataram também a presença de *A. carbonarius* em menor quantidade e não encontraram nenhuma espécie unisseriada (*A. aculeatus* e *A. japonicus*). A presença de *A. carbonarius* sugere a possível produção de OTA por esta espécie em cacau e outras matérias-primas tropicais e subtropicais, como indicado em estudos anteriores (BELLÍ et al., 2004; MAGNOLI et al., 2003; MARTÍNEZ-CULEBRAS; RAMÓN, 2007; TANIWAKI et al., 2003).

A presença de fungos toxigênicos em cacau ressalta a importância de estudos a respeito da contaminação do cacau por micotoxinas, pois estas se relacionam com perdas econômicas e problemas de saúde pública.

## 2.6 Micotoxinas

As micotoxinas são metabólitos secundários de baixo peso molecular, produzidos naturalmente por fungos filamentosos (BENNETT; KLICH, 2003). Micotoxinas são produzidas a partir das vias metabólicas dos policetídeos, dos terpenoides e de alguns processos que usam aminoácidos essenciais, possuem estruturas químicas diversificadas, presentes em uma ampla gama de produtos alimentares e são tóxicos para animais em pequenas concentrações (PITT, 2000; STEYN, 1995).

As micotoxinas podem ser produzidas como resultado do crescimento de fungos em alimentos podendo causar micotoxicoses, uma resposta tóxica, quando ingeridas por humanos e animais. Nos seres humanos, quando ingeridas através de alimentos à base de plantas ou resíduos e metabólitos presentes em alimentos de origem animal, podem levar à deterioração da função renal ou

hepática. Algumas micotoxinas são neurotoxinas, enquanto outras atuam interferindo na síntese de proteínas, e produzem efeitos como sensibilidade da pele ou necrose por imunodeficiência extrema (BENNETT; KLICH, 2003; PITT, 2000).

Por volta de 1960, surgiu o termo micotoxinas ao se relacionar a morte repentina de 100 mil perus com a produção de aflatoxina por *A. flavus* em bagaço de amendoim utilizado na ração aumentando o interesse em estudos relacionados a outros metabólicos secundários tóxicos produzidos por fungos filamentosos em produtos agrícolas (BENNETT; KLICH, 2003).

As micotoxinas mais relevantes para a segurança alimentar são produzidas pelos gêneros *Alternaria* (ácido tenuazônico, alternariol e alternariol metil éter), *Aspergillus* (aflatoxina B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub> e M<sub>1</sub>, ocratoxina A, esterigmatocistina e ácido clicopiazônico), *Claviceps* (ergo-alcalóides), *Penicillium* (patulina, ocratoxina A, citrinina, penitrinina A e ácido clicopiazônico) e *Fusarium* (desoxinivalenol, nivalenol, zearalenona, toxina T-2, diacetoxiscirpenol, fumonisinas e moniliformina) (STEYN, 1995).

As micotoxinas podem ser encontradas em diversos produtos agrícolas (cereais, milho, frutos secos, frutas, sementes oleaginosas e especiarias), bem como em produtos pecuários (leite, ovos e carne de animais) devido à sua acumulação ao longo da cadeia alimentar (DOHLMAN, 2003; SWEENEY; DOBSON, 1998; VARGA; KOZAKIEWICZ, 2006).

Quando existe a colonização por fungos, as micotoxinas podem ser formadas nos períodos pré-colheita e pós-colheita e durante seu transporte e armazenamento se realizados em condições deficientes.

As micotoxinas de maior importância em alimentos e rações são as aflatoxinas, cujos principais produtores são *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nonimus*. Porém Copetti et al. (2011a) relataram fraca correlação entre fungos potencialmente produtores de aflatoxinas e aflatoxinas.

Outra micotoxina importante produzida por espécies de *Aspergillus* é a ocratoxina A (OTA) produzida principalmente por *A. ochraceus*. OTA é uma potente nefrotoxina, teratogênica e cancerígena e é também amplamente produzida por espécies de *Penicillium*, em particular *P. verrucosum* (SWEENEY; DOBSON, 1998) sendo a micotoxina de maior interesse em amêndoas de cacau.

### 2.6.1 Ocratoxina A

A ocratoxina A (OTA; L-phenylalanylcarbonyl-5-chloro-8-hydroxy-3,4-dihydro-3-R-methylisocoumarin) (PITTET; ROYER, 2002) (Figura 2) é a principal micotoxina que ocorre no cacau. É produzida por diversas espécies fúngicas do gênero *Penicillium* e *Aspergillus* (CABAÑES; BRAGULAT; CASTELLÁ, 2010; EFSA, 2006; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 1995; PITTET; ROYER, 2002) dentre os quais se destacam *P. verrucosum*, *A. ochraceus* e *Aspergillus* da Seção *Nigri*, em especial *A. carbonarius* (OPINION..., 2006; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2001).

Apesar de todas as micotoxinas serem de origem fúngica, nem todos os compostos tóxicos produzidos pelos fungos são considerados micotoxinas (BENNETT; KLICH, 2003).

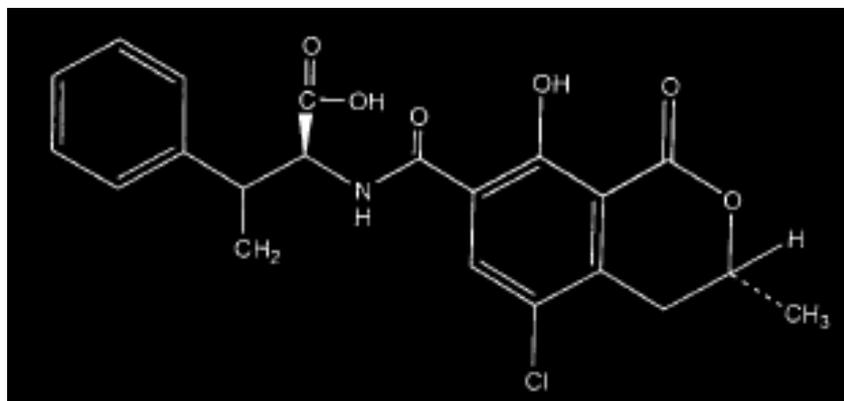


Figura 2 Estrutura química da OTA  
Fonte: Bennett e Klich (2003)

Segundo Samson et al. (2004), a ocratoxina A além de ser produzida por *P. verrucosum*, *A. ochraceus*, *A. carbonarius* e *A. niger* (poucos isolados), também é produzida por *P. nordicum*, *A. sulphureus*, *Neopetromyces muricatus* e *Petromyces alliaceus*. *Penicillium verrucosum* é mais importante em cereais de regiões temperadas e o *P. nordicum* é importante em carnes refrigeradas e em produtos de queijo. A ocratoxina A também foi detectada em vinhos e o mais provável produtor é o *A. niger*. A ocorrência nos trópicos está associada com *A. ochraceus* em café e com *A. carbonarius* e *A. niger* em cacau.

Estudos relataram que as espécies pertencentes à Seção *Nigri*, mais precisamente *A. carbonarius* e *A. niger* têm sido as principais fontes de contaminação por OTA em amêndoas de cacau (COPETTI et al., 2011b; MOUNJOUENPOU et al., 2008).

Espécies de fungos produtores de OTA têm sido encontradas no mundo todo e a presença de OTA já foi detectada em produtos alimentícios à base de cereais, leguminosas, café, cerveja, suco de uva, vinho, passas, cacau, nozes e especiarias (BATISTA et al., 2009; BAU et al., 2005a; BEJAOUÏ et al., 2006; CHULZE; MAGNOLI; DALCERO, 2006; OPINION..., 2006; GÓMEZ et al.,

2006; GUZEV et al., 2006; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2001; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2007; LASRAM et al., 2007; LEONG; HOCKING; SCOTT, 2007; O'BRIEN; DIETRICH, 2005; PALUMBO et al., 2011; PONSONE et al., 2007; SERRA; BRAGA; VENÂNCIO, 2005; TERRA et al., 2013; TJAMOS; ANTONIOU; TJAMOS, 2006). A OTA pode estar presente em rações animais resultando na contaminação de tecidos e consequentemente de produtos comestíveis oriundos da carne desses animais (OPINION..., 2006).

Mounjouenpou et al. (2008) apresentaram dados onde 70% dos *A. niger* foram produtores de OTA em amêndoas de cacau, porém apenas o percentual de 3% de *A. niger* foi relatado como produtor de OTA em café (TANIWAKI et al., 2003) e em uvas (LASRAM et al., 2007). A elevada percentagem encontrada por Mounjouenpou et al. (2008) não foi confirmada por outros estudos realizados com esta espécie em todo o mundo (AMÉZQUETA et al., 2008; BELLÍ et al., 2004; IAMANAKA et al., 2005; LEONG; HOCKING; SCOTT, 2007; MAGNOLI et al., 2007; TANIWAKI et al., 2003). Sánchez-Hervás et al. (2008) não identificaram nenhum *A. niger* produtor de OTA, porém 44,7% dos fungos identificados como *A. niger* Agregado foram produtores de OTA em seu estudo com cacau. Já no estudo realizado com amêndoas de cacau no Brasil por Copetti et al. (2010) *A. niger* Agregado foi a espécie, com potencial para produzir OTA, mais comum isolada, no entanto, apenas 5,2% foram capazes de produzir a toxina.

As amêndoas de cacau, cultivadas principalmente na África, América Central e América do Sul, países cujas condições climáticas (clima quente e úmido) e agro-econômicas são favoráveis à biossíntese de OTA, após o processamento industrial, dão origem ao cacau em pó. As condições de processamento e o armazenamento do cacau nestes países não são muito seguros

favorecendo a contaminação por fungos toxigênicos em vários pontos críticos da cadeia produtiva de cacau (TAFURI; FERRACANE; RITIENI, 2004).

Tanto os fungos como a OTA podem estar presentes em todas as fases da cadeia de produção: colheita, fermentação, secagem, armazenamento, na elaboração de alimentos e no transporte (RILEY; NORRED, 1999).

A OTA é uma substância relativamente estável e em condições normais de cozimento ou de processamento não é totalmente degradada. Há relatos de que a moagem reduz substancialmente a concentração de OTA em farinha branca, mas tem pouco efeito sobre os níveis de farinha de trigo integral, pois a OTA removida do grão para a produção de farinha branca permanece no farelo e outras frações. OTA é relativamente estável ao calor, houve redução de 50% na concentração de OTA em trigo úmido após 2,3 horas de calor e 12 horas de calor em trigo seco. A descafeinação de café diminui a concentração de ocratoxina A por cerca de 90%. A OTA suporta a maioria dos tipos de processamento de alimentos, tais como cozinhar, fritar, fermentar e, portanto, pode ser detectada em produtos alimentares manufaturados (BAKKER; PIETERS, 2003). Boudra, Bars e Bars (1995) mostraram em um estudo sobre a decomposição da OTA em trigo através de calor seco que, no máximo, 20% da OTA no trigo foram decompostas por calor seco a 100°C/160min ou 150°C/32min. Durante a torrefação das amêndoas de cacau no processamento secundário, a temperatura da amêndoa atinge 100 – 120°C/15 – 70min (MINIFIE, 1999), por isso não se pode esperar que a torrefação reduza significativamente os níveis de OTA.

Pesquisas têm demonstrado a toxicidade da ocratoxina A. Sugere-se uma correlação entre a exposição à ocratoxina A e Nefropatia Endêmica dos Bálcãs e tumores do trato urinário em humanos (OPINION..., 2006; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1993; O'BRIEN; DIETRICH, 2005). Baseado em associações epidemiológicas, Schwartz (2002) apresentou a hipótese de exposição à OTA estar ligada ao câncer testicular precoce. Existem

dados relevantes quanto a sua toxicidade renal causando nefropatia e imunossupressão em animais. O Programa Nacional de Toxicologia (NTP – National Toxicology Program) mostrou em estudos anteriores, nos Estados Unidos, que a OTA pode induzir tumores renais, em roedores, quando em doses elevadas (BOORMAN, 1989).

Não há dados disponíveis sobre os efeitos em seres humanos, porém há evidências suficientes em animais experimentais e, portanto, a IARC (International Agency for Research on Cancer) classifica a ocratoxina A como um possível carcinógeno humano (Grupo 2B) (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1993). Testes com animais confirmaram que a OTA é nefrotóxica e exerce efeitos imunossupressores, neurotóxicos e teratogênicos quando em doses elevadas (OPINION..., 2006; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 1995; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2001; O'BRIEN; DIETRICH, 2005).

É através de análises químicas de amostras biológicas (sangue, urina, leite) realizadas em seres humanos saudáveis, selecionados aleatoriamente que a exposição humana tem sido confirmada e os efeitos observados são dependentes da dose e tempo de exposição à OTA. Existem evidências crescentes de que a toxicidade renal causada pela OTA está associada ao estresse oxidativo celular (OPINION..., 2006).

Entre 1998 e 2004 Sangare-Tigori et al. (2006) analisaram OTA em amostras de sangue humano na Costa do Marfim. Os resultados mostraram que 22 dos 63 indivíduos saudáveis tinham níveis sanguíneos de OTA entre 0,01-5,81 µg/L, com uma média de 0,83 µg/L, e os níveis encontrados em 8 dos 39 pacientes nefropatas em diálise foram 0,167-2,42 µg/L, com uma média de 1,05 µg/L.

## 2.7 Ocorrência de ocratoxina A e fungos ocratoxigênicos em amêndoas de cacau e produtos de cacau

Dentre as *commodities* brasileiras de significativa importância estão o café e o cacau. Vários estudos já foram realizados com fungos filamentosos em café e sua relação com OTA durante o processamento pós-colheita (BATISTA et al., 2009; STUDER-ROHR et al., 1995; SUÁREZ-QUIROZ et al., 2004; TANIWAKI et al., 2003). No cacau e subprodutos as pesquisas estão sendo intensificadas com inúmeros estudos sendo realizados com o intuito de isolar e identificar espécies fúngicas produtoras de OTA em amêndoas de cacau e produtos.

No Brasil, Copetti et al. (2010) realizaram um estudo sobre a incidência de fungos ocratoxigênicos e OTA em cacau durante o período de 2006 a 2008 e obtiveram amostras de cacau em diferentes etapas de processamento. Durante o estudo, 271 fungos potencialmente toxigênicos pertencentes ao gênero *Aspergillus* foram isolados e identificados como *A. carbonarius*, *A. niger* Agregado, *A. ochraceus*, *A. melleus* e *A. westerdijkiae*. Antes da fermentação, não foi encontrada nenhuma espécie capaz de produzir OTA, nos frutos de cacau saudáveis ou danificados.

Durante a fermentação, Copetti et al. (2011b) encontraram poucos isolados de *A. niger* Agregado e na etapa seguinte, secagem ao sol, foi encontrada a maior diversidade e o maior número de espécies capazes de produzir OTA. Durante o armazenamento, foi observado um aumento da ocorrência de *A. niger* Agregado e *A. carbonarius*. *Aspergillus niger* Agregado foi a espécie, com potencial para produzir OTA, mais comumente isolada. Dos 191 isolados, apenas 10 (5,2%) foram capazes de produzir a micotoxina em ágar Yeast Extract Sucrose Agar (YES). Todos os 92 isolados de *A. carbonarius* e 10 isolados da Seção *Circumdati* (seis *A. melleus*, dois *A. ochraceus* e dois *A.*

*westerdijkiae*) foram capazes de produzir OTA. Os autores concluíram que *A. carbonarius* é a principal fonte de OTA no cacau, embora outras espécies ocratoxigênicas isoladas também possam contribuir.

Copetti et al. (2010) não relataram a presença de OTA em amostras de amêndoas de cacau tomadas antes do início da fermentação. Catorze (27%) amostras da fermentação continham OTA, embora a maioria das amostras desse valores próximos do limite de detecção do método (0,01 µg/kg). Três amostras tinham níveis mais elevados do que 0,10 µg/kg, com um máximo de 1,70 µg/kg. Na fase de secagem ao sol, OTA foi detectada em 51% das amostras, e a maioria (73%) das amostras apresentou níveis inferiores a 0,10 µg/kg. Uma das amostras continha 5,54 µg/kg. Nas amostras coletadas durante o armazenamento, o número de amostras positivas para OTA e o nível de contaminação foram semelhantes aos encontrados durante a secagem. Das 222 amostras analisadas, duas apresentaram valores de OTA acima de 2µg/kg. A conclusão dos autores em relação a esse estudo foi que a contaminação do cacau brasileiro por OTA é baixa, embora a ocorrência de fungos potencialmente ocratoxigênicos exista.

Amézqueta et al. (2004) relataram que 63% das 46 amostras de amêndoas de cacau de diferentes origens estavam contaminadas por OTA (média de 1,71µg/kg).

Mounjouenpou et al. (2008) avaliaram, em um estudo em Camarões, como fungos filamentosos e toxigênicos foram afetados pelos tipos de tratamento com cacau após a colheita: fermentação em caixas ou montes. Não houve muita diferença entre os tipos de fungos filamentosos encontrados durante os dois processos de fermentação, sendo abundante a presença de espécies da Seção *Nigri*. Os fungos foram mais abundantes no final da época da colheita. Nesse estudo apenas *A. niger* e *A. carbonarius* foram capazes de produzir OTA em cacau. Setenta por cento dos *A. niger* isolados apresentaram toxigenicidade, porém com baixo nível de produção, enquanto que todos os *A. carbonarius*

produziram OTA, porém em níveis muito baixos de OTA em amêndoas não fermentadas e fermentadas a partir de frutos saudáveis. Fatores que afetam a integridade das sementes como manipulação incorreta, processamento demorado resultaram em um aumento qualitativo e quantitativo da contaminação, quando o número total de fungos filamentosos pôde atingir um valor máximo de  $5,5 \pm 1,4 \times 10^7$  UFC/g e de *Aspergillus* Seção *Nigri* um valor máximo de  $1,42 \pm 2,2 \times 10^7$  UFC/g. Amêndoas secas de cacau fermentadas a partir de frutos de baixa qualidade apresentaram maior contaminação por OTA, até 48 ng/g.

Sánchez-Hervás et al. (2008) estudaram a micobiota de amêndoas de cacau, fermentadas e secas ao sol, da Serra Leoa, Guiné Equatorial e Equador. Os resultados mostraram que os fungos predominantes eram de diferentes espécies do gênero *Aspergillus* pertencentes às Seções *Flavi* e *Nigri*. Das 214 espécies da Seção *Flavi*, 120 foram identificadas como *A. flavus* e 94 como *A. tamarii*. Da Seção *Nigri*, 138 espécies foram isoladas, com 132 sendo identificadas como *A. niger* Agregado e 6 como *A. carbonarius*.

Amézqueta et al. (2008) estudaram cacau da Costa do Marfim e Nigéria e relataram a presença abundante de espécies consideradas toxigênicos da Seção *Nigri*: *A. carbonarius* e *A. niger* Agregado.

As condições de secagem desempenham um importante papel na presença de OTA (ESTEBAN et al., 2006a; ESTEBAN et al., 2006b). O estudo realizado por Mounjoeunpou et al. (2008) mostrou que a contaminação antes do processamento também influencia na qualidade final e que as boas condições do fruto e a abertura imediata podem reduzir os riscos.

Foi encontrado, por Gilmour e Lindblom (2008), níveis mais elevados de OTA, após 5 dias de armazenamento, em amêndoas de frutos danificados. A contaminação começou no primeiro dia de fermentação, sendo um maior nível de contaminação visualizado no meio da pilha. Com 3 dias de fermentação, a contaminação era visivelmente maior nas extremidades da pilha com

considerável crescimento de bolores sobre a superfície da pilha. Com 5 dias de fermentação o teor de OTA aumentou ainda mais. Traços de OTA foram encontrados após a fermentação e secagem das amêndoas, provenientes de frutos sadios, armazenados durante 5 dias. Depois de 4 semanas de armazenamento das amêndoas, os níveis de OTA eram baixos e havia apenas uma pequena diferença entre os níveis de amêndoas provenientes de frutos sadios e danificados. Os níveis de OTA encontrados em amêndoas de frutos mofado ( $\sim 7 \mu\text{g}/\text{kg}$ ), danificados por insetos ( $\sim 4 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) e mumificados ( $\sim 3 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) foram menores do que os níveis encontrados nos frutos fisicamente danificados ( $\sim 20 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) e geralmente maiores do que os encontrados nos frutos sadios ( $\sim 2 \mu\text{g}/\text{kg}$ ).

Raters e Matissek (2007) realizaram um estudo em que selecionaram sementes de cacau em bom estado cultivado na República Dominicana, em 1999 e Gana, em 2000 e examinaram o teor de OTA. Foi feita uma pequena seleção de sementes de cacau danificado ou mofado de Gana, cultivado em 2001 e incluída para análise com polpa e sementes separadas. A OTA não foi detectada em nenhuma das sementes ou polpa de cacau analisadas (LOD de  $0,02 \mu\text{g}/\text{kg}$ ). Os autores mostraram também que a fase de maturação dos frutos saudáveis não é um ponto crítico para a ocorrência da OTA.

Em um estudo com 46 amostras de amêndoas, fornecidas por uma fábrica de importação, oriundas da Costa do Marfim, Camarões e Guiné Equatorial, Amézqueta et al. (2004) analisaram OTA. Das amostras, 63% estavam contaminadas (LOD de  $0,04 \mu\text{g}/\text{kg}$ ), com níveis de  $0,04$ - $14,8 \mu\text{g}/\text{kg}$ .

Dembele, Coulibaly e Traoré (2009) realizaram um estudo em Costa do Marfim, com amostras de amêndoas de cacau dos portos de Abidjan e San Pedro. As amostras foram analisadas quanto à contaminação por OTA de acordo com o Regulamento (CE) n° 401/2006. Das 150 amostras testadas de Abidjan, 23 tinham níveis de OTA  $> 2,0 \mu\text{g}/\text{kg}$ , e 10 das 150 amostras coletadas em San Pedro tinham níveis  $> 2,0 \mu\text{g}/\text{kg}$ .

Em um estudo realizado com 59 amostras de amêndoas de cacau da Nigéria, Dongo et al. (2008) relataram que 90% das amostras testadas apresentaram OTA com concentrações entre 1,0 e 277,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , porém foi utilizado o método ELISA, para a determinação de OTA, considerado menos sensível do que o método de CLAE.

A Europa tem analisado amêndoas de cacau importadas de diferentes origens. Gilmour e Lindblom (2008) apresentam resultados confirmando a presença de amêndoas de cacau contaminadas com OTA em todas as regiões produtoras de cacau: Costa do Marfim, África Ocidental, Ásia, Oceania e Américas. A Tabela 4 mostra dados adicionais sobre a incidência de OTA em grãos de cacau provenientes de vários países produtores.

