



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**MARIA DO SOCORRO SOUZA RIBEIRO**

**EFICIÊNCIA DO HIPOCLORITO DE SÓDIO E ÁCIDO PERACÉTICO SOB  
*Aspergillus nomius* NA CASTANHA-DO-BRASIL.**

Belém-PA  
2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**MARIA DO SOCORRO SOUZA RIBEIRO**

**EFICIÊNCIA DO HIPOCLORITO DE SÓDIO E ÁCIDO PERACÉTICO SOB  
*Aspergillus nomius* NA CASTANHA-DO-BRASIL.**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de mestre

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Consuelo Lúcia Sousa de Lima

Belém-PA  
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará

Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

R484e Ribeiro, Maria do Socorro Souza  
Eficiência do hipoclorito de sódio e do ácido peracético sob  
*Aspergillus nomius* na castanha-do-Brasil. / Maria do Socorro Souza  
Ribeiro. — 2019.  
70 f. : il.

Orientador(a): Profª. Dra. Consuelo Lúcia Sousa de Lima Sousa  
Coorientação: Profª. Dra. Laura Figueiredo Abreu  
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em  
Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Tecnologia,  
Universidade Federal do Pará, Belém, 2019.

1. aflatoxinas. 2. castanhas. 3. sanitizantes. I. Título.

CDD 607.281

---



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

MARIA DO SOCORRO SOUZA RIBEIRO

DATA DA AVALIAÇÃO: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

CONCEITO: \_\_\_\_\_

**Banca examinadora:**

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Consuelo Lúcia Sousa de Lima  
FEA/ITEC/UFPA- Orientadora

---

Dr<sup>ª</sup>. Laura Figueiredo Abreu  
EMBRAPA- Co-orientadora

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Silvia Helena Marques da Silva  
MS/IEC/ Bacteriologia e Micologia- Membro Externo

---

Prof<sup>º</sup>. Dr. Nelson Rosa Ferreira  
FEA/ITEC/UFPA- Membro Interno

Belém-PA  
2019

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter permitido a conclusão de mais esta etapa na minha formação profissional e por todas as oportunidades concedidas ao longo da minha vida. As dificuldades aparecem, mas a confiança em Deus torna possível a superação.

À minha orientadora Professora Dr<sup>a</sup>. Consuelo Sousa, que tem me acompanhado desde a graduação e sempre tem acreditado no meu trabalho. Muito obrigada, por todos os ensinamentos, pelo apoio, incentivo, carinho e amizade. A senhora é uma inspiração como pessoa e profissional. Serei eternamente grata por tudo.

A minha Co-orientadora Dr<sup>a</sup> Laura Abreu, por ter confiado a mim o desenvolvimento deste trabalho e por todo apoio dedicado.

A Dr<sup>a</sup> Silvia Marques, seu apoio foi essencial para a realização deste trabalho. Muito obrigada, por toda a ajuda e ensinamentos, sou muito grata a Deus por ter colocado a senhora no meu caminho, que ele possa retribuí-la por ser essa pessoa incrível. Agradeço também a todos do Laboratório de Micologia do Instituto Evandro Chagas, Jordana, Helen, Elane, Denise, Rubens, Patrícia e Ruan.

Ao Professor Dr. Eder Araújo e ao Professor Dr. Jesus Souza pela ajuda nos tratamentos estatísticos.

Ao Instituto Evandro Chagas pela oportunidade de estágio e por toda estrutura oferecida.

À Universidade Federal do Pará (UFPA) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA). À capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo apoio financeiro na realização desta pesquisa.

Aos meus pais, Maria das Graças e Afonso Ribeiro por todo o apoio incondicional e por nunca medirem esforços para que eu pudesse estudar e ter as oportunidades que vocês não tiveram. Ao meu irmão Afonso Lucas pelo apoio e amizade.

A Msc. Cleidiane Araújo, por toda ajuda e palavras de motivação, paciência com as minhas dúvidas, você é uma pessoa muito especial que Deus te abençoe imensamente.

A todos os meus amigos do Laboratório de Microbiologia que são uma segunda família. Agradeço a Suely pelos ensinamentos, por toda ajuda, carinho e amizade nestes 6 anos. A Rosemary por todo apoio. A minha amiga Ana Carolina Sales que me acompanhou em todo o trabalho prático, pela paciência de lidar comigo, e por sempre me incentivar e acalmar dizendo que tudo daria certo. Aos meus amigos Bruno Cunha, Laila Moreira e Júlio Maia por toda a ajuda e pelos momentos de descontração, todos vocês são muito especiais.

Agradeço a minha amiga e companheira de mestrado Ananda LeHalle pela amizade e cumplicidade, desde a graduação sempre compartilhando comigo todos os momentos. Que Deus te abençoe você merece tudo de melhor nessa vida. A minha amiga Nayara Silva, por estar sempre presente na minha vida.

As minhas amigas Anna Paula, Giselle, Maria Caroline, Niara Silva, Karen Cunha, Rafaela Santos e Lidinei Carvalho pelo incentivo, amizade e por sempre torcerem por mim. Desejo todo sucesso e felicidade do mundo para vocês.

Muito obrigada!

## RESUMO

A castanha-do-Brasil é uma oleaginosa amazônica com elevada riqueza nutricional que frequentemente apresenta contaminação por aflatoxinas, o que representa um entrave para sua comercialização. Este trabalho teve como objetivos avaliar a eficiência dos sanitizantes hipoclorito de sódio e ácido peracético sob a microbiota natural e na redução da contaminação por *Aspergillus nomius* em castanhas-do-Brasil. Inicialmente foi feita a identificação da cepa de *Aspergillus* isolada de castanha, através de uma abordagem polifásica. Foram coletadas amostras de castanha, do município de Tomé-açu, PA, que foram divididas em 3 grupos: grupo 1- amostras para as análises microbiológicas e físico-químicas; grupo 2- amostras para quantificação de aflatoxinas; grupo 3- amostras para os testes com sanitizantes. Foi utilizada metodologia de superfície de resposta para otimizar o tempo de contato e concentração dos sanitizantes para a redução de *A. nomius* inoculado em castanhas-do-Brasil. Após a otimização, foram realizadas análises microbiológicas, sensoriais e de aflatoxinas na condição proposta. O fungo foi identificado como *Aspergillus nomius*. A avaliação microbiológica revelou elevada contaminação por bactérias ( $6,25 \log \text{ UFC / g} \pm 0,16$ ); fungos ( $6,02 \log \text{ UFC / g} \pm 0,11$ ) e *A. flavus* e *A. parasiticus* ( $3,74 \log \text{ UFC / g} \pm 0,35$ ) que está relacionada aos elevados valores de umidade (casca  $32,6 \% \pm 1,42$ ; amêndoa  $26,5\% \pm 0,90$ ) e atividade água (casca  $0,89 \pm 0,01$ ; amêndoa  $0,75 \pm 0,38$ ). Em nenhuma das amostras analisadas detectou-se aflatoxinas. A superfície de resposta e a função desejabilidade indicaram como condições ótimas, no planejamento proposto (8,5 minutos/ 250 mg / L) e (15 minutos /140 mg / L) para o hipoclorito e ácido peracético, respectivamente. Sob a flora microbiana natural das castanhas, os dois sanitizantes reduziram menos de 2 log UFC /g. Os sanitizantes não tiveram ação sob aflatoxinas, sendo eficientes somente para controle de fungos. Os tratamentos não causaram impacto sensorial inaceitável nas amostras, não foi detectada diferença significativa entre as amostras não tratadas e as tratadas.

**Palavras-chaves:** aflatoxinas, castanha, sanitizantes.

## ABSTRACT

Brazil nut is an Amazonian oilseed with high nutritional richness that frequently presents aflatoxin contamination, which represents an obstacle to its commercialization. The aim of this work was to evaluate the efficiency of the sanitizers sodium hypochlorite and peracetic acid on the natural microbiota and the reduction of *Aspergillus nomius* contamination in Brazil nuts. Initially the identification of the *Aspergillus* strain isolated from Brazil nuts was done through a polyphasic approach. The nut samples were collected from the city of Tomé-açu (PA) and were divided into 3 groups: group 1 - samples for the microbiological and physicochemical analyzes; group 2 - samples for quantification of aflatoxins; group 3 - samples for sanitizing tests. Response surface methodology was used to optimize contact time and sanitizers concentration for the reduction of *A. nomius* inoculated in Brazil nuts. After the optimization, microbiological, sensorial and aflatoxin analyzes were performed in the proposed condition. The fungus was identified as *Aspergillus nomius*. Microbiological evaluation revealed high bacterial contamination ( $6.25 \log \text{CFU/g} \pm 0.16$ ); fungi ( $6.02 \log \text{CFU} / \text{g} \pm 0.11$ ) and *A. flavus* and *A. parasiticus* ( $3.74 \log \text{CFU} / \text{g} \pm 0.35$ ) which is related to the high moisture content (peel  $32.6 \% \pm 1.42$ ; nut  $26.5\% \pm 0.90$ ) and water activity (peel  $0.89 \pm 0.01$ ; nut  $0.75 \pm 0.38$ ). None of the analyzed samples detected aflatoxins. The response surface and the desirability function indicated optimum conditions in the proposed planning (8.5 minutes / 250 mg / L) and (15 minutes / 140 mg / L) for hypochlorite and peracetic acid, respectively. On the natural microbial flora of the nuts, the two sanitizers reduced less than 2 log CFU/g. The sanitizers had no action on aflatoxins, being efficient only for fungi control. The treatments did not cause unacceptable sensorial impact in the samples, no significant difference was detected between the untreated and treated samples.

**Keywords:** Aflatoxins, Brazil nuts, sanitizers.



## LISTA DE TABELAS

### CAPITULO 2

<b>Tabela 1.</b> Potencial aflatoxigênico do isolado fúngico.....	37
---	----

### CAPITULO 3

<b>Tabela 1.</b> Níveis utilizados no delineamento experimental para a sanitização de castanha-do-Brasil com os sanitizantes hipoclorito de sódio e ácido peracético.....	45
<b>Tabela 2.</b> Resultados dos ensaios para otimização da aplicação de hipoclorito de sódio e ácido peracético para a redução de <i>A.nomius</i> inoculado em castanhas-do-Brasil.....	47
<b>Tabela 3.</b> Coeficientes de regressão, valores F da ANOVA, níveis de probabilidade dos parâmetros (p), coeficiente de determinação (R <sup>2</sup> ) do modelo de RD de <i>A. nomius</i> utilizando hipoclorito de sódio como sanitizante.....	48
<b>Tabela 4.</b> Coeficientes de regressão, valores F da ANOVA, níveis de probabilidade dos parâmetros (p), coeficiente de determinação (R <sup>2</sup> ) do modelo de RD de <i>A. nomius</i> utilizando ácido peracético como sanitizante.....	49
<b>Tabela 5.</b> Resultados das análises microbiológicas da superfície de amostras de castanha-do-Brasil e da redução microbiológica nas condições ótimas de aplicação dos sanitizantes hipoclorito de sódio e ácido peracético.....	51
<b>Tabela 6.</b> Resultados da análise sensorial de amostras de castanha-do-Brasil nas condições ótimas de aplicação dos sanitizantes hipoclorito de sódio e ácido peracético.....	51

## LISTA DE FIGURAS

### CAPITULO 1

**Figura 1.** Estruturas das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2..... 14

### CAPITULO 2

**Figura 1.** Microcultivo em placa de Petri contendo ágar Lactrimel do isolado fúngico de *Aspergillus* seção *Flavi*. Fonte: autor..... 32

**Figura 2.** A. Aspecto macroscópico colonial do isolado fúngico de *Aspergillus* seção *Flavi* semeado em Ágar Lactrimel. B. Aspectos Microscópicos..... 35

### CAPITULO 3

**Figura 1.** Superfície de respostas para os modelos de redução de *A. nomius* em função das condições de tempo de contato e concentração dos sanitizantes. A. hipoclorito de sódio. B ácido peracético..... 49

**Figura 2.** Condições ótimas para aplicação de hipoclorito de sódio (A) e ácido peracético (B) na superfície de castanhas-do-Brasil..... 50

## SUMÁRIO

### CAPÍTULO I

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
2 OBJETIVOS.....	2
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
3.1 CASTANHA-DO-BRASIL.....	5
3.2 CADEIA PRODUTIVA DA CASTANHA-DO-BRASIL.....	5
3.2.1 Beneficiamento da castanha-do-Brasil.....	6
3.3 CONTAMINAÇÃO DAS CASTANHAS-DO-BRASIL.....	7
3.3.1 Gênero <i>Aspergillus</i> .....	9
3.3.2 <i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> e <i>A. nomius</i> .....	10
3.3.3 <i>Micotoxinas</i> .....	12
3.4 Tratamento químico para descontaminação das castanhas-do-Brasil.....	15
3.4.1 Hipoclorito de sódio.....	16
3.4.2 Ácido Peracético.....	17
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19

### CAPITULO 2

<b>ARTIGO</b> Abordagem polifásica na identificação de uma cepa de <i>Aspergillus</i> seção <i>Flavi</i> isolada de castanha-do-Brasil.....	<b>28</b>
---	-----------

### CAPITULO 3

<b>ARTIGO</b> Eficiência do hipoclorito de sódio e ácido peracético sob <i>Aspergillus nomius</i> em castanha-do-Brasil.....	<b>39</b>
--	-----------

## INTRODUÇÃO

A castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*, H.B.K) é uma importante espécie de exploração extrativista da Amazônia. As amêndoas de castanha apresentam sabor agradável e elevado valor nutritivo que promovem benefícios à saúde e tem contribuído para o reconhecimento deste produto no mercado internacional. Contudo, por conta das condições precárias de armazenamento e processamento a castanha está sujeita a contaminações.

Dentre os micro-organismos associados à esta contaminação, os fungos merecem destaque, visto que, diversos estudos discorrem sobre a ocorrência de espécies produtoras de aflatoxinas, dentre eles *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius*, que são pertencentes a seção *Flavi*, produtores de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>. As aflatoxinas são um grupo de metabólitos secundários extremamente tóxicos e cancerígenos que podem contaminar os alimentos no campo, no armazenamento ou após o processamento (ARRUS et al 2005; BAQUIÃO et al., 2012; TANIWAKI et al., 2016).

*Aspergillus nomius* é um dos três membros mais importantes da seção *Flavi*, que apresenta a capacidade de produzir os quatro tipos de aflatoxinas, tem sido frequentemente associado a contaminação de diversos alimentos como milho, trigo, cana-de-açúcar e nozes, além de ser definido como um potencial contaminante da castanha-do-Brasil (MOORE et al., 2015). A castanha está entre os alimentos com maior índice de contaminação por aflatoxinas, o que tem prejudicado as exportações para a União Européia (FAO, 2009; BAQUIÃO et al., 2016).

Como a castanha-do-Brasil é uma noz obtida diretamente da floresta, as Boas Práticas de Higiene (BPH), são uma exigência, principalmente para castanhas que serão consumidas sem nenhum processo válido de conservação (ICMSF, 2015). Estratégias para a redução da contaminação das castanhas que não comprometam suas características nutricionais e sensoriais tem se mostrado necessárias.

O controle de aflatoxinas em castanhas-do-Brasil concentra-se principalmente em impedir o crescimento dos fungos aflatoxigênicos, conseqüentemente, o processo de sanitização atende a estes requisitos, visto que quando aplicada de maneira correta, desempenha importante papel na minimização da deterioração e na manutenção da qualidade do produto (PAS, 2004; GIL, et al., 2009). Os compostos clorados são os mais utilizados para a sanitização de alimentos. Entre estes, o hipoclorito de sódio, tem sido amplamente empregado para sanitização de vegetais minimamente processados, apesar de sua eficiência

ser reduzida pela presença de matéria orgânica (FUKUZAKI, 2006; FINTEN et al., 2017). Além deste problema, a possível formação de compostos clorados cancerígenos na água tem suscitado uma constante preocupação com a utilização do hipoclorito de sódio no processamento de alimentos (HAHN, et al., 2014).

Uma das medidas alternativas ao uso do cloro consiste na utilização de ácidos orgânicos, como ácido cítrico, ácido lático ou ácido peracético (PAA) (OLMEZ e KRETZCHMAR, 2009). O ácido peracético é uma mistura de ácido acético e peróxido de hidrogênio, caracterizado como um desinfetante que possui efeitos antimicrobianos contra um amplo espectro de bactérias, vírus e fungos, e tem sido usado para controlar bactérias em alimentos, utensílios e equipamentos (KITIS, 2004; KING et al., 2005; OLMEZ e KRETZSHMAR, 2009; WARBURTON, 2014).

O ácido peracético é esporicida em baixas temperaturas e continua efetivo na presença de material orgânico, seu elevado potencial biocida aliado a ausência de formação de resíduos tóxicos o torna de especial interesse para a indústria de alimentos (TAO, W et al., 2015). Desde 2001, a FOOD AND DRUG ADMINISTRATION em seu regulamento §173.315 aprova a utilização do ácido para a lavagem e sanitização de vegetais, desde que sejam respeitados o limite de 80 mg/ L (FDA, 2001; 2017).

Neste contexto, a proposta da descontaminação da superfície das castanhas-do-Brasil através de aplicação dos sanitizantes, pode ser caracterizada como uma alternativa de fácil aplicação e baixos custos para o controle microbiológico, destacando a possibilidade de inclusão de uma etapa de sanitização no processamento da castanha-do-Brasil.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Avaliar a eficiência dos sanitizantes hipoclorito de sódio e ácido peracético sob a microbiota natural e na redução da contaminação por *Aspergillus nomius* em castanhas-do-Brasil.

### 2.2 Específicos

- Avaliar a contaminação microbiológica superficial de castanhas através de contagens de bactérias aeróbias mesófilas, fungos totais, *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* e quantificação de aflatoxinas;
- Definir condições ideais de tempo de contato e concentração do hipoclorito de sódio e ácido peracético aplicados por imersão para redução de *Aspergillus nomius* inoculado em castanhas-do-Brasil;
- Avaliar o efeito dos tratamentos com hipoclorito de sódio e ácido peracético nas condições ótimas de tempo e concentração sob a contaminação natural das superfícies de castanhas-do-Brasil;
- Avaliar o efeito dos tratamentos com hipoclorito de sódio e ácido peracético nas condições ótimas de tempo e concentração sob a qualidade sensorial das castanhas-do-Brasil;

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 CASTANHA-DO-BRASIL

A castanha-do-Brasil ou simplesmente castanha (*Bertholletia excelsa* H. & B. k, família *Lecythidaceae*) é uma espécie nativa da região amazônica. O fruto da castanha é conhecido mundialmente como castanha-do-Brasil (*brazil nut*), entretanto no Brasil, o fruto é popularmente chamado de castanha-do-Pará (SOUZA et al., 2008). A área de ocorrência da castanha estende-se a Bolívia, Peru e Brasil, até o escudo das Guianas, compreendendo o Suriname, as Guianas e o sul da Venezuela, na região do Rio Negro (LORENZI, 2010).

A região Norte do país tem representado 99% no total de produção brasileira, e os principais estados produtores são os Estados do Amazonas, Pará e Acre, responsáveis por 80% do volume produzido, seguido em menores quantidades, por Rondônia, Amapá, Tocantins e Roraima (BAYMA et al., 2014).

No Pará os municípios de Oriximiná e Óbidos localizados na mesorregião do baixo Amazonas destacam-se na produção de castanhas-do-Brasil, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, sendo que dos 20 principais municípios produtores do país, oito são do Acre; oito, do Amazonas; três, do Pará; e um, de Rondônia, juntos, eles foram responsáveis por 68,6% do total nacional em 2015 (IBGE, 2015).

A espécie desenvolve-se bem em áreas de terra firme, em solos argilosos ou argilo-arenosos, com temperatura média anual variando entre 24 e 27°C, com máximas de 31 a 33°C e mínimas de 19 a 23°C. Nas regiões de produção, a umidade relativa varia entre 79 a 86% e precipitação total anual entre 1400 e 2800 mm (PAS, 2004).

A castanha apresenta grande porte, podendo atingir mais de 50 metros de altura. Esta característica dificulta a realização da colheita dos frutos (ouriços) nas árvores. O fruto da castanha-do-Brasil é popularmente denominado de ouriço, de forma esférica ou capsular, contém em seu interior em média de 12 a 24 castanhas ou sementes, as quais envolvem as amêndoas comestíveis conhecidas mundialmente como castanha-do-Brasil, *Brazil nut* ou castanha-do-Pará. Os ouriços não abrem espontaneamente e demoram cerca de 14 meses até o completo amadurecimento (YANG, 2009). Na região Oeste do Brasil, mais especificamente, no estado do Acre as árvores florescem antes que na região Leste, no Pará, sendo de novembro a março o período em que os frutos caem da copa da castanha, com o pico da queda nos meses de dezembro a janeiro (WADT et al., 2005)

### 3.2 CADEIA PRODUTIVA DA CASTANHA-DO-BRASIL

A castanha-do-Brasil teve grande importância na formação econômica, social e política da Amazônia, e está entre os produtos mais comercializados no mercado nacional e de exportação. O extrativismo e o beneficiamento das amêndoas sustentam inúmeras comunidades da Amazônia e movimentam suas economias regionais, ao mesmo tempo em que promovem a conservação da floresta (SÁ et al., 2008; HOMMA, 2012).