Tabela 4 Relação da ocorrência de ocratoxina A em amêndoas de cacau

Local/Ano	Nº amostras	Amostras contaminadas (%)	Referências
Abidjan/2005	147	16	Dembele; Coulibaly; Traoré (2009)
San Pedro/2005	151	7	Dembele; Coulibaly; Traoré (2009)
C. do Marfim/NI	33	15	Amézqueta et al. (2004)
Camarões/NI	7	14	Amézqueta et al. (2004)
Guiné Equat./NI	6	0	Amézqueta et al. (2004)
África/NI	21	5	Bonvehí (2004)
Brasil/2006-08	222	1	Copetti et al. (2010)

\*Amostras que apresentaram quantidades de ocratoxina A  $>2\mu\text{g}/\text{kg}$ ; <sup>NI</sup> Não Informado

Burdaşpal e Legarda (2003) encontraram OTA em 99,7% das amostras de chocolate e cacau em pó. Miraglia e Brera (2002) relataram a presença de OTA em 81,3% dos subprodutos de cacau. Em um estudo realizado com cacau em pó do mercado italiano a contaminação por OTA apresentou-se entre 0,22 e 0,77 $\mu\text{g}/\text{kg}$  (TAFURI; FERRACANE; RITIENI, 2004).

A ocratoxina A em produtos agrícolas está relacionada com a presença de fungos toxigênicos em algum momento do processamento e armazenamento. Em um estudo realizado com café, foi constatado que 75% dos *A. ochraceus* e 3% dos *A. niger* Agregados isolados produziram OTA (TANIWAKI et al., 2003). Lasram et al. (2007) relataram que *A. carbonarius* também foi a principal espécie produtora de OTA sendo que 97% dos *A. carbonarius* e 3% dos *A. niger* Agregados foram produtores de OTA.

Nem todos os isolados de uma espécie considerada toxigênica são produtores de toxina, porém com as espécies de *Aspergillus carbonarius* normalmente a produção é alta e atinge 100% na maioria dos estudos (BAU et al., 2005a; FRISVAD et al., 2011; PALUMBO et al., 2011; SERRA; BRAGA; VENÂNCIO, 2005).

Poucos estudos foram publicados sobre *A. carbonarius* não-toxigênicos. Bau et al. (2005b) identificaram morfologicamente 123 isolados envolvidos na contaminação de uvas por OTA, mas posteriormente foram corretamente identificados e descritos como uma nova espécie, *A. ibericus* (SERRA et al., 2006).

Esteban et al. (2004), Esteban et al. (2006a), Esteban et al. (2006b) incluíram, em vários estudos sobre efeito da temperatura e atividade de água na produção de OTA, 2 isolados relatados anteriormente como *A. carbonarius* não-toxigênicos. JOOSTEN et al. (2001) também relataram que um isolado de *A. carbonarius*, isolado de maçãs na Suíça, não foi capaz de produzir OTA usando grãos de café como substrato, porém este isolado também foi posteriormente identificado como *A. ibericus* (SERRA et al., 2006).

Cabañes, Bragulat e Castellá (2013) identificaram inequivocamente, pela primeira vez, três cepas selvagens de *A. carbonarius* não-ocratoxigênico isolados de uva de diferentes vinhedos do Sul da Espanha. A enorme semelhança ao comparar com isolados ocratoxigênicos da mesma espécie

contribuiu para a identificação e genes, sugeridos por serem envolvidos na biossíntese de OTA também foram selecionados. A confirmação da identidade das cepas foi pelo sequenciamento genético. Os três isolados não-toxigênicos não produziram OTA em nenhum meio de cultura em qualquer das temperaturas e tempos de incubação testados. Os autores concluíram que isolados de *A. carbonarius* não-toxigênicos podem ser úteis como agentes biotecnológicos a serem utilizados na indústria de alimentos e como agentes de controle biológico de produção de OTA em vinhas e outras culturas.

## **2.8 Fatores que afetam a presença de ocratoxina A em amêndoas de cacau**

Gilmour e Lindblom (2008) relataram, em um estudo realizado na África Ocidental, os pontos críticos de controle na cadeia de cacau com o intuito de formar a base para a formulação de prevenção estratégica a serem instituídos em um quadro de Análises de Perigo e Pontos Críticos de Controle (HACCP - Hazard Analysis and Critical Control Points) para minimizar a exposição do consumidor. Os autores concluíram que: (a) a contaminação das amêndoas de cacau começa entre a colheita e a fermentação, sendo que os frutos danificados são grande parte do problema; (b) a inoculação inicial ocorre antes ou durante a fermentação; (c) o processo de secagem das amêndoas de cacau pode participar do desenvolvimento de OTA, mas não parece ser a fonte principal de contaminação; (d) a secagem deficiente parece permitir aumento nos níveis de toxina nas amêndoas já contaminadas; (e) os níveis de OTA podem variar dentro da safra, porém não aumentam em amostras de amêndoas de cacau coletadas em fases posteriores da cadeia de fornecimento e (f) aproximadamente 50% das toxinas contaminantes são removidas fisicamente com a retirada da testa (casca) das amêndoas de cacau.

O desenvolvimento da OTA é significativamente maior em amêndoas de frutos danificados do que em amêndoas de frutos saudáveis (BASTIDE et al., 2006). Bastide et al. (2006) estudaram as fontes e o desenvolvimento de ocratoxina A em amêndoas de cacau na Costa do Marfim e Togo e os resultados sugeriram que a presença de OTA tem relação com a pós-colheita, com as práticas de processamento e com as condições climáticas. Quatro estudos foram conduzidos em uma propriedade, durante a principal safra, entre dezembro/2003 e março/2004 e ao mesmo tempo foram investigadas técnicas de processamento. Foram estabelecidas 5 categorias de frutos para estudar o fator de qualidade fitossanitária: frutos saudáveis, frutos mofados (podridão-parda e outras podridões), frutos que secaram nas árvores (mumificados), frutos danificados por insetos e frutos com dano físico externo (ataque de roedores, lesão de gancho ou cutelo na colheita). Os resultados mostraram que a presença de OTA foi altamente significativa nas amêndoas de frutos danificados fisicamente. Os autores comprovaram também que as condições meteorológicas, como a estação da seca e ventos têm um efeito considerável sobre a produção de OTA.

## **2.9 O cacau como fonte de ocratoxina A: a ingestão alimentar**

O Painel Científico dos Contaminantes da Cadeia Alimentar (CONTAM) da EFSA (European Food Safety Authority) estimou que os níveis de exposição à OTA por consumidores adultos europeus variam de 15 a 60 ng/kg/semana. Esta taxa de exposição é inferior ao valor de ingestão semanal tolerável, de 120 ng/kg de peso corporal obtida pelo Painel CONTAM. Os bancos de dados atuais de consumo da EFSA não incluem lactentes e crianças e, portanto, mais dados são necessários para avaliar as taxas de exposição deste segmento de consumidores e daqueles que consomem grandes quantidades de certos alimentos especiais regionais contendo OTA (OPINION..., 2006).

A cooperação científica (SCOOP) (Tarefa3.2.2) da União Europeia, que fornece dados de interesse em relação à segurança alimentar, apresentou dados que indicaram que o consumo diário de cacau foi de 31g/dia/pessoa correspondente a um consumo de OTA de 21 ng/kg/semana/pessoa, contribuindo para 5% do consumo total de OTA. O consumo de cereais contribuiu com 55% do consumo total. O acompanhamento do relatório da Tarefa 3.2.7 (MIRAGLIA; BRERA, 2002) confirmou que cereal ainda era o principal contribuinte da ingestão de OTA total.

O FEHD (Food and Environmental Hygiene Department), de Hong Kong estimou a exposição alimentar a OTA e concluiu, em fevereiro de 2006, um estudo com os 8 principais grupos de alimentos, dentre eles produtos de chocolate e cacau. O FEHD verificou que a exposição alimentar a OTA foi de 4 ng/kg/semana para estudantes do ensino médio secundário e 9 ng/kg/semana para o consumidor com alto consumo. Os cereais e produtos de cereais foram a principal fonte alimentar de OTA (61% do total da exposição) e os chocolates contribuíram com 6% da exposição total da dieta (VOTANO; PARHAM; HALL, 2006)

Na Holanda, a ingestão de OTA média foi estimada como sendo de 1,0ng/kg/dia, sendo 5% proveniente do consumo de produtos de cacau e mais de 50% do consumo de cereais. Café, vinho tinto e carne também contribuem na ingestão de OTA (BAKKER; PIETERS, 2003).

No Canadá, a exposição estimada a OTA por cereais e alimentos à base de cereais variou entre 1,15-1,76 ng/kg/dia para adultos e 2,6-4,38 ng/kg/dia para crianças, sendo os cereais e alimentos à base de cereais os principais contribuintes para a exposição. A exposição à OTA resultantes de cacau e de chocolate não foi avaliada (KUIPER-GOODMAN et al., 2010).

Brera et al. (2011) realizaram um estudo, na Itália, no qual a maior ingestão semanal de OTA, pelas crianças com faixa etária de 0-10 anos, foi

através do consumo de ovos de Páscoa. De acordo com Miralia e Brera (2002) o cacau e os produtos à base de chocolate representam 4% da dieta, portanto, o consumo estimado foi de 4,8ng/kg/semana, muito menor do que o valor da ingestão semanal tolerável da EFSA (120ng/kg/semana).

Na Espanha, a ingestão diária estimada de OTA através do consumo de produtos de chocolate e cacau foi de 0,036 ng/kg/dia), o que representa 0,26% da ingestão diária tolerável estabelecida pela FAO (BURDASPAL; LEGARDA, 2003).

## **2.10 Legislação dos níveis de ocratoxina A em cacau e produtos de cacau**

O problema das micotoxinas é uma preocupação global, pois provocam prejuízos econômicos, morbidade elevada e mortes prematuras na população humana (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2001).

Vários estudos já foram realizados para determinar o grau de contaminação por OTA em produtos alimentícios e bebidas (BLANC et al., 1998; HURST; MARTIN, 1998; PITTET et al., 1996; SKAUQ, 1999; THIRUMALA-DEVIT et al., 2001). A exposição do consumidor a OTA está aumentando dada a existência de OTA em diversos produtos de consumo. Estão sendo implementadas regulamentações que impõem limites à presença de certas micotoxinas em diversos produtos agroalimentares. Esses limites variam entre os países devido a diferentes percepções quanto aos níveis de segurança para a saúde e interesses econômicos (DOHLMAN, 2003).

A União Europeia, através do Regulamento (EC) nº 1881/2006, que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos gêneros alimentícios no que diz respeito à ocratoxina A, estabeleceu limites máximos para OTA em grãos crus de cereais, produtos derivados de cereais e uvas passas, café torrado, café solúvel, vinho, suco de uva, alimentos infantis, alimentos à base de cereais

para lactentes e crianças jovens e alimentos dietéticos ou para fins medicinais específicos destinados para crianças (THE COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2006).

O Regulamento (EU) nº 105/2010, que altera o Regulamento (EC) nº 1881/2006, afirmou, com base em informação já disponível, que não parece necessário, para a proteção da saúde pública, definir um nível máximo de OTA em frutos secos (com exceção para uvas passas), cacau, produtos à base de carne (incluindo miudezas comestíveis e produtos derivados de sangue) e em vinhos licorosos, pois estes produtos não são contribuintes significativos para exposição à OTA e altos níveis de OTA foram encontrados raramente nessas *commodities*. Em café verde e cerveja, a presença de OTA é controlada numa outra etapa da cadeia produtiva, café torrado e malte, respectivamente (THE COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2010).

Em 2003, o Ministério da Saúde italiano, definiu limites legais para a OTA no cacau (2,0 µg/kg) e produtos de chocolate (0,5 µg/kg), porém com base na avaliação dos riscos efetuada por Brera et al. (2011), que concluíram que a exposição à OTA, devido ao consumo de cacau e produtos de chocolate, não apresenta problemas de saúde para os consumidores, e para alinhar com a regulamentação da União Europeia, o Conselho Superior da Saúde Italiano decidiu retirar o limite legal italiano para OTA em amêndoas de cacau e produtos à base de chocolate.

No Brasil, em fevereiro de 2011, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou o Regulamento Técnico sobre Limites Máximos Tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos com o objetivo de estabelecer os limites máximos para aflatoxinas (AFB<sub>1</sub>+AFB<sub>2</sub>+AFG<sub>1</sub>+AFG<sub>2</sub> e AFM<sub>1</sub>), ocratoxina A (OTA), desoxinivalenol (DON), fumonisinas (FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub>), patulina (PAT) e zearalenona (ZON) admissíveis em alimentos prontos para oferta ao consumidor e em matérias-primas como amendoim e seus derivados; alimentos à

base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância); café torrado (moído ou em grão) e solúvel; cereais e produtos de cereais; especiarias; frutas secas e desidratadas; nozes e castanhas; amêndoas de cacau e seus derivados; suco de maçã e polpa de maçã; suco de uva e polpa de uva; vinho e seus derivados; fórmulas infantis para lactentes e fórmulas infantis do seguimento para lactentes e crianças de primeira infância; leite e produtos lácteos e leguminosas e seus derivados (BRASIL, 2011).

Os limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em amêndoas de cacau e derivados estabelecidos são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 Limites Máximos Tolerados (LMT) para micotoxinas em amêndoas e derivados de cacau

<b>Produtos</b>	<b>Aflatoxinas B1, B2, G1, G2 (µg/kg)</b>	<b>Ocratoxina A (µg/kg)</b>
Amêndoas de cacau	10	10
Produtos de cacau e chocolate	5	5

No Canadá, não há limites para a OTA no cacau embora tenham sido feitas propostas de limites, em muitos outros alimentos, como: grãos crus de cereais, grãos de consumo (arroz, aveia, cevada descascada), produtos derivados de cereais (farinha, farelo de trigo, cereais matinais), suco de uva (e como ingredientes de outras bebidas) e produtos relacionados como uvas secas (passas), alimentos para bebês e alimentos à base de cereais destinados a lactentes e crianças jovens, alimentos dietéticos destinados a fins medicinais específicos para lactentes (INFORMATION DOCUMENT ON HEALTH CANADA, 2009).

A FDA (Food and Drug Administration), agência do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos não estabeleceu, até o momento, limites de consultoria ou níveis de ação para a ocratoxina A em qualquer *commoditie*.

### **2.11 Prevenção e redução de ocratoxina A em cacau e produtos de cacau**

As micotoxinas não são completamente destruídas durante o processamento de alimentos podendo, assim, levar a contaminação os alimentos processados. Os processamentos reduzem significativamente as concentrações de micotoxinas nos alimentos, porém não são capazes de eliminá-los completamente.

Os processos que podem ter efeito sobre as micotoxinas são classificação, aparamento, limpeza, moagem, fabricação de cerveja, cozinhar, assar, torrefação, conserva, descamação, cozimento alcalino, nixtamalização e extrusão. Os processamentos de alimentos têm efeitos variáveis sobre as micotoxinas, sendo os que utilizam temperaturas elevadas os de maior efeito (BULLERMAN; BIANCHINI, 2007).

O controle de micotoxinas em alimentos faz-se com a implementação de medidas durante a produção, armazenamento e processamento dos produtos. Essas medidas podem ser divididas em preventivas e corretivas.

As medidas preventivas são aplicadas no campo (pré-colheita) e depois da colheita (pós-colheita). As estratégias pré-colheita pretendem evitar a formação de micotoxinas através de boas práticas agrícolas e de plantas geneticamente modificadas. Já as estratégias pós-colheita visam evitar a formação de micotoxinas pelo correto armazenamento dos produtos agrícolas (BENNETT; KLICH, 2003; RILEY; NORRED, 1999).

A indústria Europeia de chocolate e cacau e os países produtores estão envolvidos em estudos para entender as fontes de contaminação por OTA e ações corretivas apropriadas.

Uma pesquisa, apoiada pela indústria Europeia de chocolate e cacau mostra que a OTA pode ser encontrada em amêndoas de cacau da maioria dos países produtores e que a prática durante o processamento primário do cacau é

crítica. As intervenções devem ser feitas no processamento primário para que haja redução significativa da contaminação por OTA (GILMOUR; LINDBLOM, 2008). As ações preventivas devem ser tomadas na separação de frutos danificados, controle na fermentação e na secagem.

Bastide et al. (2006) realizaram um estudo em pequenas propriedades rurais na Costa do Marfim e Togo. Os pesquisadores sugeriram que a OTA tem relação com as práticas de processamento pós-colheita, tais como defeitos nos frutos e com as condições climáticas do mês da colheita.

Copetti et al. (2010) concluíram, ao analisar os níveis de OTA durante o processamento de cacau na fazenda, que o ponto crítico é a fase de secagem das amêndoas.

Jinap, Dimick e Hollender (1995) descreveram a presença de ácido láctico, ácido acético e ácido cítrico durante a fermentação de cacau e Copetti et al. (2010) avaliaram o crescimento de *A. carbonarius* e *A. niger* e a produção de OTA em meios de cultura com esses 3 ácidos orgânicos e verificaram que tais ácidos têm efeito inibidor no crescimento de fungos ocratoxigênicos e na produção de ocratoxina A, sendo o ácido acético o mais inibitório contra as 2 espécies de fungos, bem como na produção de OTA. Os autores recomendam a prática da fermentação das sementes de cacau, devido à presença de ácido acético gerado para prevenir a OTA.

Dados de um estudo realizado por Palumbo, O’Keeffe e Mahoney (2007) indicam que compostos antioxidantes fenólicos, ácido gálico, ácido vanílico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido cafeico e catequina, inibem o crescimento de espécies de *Aspergillus* ocratoxigênicos e a produção de OTA. Alguns desses ácidos são encontrados no cacau.

As amêndoas de cacau não são consumidas como tal, para tanto é necessário que elas passem por um processo industrial. O cacau é um

ingrediente largamente utilizado em vários alimentos como bolos, biscoitos, alimentos infantis, sorvetes e doces (TAFURI; FERRACANE; RITIENI, 2004).

A classificação e a separação podem reduzir as micotoxinas através da remoção do material contaminado, porém estas operações não destroem as micotoxinas. A limpeza com remoção de grãos com crescimento de fungos, grãos quebrados e materiais finos também ajuda a reduzir as concentrações de micotoxinas (BULLERMAN; BIANCHINI, 2007).

Durante o processamento industrial a atividade de água ( $a_w$ ) nas amêndoas é menor que 0,8, portanto, muito baixa para a produção de OTA. O processamento começa pela torrefação das amêndoas e remoção da casca (GILMOUR; LINDBLOM, 2008).

Durante o processamento industrial do cacau, as amêndoas passam por limpeza, torrefação e remoção mecânica da testa (casca) durante a obtenção do nibs (amêndoas trituradas). Quando ocorre a contaminação das amêndoas por OTA, a toxina fica localizada, principalmente, na casca das amêndoas, portanto, uma grande porção da toxina presente é removida durante o processamento (GILMOUR; LINDBLOM, 2008). A eficiência do processo de remoção da casca não chega a 100%, até 5% do peso da matéria seca sem gordura de cacau pode ser devido à presença de casca e gérmen não removido durante o processamento industrial (CODEX ALIMENTARIUS, 2001). Devido a esse fato, se as amêndoas estiverem contaminadas com OTA, a mesma não será totalmente removida durante o processamento industrial.

Bonvehí (2004) estudou a ocorrência de OTA em 170 amostras de produtos de cacau de diferentes origens geográficas. Foi na casca das amêndoas de cacau torrado que foram detectados os mais altos níveis de OTA (média de  $11\mu\text{g}/\text{kg}$ ), seguido da torta de cacau (média  $2,79\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

Em um estudo em que a casca das amêndoas de cacau foi removida à mão, Amézqueta et al. (2005) observaram que em 14 das 22 amostras analisadas

houve uma redução maior que 95% no teor de OTA, em 6 das 22 amostras, 65-95% e somente 1 amostra apresentou redução inferior a 50%. A principal conclusão dos autores foi que a contaminação por OTA em amêndoas de cacau está concentrada na casca e, portanto, melhorias do processo industrial poderia prevenir a ocorrência de OTA nos produtos finais de cacau.

Em seguida o nibs é moído dando origem à massa/liquor de cacau, um líquido viscoso contendo aproximadamente 50% de gordura. Essa massa/liquor de cacau pode ser misturada a outros ingredientes para fabricar o chocolate ou pode ser "pressionada" para a produção de manteiga de cacau e cacau em pó. Depois de extraída a manteiga, toda a OTA presente no nibs passa para o pó de cacau, pois esta é uma fração concentrada de sólidos de cacau. Gilmour e Lindblom (2008) não encontraram OTA na manteiga de cacau.

Amostras de cacau foram preparadas sob condições específicas para promover a proliferação de fungos em sementes de cacau antes do processamento com o objetivo de avaliar o impacto do processamento industrial no conteúdo de OTA em produtos derivados de cacau. As sementes sofreram os tratamentos industriais usuais de torrefação, descasque, moagem, prensagem e adição de aditivos e de cada etapa foram retiradas amostras. Os níveis de OTA detectados nas sementes de cacau contaminadas artificialmente variaram de 3,4 a 44,7  $\mu\text{g}/\text{kg}$  com uma média de  $22,9 \pm 3,6 \mu\text{g}/\text{kg}$ . A maior concentração de OTA (93%) foi encontrada na casca. A torrefação, o descasque e a adição de aditivo reduziu os níveis de OTA para 24-40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (76 e 52%, respectivamente), com uma redução global de 91%, aproximadamente (MANDA et al., 2009).

De acordo com as normas do Codex para cacau, a descrição padrão de massa/liquor de cacau e torta de cacau é o produto obtido a partir de granulado de cacau, que é obtido a partir de amêndoas de cacau de qualidade comercializável que tenham sido limpas e livres de cascas tanto quanto tecnicamente possível (CODEX ALIMENTARIUS, 2001). Grande parte da

OTA presente no cacau encontra-se na casca que é removida durante o processamento secundário (industrial). As outras etapas do processamento não removem ou degradam a OTA. Portanto, o procedimento de descascar as amêndoas de cacau bem realizado pode reduzir significativamente os níveis de OTA em produtos de cacau (AMÉZQUETA et al., 2005).

Diversos estudos têm relatado a estabilidade de micotoxinas durante variados métodos de tratamento térmico (BOUDRA; BARS; BARS, 1995; JACKSON et al., 1996a; JACKSON et al., 1996b; RYU et al., 2003). A ocratoxina A é estável durante a cocção, não ocorrendo perda ou diminuição da concentração da mesma (SCUDAMORE; BANKS; MACDONALD, 2003). Porém a torrefação de café reduziu de 12,8 a 92,7% da ocratoxina A (PÉREZ DE OBANOS; GONZÁLEZ-PEÑAS; CERAIN, 2005) e em um estudo que aplicou as condições de processamento utilizadas dentro dos parâmetros de torrefação (temperatura do ar de torrefação a 450°C) para obter o típico café expresso italiano a diminuição da ocratoxina A foi maior do que 90% (ROMANI; PINNAVAIA; ROSA, 2003).