O Decreto Federal Nº 5.975, de 30 de novembro de 2006 proíbe a exploração da castanheira para fins madeireiros em florestas naturais, primitivas ou regeneradas (BRASIL, 2006). O sistema de produção da castanha por ser predominantemente extrativista em mata nativa, não envolve investimentos tecnológicos no processo de coleta, amontoa dos ouriços e quebra das castanhas na unidade produtiva e transporte imediato para armazéns adequados ou diretamente para a indústria de beneficiamento (PAS, 2004).

A mão de obra utilizada na coleta é basicamente familiar, a coleta é realizada em grupo, os ouriços são amontoados e a divisão ocorre na hora da quebra. No Pará, na região de rios do município de Oriximiná, a coleta é feita predominantemente por comunidades de remanescentes quilombolas, em Óbidos, o extrativismo é feito por comunidades oriundas de assentamentos do Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária (INCRA) e por comunidades tradicionais (SILVA et al., 2013).

Após amontoados, independentemente do local, a maioria dos extrativistas quebra os ouriços com terço, foice ou machado, logo após a coleta; somente uma minoria quebra os ouriços dias depois da coleta. O transporte das amêndoas compreende a etapa no interior da floresta, de onde foram quebrados os ouriços, até a primeira via de melhor acessibilidade, terrestre ou fluvial (SILVA et al., 2013).

Pode ser realizada a lavagem das castanhas, esta prática é pouco comum, pode acontecer em seringais / castanhais localizados próximos a rios e igarapés. As castanhas são lavadas para a retirada de impurezas. Entretanto se a secagem posterior não for eficiente pode resultar em aumento do teor de umidade da castanha, favorecendo o desenvolvimento de fungos aflatoxigênicos (PAS, 2004).

O armazenamento das amêndoas nos municípios de Óbidos é feito na própria residência, em razão de as áreas estarem mais próximas, praticamente toda a coleta é tirada da floresta após a quebra. Em Oriximiná, as amêndoas podem permanecer armazenadas na floresta por um tempo de até 5 meses, período de safra, o armazenamento fora da floresta



geralmente é feito em paióis ou depósito, com acondicionamento em sacas ou a granel (SILVA et al., 2013).

### 3.2.1 Beneficiamento da castanha-do-Brasil

Um dos principais objetivos do processamento das castanhas-do-Brasil é a adequação dos níveis de contaminação por aflatoxinas a níveis aceitáveis para a comercialização, principalmente no mercado exterior que costuma ser mais exigente (PACHECO e SCUSSEL).

Para isso, no processamento das castanhas-do-Brasil é realizado a secagem como tratamento térmico que tem como principal finalidade a redução da atividade de água, método eficaz no controle da produção de fungos e produção de aflatoxinas (PACHECO e SCUSSEL, 2007; VARGA et al., 2011).

Na recepção é feita a pesagem e uma avaliação visual das castanhas para mensuração da qualidade do produto. A pesagem é necessária para que se tenha uma idéia exata da quantidade a ser industrializada, desde a quantidade a ser colocada na autoclave, até o resfriamento final do processo (SEBRAE, 2007).

Em algumas agroindústrias é realizado o processo de lavagem, feito por imersão da castanha-do-brasil ainda com casca em água potável a temperatura ambiente. A finalidade desta etapa é a remoção do excesso de matéria orgânica, partículas de solo, folhagens que ainda estejam aderidas as castanhas além de ajudar na identificação de castanhas chonchas, por diferença de densidade (flutuação). No Manual de Segurança e Qualidade para a Cultura da castanha-do-brasil é recomendada a troca da água com teor de cloro de 0,5 a 0,8 ppm, não sendo especificado o período para a troca da água (PAS, 2004).

Em seguida as castanhas passam por secagem preliminar, que pode ser realizada de forma natural através da exposição ao sol ou com o auxílio de secadores artificiais (COSTA, 2012). O controle da umidade inibe o crescimento de micro-organismos, um limite de segurança na umidade de 13% a 15% é recomendado pelo *Codex Alimentarius* (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2006).

Depois de secas, as castanhas passam por uma pré-seleção manual para a retirada de sementes visualmente danificadas ou mofadas (PAS, 2004). Posteriormente, é realizado o tratamento térmico que pode ser feito por imersão em tanques com água em temperatura de 100°C por 1 a 2 minutos ou através de autoclavagem em temperatura de 250 °C por 2 a 5

segundos. O tratamento térmico tem como objetivo a preparação para o descascamento, pois infla o tamanho da casca e facilita a quebra, evitando danos nas amêndoas (PACHECO; SCUSSEL, 2007).

O processo de quebra é realizado através de prensas manuais. Em seguida as amêndoas são selecionadas e classificadas de acordo com sua integridade e tamanho. A classificação pode ser realizada através de equipamento específico ou manualmente (SOUZA; CARTAXO; LEITE, 2004; MARTINS; SILVA; SILVEIRA, 2008).

Após esse procedimento, as amêndoas são novamente submetidas a secagem em estufas para a redução da umidade para a faixa de 4 a 10% sob temperatura de 60°C. Finalizada a etapa de desidratação as amêndoas são pesadas e embaladas, ou destinadas para processos de obtenção de óleo e outros subprodutos (PACHECO; SUCCEL, 2007; OURO VERDE AMAZONIA, 2014).

### 3.3 CONTAMINAÇÃO DAS CASTANHAS-DO-BRASIL

A contaminação das castanhas-do-Brasil pode iniciar nas árvores, através do ataque de animais que podem danificar os ouriços e ainda deixar inóculos de fezes, regurgitações e saliva contribuindo para o aumento da microbiota. Ao cair das árvores, os ouriços seguem amontoados no solo da floresta, outra importante via de contaminação. O armazenamento de forma inadequada nas comunidades, durante o transporte e nas indústrias, constituem-se fatores importantes para o desenvolvimento de diversos micro-organismos dentre eles fungos e bactérias (REIS et al., 2012).

Segundo Taniwaki (2016) a forma como os ouriços de castanha e as amêndoas são armazenadas pode ser considerado um ponto crítico para a qualidade das castanhas, pois independente da contaminação inicial das amêndoas, de acordo com a forma e duração, haverá maior ou menor possibilidade de desenvolvimento de fungos produtores de aflatoxinas.

Os fungos são o grupo de maior interesse por conta da capacidade de produzir micotoxinas, destacando as espécies do gênero *Aspergillus* que são potenciais produtoras de micotoxinas, denominadas aflatoxinas. Esta informação é importante sob dois aspectos: Os fungos por serem deterioradores promovem a alteração sensorial do produto, levando a rejeição no mercado e além disso, a questão de saúde pública, de maior relevância tendo em

vista seu potencial de toxinfecção alimentar a longo ou curto prazo (LEITE et al. 2002; PEREIRA et al., 2002).

De acordo com Baquião et al., (2013) as castanhas-do-Brasil são substratos altamente susceptíveis a contaminação por fungos produtores de aflatoxinas, o estudo destaca a etapa de permanência dos ouriços em contato com solo como principal via de contaminação das castanhas-do-Brasil.

A contaminação por fungos produtores de aflatoxinas também é considerada elevada nas usinas de beneficiamento, mesmo com a adoção de medidas como o descascamento e a seleção visual das amêndoas, dentre outros procedimentos para a redução dos níveis de contaminação não é possível afirmar, após o beneficiamento, se a castanha está ou não contaminada por aflatoxina, o que poderá desencadear a necessidade de modificações no processo de produção (MARKLINDER et al. 2005; BAQUIÃO, 2012).

Em 2003, o mercado europeu, rejeitou vários lotes de castanhas-do-Brasil que apresentaram níveis de aflatoxinas superiores aos estabelecidos em sua regulamentação. Desde então muitas pesquisas vêm sendo realizadas com foco nas aflatoxinas e nos fungos aflatoxigênicos, tendo como objetivos a redução da contaminação e adequação do produto aos limites preconizados (EMBRAPA, 2009; MIDORIKAWA, 2009, TANIWAKI, 2016).

Apesar das amêndoas de castanha-do-Brasil serem apreciadas internacionalmente, as barreiras fitossanitárias contribuíram para uma redução significativa no número de exportações. No período de 2008 e 2009 a exportação de castanha com casca chegou a 21.783.272 kg, já em 2010 e 2011 esses valores caíram para 941.746 kg (SECEX, 2012).

Em 2010, a normativa nº165/2010 da Comissão Europeia, trouxe especificações mais tolerantes para as importações de castanha-do-Brasil, com valores de 8 µg/kg para a aflatoxina B1, e 15 µg/kg para aflatoxinas totais em amêndoas de castanha-do-brasil com casca. Para amêndoas destinadas ao consumo direto, o limite é de 10 µg/kg de aflatoxinas totais, e 5 µg/kg para a aflatoxina B1 (UE, 2010).

Em 18 de fevereiro de 2011 foi sancionada a RDC nº 7, a qual estabelece limite de aflatoxinas totais para diversos substratos produzidos no Brasil, incluindo a castanha-do-Brasil. Foram considerados limites máximos de 20, 10 e 15 (µg/kg) para castanhas-do-Brasil destinadas ao consumo direto com casca, consumo direto sem casca e ao processamento posterior sem casca respectivamente (BRASIL, 2011).

A criação desta norma representou um grande avanço, devido ao risco de lotes que foram rejeitados no exterior serem comercializados no mercado brasileiro ter sido diminuído,

garantindo uma maior qualidade do produto e a segurança alimentar do consumidor brasileiro. As castanhas que são comercializadas nos supermercados brasileiros e as que são exportadas apresentam baixos níveis de aflatoxinas (TANIWAKI, 2016).

### 3.3.1 Gênero *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* foi descrito pela primeira vez em 1729 pelo botânico italiano Micheli, em seguida os autores Tom e Church em 1926, publicaram a primeira monografia sobre o gênero, as espécies pertencentes a esse gênero ficaram cada vez mais conhecidas e passou a ser um dos grandes gêneros de fungos estudados. Uma descrição completa sobre o gênero foi realizada por Rapper e Fennel em 1965, onde foi reconhecido cerca de 132 espécies e 18 variedades (GEISER et al., 2007; BENNETT, 2010).

O gênero *Aspergillus* compreende mais de 200 espécies, e embora esse gênero tenha sido estudado desde 1729, sua sistemática está em constante fluxo, até a década de 90 somente características morfológicas como: diâmetro, cor e textura das colônias, tamanho dos conídios e estrutura do conidióforo eram suficientes para a identificação de uma espécie (KLICH et al., 2002). Porém, novos estudos têm relatado a importância de uma abordagem polifásica, que consiste na combinação de diferentes ferramentas, como por exemplo, caracterização morfológica, bioquímicas e moleculares, produção de metabólitos para a identificação de uma espécie do gênero *Aspergillus* (SAMSON; VARGA et al., 2009; MOORE et al., 2015).

Quanto a morfologia do gênero, as colônias apresentam uma ampla variação na coloração, sendo encontradas colônias com colorações em tons de verde, amarelo, cinza, marrons, preto, e branco. As espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* podem ser divididas em seções: *Flavi*, *Circumdat*, *Nigri*, *Restricti*, *Fumigatti*, *Cervini*, *Clavati*, *Nidulantes*, *Flavipedes*, *Versicolores*, *Usti*, *Terrei*, *Candidi*, *Cremeri*, *Sparsi* e *Wentili* (KLICH, 2002; VARGA et al., 2004).

As espécies micotoxigênicas ocorrem em três seções do gênero *Aspergillus*, que são às seções *Circumdati*, *Flavi* e *Nigri*, entres estas, a seção *Flavi* apresenta o maior número de produtores potenciais, merecem destaque as espécies *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. oryzae* e *A. sojae*. Dentre estes *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* receberam as principais considerações pela capacidade de produção das aflatoxinas (PITT e HOCKING, 2009).

A contaminação de castanhas-do-Brasil por *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nomius*, *Aspergillus parasiticus* e outros fungos da seção *Flavi* tem sido frequentemente relatada em trabalhos científicos. As condições climáticas da floresta amazônica e o armazenamento inadequado das castanhas favorecem o crescimento destes fungos e a produção de aflatoxinas (BAQUIÃO et al., 2013).

### 3.3.2 *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*

As espécies fúngicas *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nomius* e *Aspergillus parasiticus* são micotoxigênicas e pertencentes a seção *Flavi*, caracterizadas como espécies mais importantes deste grupo devido ao seu potencial para a produção de aflatoxinas em diferentes alimentos, com destaque a castanha-do-Brasil. Durante o seu crescimento, estes fungos produzem estruturas filamentosas denominadas hifas que secretam enzimas responsáveis pela quebra de fontes alimentares complexas, liberando pequenas moléculas que são utilizadas durante o desenvolvimento do fungo (MIDORIKAWA, 2014).

*Aspergillus flavus* é um dos fungos mais abundantes na terra, seu reservatório natural é o solo, caracterizado como saprófita, a espécie é capaz de utilizar várias fontes de nutrientes orgânicas para sua sobrevivência como restos de plantas, forragem animal, algodão, adubo, grãos armazenados, insetos mortos e carcaças de animais (KLICH, 1998). Esta espécie apresenta habilidade de sobreviver a temperaturas entre 12°C a 48°C, porém a temperatura de desenvolvimento ideal é de 28°C a 37°C (YU, 2013).

A morfologia do *A. flavus* apresenta micélio com diâmetro entre 4 e 4,5  $\mu\text{m}$ , quando cultivadas em ágar Czapek, com micélio amarelo esverdeadas e tornando-se verde escuro à medida que o micélio envelhece. A cabeça conidial é radial, transformando-se com o tempo em colunar, a vesícula é oval possuindo toda a superfície fértil. O conidióforo é longo, incolor e rugoso, e as métulas são pequenas. As filíades são pequenas e ampuliformes, os conídios são globulosos e subglobulosos, normalmente áspero e amarelo-verde, variando em tamanho de 3 a 6  $\mu\text{m}$  (MIDORIKAWA, 2014).

Durante muitos anos *A. flavus* foi descrito como o principal fungo contaminante e produtor de aflatoxinas em castanhas-do-Brasil, porém, alguns estudos têm mostrado que existem controvérsias quanto as espécies que mais contribuem para a produção de aflatoxinas neste substrato (FREITAS-SILVA e VENACIO, 2011; G. MOORE et al., 2015). De acordo com Olsen et al., (2008), *A. flavus* não é o principal produtor de aflatoxinas em castanhas-do-

Brasil, destacando como importante contaminante o *Aspergillus nomius*, espécie produtora dos quatro tipos de aflatoxinas. Esta afirmação corrobora com os resultados de Calderari et al., (2013) que estudando a contaminação de castanhas, isolou 4172 cepas de *Aspergillus* seção *Flavi* sendo 1235 destas cepas de *A. nomius*, confirmando que *A. nomius* é de fato uma fonte importante de aflatoxinas em castanha-do-Brasil.

Poucos estudos relacionados ao *A. nomius* são justificados pela crença histórica de que suas ocorrências são raras (HORN, et al., 2001; DOSTER et al., 2009). Entretanto, existem relatos que esse fungo tem uma ampla distribuição ecológica (EHRlich, et al., 2007; HORN, 2011). Assim como, exercem elevado impacto animal e humano pela contaminação por aflatoxinas de produtos agrícolas como em nozes (OLSEN, 2008). Em cultura, *A. nomius* parece similar ao *A. flavus*, então a diferenciação entre estas espécies intimamente relacionadas pode ser bastante subjetiva e aberta. Estratégias para a identificação destes fungos estão baseadas na combinação da identificação das características macroscópicas, microscópicas, biomolecular e potencial de produção de aflatoxinas (VARGA, et al., 2011; SAMSOM et al., 2014; G. MOORE et al., 2015).

Quando cultivado em ágar Czapek, o micélio de *Aspergillus nomius* apresentam como características morfológicas, diâmetro atingindo de 4 a 7 cm, após 7 dias a 25°C, coloração entre amarelo esverdeado a verde, sendo observado o escurecimento a medida que a colônia vai envelhecendo. A cabeça conidial pode ser bisseriada ou unisseriada radial. O conidióforo é incolor e rugoso. A vesícula é globosa ou subglobosa. Os conídios também são globosos e subglobosos, rugoso, variando em 3,7-8,1 µm a 4,5-6,5 µm (KURTZAN et al., 1987).

O outro principal representante do grupo, *A. parasiticus*, quando cultivado em ágar czapeck, possui colônias com diâmetro de 3,2 a 3,5 cm, a coloração de forma similar as outras espécies citadas, pode variar de amarelo a verde, tornando-se mais verde, a medida em que, as colônias amadurecem. A cabeça é radial, com hastes longas e ásperas e vesícula globosa sendo fértil em toda superfície. Dificilmente são observadas a presença de métulas, e as filíades são ampuliformes com terminações longas e amplas. Os conídios são globulosos, bastante ásperos, quase sempre mostram tecido de conectividade, variando em tamanho de 4-6 µm (SINGH et al, 1991).

Quanto a produção de metabólitos destas espécies, os isolados aflatoxigênicos de *A. flavus*, são capazes de produzir aflatoxinas B1 e B2, e frequentemente ácido ciclopiazônico. O *A. nomius*, por sua vez, é produtor das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, semelhante ao perfil de

produção aflatoxigênico do *A. parasiticus*, visto que, ambos produzem as quatro aflatoxinas e não excretam ácido ciclopiazônico (HORN et al., 1996).

### 3.3.3 Micotoxinas

As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos, de baixo peso molecular, produzidos por espécies fúngicas filamentosas, que contaminam alimentos no campo, no armazenamento ou após o processamento (MOSS, 1989). Os produtos do metabolismo primário dos fungos assim como o de outros organismos são aqueles essenciais ao seu desenvolvimento, já os secundários são formados no final da fase exponencial e não estão diretamente envolvidos no crescimento, desenvolvimento e reprodução de um organismo, entretanto, a “longo prazo” podem influenciar no metabolismo do seu produtor (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009).

Os metabólitos secundários raramente afetam ao crescimento ou reprodução do fungo sob condições laboratoriais, porém possuem papel importante na ecologia do fungo como fatores de adaptação como, proteção aos raios U.V., repelentes contra predadores, entre outros (EHRlich et al., 2010; REVERBERI et al., 2010).

A micotoxicologia moderna inicia-se com a descoberta das aflatoxinas, após a morte de um grande número de perus, na Inglaterra em 1961, que foi atribuída ao consumo de amendoim contaminado. Desde então, houve um grande impulso na pesquisa acerca destes contaminantes, surgindo importantes descobertas envolvendo o efeito imunossupressor e carcinogênico das aflatoxinas e a revelação que as aflatoxinas contaminam grãos durante o armazenamento e na pré-colheita (CARNAGHAN e SAEGEANT, 1961; WU, 2013).

As aflatoxinas são produzidas principalmente pelos fungos *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*. Por conta da prevalência do fungo *Aspergillus sp.* é a micotoxina mais disseminada no Brasil, o potencial aflatoxigênico destes fungos é distinto, *A. flavus* produz somente aflatoxinas B, enquanto *A. nomius* e *A. parasiticus* são produtores dos quatro tipos de aflatoxinas (B e G) (PRADO, 2008).

Devido ao risco que as aflatoxinas oferecem a saúde por conta da sua elevada toxicidade (CARJAVAL, 2013), muitos estudos têm investigado a sua incidência em alimentos, assim como a identificação dos fungos produtores destes metabólitos inclusive em castanhas-do-Brasil (REIS et al., 2012; BAQUIÃO et al., 2013; REIS et al., 2014). Estas

pesquisas aliadas aos constantes avanços em genômica têm possibilitado, o esclarecimento a cerca da formação de metabólitos secundários de fungos micotoxigênicos (PK CHANG, 2010; HE et al., 2018).

A via biossintética de aflatoxinas é uma das vias de metabólitos secundários de fungos micotoxigênicos mais estudada, onde a maioria dos genes têm suas funções determinadas. O cluster da aflatoxina é conservada em vários graus em diversas espécies de fungos incluindo, *A. parasiticus*, *Aspergillus ochraceoroseus*, *A. flavus var. parvisclerotigenus*, *Aspergillus toxicarius*, *A. nomius*, *Aspergillus pseudotamarii*, *Aspergillus zhaoqingensis*, *A. bombycis*, *A. rambellii*, *A. nidulans*, *A. oryzae*, *A. sojae* (AMAIKE & KELLER, 2011). Esta característica é importante, pois, a diagnose molecular específica de fungos produtores de aflatoxinas, envolve a identificação de regiões alvo da via biossintética de aflatoxinas (GEORGIANNA, 2009).

Quimicamente, as aflatoxinas são metabólitos derivados de policetídeos altamente oxigenados. Uma série de etapas oxidativas está envolvida na formação do dihidrofurano que leva à formação de uma aflatoxina. O mecanismo de produção das aflatoxinas assim como seu papel evolutivo não é totalmente compreendido, mas a síntese de uma aflatoxina pode atuar como um mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo (PASSI et al., 1984).