Óleos essenciais de *Aframomum danielli*, uma espécie de pimenta, foram capazes de reduzir os níveis de OTA em cacau em pó com uma eficiência de redução de 64-95% (AROYEUN; ADEGOLE, 2007). Neste estudo, os autores contaminaram artificialmente cacau em pó e bebidas de cacau com padrão de ocratoxina A e usaram óleos essenciais de *Aframomum danielli* como tratamento. Esse trabalho revela a possibilidade de se utilizar *A. danielli* nos procedimentos que visam à redução de OTA em amostras contaminadas. Estes autores não realizaram teste sensorial para saber a aceitação de produtos de chocolate acrescidos de óleo essencial de *A. danielli*.

## REFERÊNCIAS

- AMÉZQUETA, S. et al. Occurrence of ochratoxin A in cocoa beans : effect of shelling. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 22, n. 6, p. 590–596, June 2005.
- AMÉZQUETA, S. et al. OTA-producing fungi isolated from stored cocoa beans. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 47, n. 3, p. 197–201, Sept. 2008.
- AMÉZQUETA, S. et al. Validation of a high-performance liquid chromatography analytical method for ochratoxin A quantification in cocoa beans. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 21, n. 11, p. 1096–1106, Nov. 2004.
- AQUARONE, E. et al. **Biotechnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos**. São Paulo: Edgar Blücher, 2001.
- ARDHANA, M. M.; FLEET, G. H. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 86, n. 1-2, p. 87–99, Sept. 2003.
- AROYEUN, S. O.; ADEGOLE, G. O. Reduction of ochratoxin A ( OTA ) in spiked cocoa powder and beverage using aqueous extracts and essential oils of *Aframomum danielli*. **African Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 6, n. 5, p. 612–616, Mar. 2007.
- BAKKER, M.; PIETERS, M. Risk assessment of ochratoxin A in the Netherlands. **RIVM**, Bilthoven, p. 1–24, 2003.
- BASSO, K. et al. **Cocoa Certification: study on the costs, advantages and disadvantages of cocoa certification**. Netherlands: ICCO, 2013. Disponível em: <[http://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/doc\\_download/302-study-on-the-costs-advantages-and-disadvantages-of-cocoa-certification-october-2012.html](http://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/doc_download/302-study-on-the-costs-advantages-and-disadvantages-of-cocoa-certification-october-2012.html)>. Acesso em: 3 maio 2013.
- BASTIDE, B. et al. **Identification of Ochratoxin A sources during cocoa post-harvest processing: influence of harvest quality and climatic factors**. San Jose, Costa Rica: Cocoa Research Centre, 2006.

- BATISTA, L. R. et al. Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 9, p. 784–790, Sept. 2009.
- BAU, M. et al. DNA-based characterization of ochratoxin-A-producing and non-producing *Aspergillus carbonarius* strains from grapes. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 156, n. 3, p. 375–381, Apr. 2005b.
- BAU, M. et al. Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 98, n. 2, p. 125–130, Feb. 2005a.
- BEJAOUI, H. et al. Black aspergilli and ochratoxin A production in French vineyards. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, supl. 1, p. 46–52, Sept. 2006.
- BELLÍ, N. et al. Occurrence of ochratoxin A and toxigenic potential of fungal isolates from Spanish grapes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 84, n. 6, p. 541–546, Apr. 2004.
- BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 16, n. 3, p. 497–516, July 2003.
- BLANC, M. et al. Behavior of ochratoxin A during green coffee roasting and soluble coffee manufacture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, n. 2, p. 673–675, Feb. 1998.
- BONVEHÍ, J. S. Occurrence of ochratoxin A in cocoa products and chocolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 20, p. 6347–6352, Oct. 2004.
- BOORMAN, G. A. Toxicology and carcinogenesis studies of ochratoxin A in F344/N rats. **National Toxicology Program Technical Reports Series**, Bethesda, n. 358, p. 1-142, May 1989.
- BOUDRA, H.; BARS, P. LE; BARS, J. LE. Thermostability of Ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 3, p. 1156–1158, Mar. 1995.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução - RDC N° 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, mar. 2011.

BRERA, C. et al. Ochratoxin A in cocoa and chocolate products from the Italian market: Occurrence and exposure assessment. **Food Control**, Guildford, v. 22, n. 10, p. 1663–1667, Oct. 2011.

BULLERMAN, L. B.; BIANCHINI, A. Stability of mycotoxins during food processing. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, n. 1-2, p. 140–146, Oct. 2007.

BURDASPAL, P. A.; LEGARDA, T. M. Ocratoxina a en distintos tipos de chocolate y preparados de cacao en polvo comercializados en España y en otros países extranjeros. **Alimentaria**, Madrid, n. 347, p. 143–153, 2003.

CABAÑES, F. J.; BRAGULAT, M. R.; CASTELLÁ, G. Characterization of nonochratoxigenic strains of *Aspergillus carbonarius* from grapes. **Food Microbiology**, London, v. 36, n. 2, p. 135–141, Dec. 2013.

CABAÑES, F. J.; BRAGULAT, M. R.; CASTELLÁ, G. Ochratoxin A producing species in the genus *penicillium*. **Toxins**, Basel, v. 2, n. 5, p. 1111–1120, May 2010.

CAMU, N. et al. Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 6, p. 1809–1824, Mar. 2007.

CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R. **Fungos associados a frutos e grãos do café: *aspergillus e penicillium***. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003.

CHULZE, S. N.; MAGNOLI, C. E.; DALCERO, A. M. Occurrence of ochratoxin A in wine and ochratoxigenic mycoflora in grapes and dried vine fruits in South America. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, supl. 1, p. 5–9, Sept. 2006.

CODEX ALIMENTARIUS. Codex Standard for cocoa (cacao) mass (cocoa/chocolate liquor) and cocoa cake. **Codex Stan**, Bethesda, n. 141, p. 1-4, 2001.

COPETTI, M. V. **Micobiota do cacau: fungos e micotoxinas do cacau ao chocolate**. Campinas: Editora da UNICAMPI, 2009.

COPETTI, M. V et al. Aflatoxigenic fungi and aflatoxin in cocoa. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 148, n. 2, p. 141–144, Aug. 2011a.

COPETTI, M. V et al. Mycobiota of cocoa: from farm to chocolate. **Food Microbiology**, London, v. 28, n. 8, p. 1499–504, Dec. 2011b.

COPETTI, M. V et al. Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in cocoa during farm processing. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 143, n. 1-2, p. 67–70, Sept. 2010.

DEMBELE, A.; COULIBALY, A.; TRAORÉ, S. Détermination du niveau de contamination de l'ochratoxine A (OTA) dans les fèves de cacao à l'exportation. **Tropicicultura**, Tingo Maria, v. 27, n. 1, p. 26–30, 2009.

DOHLMAN, E. Mycotoxin hazards and regulations: impacts on food and animal feed crop trade. In: BUZBY, J. C. (Ed.). **International trade and food safety: economic theory and case studies**. Oxford: Eletronic Report from the Economic Research Service, 2003. Chap. 6, p. 97–108.

DONGO, J. et al. Ocurrence of ochratoxin A in Nigerian ready for sale cocoa beans. **Agricultural Journal**, Bridgetown, v. 3, n. 1, p. 4-9, 2008.

ESTEBAN, A. et al. Effects of temperature and incubation time on production of ochratoxin A by black aspergilli. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 155, n. 10, p. 861–866, Dec. 2004.

ESTEBAN, A et al. Effect of water activity on ochratoxin A production by *Aspergillus niger* aggregate species. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 108, n. 2, p. 188–195, Apr. 2006a.

ESTEBAN, A. et al. Study of the effect of water activity and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*. **Food Microbiology**, London, v. 23, n. 7, p. 634–640, Oct. 2006b.

FERNÁNDEZ-PINTO, V. et al. Natural co-occurrence of aflatoxin and cyclopiazonic acid in peanuts grown in Argentina. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 18, n. 11, p. 1017–1020, Nov. 2001.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Evaluation of certain food additives and contaminants: forty-fourth report of the joint FAO/WHO expert

committee on food additives. **WHO Technical Report Series**, Rome, n. 940, p. 1-100, 1995.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Manual on the application of the HACCP system in mycotoxin prevention and control. **FAO Food and Nutrition Paper 73**, Rome, p. 124, 2001.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Safety evaluation of certain mycotoxins in food: fifty-sixth meeting of the joint FAO/WHO expert committee on food additives. **FAO Food and Nutrition Paper**, Geneva, p. 27–35, 2001.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Safety evaluation of certain mycotoxins in food: fifty-sixth meeting of the joint FAO/WHO expert committee on food additives. **FAO Food and Nutrition Paper**, Geneva, 2007.

FRISVAD, J. C.; ANDERSEN, B.; THRANE, U. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. **Micological Research**, Cambridge, v. 112, n. 2, p. 231–240, 2008.

FRISVAD, J. C. et al. Fumonisin and ochratoxin production in industrial *Aspergillus niger* strains. **PloS One**, California, v. 6, n. 8, p. 42-47, Aug. 2011.

FRISVAD, J. C. et al. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. **Studies in Mycology**, Oxford, v. 50, p. 23–43, 2004.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A.; SMEDSGAARD, J. *Emericella astellata*, a new producer of aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and sterigmatocystin. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 38, n. 5, p. 440–445, 2004.

FRISVAD, J. C.; SKOUBOE, P.; SAMSON, R. A. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B 1, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 28, n. 5, p. 442–453, July 2005.

GÁLVEZ, S. L. et al. Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 114, n. 1, p. 124–30, Fev. 2007.

GILMOUR, M.; LINDBLUM, M. Management of ochratoxin a in the cocoa supply chain: a summary of work by the CAOBISCO/ECA/FCC working group on ochratoxin A. In: LESLIE, J. F.; BANDYOPADHYAY, R.; VISCONTI, A. (Ed.). **Mycotoxins: detection methods, management, public health and agricultural trade**. Wallingford: CABI, 2008. p. 231-243.

GIORNI, P. et al. Studies on *Aspergillus* section *Flavi* isolated from maize in northern Italy. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 113, n. 3, p. 330–338, Feb. 2007.

GÓMEZ, C. et al. Ochratoxin A-producing fungi from grapes intended for liqueur wine production. **Food Microbiology**, London, v. 23, n. 6, p. 541–545, Sept. 2006.

GRAMACHO, I. da C. P. et al. **Cultivo e beneficiamento do cacau na Bahia**. Ilhéus: CEPLAC, 1992.

GUZEV, L. et al. Occurrence of ochratoxin A producing fungi in wine and table grapes in Israel. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, supl. 1, p. 67–71, Sept. 2006.

HII, C. L.; LAW, C. L.; CLOKE, M. Modeling using a new thin layer drying model and product quality of cocoa. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 90, n. 2, p. 191–198, Jan. 2009.

HOCKING, D. *Aspergillus* and related teleomorphs. In: BLACKBURN, C. de W. **Food spoilage microorganisms**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2006. Chap. 17, p. 451–477.

HONG, S. B. et al. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. **Mycologia**, Lancaster, v. 97, n. 6, p. 1316–1329, Nov./Dec. 2005.

HURST, W. J.; MARTIN, R. A. J. High-performance liquid chromatographic determination of ochratoxin A in artificially contaminated cocoa beans using automated sample clean-up. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 810, n. 1-2, p. 89–94, 1998.

IAMANAKA, B. T. et al. Incidence of toxigenic fungi and ochratoxin A in dried fruits sold in Brazil. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 22, n. 12, p. 1258–1263, Dec. 2005.

INFORMATION DOCUMENT ON HEALTH CANADA. Information document on health Canada's Proposed maximum limits (standards) for the presence of the mycotoxin ochratoxin a in foods. **Bureau of Chemical Safety**, Canadá, p. 1–4, Feb. 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA.

**Levantamento sistemático da produção agrícola**. Rio de Janeiro: IBGE, 2013. Disponível em: <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Levantamento+sistemático+da+produção+agrícola#1>>. Acesso em: 11 jul. 2013.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. **IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans**, France, v. 56, p. 489–521, June 1993.

INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION. Factors to consider in the storage area in order to minimize risk. International Cocoa Organization Westgate House, London, 2013b. Disponível em: <<http://www.icco.org/faq/60-storing-cocoa-beans/107-factors-to-consider-in-the-storage-area-in-order-to-minimize-risk.html>>. Acesso em: 2 maio. 2013.

INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION. Grindings: latest figures from the quarterly bulletin of cocoa statistics. **International Cocoa Organization Westgate House**, London, 2013d. Disponível em: <[http://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat\\_view/30-related-documents/48-statistics-grindings.html](http://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat_view/30-related-documents/48-statistics-grindings.html)>. Acesso em: 2 jul. 2013.

INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION. Origins of cocoa and its spread around the world. **International Cocoa Organization Westgate House**, London, 2013a. Disponível em: <<http://www.icco.org/about-cocoa/growing-cocoa.html>>. Acesso em: 4 jul. 2013.

INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION. Production: latest figures from the quarterly bulletin of cocoa statistics. **International Cocoa Organization Westgate House**, London, 2013c. Disponível em: <[http://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat\\_view/30-related-documents/46-statistics-production.html](http://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat_view/30-related-documents/46-statistics-production.html)>. Acesso em: 2 jul. 2013.

JACKSON, L. S. et al. Effects of thermal processing on the stability of fumonisin B 2 in an aqueous system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, p. 1984–2987, July 1996b.

JACKSON, L. S. et al. Effects of time, temperature, and pH on the stability of fumonisin B 1 in an aqueous model system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, n. 3, p. 906–912, Mar. 1996a.

JINAP, S.; DIMICK, P. S.; HOLLENDER, R. Flavour evaluation of chocolate formulated from cocoa beans from different countries. **Food Control**, Guildford, v. 6, n. 2, p. 105–110, 1995.

JOOSTEN, H. M. L. J. et al. Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 65, n. 1-2, p. 39–44, Apr. 2001.

KLICH, M. A.; PITT, J. I. **A laboratory guide to common aspergillus species and their teleomorphs**. Commonweal: Sydney, 1988.

KLICH, M. A. **Identification of common aspergillus species**. Amsterdam: Centraalbureau voor Schimmelauteurs, 2002.

KUIPER-GOODMAN, T. et al. Health risk assessment of ochratoxin A for all age-sex strata in a market economy. **Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment**, Abingdon, v. 27, n. 2, p. 212–40, Feb. 2010.

LASRAM, S. et al. Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in grapes from a Tunisian vineyard. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 114, n. 3, p. 376–379, Mar. 2007.

LEONG, S. L.; HOCKING, A. D.; SCOTT, E. S. *Aspergillus* species producing ochratoxin A: isolation from vineyard soils and infection of Semillon bunches in Austrália. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 102, n. 1, p. 124–133, Jan. 2007.

MAGAN, N.; ALDRED, D. Conditions of formation of ochratoxin A in drying, transport and in different commodities different commodities. **Food Microbiology**, London, v. 22, n. 1, p. 37–41, 2006.

MAGAN, N.; OLSEN, M. **Mycotoxins in food: detection and control**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2004.

MAGNOLI, C. et al. Mycoflora and ochratoxin-producing strains of *Aspergillus* section Nigri in wine grapes in Argentina. **Letters in applied microbiology**, Oxford, v. 37, n. 2, p. 179–184, 2003.

MAGNOLI, C. E. et al. Occurrence of ochratoxin A and ochratoxigenic mycoflora in corn and corn based foods and feeds in some South American countries. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 165, n. 5, p. 249–260, May 2007.

MANDA, P. et al. Impact of industrial treatments on ochratoxin A content in artificially contaminated cocoa beans. **Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment**, Abingdon, v. 26, n. 7, p. 1081–1088, July 2009.

MARTÍNEZ-CULEBRAS, P. V.; RAMÓN, D. An ITS-RFLP method to identify black *Aspergillus* isolates responsible for OTA contamination in grapes and wine. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 113, n. 2, p. 147–153, Jan. 2007.

MINIFIE, B. W. **Chocolate, cocoa, and confectionery: science and technology**. 3. ed. New York: Van Nostrand & Reinhold, 1999.

MIRAGLIA, M.; BRERA, C. Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU member states. **Reports on tasks for Scientific Cooperation**, Rome, p. 1–153, Jan. 2002.

MITCHELL, D. et al. Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 97, n. 2, p. 439–445, Jan. 2004.

- MOSS, M. Centenary review mycotoxins. **Mycological Research**, Cambridge, v. 100, p. 513–523, 1996.
- MOUNJOUENPOU, P. et al. Filamentous fungi producing ochratoxin a during cocoa processing in Cameroon. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 121, n. 2, p. 234–241, Jan. 2008.
- NIELSEN, D. S. **The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations**. Copenhagen: The Royal Veterinary and Agricultural University, 2006.
- OBANOS, A. P. de; GONZÁLEZ-PEÑAS, E.; CERAIN, A. L. de. Influence of roasting and brew preparation on the ochratoxin A content in coffee infusion. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 22, n. 5, p. 463–471, May 2005.
- O'BRIEN, E.; DIETRICH, D. R. Ochratoxin A: the continuing enigma. **Critical Reviews in Toxicology**, Boca Raton, v. 35, n. 1, p. 33–60, Jan. 2005.
- OPINION of the scientific panel on contaminants in the food chain of the EFSA on a request from the Commission related to ochratoxin A in food. **The EFSA Journal**, n. 365, p. 1–56, Apr. 2006.
- OYETUNJI, T. Mycological evaluation of a ground cocoa-based beverage. **African Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 5, n. 22, p. 2073–2076, Nov. 2006.
- PALACIOS-CABRERA, H. et al. Growth of *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* and *A. niger* on culture media at different water activities and temperatures. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 24–28, Jan./Mar. 2005.
- PALUMBO, J. D. et al. Isolation and identification of ochratoxin A-producing *Aspergillus* section *Nigri* strains from California raisins. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 52, n. 4, p. 330–336, Apr. 2011.
- PALUMBO, J. D.; O'KEEFFE, T. L.; MAHONEY, N. E. Inhibition of ochratoxin A production and growth of *Aspergillus* species by phenolic antioxidant compounds. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 164, n. 5, p. 241–248, Nov. 2007.
- PITT, J. I. Toxigenic fungi and mycotoxins. **Food Science**, Austrália, v. 56, n. 1, p. 184–192, 2000.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. Maryland: Aspen Publication, 1999.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. London: Blackie Academic & Professional, 1997.

PITTET, A. et al. Liquid chromatographic determination of ochratoxin a in pure and adulterated soluble coffee using an immunoaffinity column cleanup procedure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, n. 11, p. 3564–3569, Nov. 1996.

PITTET, A.; ROYER, D. Rapid, low cost thin-layer chromatographic screening method for the detection of ochratoxin A in green coffee at a control level of 10 microg/kg. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 2, p. 243–7, Jan. 2002.

PONSONE, M. L. et al. Ochratoxin A and ochratoxigenic *Aspergillus* species in Argentinean wine grapes cultivated under organic and non-organic systems. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 114, n. 2, p. 131–135, Mar. 2007.

RATERS, M.; MATISSEK, R. No OTA in fresh cocoa beans. **Food Chemistry**, London, v. 23, n. 2, p. 85–87, 2007.

RILEY, R.; NORRED, W. Mycotoxin prevention and decontamination: a case study on maize. **Food, Nutrition and Agriculture**, Georgia, v. 23, p. 25–32, 1999.

ROMANI, S.; PINNAVAIA, G. G.; ROSA, M. D. Influence of roasting levels on ochratoxin A content in coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 17, p. 5168–5171, Aug. 2003.

RYU, D. et al. Heat stability of zearalenone in an aqueous buffered model system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 6, p. 1746–1748, Mar. 2003.

SAMSON, R. A. et al. **Introduction to Food- and airborne fungi**. Netherlands: CBS, 2002.

SAMSON, R. A. et al. **Introduction to food and airborne fungi**. 4. ed. Netherlands: ACM Press, 2000.

SAMSON, R. A. et al. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. **Studies in Mycology**, Oxford, v. 50, p. 45–61, 2004.

SAMSON, R. A.; VARGA, J. **Aspergillus systematics in the genomics era**. Utrecht: CBS Fungal Biodiversity Centre, 2007.

SÁNCHEZ-HERVÁS, M. et al. Mycobiota and mycotoxin producing fungi from cocoa beans. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 125, n. 3, p. 336–340, July 2008.

SANGARE-TIGORI, B. et al. Ochratoxin A in human blood in Abidjan, Côte d'Ivoire. **Toxicon** : official journal of the international society on toxinology, Oxford, v. 47, n. 8, p. 894–900, June 2006.

SCHWARTZ, G. G. Hypothesis: does ochratoxin A cause testicular cancer? **Cancer Causes and Control**, Oxford, v. 13, n. 1, p. 91–100, Feb. 2002.  
SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. **Critical reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 44, n. 4, p. 205–21, Jan. 2004.

SCUDAMORE, K. A.; BANKS, J.; MACDONALD, S. J. Fate of ochratoxin A in the processing of whole wheat grains during milling and bread production. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 20, n. 12, p. 1153–1163, Dec. 2003.

SERRA, R.; BRAGA, A.; VENÂNCIO, A. Mycotoxin-producing and other fungi isolated from grapes for wine production, with particular emphasis on ochratoxin A. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 156, n. 4, p. 515–521, May 2005.

SERRA, R. et al. *Aspergillus ibericus* : a new species of section *Nigri* isolated from grapes. **Mycologia**, Lancaster, v. 98, n. 2, p. 295–306, Mar./Apr. 2006.

SKAUQ, M. A. Analysis of Norwegian milk and infant formulas for ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 16, n. 2, p. 75–79, Feb. 1999.

STEYN, P. Mycotoxins, general view, chemistry and structure. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 82-83, p. 843–851, Dec. 1995.

STUDER-ROHR, I. et al. The occurrence of ochratoxin a in coffee. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 33, n. 5, p. 341–355, May 1995.

SUÁREZ-QUIROZ, M. et al. Study of ochratoxin A-producing strains in coffee processing. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 39, n. 5, p. 501–507, May 2004.

SWEENEY, M. J.; DOBSON, A. D. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 43, n. 3, p. 141–158, Sept. 1998.

TAFURI, A.; FERRACANE, R.; RITIENI, A. Ochratoxin A in Italian marketed cocoa products. **Food Chemistry**, London, v. 88, n. 4, p. 487–494, Dec. 2004.

TANIWAKI, M. et al. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 82, n. 2, p. 173–179, Apr. 2003.

TERRA, M. F. et al. Detection of ochratoxin A in tropical wine and grape juice from Brazil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 93, n. 4, p. 890–894, Mar. 2013.

THE COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. Commission Regulation (EU) N° 105/2010 of 05 February 2010. **Official Journal of the European Union**, Austria, Feb. 2010. L35/7-L35/8.

THE COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. Commission Regulation (EC) N° 1881/2006 of 19 December 2006. **Official Journal of the European Union**, Austria, Dec. 2006. L364/5-L364/24.

THIRUMALA-DEVIT, K. et al. Occurrence of ochratoxin A in black pepper , coriander , ginger and turmeric in India. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 18, n. 9, p. 830–835, Sept. 2001.

TJAMOS, S. E.; ANTONIOU, P. P.; TJAMOS, E. C. *Aspergillus* spp., distribution, population composition and ochratoxin A production in wine producing vineyards in Greece. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, supl. 1, p. 61-66, Sept. 2006.

VARGA, J. et al. Evolutionary relationships among *aspergillus* species producing economically important mycotoxins. **Food Technology and Biotechnology**, Amsterdam, v. 41, n. 1, p. 29–36, Jan. 2003.

VARGA, J.; KOZAKIEWICZ, Z. Ochratoxin A in grapes and grape derived products. Trends in **Food Science & Technology**, Cambridge, v. 17, n. 2, p. 72-81, 2006.

VOTANO, J.; PARHAM, M.; HALL, L. LegCo panel on food safety and environmental hygiene. **Food and Health Bureau**, Hong Kong, v. 6, p. 1-15, Jan. 2006.

WOOD, G. A. R.; LASS, R. A. **Cocoa**. 4. ed. New York: Longman Scientific and Technical, 1985.

**CAPITULO 2**

**DISTRIBUIÇÃO DE FUNGOS TOXIGÊNICOS E NÃO TOXIGÊNICOS  
EM AMÊNDOAS DE CACAU DO ESTADO DE RONDÔNIA E  
RELAÇÃO COM AS PRÁTICAS DE PROCESSAMENTO PRIMÁRIO**

## RESUMO

A presença de espécies fúngicas em amêndoas de cacau pode acarretar na diminuição da qualidade e conseqüentemente risco à saúde dos consumidores devido à possível produção de micotoxinas. Esta pesquisa objetivou investigar a presença de espécies do gênero *Aspergillus* em amêndoas de cacau cultivadas no estado de Rondônia; o potencial toxigênico dos fungos isolados; estudar o efeito da origem geográfica e temperatura na incidência de fungos totais e toxigênicos; e analisar a influência da fermentação, secagem e do armazenamento na incidência de fungos. Quarenta amostras de amêndoas de cacau foram plaqueadas em meio Dichloran Rose Bengal Chloranphenicol (DRBC). A identificação das espécies do gênero *Aspergillus* foi através das características morfológicas e a avaliação do potencial de produção de ocratoxina A (OTA) e aflatoxinas (AFs) pelo método Plug Agar. *Aspergillus carbonarius* foram avaliados pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Para determinar a probabilidade de ocorrência de espécies de fungos do gênero *Aspergillus* totais e toxigênicos, no estado de Rondônia, foi utilizada a técnica de Regressão Logística em função das coordenadas geográficas (latitude e longitude) e temperatura. Os fungos do gênero *Aspergillus* apresentaram maior probabilidade de crescimento em amêndoas de cacau do sul do estado de Rondônia, já a distribuição dos fungos toxigênicos foi similar em todo o Estado. Os fungos do gênero *Aspergillus* identificados pertenceram às Seções *Nigri* (*A. niger*, *A. carbonarius*, *A. niger* Agregado, *A. foetidus*, *A. tubingensis* e *A. aculeatus*) e *Flavi* (*A. flavus* e *A. oryzae*). Dos 34 *A. carbonarius* testados 79,41% produziram OTA variando de 0,08 a 44,09 µg/g e 3,13% dos 64 *A. niger*. Com relação aos fungos produtores de AFs, uma significativa porcentagem (83,33%) dos 18 *A. flavus* foi capaz de produzir AFs B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>. As práticas de fermentação, secagem e o armazenamento exercem influência sobre a incidência de fungos em amêndoas de cacau e a presença destes indicam que há um risco potencial de contaminação por OTA e AFs em cacau e produtos de cacau do estado de Rondônia, sendo importante a conscientização dos agricultores quanto aos riscos de contaminação das amêndoas de cacau e práticas de processamento primário inadequadas que influenciam a incidência de fungos em amêndoas de cacau.

Palavras-chave: *Aspergillus* sp. Teste toxigênico. Distribuição de fungos. Micotoxinas.

## ABSTRACT

The presence of fungal species in cocoa beans may result in decreased quality and therefore health risk to consumers due to the possible production of mycotoxins. This study investigated the presence of *Aspergillus* species in almond cocoa grown in the state of Rondônia, the toxigenic potential of fungal isolates and to study the effect of geographical origin and temperature in the incidence of total and toxigenic fungi, and analyze the influence of fermentation, drying and storage in the incidence of fungi. Forty samples of cocoa beans were plated in medium Dichloran Chloranphenicol Rose Bengal (DRBC). The identification of the genus *Aspergillus* was in their morphological characteristics and evaluation of the production potential of ochratoxin A (OTA) and aflatoxins (AFs) by Plug Agar method. *Aspergillus carbonarius* were evaluated by the method of High Performance Liquid Chromatography (HPLC). To determine the probability of occurrence of species of fungi of the genus *Aspergillus* toxigenic total and in the state of Rondônia technical logistic regression depending on the geographical coordinates (latitude and longitude) and temperature was used. The fungi of the genus *Aspergillus* were more likely growth in cocoa beans from the southern state of Rondônia, since the distribution of toxigenic fungi was similar throughout the state. The fungi of the genus *Aspergillus* identified belonged to sections *Nigri* (*A. niger*, *A. carbonarius*, *A. niger* Aggregate, *A. foetidus*, *A. tubingensis* e *A. aculeatus*) e *Flavi* (*A. flavus* e *A. oryzae*). Of the 34 tested *A. carbonarius* OTA produced 79.41 % ranging from 0.08 to 44.09 µg/g and 3.13 % of 64 *A. niger*. Regarding producing fungi households, a significant percentage (83.33%) of the 18 *A. flavus* was able to produce AFs B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub>. The practices of fermentation, drying and storage influence on the incidence of fungi in amêndoas cocoa and the presence of these indicate that there is a potential risk of OTA contamination in cocoa and households and cocoa products in the state of Rondônia is important to raise awareness of farmers about the risks of contamination of cocoa beans and inadequate primary processing practices that influence the incidence of fungi in cocoa beans.

Keywords: *Aspergillus* sp. Test toxigenic. Distribution of fungi. Mycotoxins.

## 1 INTRODUÇÃO

A árvore de cacau pertence ao gênero *Theobroma* ocorre na Amazônia e em outras áreas tropicais da América do Sul e Central. Há mais de vinte espécies do gênero, mas a *Theobroma cacao* L. é a única cultivada amplamente (WOOD; LASS, 1985). Segundo a Organização Internacional do Cacau, aproximadamente 71% da oferta mundial de cacau vem da África Ocidental (INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION, 2013b). O Brasil é o sexto maior produtor com 4,64% (200 mil toneladas) da produção mundial de amêndoas de cacau (INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION, 2013b). No Brasil, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, a região nordeste é a maior produtora de cacau. Na sequência, encontram-se as regiões norte e sudeste. O estado de Rondônia ocupa o terceiro lugar nacional entre os produtores de cacau (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2013).

O cacau é uma cultura que passa pelo processamento primário antes da comercialização das amêndoas com duas etapas principais: fermentação e secagem (WOOD; LASS, 1985), essenciais para a obtenção de um produto final de qualidade. Após a colheita dos frutos maduros, os grãos são removidos e fermentados durante 5-7 dias (SCHWAN; WHEALS, 2004) e secos até um nível seguro de umidade de 8% (GUEHI; DABONNE, 2010; HII et al., 2009; MAGAN; ALDRED, 2006). Após a secagem, as amêndoas são ensacadas e transferidas para locais de armazenamento para posterior comercialização.

Estas etapas do processamento primário não são controladas e, portanto, a contaminação fúngica é possível em muitos pontos da cadeia produtiva do cacau (MAGAN; ALDRED, 2006; TAFURI; FERRACANE; RITIENI, 2004). Atualmente pesquisas relatam a presença de fungos durante o processo de fermentação, secagem e armazenamento das amêndoas de cacau (ARDHANA;

FLEET, 2003; COPETTI et al., 2011b; MOUNJOUENPOU et al., 2008; SÁNCHEZ-HERVÁS et al., 2008). As espécies fúngicas mais comumente encontradas em amêndoas de cacau pertencem ao gênero *Aspergillus* sp. (AMÉZQUETA et al., 2008; COPETTI et al., 2011b; MOUNJOUENPOU et al., 2008; SÁNCHEZ-HERVÁS et al., 2008).

Os níveis de contaminação das amêndoas de cacau têm sido relacionados com a variação sazonal, práticas de cultivo, condições fitossanitárias (danos nos frutos de cacau por pragas, feridos fisicamente, podres e mumificados), condições da colheita e fermentação (MOUNJOUENPOU et al., 2008).

Práticas de colheita pobres, armazenamento inadequado e condições impróprias durante o transporte, comercialização e processamento também podem contribuir para o crescimento de fungos e aumentar o risco de produção de micotoxinas (WAGACHA; MUTHOMI, 2008). Os fungos podem estar presentes em todas as fases da cadeia de produção: colheita, fermentação, secagem e armazenamento (RILEY; NORRED, 1999). Copetti et al. (2011b) consideraram a secagem a etapa mais crítica do processamento primário para o desenvolvimento de fungos. Condições de armazenamento inapropriadas, como alta umidade relativa, podem favorecer a germinação de esporos, o crescimento fúngico e a produção de micotoxinas (COPETTI et al., 2011b).

As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos de origem fúngica que contaminam *commodities* agrícolas antes da colheita ou em condições de pós-colheita (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 1995). Dentre as micotoxinas mais importantes, pesquisadas em diversos produtos agrícolas, destacam-se a ocratoxina A (OTA) e as aflatoxinas (AFs).

A ocratoxina A (OTA) é considerada uma micotoxina nefrotóxica e que exerce efeitos imunossupressores, neurotóxicos e teratogênicos quando em doses elevadas (OPINION..., 2006; FOOD AND AGRICULTURE

ORGANIZATION, 1995; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2001; O'BRIEN; DIETRICH, 2005). A Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (IARC) classifica a ocratoxina A com um possível carcinógeno humano do Grupo 2B (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1993). Estudos relatam que as espécies pertencentes à Seção *Nigri*, *A. carbonarius* e *A. niger* têm sido as principais fontes de contaminação por OTA em amêndoas de cacau (COPETTI et al., 2011b; MOUNJOUENPOU et al., 2008).

As aflatoxinas são metabólitos altamente tóxicos, com comprovadas propriedades mutagênicas e carcinogênicas (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1993) que podem ser produzidos por espécies pertencentes à Seção *Flavi*, principalmente *A. flavus* e *A. parasiticus* (FRISVAD; SKOUBOE; SAMSON, 2005). Publicações recentes relatam a ocorrência de fungos da Seção *Flavi* em amêndoas de cacau (COPETTI et al., 2011a; COPETTI et al., 2011b; SÁNCHEZ-HERVÁS et al., 2008).

Em fevereiro de 2011, o Brasil aprovou o Regulamento Técnico sobre Limites Máximos Tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos, entre eles amêndoas de cacau (10 µg/kg) e derivados (5 µg/kg) (BRASIL, 2011). Para que a legislação seja atendida medidas preventivas para controle de micotoxinas em alimentos devem ser implantadas e inicia-se com o conhecimento das espécies toxigênicas nas regiões de cultivo, bem como identificar as áreas geográficas com maior probabilidade de incidência de fungos e risco de micotoxinas.

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi investigar a presença de espécies do gênero *Aspergillus* em amêndoas de cacau cultivadas em municípios do estado de Rondônia; verificar o potencial toxigênico destas espécies; estudar o efeito da origem geográfica sobre a incidência de espécies de fungos toxigênicos e não toxigênicos; e analisar a incidência das espécies e sua relação com as práticas de fermentação, secagem e com o armazenamento.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Área de estudo

O estado de Rondônia encontra-se localizado na Amazônia Ocidental, no Norte do Brasil, e foi utilizado nesse estudo por ser o terceiro maior produtor nacional de amêndoas de cacau, apresentando condições adequadas para a produção desta *commodity* brasileira. Rondônia fica localizado a 11°30'20" de latitude Sul e a 63°34'20" de longitude Oeste. A temperatura média anual é de 24 – 26°C, a precipitação, 1.400-2.600 mm/ano e o tipo de clima é quente e úmido com 1 a 3 meses secos.

### 2.2 Amostras de amêndoas de cacau

Quarenta amostras de amêndoas de cacau foram coletadas em propriedades cacaeiras localizadas em Rondônia. Estas amostras foram coletas no ano de 2012 em 12 municípios: Ariquemes, Buritis, Cacoal, Cacaulândia, Colorado do Oeste, Governador Jorge Teixeira, Jaru, Machadinho d'Oeste, Ouro Preto do Oeste, São Felipe d'Oeste, Urupá e Vilhena (Figura 1). Todas as amostras deste estudo estavam armazenadas nas propriedades de origem.

A definição dos pontos de amostragem foi realizada em conjunto com a Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), do estado de Rondônia, levando-se em consideração a produtividade cacaeira por município e a localização ao longo do estado. A média da produção de amêndoas de cacau dos municípios selecionados para coleta representou, entre 2007 e 2010, 76,20% da produção do estado de Rondônia (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2013). O número de amostras coletadas em cada município variou em função da disponibilidade de amêndoas.

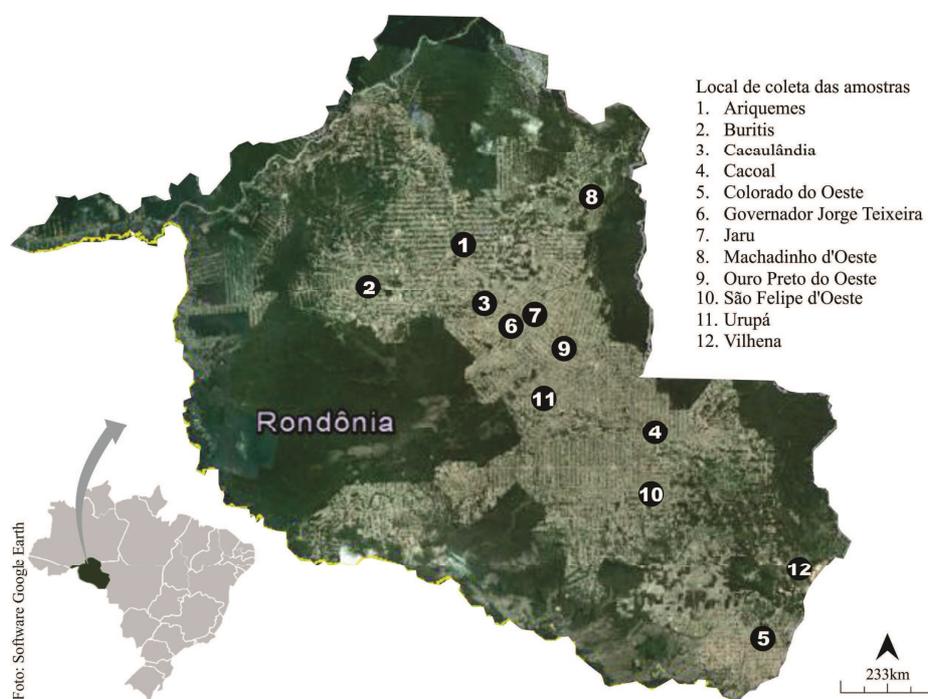


Figura 1 Localização dos municípios onde foram coletadas as amostras de amêndoas de cacau no estado de Rondônia

Os dados sobre as condições meteorológicas (temperatura e precipitação pluviométrica) foram fornecidos pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) e obtidos a partir de estações climáticas próximas aos locais de coleta, uma vez que nem todos os municípios do estado de Rondônia possuem estações meteorológicas implantadas. As coordenadas geográficas foram obtidas através do *software* de distribuição livre Google Earth.

Na Tabela 1 é possível observar as condições meteorológicas e coordenadas geográficas de cada município e o respectivo número de amostras coletadas.

o e dados meteorológicos das coletas de amêndoas de cacau realizadas em municípios de Rondônia

Localização geográfica		Temperatura média anual (°C)	Precipitação total média anual (mm)	Nº de amostras coletadas
Latitude S	Longitude W			
09°54'48"	63°02'27"	25,71	2280,2	5
10°12'42"	63°49'43"	25,71	2280,2	3
10°20'21"	62°53'43"	25,71	2280,2	3
11°26'19"	61°26'50"	26,13	1759,6	3
13°07'00"	60°32'30"	24,33	2334,8	4
10°31'30"	62°38'38"	25,71	2280,2	2
10°26'20"	62°27'59"	25,71	2280,2	3
09°26'38"	61°58'53"	25,71	2280,2	4
10°44'53"	62°12'57"	25,71	2280,2	5
11°54'09"	61°30'08"	26,13	1759,6	3
11°08'26"	62°21'39"	25,71	2280,2	3
12°44'26"	60°08'45"	24,33	2334,8	1

eteorológica Ariquemes; <sup>2</sup>Dados da estação meteorológica Cacoal; <sup>3</sup>Dados da estação meteorológica Vilhena

Dados sobre as propriedades de cultivo de cacau e o processamento primário das amostras foram obtidos através da aplicação de um questionário (APÊNDICE). Aproximadamente 1.000g de cada amostra de amêndoas de cacau foram coletados, aleatoriamente, dos sacos armazenados nas propriedades.

Estas amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Micologia e Micotoxinas de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras-MG, onde foram realizadas a identificação dos fungos e detecção do seu potencial toxigênico.

### **2.3 Micobiota das amêndoas de cacau**

Para o isolamento de fungos das amêndoas de cacau foi utilizada a técnica do plaqueamento direto em meio de cultura Dichloran Rose Bengal Chloranphenicol (DRBC) (Digestão Péptica de tecido animal: 5,0 g/L, Dextrose: 10,0 g/L, Fosfato Monopotássico: 1,0 g/L, Sulfato de Magnésio: 0,50 g/L, Rosa Bengala: 0,025 g/L, Dicloran: 0,002 g/L, Agar: 15,0 g/L e Água Destilada 500mL) acrescido de 0,1 g/L de Cloranfenicol conforme descrito por Samson et al. (2000). Cem amêndoas coletadas ao acaso foram submetidas à desinfecção superficial com álcool a 70% por um minuto e hipoclorito de sódio a 1% por 30 segundos, seguido de lavagem com água destilada estéril. As amêndoas foram dispostas em 10 placas de Petri contendo o meio DRBC. Estas foram incubadas a 25°C por 5-7 dias.

Em seguida, as amêndoas foram inspecionadas visualmente, com a ajuda de um estereomicroscópio quanto ao crescimento das colônias. Os resultados foram expressos em porcentagem de amêndoas contaminadas de acordo com a metodologia de Pitt e Hocking (1997).

Para a purificação das culturas representativas do gênero *Aspergillus*, foram realizadas repicagens sucessivas em meio Malt Agar (MA) (Extrato de Malte: 20,0 g, Ágar: 20,0 g e Água Destilada: 1000 mL).

#### **2.4 Identificação de espécies do gênero *Aspergillus***

A partir das culturas puras, os isolados do gênero *Aspergillus* sp. foram incubados em meio Czapek Yest Agar (CYA) ( $K_2HPO_4$ : 1,0 g; Concentrado Czapek: 10,0 mL; Extrato de Levedura: 5,0 g, Ágar: 15,0 g, Água Destilada: 1.000 mL; Concentrado Czapek  $NaNO_3$ : 30,0 g, KCl: 5,0 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ : 5,0 g,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ : 0,1 g,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ : 0,1 g,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ : 0,05 g, Água Destilada: 100 mL) a 25°C e 37°C e Malt Extract Agar (MEA) (Extrato de Malte: 20,0 g, Peptona: 1,0 g, Glucose: 30,0 g, Ágar: 20,0 g, Água Destilada: 1.000 mL) a 25°C durante 7 dias.

A identificação das espécies do gênero *Aspergillus* foi realizada de acordo com Klich e Pitt (1988); Klich (2002); Samson et al. (2002), Samson et al. (2004), complementado com outras fontes, quando necessário.

#### **2.5 Avaliação do potencial ocratoxigênico das espécies da Seção *Nigri* pelo método Plug Agar**

As espécies da Seção *Nigri* foram cultivadas em meio CYA a 25°C durante 7 dias. A extração foi pelo método Plug Agar (FILTENBORG; FRISVALD; SVENDENSEN, 1983).

Foi utilizado extratos fúngicos de aproximadamente 0,5 cm, solução padrão de ocratoxina A (SIGMA-ALDRICH), placas de Cromatografia em Camada Delgada (MERK-SÍLICA GEL 60, 20x20) e como Fase móvel TEF-Tolueno Acetato de Etila e Ácido Fórmico 90% (60:30:10 v/v/v). Após a

eluição, as placas foram secas em capela pelo fluxo laminar. O resultado positivo/negativo foi obtido através da comparação qualitativa do *spot* de fluorescência e fator de retenção dos metabólitos secundários produzidos por cada isolado com o padrão de ocratoxina A desenvolvidos paralelamente nas placas cromatográficas, observadas sob a incidência de luz ultravioleta com  $\lambda$  365 nm em Cromatovisor CAMAG (UF-BETRACHTER).

## **2.6 Avaliação do potencial ocratoxigênico e quantificação da ocratoxina A produzida por *Aspergillus carbonarius* pelo método de CLAE**

Foi utilizado o método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), com detecção por fluorescência, para o teste de potencial ocratoxigênico e a quantificação de OTA produzida por *A. carbonarius*.

### **2.6.1 Preparo das amostras**

Trinta e quatro isolados de *A. carbonarius* foram inoculados em placa de Petri contendo o meio Czapek Yeast Agar (CYA). As placas foram incubadas a 25°C por 10 dias. O experimento foi realizado em duplicata.

### **2.6.2 Extração da OTA das amostras**

A extração da OTA foi realizada no 10º dia do período de incubação dos inóculos, de acordo com a metodologia descrita por Bragulat, Abarca e Cabañes (2001), com algumas modificações.

Três pedaços do micélio do fungo com ágar foram removidos da área interna, meio e externa de cada uma das placas pelo método Plug Agar. Para a remoção dos plugs, foram feitos cortes circulares de aproximadamente 10 mm

de diâmetro, com auxílio de ponteiros estéreis de 100 µL. Esses pedaços foram pesados e colocados em tubos de ensaio envolvidos por papel-alumínio, para evitar a degradação da OTA. Foi adicionado 1 mL de metanol nos tubos de ensaio, os quais foram, então, homogêneos por 5 segundos e incubados a 25°C por 60 minutos. Os extratos foram filtrados em unidades filtrantes de PTFE (0,22 µm) e, então, analisados por CLAE, de forma a quantificar a OTA presente.

### **2.6.3 Condições cromatográficas utilizadas na quantificação da OTA por CLAE**

As amostras foram analisadas por CLAE de forma a quantificar a OTA presente. Utilizou-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência HPLC Shimadzu, equipado com duas bombas de alta pressão modelo SPD-M20A, degaseificador modelo DGU 20A3, interface modelo CBM-20A, injetor automático modelo SIL-10AF e detector de fluorescência RF-10 AXL. A coluna usada foi a Agilent-Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 × 250mm, 5µm) conectada a uma pré-coluna Agilent-Zorbax Eclipse XDB-C18 4-Pack (4,6 × 12,5mm, 5µm).