Tanto a produção de aflatoxinas, quanto a produção escleródica (massa compacta de hifas) podem se tratar de uma proteção contra o estresse oxidativo. Os tipos de escleródios e quantidades de aflatoxinas produzidas pelas espécies são indicativos da sua capacidade de eliminar ou neutralizar as ROS (Espécies reativas de oxigênio). Desta forma, a incapacidade de uma determinada espécie em produzir um grande número de escleródios pode ser compensada pela produção abundante de conídios, refletindo as diferenças genéticas e os mecanismos diferenciais usados por cada cepa para combater as ROS, de modo a restaurar as células fúngicas a um equilíbrio estável do estado fisiológico (PK, CHANG 2010).

Existem pelo menos 17 compostos tóxicos de aflatoxina, dentre os mais importantes se destacam as aflatoxina B1, G1, B2 e G2. Estas quatro toxinas podem ser diferenciadas através de suas fluorescências. A aflatoxina B1 (AFB1) e a aflatoxina B2 (AFB2) emitem fluorescência azul (*blue*) enquanto as aflatoxinas G1 (AFG1) e G2 (AFB2) emitem fluorescência verde (*green*). Sendo que a aflatoxina B1 (AFB1) é conhecida como agente natural que representa maior risco a saúde, devido a sua elevada hepatotoxicidade e alto potencial carcinogênico (MARKLINDER et al 2005; VEIGA et al., 2009, CARVAJAL, 2013). A Figura 1 apresenta as estruturas das aflatoxinas B1; B2; G1e G2.



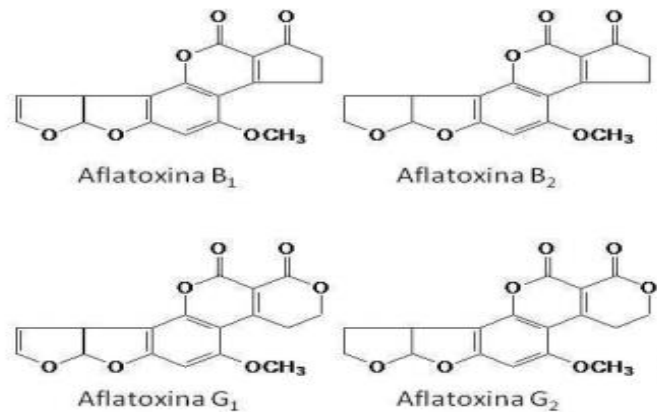


Figura 1. Estruturas das aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>

Fonte: WILSON, 2005

As aflatoxinas são compostos que após formados dificilmente serão eliminados (PAS, 2004, TANIWAKI 2016). Elas são estáveis ao calor sendo decompostas a temperaturas de cerca de 220°C. São destruídas por agentes oxidantes fortes e devido a presença do anel lactona, são susceptíveis a ação de base. Apresentam baixo peso molecular, são bastante solúveis em solventes moderadamente polares como o clorofórmio, metanol, dimetilsulfoxido e pouco solúveis em água. Apresentam ponto de fusão ao redor de 269°C são particularmente sensíveis a luz ultravioleta, principalmente quando dissolvidas em soluções polares e são destruídas por autoclavagem em presença de amônia e por tratamento com hipoclorito (WHO, 1979; CARJAVAL 2013).

Devido à dificuldade de eliminação das aflatoxinas após a sua produção, atualmente o controle destes compostos na cadeia produtiva da castanha está baseado em medidas preventivas para evitar o crescimento de fungos aflatoxigênicos, e de condições que favoreçam a produção das aflatoxinas, como a redução do tempo de permanência dos ouriços em contato com o solo, intensificação das coletas, controle da umidade e temperatura no armazenamento (BAQUIÃO et al., 2012).

### 3.4 Tratamento químico para descontaminação das castanhas-do-Brasil

A contaminação das castanhas-do-Brasil tem estimulado o estudo de diversos métodos visando à eliminação ou redução das concentrações de fungos micotoxigênicos e aflatoxinas. Dentre eles pode-se citar a utilização do ozônio, irradiação, ultrassom, *cold-plasma*, métodos eficientes que não tem ampla aplicação por conta do alto custo (FREITAS-SILVA et al., 2013; WEIYI TAO, 2015; YAMUNA DEVI, et al 2017).

A utilização de agrotóxicos na pré-colheita da castanha-do-Brasil não ocorre por conta da produção extrativista. No entanto, a pré-disposição da castanha a contaminação levanta a possibilidade da utilização de produtos químicos, mesmo que em pequena escala, para controle na etapa de armazenamento na indústria (PAS, 2004). A sanitização quando aplicada de maneira correta, desempenha importante papel na minimização da deterioração e na manutenção da qualidade do produto (PAS, 2004; POIMENIDOU et al., 2016).

Os sanitizantes são conceituados como agentes ou produtos que diminuem o número de micro-organismos vivos no ambiente ou no produto, a níveis seguros, de acordo com as normas de saúde (BRASIL, 2007). Segundo Beltrame et al., (2012), os sanitizantes ideais devem ser aprovados pelos órgãos competentes, terem amplo espectro de atividade antimicrobiana, serem capazes de rapidamente eliminar micro-organismos, estáveis sobre diversas condições de uso, e apresentarem baixa toxicidade e corrosividade.

A aplicação dos sanitizantes deve considerar fatores tais como: o tipo de tratamento, tipo e fisiologia do micro-organismo, características da superfície do alimento como rachaduras, fendas e textura, tempo de exposição e concentração, assim como pH e temperatura (ANDRADE, 2008).

Outro fator importante, consiste na limpeza previa da superfície que será sanitizada para que haja uma maior eficiência do sanitizante. A lavagem com água potável permite a remoção de componentes do solo e parte dos micro-organismos presentes (ALLENDE et al., 2008; JOSHI et al., 2013). Além disso, cuidados como o monitoramento das variações físico-químicas do sanitizante, como por exemplo variações de pH; a qualidade da água utilizada para lavagem, temperatura, estabilidade durante o armazenamento (MATTHEWS, 2006).

Deve-se ter cuidado também, com a concentração do sanitizante, para que está não ocasione impacto sensorial inaceitável no alimento (FDA, 2001). Desta forma, para que os sanitizantes atuem de forma eficiente é necessário a determinação dos parâmetros ideais de condições de processo (ANDRADE, 2008).

A redução provocada pela ação dos sanitizantes pode ser calculada em número de reduções decimais, de acordo com a equação 1 (SALOMÃO, 2011).

$$\text{Equação 1: RD} = \text{Log} \left( \frac{N_0}{N} \right)$$

Em que:

RD: Número de reduções decimais

No: Concentração da população inicial de células (UFC/g)

N: Concentração de sobreviventes após o tratamento aplicado (UFC/ g)

### 3.4.1 Hipoclorito de sódio

Dentre as soluções sanitizantes, os compostos clorados são os mais utilizados na indústria de alimentos devido ao baixo custo, completa solubilidade em água e por serem efetivos contra bactérias, fungos e dependendo do pH da solução, contra esporos bacterianos (ANDRADE, 2008; SÃO JOSÉ, VANETTI, 2015). O hipoclorito de sódio é um potente agente microbiano em pH ácido, no combate ao biofilme microbiano. Contudo, nos últimos anos, sua aplicação e a dos demais sais de cloro tem causado preocupação já que são precursores na formação de cloraminas orgânicas, com alto potencial carcinogênico (ANDRADE, 2008).

A utilização de outros produtos em substituição ao cloro e seus derivados que confirmam segurança e qualidade microbiológica é pertinente. Muitos estudos têm comprovado a eficácia de agentes sanitizantes em substituição ao cloro, como ultrassom, ácidos orgânicos, ozônio, peróxido de hidrogênio, ácido peracético, irradiação, entre outros (GONZÁLEZ AGUILAR et al., 2010; GÓMEZ-LÓPEZ et al., 2015).

A ação antimicrobiana dos compostos clorados, à exceção do dióxido de cloro, está relacionada à liberação do ácido hipocloroso em solução aquosa. Essa forma não dissociada é cerca de 80 vezes mais bactericida do que a forma dissociada. Dependendo do pH da solução, esses compostos sanitizantes apresentam ação sobre esporos bacterianos, grupo microbiano importante em processamento de alimentos. Em soluções com pH mais baixo, em que há maior presença de ácido hipocloroso (HClO), que é a forma não dissociada, a eficiência esporicida do cloro pode ser aumentada (ANDRADE, 2008).

O possível mecanismo de ação do hipoclorito de sódio pode ser dividido em algumas etapas: Primeiramente, na forma não dissociada penetra através da membrana celular e oxida os grupos sulfidrilas (SH) de certas enzimas importantes da via glicolítica inibindo-a; em um segundo momento, ocorre a formação de compostos N-clorados tóxicos pela combinação do

cloro com proteínas da membrana celular causando danos a membrana e dificultando o transporte de carboidratos e de aminoácidos, podendo resultar no extravasamento de compostos celulares. Posteriormente ocorre a descarboxilação oxidativa de aminoácidos formando nitrilas e aldeídos, além disso, através da reação com o DNA, ocorre a oxidação das bases purínicas pirimidínicas e paralisação da síntese proteica, inibindo a captação de oxigênio e a fosforilação e causa vazamento de algumas macromoléculas. O hipoclorito de sódio também pode ser causador de alterações cromossômicas (ANDRADE, 2008).

De acordo com o Regulamento nº 21 CRF 178 do FDA (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION), as concentrações de hipoclorito de sódio destinadas para sanitização de vegetais devem ser de no máximo 200 mg/ L (FDA 2001, 2017). No Brasil não existe uma Legislação específica para a utilização do hipoclorito de sódio, entretanto no estado Rio Grande do Sul foi criada uma Portaria nº 78 de 30 de janeiro de 2009 da que determina o uso de concentrações de 100 a 250 mg /L para soluções de desinfecção de alimentos durante o tempo de 15 minutos (RS, 2009).

#### 3.4.2 Ácido Peracético

O ácido peracético é um dos tipos mais importantes de peróxidos e um desinfetante rápido, de amplo espectro, que tem sido amplamente utilizado na esterilização, branqueamento, indústria têxtil, engenharia ambiental e síntese química. É esporicida em baixas temperaturas e continua efetivo na presença de material orgânico. Seu efeito biocida sem residual tóxico o torna de especial interesse para a indústria de alimentos (BALDRY, 1983; BLOCK, 1991; WEY TAO, et al., 2015).

O ácido peracético é um agente químico que se origina a partir da mistura de peróxido de hidrogênio e de ácido acético. O resultado da sua decomposição, contém água, ácido acético e oxigênio como subprodutos biodegradáveis e atóxicos. O ácido peracético é caracterizado por uma ação muito rápida e atividade antimicrobiana de largo espectro, a qual inativa as bactérias gram-positivas e gram-negativas, e os fungos (STOPIGLIA et al. 2011). Há vários artigos relatando a sua eficácia desinfetante contra bactérias, tanto *in vitro* quanto em produtos (SREBERNICH, 2007; SILVEIRA 2008, ROSÁRIO, 2017).