Foram seguidas as condições cromatográficas de comprimentos de onda: excitação de 332 nm e emissão de 476 nm. O fluxo utilizado em toda a análise foi de 0,8 mL min<sup>-1</sup> e o volume injetado das amostras e do padrão foi de 20 µL. A eluição foi realizada em sistema isocrático de 35:35:29:1 (Metanol:Acetonitrila:Água:Ácido Acético). O tempo de retenção médio obtido para OTA foi de 11 ± 0,1 min.

#### 2.6.4 Quantificação da OTA por CLAE

A quantificação da OTA nas amostras foi realizada pela construção de uma curva analítica obtida por regressão linear, correlacionando a área do pico versus a concentração da respectiva solução-padrão. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados por meio dos parâmetros obtidos para a curva analítica construída, sendo calculados pelas respectivas relações matemáticas:  $LD=3DP/m$  e  $LQ=10DP/m$  (em que, DP = estimativa do desvio-padrão da linha de regressão e m = coeficiente angular da linha de calibração) (HARRIS, 2008).

#### 2.7 Avaliação do potencial aflatoxigênico das espécies da Seção *Flavi* pelo método Plug Agar

As espécies da Seção *Flavi* foram cultivadas em meio Yeast Extract Sucrose Agar (YES) (Extrato de levedura 20,0 g; Sacarose 150 g; Ágar 20,0 g; Solução metálica 1mL; Água destilada 1.000 mL) a 25°C durante 7 dias. A extração foi pelo método Plug Agar (FILTENBORG; FRISVALD; SVENDENSEN, 1983).

Foi utilizado extratos fúngicos de aproximadamente 0,5 cm, soluções padrão de aflatoxinas (SIGMA-ALDRICH), Placas de Cromatografia em Camada Delgada (MERK-SÍLICA GEL 60, 20X20) e como Fase móvel TEF - Tolueno Acetato de Etila e Ácido Fórmico 90% (60:30:10 v/v/v). Após a eluição, as placas foram secas em capela pelo fluxo laminar. O resultado positivo/negativo foi obtido através da comparação qualitativa do *spot* de fluorescência e fator de retenção dos metabólitos secundários produzidos por cada isolado com os padrões de aflatoxinas desenvolvidos paralelamente nas

placas cromatográficas, observadas sob a incidência de luz ultravioleta com  $\lambda$  365nm em Cromatovisor CAMAG (UF-BETRACHTER).

## **2.8. Análises estatísticas**

Para determinar a probabilidade de ocorrência de espécies do gênero *Aspergillus* totais e toxigênicos no estado de Rondônia, foi utilizada a técnica de Regressão Logística em função das seguintes variáveis independentes: coordenadas geográficas (latitude e longitude) e temperatura. A variável resposta foi caracterizada pela presença e ausência de fungos totais e toxigênicos do gênero *Aspergillus*. Com este propósito, os modelos de Regressão Logística foram ajustados utilizando o *software* RCore Team (2013). Em função das probabilidades, ajustadas pelos modelos, foram construídos gráficos de superfície de resposta e de contornos de modo a facilitar a identificação das regiões mais promissoras para a incidência de espécies de fungos totais e toxigênicos do gênero *Aspergillus*.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Contaminação fúngica das amêndoas de cacau

Das 40 amostras analisadas 1 (2,5%) não apresentou contaminação por espécies fúngicas. A porcentagem de amêndoas contaminadas por fungos variou de 2 a 100%, sendo que 9 amostras apresentaram 100% de contaminação. A Tabela 2 apresenta o percentual de contaminação por amostra e município de coleta.

A qualidade microbiológica das amêndoas de cacau tem grande importância pois elas são a matéria-prima destinada à fabricação de chocolate e produtos derivados de cacau consumidos mundialmente. A presença de fungos em amêndoas de cacau não é desejável, pois durante a fermentação podem causar hidrólise da celulose, produção de ácidos, sabores desagradáveis e alterar o sabor das amêndoas de cacau (SCHWAN; WHEALS, 2004). Além disso, algumas espécies de fungos podem produzir micotoxinas em amêndoas de cacau durante a secagem e armazenamento (COPETTI et al., 2010; COPETTI et al., 2011a; COPETTI et al., 2011b; MOUNJOUENPOU et al., 2008; SÁNCHEZ-HERVÁS et al., 2008). A Figura 2 apresenta a colonização fúngica pelo gênero *Aspergillus* em amêndoas de cacau em meio DRBC a 25°C no 7º dia.

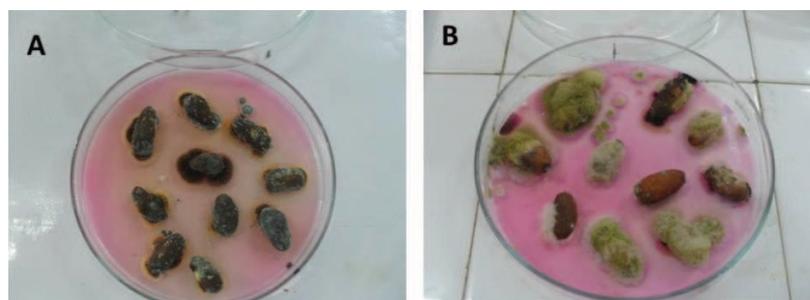


Figura 2 Colonização fúngica por *Aspergillus* em amêndoas de cacau em meio DRBC/7 dias. A) Seção *Nigri*, B) Seções *Nigri* e *Flavi*.

de amêndoas contaminadas por amostra e município de coleta

<b>Município de coleta</b>	<b>Amêndoas colonizadas (%)</b>	<b>Amostras</b>	<b>Município de coleta</b>	<b>Amêndoas colonizadas (%)</b>
Ariquemes	100	21	Jaru	100
Ariquemes	25	22	Jaru	91
Ariquemes	58	23	Jaru	13
Ariquemes	70	24	Machadinho d'Oeste	100
Ariquemes	50	25	Machadinho d'Oeste	3
Buritis	96	26	Machadinho d'Oeste	27
Buritis	14	27	Machadinho d'Oeste	13
Buritis	0	28	Machadinho d'Oeste	25
Cacoal	96	29	Ouro Preto do Oeste	100
Cacoal	5	30	Ouro Preto do Oeste	100
Cacoal	2	31	Ouro Preto do Oeste	100
Cacaulândia	90	32	Ouro Preto do Oeste	43
Cacaulândia	100	33	Ouro Preto do Oeste	100
Cacaulândia	99	34	São Felipe d'Oeste	23
Colorado do Oeste	100	35	São Felipe d'Oeste	98
Colorado do Oeste	43	36	São Felipe d'Oeste	75
Colorado do Oeste	24	37	Urupá	3
Colorado do Oeste	95	38	Urupá	55
Governador Jorge Teixeira	29	39	Urupá	51
Governador Jorge Teixeira	76	40	Vilhena	58

### 3.2 Identificação de espécies do gênero *Aspergillus*

Os fungos isolados das amostras foram identificados como pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Eurotium*, *Rhizopus* e *Paecilomyces* (Tabela3). Em estudos anteriores, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Fusarium* e especialmente *Aspergillus* foram os fungos mais frequentemente isolados a partir de amêndoas de cacau (COPETTI et al., 2011b; MOUNJOUENPOU et al., 2008; OYETUNJI, 2006; SÁNCHEZ-HERVÁS et al., 2008). Esses fungos representam parte importante e significativa da microbiota das amêndoas de cacau da região avaliada, porém não são desejáveis, podendo causar hidrólise da polpa, rompimento da testa (casca) das sementes e sabor desagradável (SCHWAN; WHEALS, 2004) e produção de micotoxinas (GILMOUR; LINDBLUM, 2008).

Diversos estudos avaliaram a ocorrência de fungos em cacau e relataram a presença de espécies do gênero *Aspergillus* sp. (AMÉZQUETA et al., 2008; COPETTI et al., 2011b; MOUNJOUENPOU et al., 2008; SÁNCHEZ-HERVÁS et al., 2008). Copetti et al. (2011b) e Mounjouenpou et al. (2008) relataram a ocorrência de espécies do gênero *Aspergillus* em todas as fases de processamento primário das amêndoas de cacau no Brasil e Camarões, respectivamente, destacando as espécies produtoras de ocratoxina A da Seção *Nigri* (*A. niger* e *A. carbonarius*) cujo número aumentou após a fermentação.

Os resultados obtidos neste estudo apresentam, informações sobre a presença de fungos toxigênicos e não toxigênicos em amêndoas de cacau do estado de Rondônia e a capacidade desses fungos de produzirem micotoxinas.

Os fungos do gênero *Aspergillus* foram identificados até espécie devido a sua alta incidência em amêndoas de cacau e risco para a produção de ocratoxina A em regiões tropicais. As espécies identificadas pertencem à Seção *Nigri* e à Seção *Flavi* (Tabela 4).

fungos filamentosos contados nas amêndoas de cacau por amostra e município de coleta

Ariquemes		Buritis			Cacoal			Cacaulândia			Colorado do Oeste				G. Jorge Teixeira <sup>1</sup>			
2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
-	-	1	-	15	2	-	8	2	2	1	-	-	4	7	2	30	-	-
-	-	-	-	2	3	-	-	-	-	9	-	-	4	1	2	5	2	1
44	56	70	50	2	3	5	-	-	-	5	100	99	12	1	20	16	8	71
-	3	-	-	2	1	-	-	2	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-
-	9	1	-	20	3	23	96	1	-	12	3	16	127	12	-	23	3	-

Jarú		Machadinho d'Oeste				Ouro Preto do Oeste				São Felipe d'Oeste			Urupá			Vilhena		
22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
-	-	39	-	1	-	-	-	3	3	4	4	7	-	28	-	7	-	2
-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	2	2	3	-	2	-	-	10	8
15	3	9	2	13	2	2	6	20	59	7	9	4	98	6	2	7	6	18
-	-	3	1	2	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	1	-	-
3	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	2	-	-
76	10	-	-	1	11	13	100	80	45	27	27	-	-	15	-	15	12	-

governador Jorge Teixeira

Tabela 4 Espécies do gênero *Aspergillus* isoladas de amêndoas de cacau processadas e armazenadas em propriedades cacauceiras de Rondônia

Gênero/Espécie	Nº gênero/espécies	(%)
<b><i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigri</i></b>	<b>166</b>	<b>89,73</b>
<i>A. acuelatus</i>	12	7,23
<i>A. carbonarius</i>	34	20,48
<i>A. foetidus</i>	17	10,24
<i>A. japonicus</i>	5	3,02
<i>A. niger</i>	64	38,55
<i>A. niger</i> Agregado	20	12,05
<i>A. tubingensis</i>	14	8,43
<b><i>Aspergillus</i> Seção <i>Flavi</i></b>	<b>19</b>	<b>10,27</b>
<i>A. flavus</i>	18	94,74
<i>A. oryzae</i>	1	5,26

Resultado semelhante foi encontrado por Sánchez-Hervás et al. (2008) em amêndoas de cacau de Serra Leoa, Guiné Equatorial e Equador, porém as quantidades de fungos pertencentes a cada Seção diferem do nosso estudo. É conhecido que algumas espécies destas duas Seções de *Aspergillus* são consideradas os mais importantes fungos toxigênicos (MOSS, 1996; SAMSON et al., 2004).

Espécies da Seção *Nigri* foram mais frequentemente encontradas nas amêndoas de cacau analisadas neste estudo. A presença de espécies pertencentes à Seção *Nigri* foi expressiva (89,73%) nas amêndoas de cacau do estado de Rondônia, bem como já foi apresentado em outros estudos com amêndoas de cacau (COPETTI et al., 2011b; MOUNJOUENPOU et al., 2008).

A espécie *A. niger* foi predominante entre as espécies da Seção *Nigri* tanto neste estudo como em outros realizados com cacau (COPETTI et al., 2011b; MOUNJOUENPOU et al., 2008). Mounjouenpou et al. (2008) isolaram, em um estudo com amêndoas de cacau de Camarões, as espécies *A. carbonarius*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. tamarii* e *A. versicolor*. Sánchez-Hervás et

al. (2008) obtiveram como espécie predominante, na Seção *Nigri*, *A. niger* Agregado, porém relataram também a presença de *A. carbonarius* em menor quantidade e não encontraram nenhuma espécie unisseriada (*A. aculeatus* e *A. japonicus*).

Copetti et al. (2011b) realizaram um estudo semelhante no Brasil e também isolaram algumas espécies mencionadas no estudo acima, como *A. versicolor* e *A. fumigatus*, bem como *A. clavatus*, *A. niger*, *A. ochraceus* e *A. parasiticus*. Algumas espécies foram semelhantes às encontradas neste estudo como *A. carbonarius*, *A. niger* e *A. flavus*, espécies conhecidas por produzirem micotoxinas, confirmando a existência de uma microbiota toxigênica associada à cultura do cacau, bem como o risco da produção de ocratoxina A e aflatoxinas em amêndoas de cacau.

*A. flavus* foi a espécie que prevaleceu entre as espécies da Seção *Flavi* isoladas a partir de amêndoas de cacau dos municípios do estado de Rondônia. No estudo realizado em amêndoas de cacau de Serra Leoa, Guiné Equatorial e Equador, por Sánchez-Hervás et al. (2008), esta foi a espécie predominante da Seção *Flavi*. Copetti et al. (2011b) relataram um aumento da ocorrência de espécies da Seção *Flavi* no decurso da secagem das amêndoas de cacau. Outra principal espécie pertencente à Seção *Flavi*, responsável pela produção de aflatoxinas, *A. parasiticus* (HORN, 2007) não foi isolada neste estudo.

Nenhuma espécie pertencente à Seção *Circumdati*, tradicionalmente considerados ocratoxigênicos, como *A. ochraceus*, (PITT; HOCKING, 1997) foi identificada neste estudo. Sánchez-Hervás et al. (2008) relataram baixa incidência de espécies pertencentes à Seção *Circumdati* com 1, das 2 espécies de *A. ochraceus* isoladas, produtora de OTA. Os autores consideraram que provavelmente *A. ochraceus* é uma fonte de OTA, relativamente sem importância em produtos de cacau.

### 3.3 Potencial ocratoxigênico de espécies da Seção *Nigri*

A Tabela 5 mostra o potencial ocratoxigênico das espécies da Seção *Nigri* isoladas a partir de amêndoas de cacau. A avaliação do potencial ocratoxigênico das espécies *A. aculeatus*, *A. foetidus*, *A. japonicus*, *A. niger*, *A. niger* Agregado e *A. tubingensis* foi através do método Plug Agar e a avaliação do potencial ocratoxigênico e a quantificação da produção de OTA por *A. carbonarius* foi realizada através de CLAE.

Tabela 5 Potencial ocratoxigênico das espécies da Seção *Nigri* isoladas de amêndoas de cacau de Rondônia pelo método Plug Agar

Espécies	Total de espécies	Nº de espécies produtoras de ocratoxina A (%)
<i>A. aculeatus</i>	12	0
<i>A. foetidus</i>	17	0
<i>A. japonicus</i>	5	0
<i>A. niger</i>	64	2 (3,13%)
<i>A. niger</i> Agregado	20	0
<i>A. tubingensis</i>	14	0

Um total de 132 espécies da Seção *Nigri* foi testado quanto à capacidade de produzir ocratoxina A pelo método Plug Agar através de Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Dois (1,52% dos 132 testados) isolados apresentaram capacidade para produzir OTA. Nenhum isolado identificado como *A. niger* Agregado, *A. aculeatus*, *A. foetidus*, *A. japonicus* e *A. tubingensis* foi positivo quanto à capacidade de produzir OTA enquanto que 2 *A. niger* foram positivos.

Dois (3,13%) isolados da Seção *Nigri* identificados como *A. niger* foram capazes de produzir OTA. Este dado diferiu do apresentado por Mounjouenpou et al. (2008) em que 70% das espécies *A. niger* foram produtores de OTA em amêndoas de cacau, porém o mesmo percentual (3%) das espécies *A. niger*

foram relatados como produtores de OTA isolados de café (TANIWAKI; PITT, 2003) e de uvas (LASRAM et al., 2007). A elevada percentagem encontrada por Mounjouenpou et al. (2008) não foi confirmada por outros estudos realizados com esta espécie em todo o mundo (AMÉZQUETA et al., 2008; BELLÍ et al., 2004a; IAMANAKA et al., 2005; LEONG; HOCKING; SCOTT, 2007; MAGNOLI et al., 2007; TANIWAKI et al., 2003).

Sánchez-Hervás et al. (2008) não identificaram nenhum *A. niger* produtor de OTA em cacau, porém 44,7% dos fungos identificados como *A. niger* Agregado isolados foram produtores de OTA em seu estudo. Já no estudo realizado com amêndoas de cacau no Brasil por Copetti et al. (2010), *A. niger* Agregado foi a espécie, com potencial para produzir OTA, mais comum isolada, no entanto, apenas 5,2% foram capazes de produzir a toxina.

As espécies *A. aculeatus*, *A. foetidus*, *A. japonicus* e *A. tubingensis* não são relatadas como toxigênicas.

### **3.4 Produção de ocratoxina A por *Aspergillus carbonarius* isolados de amêndoas de cacau**

A produção de OTA por *A. carbonarius* em meio CYA no 10º dia foi quantificada por CLAE (Tabela 6).

A presença de *A. carbonarius* sugere a possível produção de OTA por essa espécie em cacau e outras matérias primas tropicais e subtropicais, como indicado em estudos anteriores (BELLÍ et al., 2004a; MAGNOLI et al., 2003; MARTÍNEZ-CULEBRAS; RAMÓN, 2007; TANIWAKI et al., 2003).

Os *A. carbonarius* isolados de amêndoas de cacau produziram quantidades de OTA variando de 0,08 a 44,09 µg/g enquanto que Sánchez-Hervás et al. (2008) relataram uma menor produção de OTA por *A. carbonarius* isolados de cacau, variando de 0,2 a 8 µg/g. Em outros estudos com outros

substratos, como uvas e café, as quantidades de OTA encontradas variaram de 1 a 10 µg/g (BELLÍ et al., 2004a; LASRAM et al., 2007; MARTÍNEZ-CULEBRAS; RAMÓN, 2007). Chiotta et al. (2009) relataram produção de OTA por *A. carbonarius* isolados de uvas na Argentina variando de 1,2 a 1.285 ng/g. Esta diferença de produção pode estar relacionada à interferência das condições de cultivo e da origem do substrato na produção quantitativa de OTA pelos isolados.

Tabela 6 Produção de ocratoxina A (OTA) por *A. carbonarius*<sup>1</sup>

Isolado	Média de OTA (µg/g)	Isolado	Média de OTA (µg/g)
<i>A. carbonarius</i> 1	44,09	<i>A. carbonarius</i> 18	0,18
<i>A. carbonarius</i> 2	0,25	<i>A. carbonarius</i> 19	30,21
<i>A. carbonarius</i> 3	0,09	<i>A. carbonarius</i> 20	0,18
<i>A. carbonarius</i> 4	0,11	<i>A. carbonarius</i> 21	20,98
<i>A. carbonarius</i> 5	ND	<i>A. carbonarius</i> 22	0,19
<i>A. carbonarius</i> 6	0,13	<i>A. carbonarius</i> 23	0,20
<i>A. carbonarius</i> 7	ND	<i>A. carbonarius</i> 24	0,12
<i>A. carbonarius</i> 8	0,12	<i>A. carbonarius</i> 25	ND
<i>A. carbonarius</i> 9	ND	<i>A. carbonarius</i> 26	0,29
<i>A. carbonarius</i> 10	0,08	<i>A. carbonarius</i> 27	0,17
<i>A. carbonarius</i> 11	4,82	<i>A. carbonarius</i> 28	0,22
<i>A. carbonarius</i> 12	ND	<i>A. carbonarius</i> 29	0,37
<i>A. carbonarius</i> 13	0,39	<i>A. carbonarius</i> 30	0,29
<i>A. carbonarius</i> 14	ND	<i>A. carbonarius</i> 31	14,07
<i>A. carbonarius</i> 15	14,10	<i>A. carbonarius</i> 32	17,32
<i>A. carbonarius</i> 16	30,68	<i>A. carbonarius</i> 33	11,82
<i>A. carbonarius</i> 17	0,33	<i>A. carbonarius</i> 34	ND

<sup>1</sup>Análises feitas por CLAE, em meio CYA/10dias; <sup>ND</sup> Não Detectado

Apesar de que nem todos os isolados de uma espécie considerada toxigênica serem produtores de toxina, com as espécies de *A. carbonarius* normalmente a produção é alta atingindo 100% na maioria dos estudos (BAU et

al., 2005a; COPETTI et al., 2010; FRISVAD et al., 2011; MOUNJOUENPOU et al., 2008; PALUMBO et al., 2011; SÁNCHEZ-HERVÁS et al., 2008; SERRA; BRAGA; VENÂNCIO, 2005).

Foi realizada a quantificação de OTA produzida por *A. carbonarius* em meio CYA/10 dias, através de Cromatografia de Alta Eficiência (CLAE). Dos 34 *A. carbonarius* testados 27 (79,41%) apresentaram produção de OTA. Resultado similar ao relatado por Taniwaki et al. (2003) em um estudo, utilizando o mesmo método, realizado com *A. carbonarius* isolados de amostras de café dos quais 77% dos *A. carbonarius* produziram OTA. Já esse resultado foi mais baixo do que o encontrado por outros autores com espécies isoladas de outros substratos como 90% de uvas da Argentina (CHIOTTA et al., 2009) e 94% de uvas da Tunísia (LASRAM et al., 2007).

Poucos estudos foram publicados sobre *A. carbonarius* não-ocratoxigênicos. Bau et al. (2005b) relataram 4 isolados não-ocratoxigênicos de 123 isolados morfológicamente identificados como *A. carbonarius* envolvidos na contaminação de ocratoxina A em uvas, mas esses isolados posteriormente foram corretamente identificados e descritos como uma nova espécie, *A. ibericus* (SERRA et al., 2006a). Esteban et al. (2006), Esteban et al.(2004) incluíram em vários estudos sobre o efeito da temperatura e a atividade de água na produção de OTA, 2 isolados relatados anteriormente como *A. carbonarius* não-ocratoxigênicos. Joosten et al. (2001) também relataram que um *A. carbonarius* isolado de maçãs na Suíça, não foi capaz de produzir OTA usando grãos de café como substrato, porém este isolado também foi posteriormente identificado como *A. ibericus* (SERRA et al., 2006a).

Cabañes, Bragulat e Castellá(2013)identificaram 3 isolados selvagens de *A. carbonarius* não-ocratoxigênicos provenientes de uva de diferentes vinhedos do Sul da Espanha, através de sequenciamento genético. Os três isolados não produziram OTA em nenhum meio de cultura em qualquer das temperaturas e

tempos de incubação testados, comprovando a existência de espécies de *A. carbonarius* não-ocratoxigênicos.

### 3.5 Potencial aflatoxigênico das espécies da Seção *Flavi* isoladas de amêndoas de cacau

A Tabela 7 mostra o potencial aflatoxigênico das espécies da Seção *Flavi* isoladas a partir de amêndoas de cacau. A avaliação do potencial aflatoxigênico das espécies *A. flavus* e *A. oryzae* foi através do método Plug Agar.

Tabela 7 Potencial aflatoxigênico das espécies da Seção *Flavi* isoladas de amêndoas de cacau de Rondônia pelo método Plug Agar

Espécie	Total de espécies	Nº de espécies produtoras de Aflatoxinas B <sub>1</sub> e B <sub>2</sub> (%)
<i>A. flavus</i>	18	15 (83,33)
<i>A. oryzae</i>	1	0

A ocorrência de aflatoxinas já foi relatada contaminando *commodities* agrícolas como cacau, café, amendoim e milho (BATISTA et al., 2009; COPETTI et al., 2011a,b; FERNÁNDEZ-PINTO et al., 2001; GIORNI et al., 2007). Um total de 18 *A. flavus*, isolados de amêndoas de cacau do estado de Rondônia, foi testado quanto à sua capacidade de produzir aflatoxinas pelo método Plug Agar através de CCD. Quinze (83,33% dos 18 testados) apresentaram capacidade de produzir aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>.

Estes resultados são compatíveis aos encontrados em outros estudos com amêndoas de cacau (60%) (COPETTI et al., 2011b; SÁNCHEZ-HERVÁS et al., 2008). Copetti et al. (2011a) relataram fraca correlação entre presença de fungos potencialmente produtores de aflatoxinas e aflatoxinas em amêndoas de cacau e sugeriram a existência de fatores limitantes para a acumulação de aflatoxinas em

grãos. Portanto a contaminação de amêndoas de cacau por aflatoxinas não parece ser preocupante em amêndoas de cacau do Brasil.

O isolado de *A. oryzae* testado não foi produtor de aflatoxinas e não relatado como toxigênico (MAGAN; OLSEN, 2004).

### **3.6 Probabilidade de ocorrência de espécies de fungos totais e fungos toxigênicos pertencentes ao gênero *Aspergillus* em função das coordenadas geográficas e temperatura**

Este estudo analisou dados de coordenadas geográficas e dados de temperatura em Rondônia para relacionar com os níveis de contaminação por espécies de fungos totais e fungos toxigênicos pertencentes ao gênero *Aspergillus* em amêndoas de cacau.

A indicação e seleção do modelo logístico foram realizadas seguindo os resultados do teste de Hosmer-Lemeshow (Tabela 8), considerando a natureza das variáveis respostas serem binárias, onde  $Y=1$  representa a presença e  $Y=0$  a ausência de espécies fúngicas.

Tabela 8 Probabilidades de significância do teste Hosmer-Lemeshow para seleção do modelo logístico para espécies de fungos totais e toxigênicos, do gênero *Aspergillus*.

<b>Grupos</b>	<b>Probabilidade</b>
Fungos totais	0,907
Fungos toxigênicos	0,992

Considerando o nível de significância fixado em 5%, os resultados não significativos sugerem que os modelos logísticos utilizados na modelagem da probabilidade de ocorrência das espécies em relação às regiões estão adequados.

O modelo de regressão logística ajustado para a identificação da ocorrência de espécies de fungos totais permite interpretar que dado valores

fixos para as coordenadas geográficas e temperatura, a probabilidade resultante do modelo refere-se à probabilidade de ocorrência de espécies de fungos totais do gênero *Aspergillus* característicos a uma determinada região do estado de Rondônia.

Considerando as covariáveis coordenadas geográficas e temperatura e assumindo a codificação  $Y=1$  referente à presença de espécies totais e  $Y=0$ , a ausência, o modelo logístico ajustado é dado na Equação 1:

$$P(Y = 1|Long, Lat, T) = \frac{\exp(+ 36,047 - 0,8294Long + 0,428Lat - 0,690T)}{1 + \exp(+ 36,047 - 0,8294Long + 0,428Lat - 0,690T)} \quad (1)$$

em que  $P$  é igual a probabilidade ajustada para ocorrência de espécies de fungos totais do gênero *Aspergillus*; Long. e Lat. correspondem às coordenadas geográficas que caracterizam um município e  $T$ , o efeito da temperatura.

Em função das probabilidades ajustadas e das coordenadas previamente especificadas, visando uma melhor discriminação das regiões, gerou-se a superfície (Figura 3) de resposta bem como o gráfico de contornos para auxiliarem na interpretação (Figura 4).

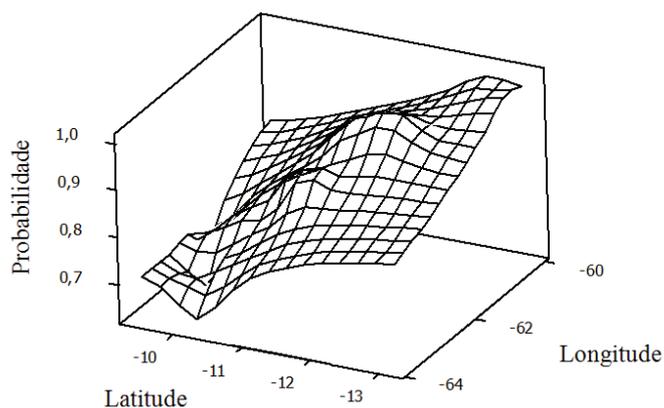


Figura 3 Superfície de resposta para as probabilidades de ocorrência de fungos totais nas localidades caracterizadas por diferentes níveis faixas de longitude e latitude

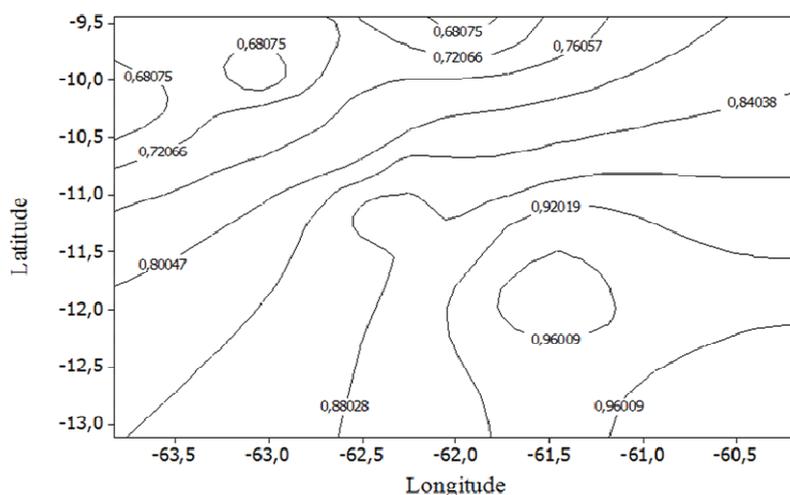


Figura 4 Curvas de nível obtidas da superfície de resposta com as porcentagens da probabilidade de ocorrência de fungos totais

Os resultados ilustrados nas Figuras 3 e 4 evidenciam que a ocorrência de espécies de fungos totais do gênero *Aspergillus* se difere em função das coordenadas geográficas (latitude e longitude) e temperatura. Neste contexto, nota-se, ao considerar dados de latitude, longitude e temperatura, uma maior probabilidade de ocorrência de fungos totais do gênero *Aspergillus* nos municípios do estado de Rondônia localizados entre os paralelos de 11° e 13° de latitude Sul e meridianos de 60° e 62° de longitude Oeste. Os municípios localizados nesta área são: Vilhena, Colorado do Oeste, Cacoal, São Felipe d'Oeste e Urupá (Figura 5).

Diversos estudos já demonstraram que a área geográfica e as condições meteorológicas podem contribuir para a incidência de fungos e OTA em uvas (BATTILANI; BARBANO; MARIN, 2006; BATTILANI et al., 2006; BELLÍ et al., 2006; CHIOTTA et al., 2009; SAGE; GARON; SEIGLE-MURANDI, 2004; SERRA et al., 2006b), porém em cacau nenhum estudo foi encontrado até o presente momento.

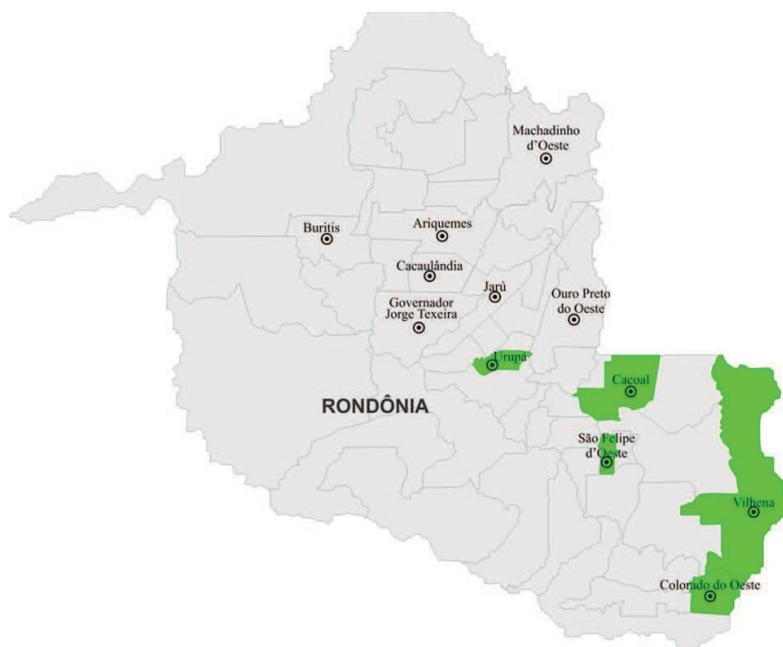


Figura 5 Localização dos municípios com maior probabilidade de ocorrência de fungos do gênero *Aspergillus* no estado de Rondônia: Cacoal, Colorado do Oeste, São Felipe d'Oeste, Urupá e Vilhena

Mantendo o mesmo enfoque, em relação ao ajuste do modelo logístico considerando as mesmas covariáveis, porém assumindo a codificação  $Y=1$  referente à presença de espécies toxigênicas e  $Y=0$ , a ausência, o modelo logístico ajustado é dado na Equação 2:

$$P(Y = 1 | \text{Long, Lat, T}) = \frac{\exp(-20,5807 - 0,2002\text{Lat} - 0,4682\text{Long} - 0,0805\text{T})}{1 + \exp(-20,5807 - 0,2002\text{Lat} - 0,4682\text{Long} - 0,0805\text{T})} \quad (2)$$

em que  $P$  é igual à probabilidade ajustada para ocorrência de espécies de fungos toxigênicos do gênero *Aspergillus*; Long. e Lat. correspondem às coordenadas geográficas que caracterizam um município e  $T$ , o efeito da temperatura.

As superfícies de resposta com as probabilidades de ocorrência das espécies de fungos toxigênicos, em função das coordenadas de longitude e

latitude, bem como gráfico de contornos para auxiliar na interpretação encontram-se ilustrados nas Figuras 6 e 7, respectivamente.

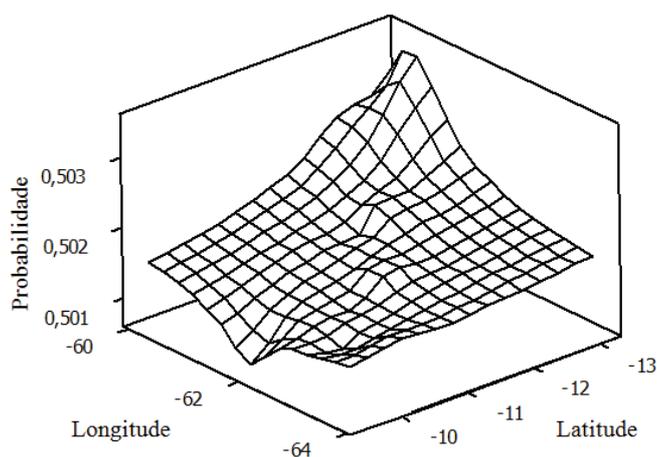


Figura 6 Superfície de resposta para as probabilidades de ocorrência de fungos toxigênicos nas localidades caracterizadas por diferentes níveis faixas de longitude e latitude

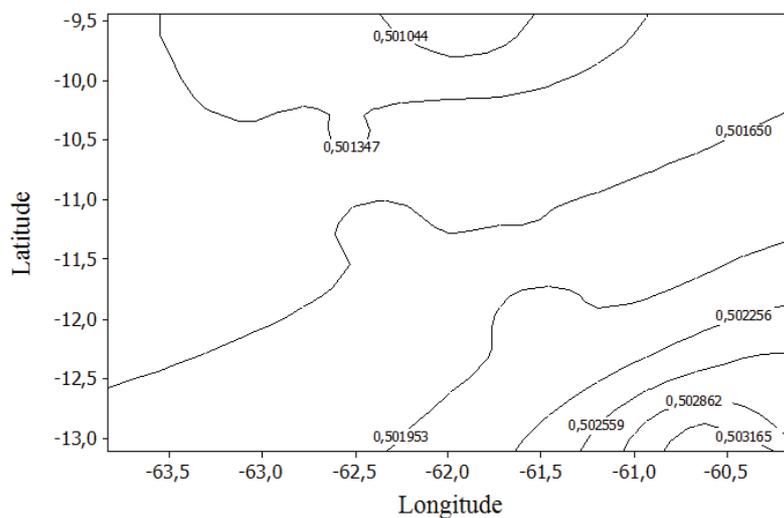


Figura 7 Curvas de nível para as probabilidades de ocorrência de fungos toxigênicos nas localidades caracterizadas por diferentes níveis faixas de longitude e latitude

Analisando as Figuras 6 e 7, podemos verificar que, para as espécies de fungos toxigênicos, as probabilidades de ocorrência foram similares em todas as regiões estudadas do estado de Rondônia. Na Figura 8, pode ser visualizada a localização dos municípios onde foram isolados fungos toxigênicos de amêndoas de cacau: Ariquemes, Buritis, Cacoal, Colorado do Oeste, Governador Jorge Teixeira, Jaru, Machadinho d'Oeste, Ouro Preto do Oeste, São Felipe d'Oeste e Urupá.

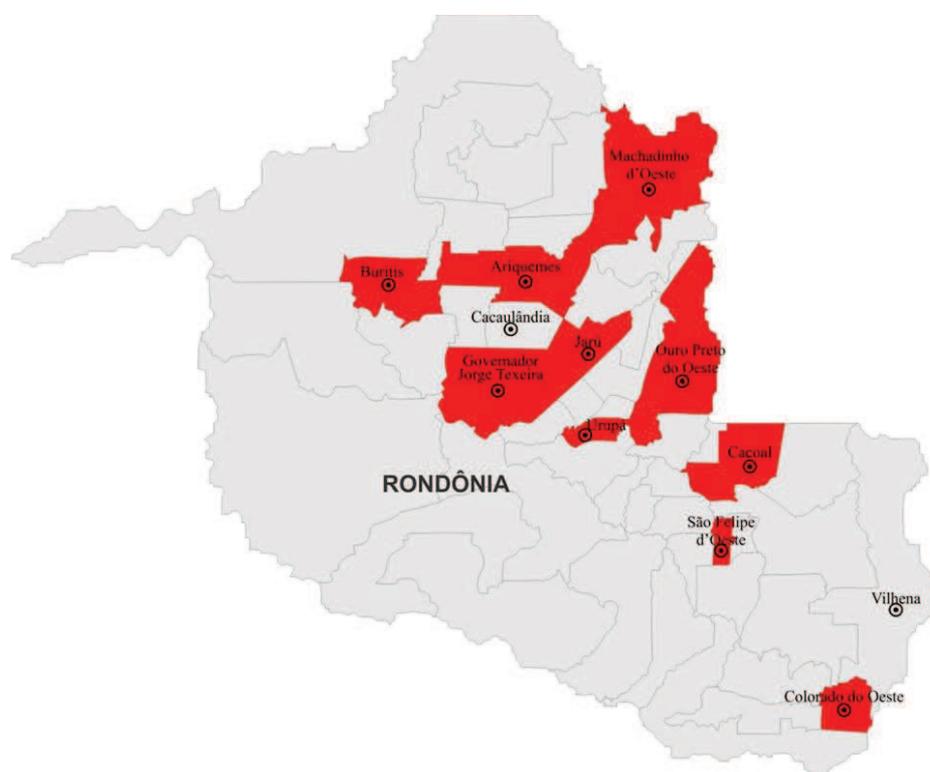


Figura 8 Localização dos municípios onde foram isolados fungos toxigênicos do gênero *Aspergillus*: Ariquemes, Buritis, Cacoal, Colorado do Oeste, Governador Jorge Teixeira, Jaru, Machadinho d'Oeste, Ouro Preto do Oeste, São Felipe d'Oeste e Urupá

O efeito da área geográfica sobre a biota fúngica foi confirmado por Battilani, Magan e Logrieco (2006), mostrando um efeito significativo da localização quando analisaram a incidência de espécies do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* em uvas. A incidência foi significativamente correlacionada com as coordenadas geográficas mostrando correlação positiva com a longitude, indicando que a incidência aumentou indo de oeste para leste, enquanto que a correlação com a latitude foi negativa, mostrando um gradiente positivo para o Sul da Europa. A incidência de *A. carbonarius* também foi positivamente correlacionada com longitude. Estes autores também verificaram que as condições meteorológicas desempenham um papel importante na colonização fúngica e na presença de OTA em uvas da Itália.

Bellí et al. (2006) estudaram a correlação entre parâmetros meteorológicos e fungos da Seção *Nigri* em uvas de regiões vitivinícolas da Espanha e revelaram uma correlação positiva significativa entre a colonização por *Aspergillus* Seção *Nigri* e temperaturas. Esses autores atribuíram a maior percentagem de infecção de uvas por *Aspergillus* Seção *Nigri*, no ano de 2003, às condições meteorológicas extremamente quentes durante o ano. Estudos com espécies da Seção *Nigri* sugerem que a maior frequência em uvas de climas mais quentes pode estar associada à capacidade de sobrevivência destas espécies no solo e capacidade de adaptação a altas temperaturas e baixa atividade de água (BATTILANI; MAGAN; LOGRIECO, 2006; LEONG; HOCKING; PITT, 2004), bem como ao fato de que os esporos pretos das espécies da Seção *Nigri* oferecem proteção contra a luz solar proporcionando vantagem competitiva em climas mais quentes (HOCKING, 2006; LEONG et al., 2006; PITT; HOCKING, 1997).

Correlação positiva da ocorrência de *A. carbonarius* em uvas com a temperatura já foi relatada, sendo que a ocorrência maior de *A. carbonarius* se deu em áreas quentes (BATTILANI; BARBANO; MARIN, 2006; CHIOTTA et

al., 2009). *A. carbonarius* crescem em temperaturas entre 10 e 40°C (PITT, 2000), com ótimo entre 25 – 35°C (BELLÍ et al., 2004b; MITCHELL et al., 2004). As temperaturas médias dos municípios onde foram coletadas as amostras de amêndoas de cacau do estado de Rondônia estão entre 24,33 e 26,13°C, sendo propício o crescimento de *A. carbonarius* em todo o Estado. Quanto à produção de OTA, *A. carbonarius* produziram os níveis mais elevados de OTA a 15 ou 20°C, faixa esta de temperatura abaixo da encontrada em Rondônia (ESTEBAN et al., 2004) o que sugere diminuição do risco de contaminação das amêndoas de cacau por OTA produzida por esta espécie.

Uma suposição para explicar a uniformidade entre as probabilidades preditas pelo ajuste do modelo em relação às coordenadas geográficas e temperatura dar-se-á devido ao número limitado de amostras de amêndoas de cacau coletadas, de tal forma a reduzir a possibilidade de isolar fungos toxigênicos.

Os fungos isolados das amêndoas de cacau dos municípios do estado de Rondônia pertencem às Seções *Nigri* e *Flavi*. Fungos da Seção *Nigri* e são habitantes saprófitas comuns do solo onde colonizam e sobrevivem em restos culturais produzindo um grande número de esporos que podem espalhar-se facilmente pelo ar (MAGAN; ALDRED, 2006).

*A. niger*, espécie isolada em maior número neste estudo, é uma espécie de grande ocorrência da Seção *Nigri* e conhecida por sua ampla distribuição no ambiente (PITT; HOCKING, 1997). *A. niger* crescem otimamente em temperaturas entre 30 e 37°C (BELLÍ et al., 2004). Para a espécie da Seção *Flavi* mais isolada, *A. flavus*, a temperatura ótima para crescimento é por cerca de 30°C (MOSS, 1996). A temperatura média do estado de Rondônia não se enquadra entre as temperaturas ótimas de crescimento da maioria dos fungos, porém devemos lembrar que fungos do gênero *Aspergillus* podem crescer em ampla faixa de temperatura (10 – 40°C) (PITT; HOCKING, 1997).

Não há grande variação da temperatura média anual entre os municípios de maior probabilidade de ocorrência (25,33°C) de fungos totais e os de menor (25,71°C), portanto, supõe-se que a maior incidência nos 5 municípios citados acima se deve às práticas de processamento realizadas nas propriedades cacaeiras.

### **3.7 Influência do processamento primário na incidência de fungos do gênero *Aspergillus* em amêndoas de cacau do estado de Rondônia**

As amostras de amêndoas de cacau foram obtidas, processadas e armazenadas nas propriedades cacaeiras do estado de Rondônia. Considerando a influência do processamento primário na incidência de fungos e produção de micotoxinas (ARDHANA; FLEET, 2003; COPETTI et al., 2011b; MOUNJOUENPOU et al., 2008; RILEY; NORRED, 1999; SÁNCHEZ-HERVÁS et al., 2008), foi analisada a relação dos fungos identificados nas amêndoas com as práticas do processamento primário conhecidas por meio de um questionário.

A contaminação das amêndoas de cacau por fungos pode ocorrer entre a colheita e a fermentação. Danos aos frutos podem favorecer a colonização de fungos nas sementes de cacau. Mounjouenpou et al. (2008), em um estudo com amêndoas de cacau de Camarões, verificaram que amêndoas secas de cacau fermentadas a partir de frutos de baixa qualidade apresentaram maior contaminação por OTA. A contaminação por OTA está associada à presença de fungos toxigênicos. Estes pesquisadores relataram maior incidência de *A. carbonarius* em amêndoas de cacau provenientes de frutos danificados e relacionou esse fato ao contato dos frutos abertos com o ar e o solo. Estes autores verificaram que frutos feridos revelaram alta proliferação de *A. carbonarius* e *A. niger*. Gilmour e Lindblom (2008) relataram que a

contaminação das amêndoas de cacau começa entre a colheita e a fermentação, sendo que os frutos danificados são grande parte do problema e que a inoculação inicial ocorre antes ou durante a fermentação.