Srebernich (2007) demonstra que o ácido peracético é um excelente sanitizante, devido a sua grande capacidade de oxidação dos componentes celulares dos micro-organismos, com rápida ação em baixas concentrações sobre um amplo espectro de micro-organismos. Sua ação biocida é influenciada pela concentração, pela temperatura e pelo tipo

de micro-organismos. Ainda, segundo o autor, o uso dessas soluções reduz significativamente a contaminação, resultando na obtenção de produtos microbiologicamente seguros.

De acordo com a FOOD AND DRUG ADMINISTRATION em seu regulamento §173.315 (2001), atualizado em abril de 2017, que dispõe sobre Produtos químicos utilizados na lavagem ou para ajudar na descamação de frutas e vegetais, o ácido peracético pode ser utilizado para este fim, desde que seja preparado por reação de ácido acético com peróxido de hidrogênio e que não exceda 80 mg / L em água de lavagem (FDA, 2001, 2017).

O mecanismo de ação dos ácidos orgânicos está relacionado ao efeito sobre o valor do pH do alimento e as propriedades antimicrobianas das moléculas não dissociadas de ácido (SÃO JOSÉ, 2015). Os ácidos na forma não dissociada atravessam com maior facilidade a membrana da célula microbiana e, no caso o valor de pH intracelular seja maior que o do meio circundante, estes ácidos se dissociarão e liberarão prótons, o que provocará a acidificação do citoplasma (HUNG; CHEN, 2011). Devido a isto, a célula precisará eliminar prótons em excesso para manter o pH interno e assim gastará mais energia e provocará alteração das atividades metabólicas como transporte de nutrientes e redução da força próton motora (RAYBAUDI-MASSILA et. Al., 2009; HUNG; CHEN, 2011).

O ácido peracético possui algumas vantagens em relação a outros sanitizantes como, por exemplo, à ação em baixas temperaturas, não sendo corrosivo ao aço inox e ao alumínio, em concentrações recomendadas de uso, não requer enxague da superfície, sendo inodoro na forma diluída, facilidade de implantação de tratamento (sem a necessidade de elevado investimento), efetividade mesmo na presença da matéria orgânica e a ausência de residual ou subprodutos tóxicos e/ou mutagênicos, a desnecessária descoloração, a baixa dependência do pH e o curto tempo de contato (SOUZA e DANIEL, 2005; SREY et al., 2013).

As desvantagens do ácido peracético segundo Nascimento (2010), foram a baixa estabilidade durante a estocagem e o fato de ser irritante à pele, necessitando de muitos cuidados com o manuseio do produto. Quando apresentado na forma pura, é incompatível com ácidos, álcalis concentrados, borrachas naturais e sintéticas, ferro, cobre e alumínio.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLENDE, A.; McEVOY, J.; TAO, Y.; LUO, Y. Antimicrobial effect of acidified sodium chlorite, sodium chlorite, sodium hypochlorite, and citric acid on *Escherichia coli* O157: H7 and natural microflora of fresh-cut cilantro. **Food Control**, v. 20. N.3, 230-234, 2008.
- AMAIKE, S.; KELLER, N. P. *Aspergillus flavus*. **Annual Review of Phytopathology**. doi:10.1146/annurev-phyto-072910-095221 5, 2011.
- ANDRADE, N.J. Avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos. **Higiene na indústria de alimentos**. São Paulo. Varela, p. 412, 2008.
- ARRUS, K.; BLANK, G.; CLEAR, R.; HOLLEY, R.A. e ABRAMSON, D. Microbiological and aflatoxina evaluation of Brazil nut pods and the effects of unit processing operations. **Journal Food Prot.** v. 68, p. 1060-1065, 2005.
- BAQUIÃO, A.C; ZORZETE, P; REIS, T. A; ASSUNÇÃO, E.; VERGUEIRO, B.C., Myclora and mycotoxins in field samples of Brazil nuts. **Food Control**. v. 28, p. 224-229, 2012.
- BAQUIÃO, A. C., DE OLIVEIRA, M. M. M., REIS, T. A., ZORZETE, P., ATAYDE, D. D., & CORRÊA, B. Monitoring and Determination of Fungi and Mycotoxins in Stored Brazil Nuts. **Journal of Food Protection**, 76(8), 1414–1420, 2013.
- BAQUIÃO, A.C., LOPES, E.L. & CORRÊA, B., Molecular and mycotoxigenic biodiversity of *Aspergillus flavus* isolated from Brazil nuts, **Food Research International**, v 89, p. 266-271, 2016.
- BAYMA, M. M. A.; MALAVAZI, F. W.; SÁ, C. P.; FONSECA, F. L.; ANDRADE, E. P.; WADT, L. H. O. Aspectos da cadeia produtiva da castanha-do-Brasil no estado do Acre, Brasil. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**, Ciências Naturais, Belém, v. 9, n. 2, p. 417-426, 2014.
- BALDRY, M.G.C. The bactericidal fungicidal and esporicidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid. **Journal of Applied Bacteriology**, v.54, n.3, p.417- 423, 1983.
- BENNET, J.W. **A Overview of the Genus *Aspergillus***. 2010. Disponível em <<https://www.caister.com/openaccess/pdf/aspergillus1.pdf>> Acesso em 31.08.2017.
- BELTRAME, C. A. et al. Influence of different sanitizers on food contaminant bacteria: effect of exposure temperature, contact time, and product concentration. **Ciência e Tecnologia em Alimentos** [online]. v.32, n.º 2, p. 228-232, 2012.
- BLOCK, S.S. Disinfection, sterilization, and preservation. 4 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991.
- BRASIL. **Decreto Federal N° 5.975, de 30 de novembro de 2006**. Regulamenta os arts. 12, parte final, 15, 16, 19, 20 e 21 da Lei nº 4.771, de 15 de setembro de 1965, o art. 4º, inciso III, da Lei nº 6.938, de 31 de agosto de 1981, o art. 2º da Lei nº 10.650, de 16 de abril de 2003, altera e acrescenta dispositivos aos Decretos nºs 3.179, de 21 de setembro de 1999, e 3.420, de 20 de abril de 2000, e dá outras providências. Código Florestal. Disponível em <[www.planalto.gov.br/civil](http://www.planalto.gov.br/civil)> Acesso em 06 de janeiro de 2018.

BRASIL. **RDC nº 14, de 28 de fevereiro de 2007**. Regulamento Técnico para Produtos Saneantes com Ação Antimicrobiana harmonizado no âmbito do Mercosul. Resolução da diretoria colegiada. Disponível em < [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)> Acesso em 24/05/2017.

BRASIL, Ministério da Saúde, 2009. **Portaria nº 78, de 30 de janeiro de 2009**, aprova a Lista de Verificação em Boas Práticas para Serviços de alimentação, aprova Normas para Cursos de Capacitação em Boas Práticas para Serviços de Alimentação e das outras providencias, Secretaria de Saúde, Porto Alegre, RS, 30 de janeiro de 2009.

BRASIL- **Resolução RDC n. 7 de 18 de fevereiro de 2011**, dispõe sobre os limites de aflotoxinas totais para diversos substratos produzidos no Brasil. Disponível em < [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)> Acesso em 24/05/2017.

CALDERARI, T. O.; IAMANAKA, B. T; FRISVAD, J. C.; PIT, J. I.; SARTORI; J. PEREIRA, D. ; M. H; FUNGARO, P.; TANIWAKI, M. H.. The biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in brazil nuts: From rainforest to consumer. **International Journal of Food Microbiology**, 160, 267–272, 2013.

CARNAGHAN, R.B.A.; SARGEANT, K. The toxicity of certain groundnuts meals to poultry. **Vet. Rev.**v. 73, n.29, p.726, 1961.

CARVAJAL. M. Transformación de la aflatoxina b1 de alimentos, en el cancerígeno humano, aducto AFB1 -ADND.R. **Rev. Especializada en Ciências Químico-Biológicas**, Universidad Nacional Autónoma de México v. 16 (2), p. 109-120, 2013.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Code of practice for the prevention and reduction of aflatoxinas contamination in tree nuts. **Codex Alimentarius Comission Research** Project, Amsterdã, v.59, p. 1-9, 2006.

EHRlich, K.C.; KOBbEMAN, K.; MONTALBANO, B.G.; COTTy, P.J. Aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Thailand. **International Journal Food Microbiol.** 4, 114-153–9, 2007.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Inovações tecnológicas para o controle da contaminação da castanha-do-Brasil por aflatoxinas**. Projeto, PAC – Encomenda – Embrapa, 2009.

FINTEN, G.; AGUERO, M.V.; JAGUS, R.J. Citric acid as alternative to sodium hypochlorite for washing and disinfection of experimentally-infected spinach leaves. **LWT-Food Science and Technology**, v. 82, p. 318-325, 2017.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Department of Health and Human Services. Secondary direct food additives permitted in food for human consumption: **21 CFR part 173.315** de 2001, peroxyacetic acid, sodium dichloroisocyanurate, sodium hypochlorite and chlorine dioxide atualizado em 2017. Disponível em <<https://www.accessdata.fda.gov>> Acesso em janeiro de 2018.

FOOD IGREDIENTS BRASIL. **As micotoxinas**. Nº 7. 2009. Disponível em:< [www.revista-fi.com](http://www.revista-fi.com)> acesso em 3.9.2017.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Department of Health and Human Services. Secondary direct food additives permitted in food for human consumption: **21 CFR part**

173.315 de 2001, peroxyacetic acid, sodium dichloroisocyanurate, sodium hypochlorite and chlorine dioxide atualizado em 2017. Disponível em <<https://www.accessdata.fda.gov>> Acesso em janeiro de 2018.

FREITAS-SILVA, O.; VENANCIO, A. Brazil nuts: benefits and risks associated with contamination by fungi and mycotoxins. **Food Research International**, vol. 44, no. 5, p. 1434–1440, 2011.

FREITAS-SILVA, O.; MORALES-VALLE, H.; VENÂNCIO, A. Potential of Aqueous Ozone to Control Aflatoxigenic Fungi in Brazil Nuts. Ver. **Hindawi Publishing Corporation ISRN Biotechnology**, V. 2013, p. 1-6, 2013.

FUKUZAKI, S. Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. **Rev. Biocontrol Sci**, cap.11p. 147-157, 2006.

GEISER, D. M. et al. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. **Estudies in Mycology**, Utrecht, v.59, p.1-10, 2007.

GEORGIANNA, D.R., PAYNE, G.A. Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: from gene to genome. **Fungal Genetics and Biology**. 46, 113–125, 2009.