A prática de não separar as sementes provenientes de frutos doentes e atacados por pragas, das sementes de frutos sadios para a realização da fermentação também vem a contribuir carreando maior quantidade de inóculo fúngico inicial para a fermentação. Bastide et al. (2006) estudaram as fontes e o desenvolvimento de ocratoxina A em amêndoas de cacau na Costa do Marfim e Togo e os resultados sugeriram que a presença de OTA tem relação com a pós-colheita, com as práticas de processamento e com as condições climáticas. Quatro estudos foram conduzidos em uma propriedade, durante a principal safra, entre dezembro/2003 e março/2004 e ao mesmo tempo foram investigadas técnicas de processamento. Foram estabelecidas 5 categorias de frutos para estudar o fator de qualidade fitossanitária: frutos saudáveis, frutos mofados (podridão-parda e outras podridões), frutos que secaram nas árvores (mumificados), frutos danificados por insetos e frutos com dano físico externo (ataque de roedores, lesão de gancho ou cutelo na colheita). Os resultados mostraram que a presença de OTA foi altamente significativa nas amêndoas de frutos danificados fisicamente. Os autores comprovaram também que as condições meteorológicas, como a estação da seca e ventos têm um efeito considerável sobre a produção de OTA.

O Quadro 1 apresenta a distribuição das espécies do gênero *Aspergillus* por amostra de amêndoas de cacau coletadas do armazenamento em municípios de Rondônia, as práticas de processamento primário realizadas para obtenção das amêndoas e as condições de armazenamento no momento da coleta das amostras.

ção das espécies do gênero *Aspergillus* por amostra de amêndoas de cacau coletadas em municípios de  
 as práticas de processamento primário realizadas para obtenção das amêndoas e as condições de  
 nento

Fermentação	Secagem	Armazenamento	Espécies isoladas (isolados toxigênicos)								
			A	B	C	D	E	F	G	H	I
n fermentar	Lona	Tulha de madeira	1	1/1	-	2	-	7	3	-	2
na	Lona	Tulha de madeira	-	-	-	-	-	-	-	-	-
o de poliprop.	Lona	Tulha de madeira	-	-	-	-	-	-	-	-	-
o de poliprop.	Lona	Tulha de madeira	-	-	-	-	-	-	-	-	-
o de poliprop.	Lona	Tulha de madeira	-	-	-	-	-	-	-	-	-
o de poliprop.	Barcaça de madeira	Tulha de madeira	7	2/2	1	-	4	1	1	-	-
o de poliprop.	Concreto	Tulha de madeira	-	-	-	1	-	1	-	-	-
na	Lona	Não Armazena	-	-	-	-	-	-	-	-	-
xa de madeira	Barcaça de madeira	Tulha de madeira	1	-	-	1	-	6	-	-	-
nte	Concreto	Tulha de madeira	-	-	1/1	-	-	-	1	-	-
o de poliprop.	Lona	Tulha de madeira	-	-	-	-	-	1	1	-	-
o de poliprop.	Barcaça de madeira	Tulha de madeira	-	-	-	-	-	1	-	-	-
o de poliprop.	Barcaça de madeira	Tulha de madeira	-	-	-	-	-	-	-	-	-
o de poliprop.	Barcaça de madeira	Não Armazena	-	-	-	-	-	-	-	-	-
xa de madeira	Tela suspensa	Tulha de madeira	-	-	-	-	-	1	-	-	-
n fermentar	Concreto	Tulha de madeira	-	-	4/4	-	-	-	-	-	-
na	Lona	Tulha de madeira	1	-	-	-	-	1	-	-	-
o de poliprop.	Lona	Casa de alvenaria	-	28/21	-	-	1	1	-	-	-
xa de madeira	Concreto	Tulha de madeira	-	-	-	-	-	-	-	-	-
na	Lona	Não Armazena	-	1/1	-	-	-	-	1	-	-

Fermentação	Secagem	Armazenamento	Espécies isoladas /isolados toxigênicos								
			A	B	C	D	E	F	G	H	I
aco de poliprop.	Concreto	Tulha de madeira	-	-	-	1	-	4	2	-	-
aco de poliprop.	Barcaça de madeira	Tulha de madeira	-	-	1/1	-	-	-	-	-	-
onte	Barcaça de madeira	Não Armazena	-	-	-	-	-	-	-	-	-
onte	Lona	Tulha de madeira	-	-	1/1	8	-	17/2	2	-	6
aco de poliprop.	Lona	Tulha de madeira	-	-	-	-	-	-	-	-	-
em fermentar	Lona	Tulha de madeira	-	-	-	-	-	1	-	-	-
aco de poliprop.	Lona	Tulha de madeira	-	-	-	-	-	-	-	-	-
aixa de madeira	Lona	Tulha de madeira	-	-	-	-	-	-	-	-	-
aco de poliprop.	Lona	Tulha de madeira	-	-	-	-	-	-	-	-	-
em fermentar	Concreto	Tulha de madeira	-	-	-	1	-	1	-	-	-
aco de poliprop.	Lona	Não Armazena	-	2/2	-	-	-	-	-	1	-
ecip. plástico	Barcaça de madeira	Tulha de madeira	1	-	-	1	-	-	2	-	-
aixa de madeira	Barcaça de madeira	Tulha de madeira	-	-	-	-	-	2	1	-	1
aixa de madeira	Concreto	Chão batido EM <sup>1</sup>	-	-	7/7	-	-	-	-	-	-
aixa de madeira	Concreto	Chão batido EM <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
aixa de madeira	Concreto	Tulha de madeira	1	-	-	2	-	17	5	-	3
aixa de madeira	Lona	Tulha de madeira	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ecip. Plástico	Concreto	Chão batido EM <sup>1</sup>	-	-	3/1	-	-	1	1	-	2
aixa de madeira	Lona	Casa de alvenaria	-	-	-	-	-	-	-	-	-
aixa de madeira	Lona	Tulha de madeira	-	-	-	-	-	1	-	-	-

Gov.: Governador; Poliprop.: Polipropileno; Recip.: Recipiente; <sup>1</sup> Chão batido sobre Estrado de Madeira  
*A. carbonarius*; C: *A. flavus*; D: *A. foetidus*; E: *A. japonicus*; F: *A. niger*; G: *A. niger* Agregado; H: *A. oryzae*; I: *A.*

De acordo com Schwan e Wheals (2004), após a abertura dos frutos, a polpa é contaminada com micro-organismos carreados pelas mãos dos manipuladores, facas, cestos utilizados para o transporte das amêndoas e resíduos das caixas de fermentação. São esses micro-organismos que contribuirão para o processo fermentativo.

No Brasil, já está estabelecida a sucessão microbiana natural, do cacau com polpa, que dura de 5 a 7 dias (SCHWAN; WHEALS, 2004). Inicialmente espécies de leveduras proliferam, produzindo etanol e secretando enzimas pectinolíticas, em seguida o número de bactérias aumenta, em especial as bactérias ácido lácticas e acéticas, seguidas pelas formadoras de esporos (SCHWAN; WHEALS, 2004).

Durante a fermentação o desenvolvimento de fungos não é preocupante, pois a temperatura, acima de 45°C, alcançada durante essa fase do processamento, não permite o desenvolvimento da maioria dos fungos, além da competição com bactérias e leveduras pela sua maior velocidade de multiplicação e pelos metabólitos produzidos durante o crescimento (COPETTI et al., 2011b).

Ao final do processo fermentativo, Copetti et al. (2011b) relataram a presença de fungos filamentosos, principalmente na parte externa, devido a maior aeração e temperaturas mais baixas. A função dos fungos na sucessão microbiana da fermentação do cacau não é conhecida, porém Gilmour e Lindblom (2008) associaram extenso desenvolvimento fúngico, no final da fermentação, ao aumento da atividade deteriorativa na fase de secagem devido à existência de um maior inóculo fúngico inicial.

A presença de fungos em amêndoas de cacau independe do tipo de fermentação o que pode ser explicado pela mucilagem que envolve as sementes, rica em carboidratos, e o pH ácido altamente propícios ao desenvolvimento de fungos (MOUNJOUENPOU et al., 2008).

A Figura 9 mostra as práticas de fermentação realizadas pelos produtores de cacau no estado de Rondônia.

Foi verificada uma prática muito comum, realizada pelos produtores de cacau deste Estado: fermentação em sacos de polipropileno (Figura 9A). Esta prática consiste em colocar as sementes de cacau, após a quebra dos frutos, em sacos de polipropileno e deixá-los na plantação de cacau, sob as árvores de 1 a 4 dias. Durante este tipo de prática de fermentação não é realizado o revolvimento das amêndoas de cacau.

Das 40 amostras coletadas, 16 (40%) foram provenientes de fermentação em sacos de polipropileno. Além da fermentação em saco de polipropileno outras práticas de fermentação também são realizadas em Rondônia: fermentação em caixa de madeira (Figura 9B), sobre lona (Figura 9C), em recipiente plástico (Figura 9D) e fermentação em monte (Figura 9E). Quatro amostras foram coletadas sem fermentar. As sementes de cacau dessas amostras foram encaminhadas, após a quebra dos frutos, diretamente para a secagem.

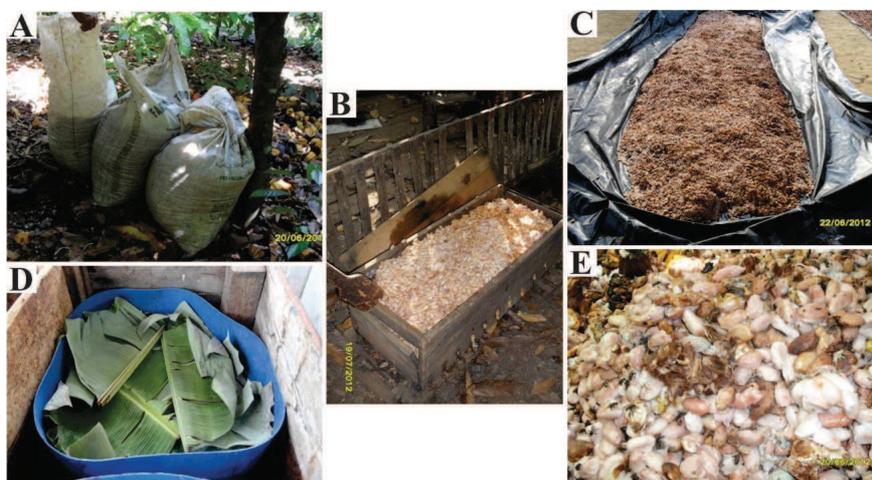


Figura 9 Práticas fermentativas de sementes de cacau no estado de Rondônia. A) Fermentação em sacos de polipropileno; B) Fermentação em caixas de madeira; C) Fermentação em lona; D) Fermentação em recipiente plástico; E) Fermentação em monte.

Em um estudo realizado em Camarões, Mounjouenpou et al. (2008) relataram a presença de *A. niger* em todas as fases de processamento primário de amêndoas de cacau processados sob condições controladas. Esta espécie é conhecida por ser amplamente distribuída no ambiente (PITT; HOCKING, 1997) podendo facilmente estar contaminando as caixas de madeira e montes.

Mounjouenpou et al. (2008) avaliaram a utilização de sementes provenientes de frutos íntegros colocados para fermentar em caixas de madeira logo após a abertura dos frutos, e não encontraram diferença significativa entre os fungos filamentosos isolados de amêndoas de cacau fermentadas em monte ou em caixas de madeira.

Guehi e Dabonne (2010) encontraram maior taxa de contaminação por fungos filamentosos em cacau fermentado em montes o que pode estar relacionado com o contato direto das amêndoas com o ar e o solo. Esses autores encontraram menor taxa de contaminação por fungos em amêndoas de cacau fermentadas em recipiente plástico do que em caixa de madeira e relacionaram a influência do material plástico contra a germinação de esporos de fungos, bem como com a baixa disponibilidade de oxigênio prejudicando o crescimento da maioria dos fungos devido às condições de microaerofilia (TANIWAKI et al., 2009), enquanto que o material biológico, tal como a caixa de madeira e folhas de bananeira que cobrem as sementes em processo fermentativo permitem um bom crescimento microbiano (GUEHI; DABONNE, 2010).

A prática de revolvimento da massa de cacau em Rondônia é realizada quase na totalidade com pás de madeira e nenhum procedimento de limpeza é realizado. Isso pode favorecer a inoculação de fungos no momento da fermentação e as amêndoas chegarem à secagem com alto inóculo inicial. Esses fungos encontraram condições adequadas para o desenvolvimento durante a secagem, portanto é importante o cuidado para evitar a contaminação das amêndoas durante a fermentação.

Os fungos foram encontrados nas amêndoas de cacau processadas em Rondônia independente da duração da fermentação o que pode ser devido à contaminação por fungos através do contato com as superfícies durante a fermentação, bem como do contato com o ar que contém esporos fúngicos. A incidência de fungos pode ter sido favorecida pela condução de fermentação inadequada, gerando amêndoas de cacau de baixa qualidade microbiológica.

Neste estudo, verificou-se que a grande maioria dos processos de fermentação são desenvolvidos por período inferior a 4 dias. Em geral a fermentação deve ocorrer de 5 a 7 dias (WOOD; LASS, 1985) para obtenção de amêndoas de qualidade. Essa prática, bem como a não fermentação das sementes com secagem direta podem ser propícias ao crescimento de fungos.

Jinap, Dimick e Hollender (1995) descreveram a presença de ácido láctico, ácido acético e ácido cítrico durante a fermentação de cacau e Copetti et al. (2012) demonstraram a influência de ácidos orgânicos no crescimento de fungos e produção de ocratoxina A em amêndoas de cacau e sugeriram a condução das práticas de fermentação no sentido de produzir ácido acético, uma vez que esse é o ácido mais inibitório contra *A. carbonarius* e *A. niger*, principais fungos responsáveis pela produção de OTA em cacau e identificados neste estudo, o que poderia minimizar o problema da contaminação por OTA em cacau.

Geralmente, ao final da fermentação as amêndoas são encaminhadas para o local de secagem ao sol. Nas propriedades cacaueiras visitadas para as coletas de amêndoas de cacau, em Rondônia, não é realizada a prática de secagem artificial. Todas as amostras coletadas foram provenientes de secagem natural, ao sol. Esta é a prática preferencial de pequenos agricultores de cacau (WOOD; LASS, 1985). A duração da secagem das amêndoas de cacau depende das condições climáticas locais na época da colheita e processamento primário.

A secagem natural é mais lenta do que o processo de secagem artificial, e assim o tempo para que as amêndoas de cacau reduzam a umidade de cerca de 60% para 8% é maior. É essencial que as amêndoas de cacau sejam secas para reduzir o conteúdo de umidade tão rapidamente quanto possível, independentemente do sistema de secagem utilizado, para evitar o crescimento de fungos filamentosos (HII et al., 2009). Copetti et al. (2011b) sugeriram a secagem como o estágio crítico para acúmulo de micotoxinas no processamento primário de amêndoas de cacau por apresentar condições de umidade e temperatura adequadas ao desenvolvimento de fungos toxigênicos.

Na Figura 10, podem ser visualizadas as práticas de secagem realizadas pelos produtores de cacau em Rondônia.



Figura 10 Práticas de secagem de amêndoas de cacau no estado de Rondônia. A) Secagem sobre lona; B) Secagem sobre concreto; C) Secagem sobre plataformas de madeira; D) Secagem sobre tela suspensa.

Todas as amostras coletadas em Rondônia foram secas naturalmente. A maioria das amostras foi seca sobre lona estendida em terreiro, 50% das 40 amostras (Figura 2A).

Copetti et al. (2011b) sugeriram a secagem como o estágio crítico para acúmulo de micotoxinas no processamento primário de amêndoas de cacau por apresentar condições de umidade e temperatura adequadas ao desenvolvimento de fungos toxigênicos.

Os fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* são habitantes saprófitas comuns do solo onde colonizam e sobrevivem em restos culturais produzindo um grande número de esporos que podem espalhar-se pelo ar (MAGAN; ALDRED, 2006). A secagem das amêndoas realizadas sobre lona plástica e sobre chão de concreto pode favorecer a contaminação, pois o local de secagem é próximo ao solo e os esporos fúngicos presentes no solo podem ser carreados mais facilmente pelo vento até a superfície das amêndoas (HOCKING, 2006; LEONG et al., 2006).

Os fatores mais importantes para o crescimento e sobrevivência dos fungos filamentosos são a disponibilidade de água, temperatura e sua interação com o substrato. De acordo com Copetti et al. (2011b), há uma redução da  $a_w$  durante a secagem, para valores inferiores a 0,88 ocorrendo a interrupção da multiplicação de bactérias e leveduras, no entanto ainda há água suficiente para a multiplicação fúngica. A microbiota é alterada, então, com predominância de fungos tipicamente isolados a partir de alimentos de umidade intermediária, como os do gênero *Aspergillus* especialmente após a redução do ácido acético volátil evaporado (COPETTI et al., 2011b). Assim o valor do pH para amêndoas secas ao sol é geralmente mais elevado (menos ácido), pois o processo de secagem lento permite a evaporação de mais ácido acético (HII et al., 2009).

Em Rondônia, durante o período noturno, a lona onde as amêndoas de cacau são expostas para secagem, é dobrada o que provavelmente cria um

ambiente úmido pela transpiração das amêndoas causando o reumedecimento das amêndoas de cacau e criando assim um ambiente propício ao desenvolvimento de fungos e produção de OTA.

Outras duas práticas de secagem natural, comumente encontradas, foram sobre concreto (Figura 10B) e sobre barcaça de madeira (Figura 10C).

Copetti et al. (2011a) definiram a fase da secagem ao sol como o ponto crítico para fungos aflatoxigênicos infectarem amêndoas de cacau, pois é nessa fase que os grãos começam a perder água. A redução da  $a_w$  reduz o número de competidores, devido à elevada sensibilidade de bactérias e leveduras à baixa disponibilidade de água.

A prática de secagem sobre concreto pode ser uma prática que favoreça espécies fúngicas, uma vez que o cimento pode se tornar uma superfície de temperatura elevada, diminuindo assim o tempo de secagem externa das amêndoas, porém essa secagem rápida pode criar uma casca rígida impedindo a redução da umidade interna das amêndoas e assim durante o armazenamento propiciar o desenvolvimento de fungos. Uma solução para esse problema seria a secagem artificial com temperatura bem controlada.

O processo de secagem ao sol sobre plataforma de madeira é o mais usado para secagem de amêndoas de cacau no Brasil. Foi na secagem ao sol em plataforma de madeira que Copetti et al. (2011b) encontraram a maior diversidade e número de espécies capazes de produzir OTA. A dificuldade em manter as barcaças de madeira em boas condições de higiene pode contribuir para essa elevada carga de fungos.

É recomendado que as amêndoas de cacau fossem espalhadas, logo após o término da fermentação, para secar, sobre superfícies elevadas adequadas e não diretamente sobre o chão ou superfície de concreto (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 1995). Em uma propriedade de cacau foi verificada uma técnica de secagem diferenciada: sobre tela suspensa (Figura

10D). Essa técnica além de ser em superfície elevada, diminuindo a possibilidade de contaminação por esporos carregados pelo vento, possivelmente favorece a secagem mais rápida das amêndoas por permitir maior aeração.

Na pesquisa realizada na Bahia por Copetti et al. (2011b), a secagem das amêndoas de cacau usualmente demorava entre 7 e 14 dias, dependendo das condições climáticas. Trinta e seis das amostras coletadas em Rondônia foram secas por período menor que 6 dias. Duas questões podem ser levantadas: ou o clima quente de Rondônia favorece a aceleração da secagem ou as amêndoas não são adequadamente secas o que propiciaria o desenvolvimento de fungos e micotoxinas durante o armazenamento.

O final da secagem é determinado pelo produtor quando o mesmo julgar que as amêndoas atingiram a umidade adequada (8%), portanto o teor de umidade das amêndoas secas varia consideravelmente. Após a secagem, as amêndoas geralmente são armazenadas em sacos de polipropileno até o momento da comercialização. Alguns produtores comercializam as amêndoas assim que a secagem é finalizada.

Em condições adversas, como as de baixa  $a_w$ , os esporos fúngicos podem permanecer viáveis por longos períodos, mesmo sem haver crescimento vegetativo das hifas. Armazenamento em condições deficientes, nas quais o cacau é submetido a ambientes com alta umidade relativa, podem propiciar condições adequadas para germinação dos esporos, crescimento fúngico e deterioração, além da produção de micotoxinas (COPETTI et al., 2011b).

Na Figura 11, podem ser visualizadas as condições dos locais de armazenamento das amêndoas no estado de Rondônia.



Figura 11 Locais de armazenamento de amêndoas de cacau no estado de Rondônia. A) Em tulha de madeira. B) Em casa de alvenaria. C) Em estrado de madeira sobre chão batido.

Trinta (75%) das amostras foram coletadas em propriedades cujo armazenamento era em sacos de polipropileno em tulha de madeira (Figura 3A). Em amostras provenientes desse tipo de armazenamento, foi encontrada uma grande variedade de fungos: *A. niger*, *A. niger* Agregado, *A. aculeatus*, *A. foetidus*, *A. tubingensis*, *A. japonicus*, *A. carbonarius* e *A. flavus*. Copetti et al. (2011) observaram um pequeno aumento na diversidade de espécies do gênero *Aspergillus* em amêndoas de cacau estocadas em relação às encontradas no final da secagem. Sanchez-Hervas et al. (2008) avaliaram a micobiota de 9 amostras de cacau estocadas, provenientes de Serra Leoa, Guiné Equatorial e Equador e também revelaram a predominância de *Aspergillus* Seções *Flavi* e *Nigri*.

Também foram coletadas amostras cujo armazenamento das amêndoas era em casa de alvenaria (Figura 11B) e em estrado de madeira sobre chão batido (Figura 11C).

O tempo de armazenamento pode variar de poucos dias a meses, dependendo da agilidade ou necessidade de comercialização das amêndoas de cacau pelo produtor. A maioria das amostras é mantida armazenada por tempo inferior a 3 meses, porém as amostras onde foi encontrado o maior número de *A.*

*carbonarius* eram provenientes de propriedade cujo armazenamento era em casa de alvenaria e superior a 3 meses.

A amostra com maior contaminação por *A. carbonarius*, espécie relacionada com a contaminação por OTA em amêndoas de cacau foi proveniente de uma amostra do município Colorado do Oeste (Amostra 18). A fermentação dessa amostra foi realizada em saco de polipropileno por aproximadamente 4 dias; a secagem foi realizada sobre lona por tempo inferior a 6 dias e o armazenamento em casa de alvenaria por tempo superior a 3 meses. Supõe-se que as práticas de processamento primário tenham exercido efeito positivo na contaminação das amêndoas por fungos da espécie *A. carbonarius* e na produção de OTA por essa espécie.

A fermentação em saco de polipropileno não pode ser considerada uma prática adequada para obtenção de amêndoas de cacau de qualidade, pois pode interferir na sucessão microbiana, uma vez que não há revolvimento da massa e consequentemente aeração adequada para os micro-organismos. A secagem sobre lona é muito próxima ao solo facilitando a contaminação das amêndoas por fungos carregados pelo vento e quando a lona é dobrada durante o período noturno pode gerar um ambiente propício de umidade e temperatura favorecendo o desenvolvimento de fungos. As amêndoas armazenadas em casa de alvenaria por tempo superior a 3 meses podem estar sujeitas a alterações de umidade propiciando o desenvolvimento desses fungos indesejáveis.

A atividade de água exerce grande influência sobre o tipo de micro-organismo capaz de crescer em um determinado alimento (COPETTI et al., 2011b). A atividade de água nas amêndoas de cacau durante a etapa da secagem encontra-se dentro da faixa de atividade de água ótima (0,97 a 0,99) para o crescimento e produção de ocratoxina A por *A. carbonarius*. Esta espécie cresce em atividade de água de até 0,82 (ESTEBAN et al., 2006). Atividade de água

possível durante o armazenamento deficiente uma vez que as amêndoas de cacau são altamente higroscópicas (MAGAN; ALDRED, 2006).

O estado de Rondônia apresenta temperatura média anual de 24 a 26°C, temperatura que favorece o crescimento do *A. carbonarius* que possui temperatura ótima de crescimento a 30 – 35°C e ideal de  $a_w$  entre 0,930-0,987, com a mais ampla tolerância a  $a_w$  a 25 – 30°C (MITCHELL et al., 2004), porém a maior produção de OTA por *A. carbonarius* foi relatada a 15 ou 20°C, (ESTEBAN et al., 2004). Medidas para impedir o crescimento de espécies fúngicas consequentemente impedem a produção de OTA e têm sido documentadas para evitar a OTA na cadeia alimentar.

Magan e Aldred (2007) sugeriram os seguintes pontos críticos de controle pós-colheita: (a) medições de umidade regulares e precisas; (b) secagem rápida e eficiente de grãos úmidos para níveis de umidade seguros e (c) condições adequadas de armazenamento em todas as fases em termos de controle de umidade e temperatura, manutenção geral e higiene eficaz das instalações de armazenagem para a prevenção de pragas e entrada de água.

De acordo com a ICCO, alguns fatores devem ser considerados na área de armazenamento, a fim de minimizar os riscos: (a) o armazém deve ser de piso de cimento ou não inflamável, sem rachaduras e fendas para evitar insetos; (b) o piso deve ser mais alto que o terreno circundante para evitar inundações; (c) as paredes devem ser de material não inflamável, sem fendas e fissuras; (d) a ventilação deve ser adequada para evitar mofo; (e) o telhado deve ser isolado e não deve ser feito de madeira; (e) os sacos podem ser empilhados, mas de preferência a camada inferior deve ser em estrados, permitindo um espaço de ar de 5 a 10 cm entre as pilhas e a camada superior deve ser de, pelo menos, 1 m de distância a partir do telhado, as pilhas devem ser posicionadas afastadas das paredes; (f) fumigação e outras formas de controle de insetos podem ser utilizadas para assegurar que as amêndoas fiquem livres de pragas; (g) o cacau

deve ser inspecionado regularmente; (h) nenhum outro produto deve ser armazenado com o cacau para evitar a contaminação e (i) o acesso a áreas de armazenamento deve ser controlado (ICCO, 2013a).

#### 4 CONCLUSÃO

A microbiota encontrada em amêndoas de cacau do estado de Rondônia foi variada e composta por 9 espécies de fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* e Seção *Flavi*. A incidência de fungos Seção *Nigri* potencialmente ocratoxigênicos (*Aspergillus niger* e *Aspergillus carbonarius*) e *Aspergillus flavus*, da Seção *Flavi* nas amêndoas de cacau é considerado um risco potencial de contaminação por ocratoxina A e aflatoxinas, respectivamente, em cacau e produtos de cacau.

Os municípios do estado de Rondônia com maior probabilidade de ocorrência de fungos do gênero *Aspergillus* encontram-se localizados entre os paralelos 11° e 13° de latitude Sul e meridianos 60° e 62° de longitude Oeste: Vilhena, Colorado do Oeste, Cacoal, São Felipe d'Oeste e Urupá. Os fungos toxigênicos mostraram distribuição homogênea, sendo isolados de amêndoas de cacau provenientes dos municípios Ariquemes, Buritis, Cacoal, Colorado do Oeste, Governador Jorge Teixeira, Jarú, Machadinho d'Oeste, Ouro Preto do Oeste, São Felipe d'Oeste e Urupá.

As práticas de processamento primário exercem efeito sobre a incidência de fungos toxigênicos em amêndoas de cacau. A prática de fermentação deve ser realizada para obtenção de amêndoas de qualidade e cuidados durante a secagem e armazenamento adequados devem ser implantados durante o processamento primário de amêndoas de cacau em Rondônia. A fermentação em sacos de polipropileno, secagem sobre lona e armazenamento em casa de alvenaria por tempo superior a 3 meses não é indicada, pois favorecem a contaminação das amêndoas por *A. carbonarius*, espécie fúngica altamente relacionada com a produção de OTA em amêndoas de cacau.

## REFERÊNCIAS

AMÉZQUETA, S. et al. OTA-producing fungi isolated from stored cocoa beans. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 47, n. 3, p. 197–201, Sept. 2008.

ARDHANA, M. M.; FLEET, G. H. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 86, n. 1-2, p. 87–99, Sept. 2003.

BASTIDE, B. et al. **Identification of Ochratoxin A sources during cocoa post-harvest processing**: influence of harvest quality and climatic factors. San Jose, Costa Rica: Cocoa Research Centre, 2006.

BATISTA, L. R. et al. Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 9, p. 784–790, Sept. 2009.

BATTILANI, P. et al. Black aspergilli and ochratoxin A in grapes in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, supl. 1, p. 53–60, 2006.

BATTILANI, P.; BARBANO, C.; MARIN, S. Mapping of *Aspergillus* Section Nigri in Southern Europe and Israel based on geostatistical analysis. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, supl. 1, p. 72–82, 2006.

BATTILANI, P.; MAGAN, N.; LOGRIECO, A. European research on ochratoxin A in grapes and wine. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, supl. 1, p. 2–4, Sept. 2006.

BAU, M. et al. DNA-based characterization of ochratoxin-A-producing and non-producing *Aspergillus carbonarius* strains from grapes. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 156, n. 3, p. 375–381, Apr. 2005b.

BAU, M. et al. Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 98, n. 2, p. 125–130, Feb. 2005a.

BELLÍ, N. et al. Influence of water activity and temperature on growth of isolates of *Aspergillus* section Nigri obtained from grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 96, N. 1, p. 19–27, Oct. 2004b.

BELLÍ, N. et al. Mycobiota and ochratoxin A producing fungi from Spanish wine grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, supl. 1, p. 40–45, Sept. 2006.

BELLÍ, N. et al. Occurrence of ochratoxin A and toxigenic potential of fungal isolates from Spanish grapes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 84, n. 6, p. 541–546, Apr. 2004a.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 16, n. 3, p. 497–516, July 2003.

BRAGULAT, M. R.; ABARCA, M. L.; CABAÑES, F. J. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. **International Journal of Food Microbiology**, **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 71, n. 2-3, p. 139–144, Dec. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução - RDC N° 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, mar. 2011.

CABAÑES, F. J.; BRAGULAT, M. R.; CASTELLÁ, G. Characterization of nonochratoxigenic strains of *Aspergillus carbonarius* from grapes. **Food Microbiology**, London, v. 36, n. 2, p. 135–141, Dec. 2013.

CHIOTTA, M. L. et al. *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from different wine-grape growing regions in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 136, n. 1, p. 137–141, Nov. 2009.

CODEX COMMITTEE ON CONTAMINANTS IN FOOD. **Proposed draft code of practice for the prevention and reduction of ochratoxin a contamination in cocoa**. Moscow: FAO, 2013.

COPETTI, M. V et al. Aflatoxigenic fungi and aflatoxin in cocoa. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 148, n. 2, p. 141–144, Aug. 2011a.

COPETTI, M. V et al. Mycobiota of cocoa: from farm to chocolate. **Food microbiology**, London, v. 28, n. 8, p. 1499–1504, Dec. 2011b.

COPETTI, M. V et al. Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in cocoa during farm processing. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 143, n. 1-2, p. 67–70, Sept. 2010.

COPETTI, M. V. et al. The effect of cocoa fermentation and weak organic acids on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus* species. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 155, n. 3, p. 158–164, Apr. 2012.

ESTEBAN, A. et al. Effects of temperature and incubation time on production of ochratoxin A by black aspergilli. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 155, n. 10, p. 861–866, Dec. 2004.

ESTEBAN, A. et al. Effect of water activity on ochratoxin A production by *Aspergillus niger* aggregate species. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 108, n. 2, p. 188–195, Apr. 2006.

FERNÁNDEZ-PINTO, V. et al. Natural co-occurrence of aflatoxin and cyclopiazonic acid in peanuts grown in Argentina. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 18, n. 11, p. 1017–1020, Nov. 2001.

FILTENBORG, O.; FRISVALD, J. C.; SVENDENSEN, J. A. Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 45, n. 2, p. 581–585, Feb. 1983.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Evaluation of certain food additives and contaminants: forty-fourth report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives. **WHO Technical Report Series**, Rome, n. 940, p. 1-100, 1995.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Manual on the application of the HACCP system in mycotoxin prevention and control. **FAO Food and Nutrition Paper 73**, Rome, p. 124, 2001.

FRISVAD, J. C. et al. Fumonisin and ochratoxin production in industrial *Aspergillus niger* strains. **PloS One**, California, v. 6, n. 8, p. 42-47, Aug. 2011.

FRISVAD, J. C.; SKOUBOE, P.; SAMSON, R. A. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B 1, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 28, n. 5, p. 442–453, July 2005.

GILMOUR, M.; LINDBLOM, M. Management of ochratoxin a in the cocoa supply chain: a summary of work by the CAOBISCO/ECA/FCC working group on ochratoxin A. In: LESLIE, J. F.; BANDYOPADHYAY, R.; VISCONTI, A. (Ed.). **Mycotoxins: detection methods, management, public health and agricultural trade**. Wallingford: CABI, 2008. p. 231-243.

GIORNI, P. et al. Studies on *Aspergillus* section *Flavi* isolated from maize in northern Italy. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 113, n. 3, p. 330–338, Feb. 2007.

GUEHI, S.; DABONNE, S. Effect of turning beans and fermentation method on the acidity and physical quality of raw cocoa beans. **Advance Journal of Food Science and Technology**, Washington, v. 2, n. 3, p. 163–171, May 2010.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008.

HII, C. L. et al. Thin layer drying kinetics of cocoa and dried product quality. **Biosystems Engineering**, Oxford, v. 102, n. 2, p. 153–161, Feb. 2009.

HOCKING, D. *Aspergillus* and related teleomorphs. In: BLACKBURN, C. de W. **Food spoilage microorganisms**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2006. Chap. 17, p. 451–477.

HORN, B. W. Biodiversity of *aspergillus* section *Flavi* in the United States : a review. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 24, n. 10, p. 1088–1101, Oct. 2007.

IAMANAKA, B. T. et al. Incidence of toxigenic fungi and ochratoxin A in dried fruits sold in Brazil. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 22, n. 12, p. 1258–1263, Dec. 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA.  
**Levantamento sistemático da produção agrícola**. Rio de Janeiro: IBGE, 2013.  
Disponível em: <<http://scholar.google>>.

com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Levantamento+sistemático+da+produção+agrícola#1>. Acesso em: 11 jul. 2013.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. **IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans**, France, v. 56, p. 489–521, June 1993.

INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION. Factors to consider in the storage area in order to minimize risk. **International Cocoa Organization Westgate House**, London, 2013a. Disponível em: <<http://www.icco.org/faq/60-storing-cocoa-beans/107-factors-to-consider-in-the-storage-area-in-order-to-minimize-risk.html>>. Acesso em: 2 maio. 2013.

INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION. Production: latest figures from the quarterly bulletin of cocoa statistics. **International Cocoa Organization Westgate House**, London, 2013b. Disponível em: <[http://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat\\_view/30-related-documents/46-statistics-production.html](http://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat_view/30-related-documents/46-statistics-production.html)>. Acesso em: 2 jul. 2013.

JINAP, S.; DIMICK, P. S.; HOLLENDER, R. Flavour evaluation of chocolate formulated from cocoa beans from different countries. **Food Control**, Guildford, v. 6, n. 2, p. 105–110, 1995.

JOOSTEN, H. M. L. J. et al. Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 65, n. 1-2, p. 39–44, Apr. 2001.

KLICH, M. A.; PITT, J. I. **A laboratory guide to common aspergillus species and their teleomorphs**. Commonweal: Sydney, 1988.

KLICH, M. A. **Identification of common aspergillus species**. Amsterdam: Centraalbureau Voor Schimmelcultures, 2002.

LASRAM, S. et al. Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in grapes from a Tunisian vineyard. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 114, n. 3, p. 376–379, Mar. 2007.

LEONG, S. L. et al. Australian research on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, supl. 1, p. 10–17, Sept. 2006.

LEONG, S.-L.; HOCKING, A. D.; PITT, J. I. Occurrence of fruit rot fungi (*Aspergillus* section *Nigri*) on some drying varieties of irrigated grapes. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, Amsterdam, v. 10, n. 1, p. 83–88, 2004.

LEONG, S. L.; HOCKING, A. D.; SCOTT, E. S. *Aspergillus* species producing ochratoxin A: isolation from vineyard soils and infection of Semillon bunches in Australia. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 102, n. 1, p. 124–133, Jan. 2007.

MAGAN, N.; ALDRED, D. Conditions of formation of ochratoxin A in drying, transport and in different commodities different commodities. **Food Microbiology**, London, v. 22, n. 1, p. 37–41, 2006.

MAGAN, N.; OLSEN, M. **Mycotoxins in food: detection and control**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2004.

MAGNOLI, C. et al. Mycoflora and ochratoxin-producing strains of *Aspergillus* section *Nigri* in wine grapes in Argentina. **Letters in applied microbiology**, Oxford, v. 37, n. 2, p. 179–184, 2003.

MAGNOLI, C. E. et al. Occurrence of ochratoxin A and ochratoxigenic mycoflora in corn and corn based foods and feeds in some South American countries. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 165, n. 5, p. 249–260, May 2007.

MARTÍNEZ-CULEBRAS, P. V.; RAMÓN, D. An ITS-RFLP method to identify black *Aspergillus* isolates responsible for OTA contamination in grapes and wine. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 113, n. 2, p. 147–153, Jan. 2007.

MITCHELL, D. et al. Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 97, n. 2, p. 439–445, Jan. 2004.

MOSS, M. Centenary review mycotoxins. **Mycological Research**, Cambridge, v. 100, p. 513–523, 1996.

MOUNJOUENPOU, P. et al. Filamentous fungi producing ochratoxin a during cocoa processing in Cameroon. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 121, n. 2, p. 234–241, Jan. 2008.

O'BRIEN, E.; DIETRICH, D. R. Ochratoxin A: the continuing enigma. **Critical Reviews in Toxicology**, Boca Raton, v. 35, n. 1, p. 33–60, Jan. 2005.

OPINION of the scientific panel on contaminants in the food chain of the EFSA on a request from the Commission related to ochratoxin A in food. **The EFSA Journal**, n. 365, p. 1–56, Apr. 2006.

OYETUNJI, T. Mycological evaluation of a ground cocoa-based beverage. **African Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 5, n. 22, p. 2073–2076, Nov. 2006.

PALUMBO, J. D. et al. Isolation and identification of ochratoxin A-producing *Aspergillus* section *Nigri* strains from California raisins. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 52, n. 4, p. 330–336, Apr. 2011.

PITT, J. I. Toxigenic fungi and mycotoxins. **Food Science**, Austrália, v. 56, n. 1, p. 184–192, 2000.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. London: Blackie Academic & Professional, 1997.

R CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna: Foundation for Statistical Computing, 2013.

RILEY, R.; NORRED, W. Mycotoxin prevention and decontamination: a case study on maize. **Food, Nutrition and Agriculture**, Georgia, v. 23, p. 25–32, 1999.

SAGE, L.; GARON, D.; SEIGLE-MURANDI, F. Fungal microflora and ochratoxin A risk in French vineyards. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 18, p. 5764–5768, Sept. 2004.

SAMSON, R. A. et al. **Introduction to Food- and Airborne Fungi**. Netherlands: CBS, 2002.

SAMSON, R. A. et al. **Introduction to food and airborne fungi**. 4. ed. Netherlands: ACM Press, 2000.

SAMSON, R. A. et al. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. **Studies in Mycology**, Oxford, v. 50, p. 45–61, 2004.

SÁNCHEZ-HERVÁS, M. et al. Mycobiota and mycotoxin producing fungi from cocoa beans. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 125, n. 3, p. 336–340, July 2008.

SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. **Critical reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 44, n. 4, p. 205–21, Jan. 2004.

SERRA, R. et al. *Aspergillus ibericus* : a new species of section Nigri isolated from grapes. **Mycologia**, Lancaster, v. 98, n. 2, p. 295–306, Mar./Apr. 2006a.

SERRA, R. et al. Influence of the region of origin on the mycobiota of grapes with emphasis on *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Microbiology Research**, Cambridge, v. 110, n. 8, p. 971–978, Aug. 2006b.

SERRA, R.; BRAGA, A.; VENÂNCIO, A. Mycotoxin-producing and other fungi isolated from grapes for wine production, with particular emphasis on ochratoxin A. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 156, n. 4, p. 515–521, May 2005.

TAFURI, A.; FERRACANE, R.; RITIENI, A. Ochratoxin A in Italian marketed cocoa products. **Food Chemistry**, London, v. 88, n. 4, p. 487–494, Dec. 2004.

TANIWAKI, M. H. et al. Growth and mycotoxin production by food spoilage fungi under high carbon dioxide and low oxygen atmospheres. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 132, n. 2-3, p. 100–108, June 2009.

TANIWAKI, M. et al. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 82, n. 2, p. 173–179, Apr. 2003.

WAGACHA, J. M.; MUTHOMI, J. W. Mycotoxin problem in Africa: current status, implications to food safety and health and possible management strategies. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 124, n. 1, p. 1–12, May 2008.

WOOD, G. A. R.; LASS, R. A. **Cocoa**. 4. ed. New York: Longman Scientific and Technical, 1985.

## CONSIDERAÇÕES GERAIS

O Brasil é o sexto maior produtor mundial de amêndoas de cacau tendo como terceiro maior produtor nacional, o estado de Rondônia. A contaminação das amêndoas de cacau por fungos e consequentemente micotoxinas é de grande preocupação para os países produtores e isso tem exigido interação significativa e cooperação entre pesquisadores de todo o mundo, a fim de reduzir os riscos de ocratoxina A (OTA) e aflatoxinas (AFs) em amêndoas de cacau. A legislação brasileira implementada em fevereiro de 2011 para os limites máximos toleráveis (LMT) para micotoxinas em alimentos tem exigido compreender os requisitos fundamentais para minimizar a exposição dos consumidores as micotoxinas.

Este estudo traz dados de fungos isolados de amêndoas de cacau do estado de Rondônia e seu potencial toxigênico. Foram analisados dados de coordenadas geográficas (longitude e latitude) e de temperatura do estado de Rondônia e relacionados com os níveis de contaminação por espécies de fungos toxigênicos e não toxigênicos pertencentes ao gênero *Aspergillus* em amêndoas de cacau, bem como a influência de práticas do processamento primário (fermentação, secagem, armazenamento) no favorecimento de espécies fúngicas.

Os resultados obtidos neste estudo sugerem um risco de contaminação das amêndoas de cacau, processadas no estado de Rondônia, por micotoxinas uma vez que foram isolados e identificados fungos potencialmente toxigênicos (*Aspergillus carbonarius*, *A. niger* e *A. flavus*). Cuidados para evitar a contaminação de amêndoas de cacau por estes fungos e consequentemente a produção de micotoxinas devem ser tomados durante o processamento primário. Práticas de fermentação, secagem e controle de temperatura e umidade durante o armazenamento das amêndoas devem ser mais profundamente exploradas e orientações a respeito das práticas que originam amêndoas de cacau de melhor

qualidade microbiológica repassadas aos produtores, bem como a conscientização dos problemas resultantes da contaminação de amêndoas por micotoxinas.

Este estudo demonstrou maior probabilidade de ocorrência de fungos totais nos municípios do estado de Rondônia localizados entre os paralelos de 11° e 13° de latitude Sul e meridianos de 60° e 62° de longitude Oeste, confirmando o efeito da localização geográfica e temperatura na incidência de fungos do gênero *Aspergillus*, porém as práticas de processamento primário exercem influência sobre a incidência de fungos em amêndoas de cacau. Os fungos toxigênicos mostraram distribuição homogênea, sendo isolados de amêndoas de cacau provenientes dos municípios Ariquemes, Buritis, Cacoal, Colorado do Oeste, Governador Jorge Teixeira, Jaru, Machadinho d'Oeste, Ouro Preto do Oeste, São Felipe d'Oeste e Urupá.

Algumas questões-chave ainda devem ser respondidas para minimizar a contaminação por micotoxinas em amêndoas de cacau. Sugere-se (a) identificar as áreas geográficas com risco de micotoxinas; (b) caracterizar o ciclo de infecção e ecologia dos fungos toxigênicos isolados nos locais que produzem amêndoas de cacau; (c) otimizar métodos para controle de campo, como por exemplo, através de fungicidas; (d) criar sistemas de informação geográficas e mapas de risco para apoio dos produtores e pesquisadores, (e) taxonomia, diagnóstico e identificação molecular e quantificação das espécies micotoxigênicas por região; (f) estudar detalhadamente cada fase de processamento pós-colheita e o destino das micotoxinas durante o processamento industrial para obtenção do chocolate.

Este estudo vem ressaltar a importância de mais pesquisas a respeito da contaminação das amêndoas de cacau por micotoxinas, bem como detectar a etapa crítica de contaminação na cadeia produtiva do cacau no estado de

Rondônia, pois estas se relacionam com perdas econômicas e problemas de saúde pública.

**APÊNDICE****Questionário sobre a caracterização das fazendas de cultivo de cacau**

Nome da fazenda: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Proprietário: \_\_\_\_\_

Data da coleta da amostra: \_\_\_\_\_

1) A plantação de cacau sofre ataque de pragas/doenças? ( ) Sim ( ) Não

2) Há separação do cacau doente e sadio? ( ) Sim ( ) Não

3) Como é realizada a fermentação e por quantos dias?

( ) Montões: \_\_\_\_\_

( ) Caixas: \_\_\_\_\_

( ) Outro: \_\_\_\_\_

4) Como é realizada a secagem e por quantos dias?

( ) Secagem natural: \_\_\_\_\_

( ) Secagem artificial: \_\_\_\_\_

( ) Secagem natural + secagem artificial: \_\_\_\_\_

( ) Outro: \_\_\_\_\_

5) Quais são as condições do local em que é realizada a secagem? \_\_\_\_\_

6) Quais são as condições do local de armazenamento? \_\_\_\_\_

7) Por quanto tempo as amêndoas coletadas ficaram armazenadas na fazenda depois de secas \_\_\_\_\_

8) Quais as condições do local de armazenamento das amêndoas de cacau?

\_\_\_\_\_