GIL, M. I.; SELMA, M. V.; LÓPEZ-GÁLVEZ, F., ALLENDE, A. Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: problems and solutions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 134, p. 37-45, 2009.

GONZÁLEZ-AGUILAR. G.A.; AYALA-ZAVALA. J.F.; OLIVAS. G.I.; ROSA. L.A.; ÁLVAREZ-PARRILLA. E. Preserving quality of fresh-cut products using safe Technologies. **Journal of Consumer Protection and Food Safety**. v.5. p. 65-72, 2010.

GÓMEZ-LÓPEZ, V.M.; GIL, M.I.; ALLENDE, A.; VANHEE, B.; SELMA, M.V. Water reconditioning by high power ultrasound combined with residual chemical sanitizers to inactivate foodborne pathogens associated with fresh-cut products. **Food Control**. V.53, p-29-34, 2015.

HAHN, K; WEBER, J.A; BLEACH, IN: P. WEXLER (Ed.) **Encyclopedia of Toxicology, Academic Press**, Oxford, p. 519-521. 2014.

HE, Y.; WANG, B.; CHEN, W.; COX, R.J.; HE, J.; CHEN, F. Recent advances in reconstructing microbial secondary metabolites biosynthesis in *Aspergillus* spp. **Rev. Biotechnology Advances**, v. 36, pg 739-783, 2018.

HOMMA, A.K.O. Extrativismo vegetal ou plantio: qual a opção para a Amazônia? **Estudos avançados**. V 26, p 167-186, 2012.

HORN, B.W; DORNER, J.W.; Soil populations of *Aspergillus* species from section Flavi along a transect through peanut growing regions of the United States. **Mycologia**, 90, 76-767, 1998.

HORN BW, MOORE GG, CARBONE I. Sexual reproduction in aflatoxin-producing *Aspergillus nomius*. **Mycologia**. 103:174–83, 2011.



HUNG, Y.; CHEN, H. Effect of organic acids, hydrogen peroxide and mild heat on inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 on baby spinach. **Food Control**, v. 22, n.8, p. 1178-1183, 2011.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS-ICMSF. **Microrganismos em alimentos 8: utilização de dados para avaliação do controle de processo e aceitação de produto**. São Paulo: Blucher, 2015

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA- Produção da Extração vegetal e da Sicultura-PEVS-2016. Disponível em <[www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pevs/2016](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pevs/2016)> Acesso em janeiro de 2018.

JOSHI, K.; MAHENDRAN, R.; ALAGUSUNDARAM, K.; NORTON. T.; TIWARI, B.K. Novel disinfectants for fresh produce. **Trends in Food Science e Technology**, v. 34, n. 1, p. 54-61, 2013.

KITIS, M. Disinfection of wastewater with peracetic acid: A review **Environment International**, c.30. p. 47-55, 2004.

KING, D., LUCIA, L., CASTILLO,A., ACUFF, G., HARRIS,K., e SAVELL, J. Evaluation of peroxyacetic acid as post-chilling intervention for control of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* on beef carcass surfaces. **Meat Science**, c. 69, p. 401-407, 2005.

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

KURTZAN, C.P., HORN, B.W., HESSELTINE, C.W. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamari*. *Antonie van Leeuwenhoek* 53, 147-158, 1987.

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

LORENZI, H. Árvores brasileiras: **Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. São Paulo: Instituto Plantarum Ltda, p.384, 2010.

MARKLINDER, I.; LINDBLAD, M.; GIDLUND, A.; OLSEN, M. Consumers' ability to discriminate aflatoxin contaminated Brazil nuts. **Food Additives & Contaminants**. v, 22 (1): p. 56-64, 2005.

MARTINS, L.; SILVA, Z.P.G.; SILVEIRA, B.C. **Produção e comercialização da castanha-dobrasil (*Bertholletia excelsa*, H.B.K) no estado do Acre-Brasil, 1998-2006**. Congresso da Sociedade Brasileira de Economia Administração e Sociologia Rural. Rio Branco UFAC .V. 45, p. 14, 2008.

MARKLINDER, I.; LINDBLAD, M.; GIDLUND, A.; OLSEN, M. Consumers' ability to discriminate aflatoxin contaminated Brazil nuts. **Food Additives & Contaminants**. v, 22 (1): p. 56-64, 2005.

MIDORIKAWA, G.E.O.; ***Aspergillus* seção *Flavi*: caracterização molecular de espécies aflatoxigênicas da castanha-do-brasil e análise do transcrito de *Aspergillus oryzae* em relação a degradação enzimática do bagaço da cana-de-açúcar**. Tese de doutorado em Biologia Molecular pelo Programa de Pós Graduação em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, 2014.

MIDORIKAWA, G. E. O. **Desenvolvimento de um método PCR específico para detecção de *Aspergillus flavus* aflatoxigênico em grãos brasileiros**. Dissertação. Universidade Católica de Brasília. Brasília, 2009.

MOSS, M.O. Mycotoxins of *Aspergillus* and others filamentous fungi. **J. Appl. Bacteriol.**, p. 69-81, 1989.

MOORE, G.; MACK, B. M.; BELTZ, S.B. Genomic sequence of the aflatoxigenic filamentous fungus *Aspergillus nomius* Geromy. **Biomed Central Genomics**. 16: 551, 2015.

MATTHEWS, K. R (Ed) Microbiological Safety of Fresh-cut Produce. **American Society for Microbiology Press**, Washington, DC, USA, 2006.

NASCIMENTO, H. M.; DELGADO, D. A. BARBARIC, I. F. Avaliação da aplicação de agentes sanitizantes como controladores do crescimento microbiano na indústria alimentícia. **Revista Ceciliana**, V 2, p. 11-13, 2010.

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

OLMEZ, H e KRETZCHMAR, U. Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry form minimizing water consumption and environmental impact LWT- **Rev. Food Science and Technology**, cap. 42, p.686-693, 2009.

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

**Feed and Bioweapons**, DOI: 10.1007/978-3-642-00725-5\_6, # Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010.

PAS. Programa alimentos Seguros. Safety **Manual for the quality of the Brazil nut**. Brasília, DF: Campo PaS, 62 pp. (Série Qualidade e Segurança dos alimentos). (in Portuguese), 2004.

PASSI, S.; NAZZARO-PORRO, M.; FANELLI, C.; FABBRI, A.A.; FASELLA, P. Role of lipoperoxidation in aflatoxin production. **Appl Microbiol Biotechnol** 19:186–190, 1984.

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

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

PK CHANG.; M. Rai and A. Varma (eds.), Aflatoxin Biosynthesis and Sclerotial Development in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons**, DOI: 10.1007/978-3-642-00725-5\_6, # Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010.

PITT, J.I; HOCKING, A.D. **Fungi and food spoilage**. 3 rd ed. Dordrecht: Springer, 2009.

POMENIDOU, S.V.; BIKOULI, V.C.; GARDEU.C., TARANTILIS, P.A.; NYCHAS, G.; SKANDAMIS, P.N. Effect of single or combined chemical and natural antimicrobial interventions on *Escherichia coli* O157:H7, total microbiota and color of packaged spinach and lettuce, **International Journal of Food Microbiology**, v.220, p.6-18, 2016.

OURO VERDE AMAZÔNIA (2014). **Caminho da castanha**. Disponível em<<http://ouroverdeamazonia.com.br>> acesso em agosto de 2017.

PAS. Programa alimentos Seguros. Safety **Manual for the quality of the Brazil nut**. Brasília, DF: Campo PaS, 62 pp. (Série Qualidade e Segurança dos alimentos). (in Portuguese), 2004.

PRADO, G.; OLIVEIRA, M.S.; LIMA, A.S.; MOREIRA, A.P.A.. Ocurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in parmesan cheese consumed in Minas Gerais, Brazil. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n.6, nov 2008.

RAYBAUDI-MASSILA, R.M.; MOSQUEDA-MELGAR, J.; SABRINO-LÓPEZ, A-SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO, O. Used of malic acid and other quality stabilizing compounds to assure the safety of fresh-cut “Fuji” apples by inactivation of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis and *Escherichia coli* o157:h7. **Journal of Food Safety**, v. 29, n.1, p. 236-252, 2009.

REVERBERI, M.; RICELLI, A.; ZJALIC, S.; FABBRI, A.A.; FANELLI, C. Natural functions of mycotoxins and control of their biosynthesis in fungi. **Applied microbiology and biotechnology**. 87:899–911, 2010.

REIS, T.A.; OLIVEIRA, T.D.; BAQUIÃO, A.C.; GONÇALVES, S.S.; ZORZETE, S.S CORREA, B. Mycobiota and mycotoxins in Brazil nut samples from different states of the Brazilian Amazon region. **International Journal of Food Microbiology** V. 159, 2, pg. 61-68, 2012.

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

ROSARIO, D. K. A.; MUTZ, Y. S.; PEIXOTO, J. M. C.; OLIVEIRA, S. B. S.; CARVALHO, R.V.; CARNEIRO, J.C.S.; SÃO JOSÉ, J.F.B.; BERNARDES, P.C. Ultrasound improves chemical reduction of natural contaminat microbiota and *salmonella* entérica subsp. Entérica on strawberries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 241, p. 23-29, 2017.

SÁ, C.P.; BAYMA, M.M.A.; WADT, L.H.O. Coeficientes técnicos, custo e rentabilidade para a coleta de castanha-do-brasil no Estado do Acre: sistema de produção melhorado. **Comunicado Técnico Embrapa**. Rio Branco: Embrapa Acre; v 68. p.4, 2008.

SALOMÃO, B.C.M.; MÜLLER, C. MASSAGUER, P.R.; ARAGÃO, G. M. F. Aplicação de dicloroisocianurato de sódio e ácido peracético para redução de esporos de *Penicillium expansum*, *Byssochlamys fulva* e *Alicyclobacillus acidoterrestris* na superfície de maçãs e em soluções aquosas. **Rev. Alim. Nutr.**, Araraquara v. 22, n. 2, p. 219-230, abr./jun. 2011.

SAMSON, R.A.; VARGA, J. What is species in *Aspergillus*? **Medical Mycology**, Oxford, v.47, p. 13-20, 2009.

SECEX, Secretaria de Comércio Exterior – **Sistema de Análise das informações de comércio exterior, Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior**. 2007. Disponível em: <<http://aliceweb2.mdic.gov.br/>>. Acesso em: 24/05/2017.

SINGH, K., FRISVAD, J.C., THRANE, U. & MATHUR, S.B. An illustrated manual on identification of some seed-borne *Aspergilli*, *Fusaria*, *Penicillia* and their micotoxins. Copenhagen. Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries. 1991.

SÃO JOSÉ, J.F.B., VANETTI, M.C.D. Application of ultrasound and chemical sanitizers to watercress, parsley and strawberry microbiological and physicochemical quality. **LWT-Food Science and Technology**, v. 63, n. 2, p. 946-952, 2015.

SÃO JOSÉ, J.F.B. E VANETTI, M.C.D.– Application of ultrasound and chemical sanitizers to watercress, parsley and strawberry: Microbiological and physicochemical quality. **LWT – Food Science and Technology**, vol.63,n.2,p.946-952,<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.04.029>, 2015.

SILVA, A.A; SANTOS, M.K.V.; GAMA, J.R.V.; NOCE, R.; LEÃO, S. Potencial do Extrativismo da Castanha-do-Pará na Geração de Renda em Comunidades da Mesorregião Baixo Amazonas, Pará. **Revista Floresta e Ambiente**, ed. 20(4) pag 500-509, 2013.

SILVEIRA, A. C. Desinfetantes alternativos ao cloro para uso em recém-cortada "Galia" (*Cucumis melo* var. *catalupensis*) melão. **Journal of Food Science**, v. 73 (9), M405, M411, 2008.

SOUZA, C.R.; AZEVEDO, C. P.; ROSSI, L. M. B.; LIMA, R. M. B. Castanha-do-brasil *Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl. **Comunicado Técnico Embrapa**. Manaus, Dezembro, 2008.

SOUZA e DANIEL. Comparação entre hipoclorito de sódio e ácido peracético na inativação de *E. Coli*, *colifagos* e *C. Perfringens* em água com elevada concentração de matéria orgânica. **Revista engenharia sanitária ambiental**, v. 7, p. 175-189, 2005.

SOUZA, M.L.; CARTAXO, C.B.C.; LEITE, F.M.N., **Manual de Segurança e qualidade para a cultura da castanha-do-brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p.61, 2004.

SREBERNICH, Silvana Mariana. Utilização do dióxido de cloro e do ácido peracético como substitutos do hipoclorito de sódio na sanitização do cheiro verde minimamente processado. **Rev. Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, SP, v. 27, nº 4 out-dez, 2007.

SREY, S.; JAHID, I.K.; HÁ, S.D. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, v.31, p. 572-585, 2013.

SEBRAE – Serviço brasileiro de apoio às micro e pequenas empresas. Trabalho e paciência - entrevista realizada com a diretoria COOPERACRE. Rio Branco, 2007.

TANIWAKI, M.H; FRISVAD, J.C; FERRANTI, L.S; FERRANTI, L.S; LOPES, A.S; LARSEN, T.O; FUNGARO, M.H.F; IAMANKA, B.T., Biodiversity of mycobiota throughout the Brazil nut supply chain: From rainforest to consumer. **Food Microbiology**. v, 61 p.14-22, 2016.

UNIÃO EUROPÉIA. Regulamentação nº 165/ 2010 de fevereiro de 2010, que altera o Regulamento (CE) nº 1881/ 2006, que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes em gêneros alimentícios, no que diz respeito as aflatoxinas. **Journal Oficial da União Europeia 2010**. Disponível em < [http://eur-lex.europa.eu/legal->](http://eur-lex.europa.eu/legal-) acesso em janeiro de 2018.

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

VARGA, J.; JUHÁSZ, A.; KEVEI, F., KOZAKIEWICZ, Z. et al. Molecular diversity of agriculturally important *Aspergillus* species. **European Journal of Plant Pathology**, 110: 627. <https://doi.org/10.1023/B:EJPP.0000032402.36050.df>, 2004.

VEIGA, A.; LOPES, A.; CARRILHO, E.; SILVA, L.; DIAS, M.B.; SEABRA, M.J.; BORGES, M.; FERNANDES, N.S. **Perfil dos riscos dos alimentos consumidos em Portugal**. Autoridade de segurança alimentar e economia. abril 2009, Disponível em < [www.scribd.com/document/119468844/Perfil-de-Risco-dos-Alimentos](http://www.scribd.com/document/119468844/Perfil-de-Risco-dos-Alimentos)> Acesso em janeiro de 2018.

WARBURTON, R. Peracetic acid in the fresh food industry. **Food Safety Magazine**. Acesso em < [www.foodsafetymagazine.com/signature-series/peracetic](http://www.foodsafetymagazine.com/signature-series/peracetic)> Acesso em novembro de 2017.

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

WEIYI TAO, QING XU, HE HUANG, SHUANG LI. Efficient production of peracetic acid in aqueous solution with cephalosporin-deacetylating acetyl xylan esterase from *Bacillus subtilis* \* College of **Biotechnology and Pharmaceutical Engineering**, Nanjing University of Process Biochemistry *Process Biochemistry*. v, 50, p. 2121–2127, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) **Micotoxins** (Environmental Health criteria) Geneva p. 21-84, 1979.

WU, F.; STACY, S. L.; KENSLER, T. W.. Global Risk Assessment of Aflatoxins in Maize and Peanuts: Are Regulatory Standards Adequately Protective **Toxicological Sciences**, [s.l.], v. 135, n. 1, p.251-259, 2013.

YAMUNA DEVI, ROHIT THIRUMDAS, C. SARANGAPANI, R.R. DESHMUKH, U.S. ANNAPURE, Influence of cold plasma on fungal growth and aflatoxins production on groundnuts, **Rev. Food Control**. v. 77, p. 187-191, 2017.

YANG, J. Brazil nuts and associated health benefits: A review. **LWT - Food Science and Technology**, Sheffield, v.42, n.10, p.1573-1580, 2009.

## **Abordagem polifásica na identificação de uma cepa de *Aspergillus* seção *Flavi* isolada de castanha-do-Brasil.**

*Artigo submetido a Revista Emirates Journal Food Agriculture*  
(Configuração conforme normas da revista)

### **RESUMO**

A castanha-do-Brasil é uma matéria-prima amazônica com papel fundamental na organização socioeconômica das áreas extrativistas da Amazônia Legal, porém, devido às precárias condições de armazenamento e processamento, a castanha é frequentemente sujeita à contaminação por fungos aflatoxigênicos. Essas espécies de fungos têm alta similaridade, o que dificulta sua identificação apenas pelos métodos tradicionais. Esta pesquisa teve como objetivo a identificação de uma espécie de *Aspergillus* seção *Flavi* isolada de amostras de castanha-do-Brasil, por meio da abordagem polifásica. Para identificar o isolado fúngico, foram utilizadas técnicas de caracterização macromorfológica e micromorfológica por microcultivo em lâmina; A identificação molecular seguida de sequenciamento comparando as seqüências nucleotídicas com o banco de dados GenBank; e a avaliação do potencial aflatoxigênico da cepa por HPLC. De acordo com os resultados, a análise macromorfológica e micromorfológica evidenciou características de coloração e estruturas reprodutivas típicas do genero *Aspergillus* e da seção *Flavi*. Entretanto somente a partir dos resultados de identificação molecular em que a cepa apresentou 100% de semelhança com *Aspergillus nomius* e do perfil de produção de metabólitos no qual a espécie foi produtora dos 4 tipos de aflatoxinas (AFG2= 1177,23 ng/mL; AFG1=2458,90 ng/mL; AFB2=860,23 ng/mL; AFB1=2370,06 ng/mL) foi possível realizar a identificação correta do fungo como *Aspergillus nomius*. A combinação de diferentes técnicas para identificação da cepa de *Aspergillus* seção *Flavi* permitiu uma caracterização mais precisa. A identificação de linhagens como *Aspergillus nomius* com potencial aflatoxigênico em castanha-do-Brasil confirma a afinidade desses micro-organismos por esse substrato.

**PALAVRAS - CHAVES:** Castanha-do-Brasil, contaminação, identificação.

**Polyphase approach in the identification of a strain of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts**

*Article under review for submission to Emirates Journal Food Agriculture Journal*  
(Shape according to the norms of the journal)

**ABSTRACT**

Brazil nut is an Amazonian raw material with a fundamental role in the socioeconomic organization of the extractive areas of the Legal Amazon, however, due to the precarious conditions of storage and processing, the nut is frequently subject to contamination by aflatoxigenic fungi. These fungal species have high similarity, which makes it difficult to identify them only by traditional methods. This research had as objective the identification of a species of *Aspergillus Flavi* isolated from Brazil nut samples, through the polyphase approach. To identify the fungal isolate, macromorphological and micromorphological characterization techniques by microculture in a slide were used; The molecular identification followed by sequencing comparing the nucleotide sequences with the GenBank database; And the evaluation of the aflatoxigenic potential of the strain by HPLC. According to the results, the macromorphological and micromorphological analysis showed color characteristics and reproductive structures typical of the genus *Aspergillus* and the *Flavi* section. However, only from the results of molecular identification in which the strain showed 100% similarity with *Aspergillus nomius* and the metabolic production profile in which the species was producing the 4 types of aflatoxins (AFG2= 1177,23, AFG1 = 2458, 90, AFB2 = 860,23, AFB1 = 2370,06) it was possible to carry out the correct identification of the fungus as *Aspergillus nomius*. The combination of different techniques for identification of the strain *Aspergillus* section *Flavi* allowed a more accurate characterization. The identification of strain as *Aspergillus nomius* with aflatoxigenic potential in Brazil nuts confirms the affinity of these microorganisms for this substrate.

**KEYWORDS:** Brazil nuts, contamination, identification.



## 1. INTRODUÇÃO

A castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*, H.B.K) possui um papel fundamental na organização socioeconômica das grandes áreas extrativistas nos estados da Amazônia Legal, com importância no sustento das famílias de baixa renda e fazendo parte da sua base alimentar (Pedrozo et al., 2011). O sabor das amêndoas junto aos seus benefícios nutricionais, promoveram o reconhecimento deste produto no mercado internacional. Contudo, por conta das condições precárias de armazenamento e processamento a castanha está sujeita a contaminações (Baquião, et al., 2013).

As espécies fúngicas *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nomius* e *Aspergillus parasiticus* que são pertencentes à seção *Flavi*, destacam-se como potenciais produtores de aflatoxinas e contaminantes da castanha-do-Brasil (Midorikawa, et al., 2014). As aflatoxinas são metabólitos secundários extremamente tóxicos e cancerígenos que podem contaminar os alimentos no campo, no armazenamento ou após o processamento (Arrus et al 2005; Baquião et al., 2012; Taniwaki et al., 2016).

As espécies pertencentes à seção *Flavi* apresentam elevada similaridade, esta característica tem dificultado sua identificação por métodos tradicionais, como por exemplo, apenas a caracterização morfológica. Devido a estas particularidades, estratégias para a identificação destes fungos estão baseadas em uma abordagem polifásica, que consiste na combinação de várias técnicas como: caracterização macroscópica, microscópica, biologia molecular e potencial de produção de aflatoxinas, para identificação correta da cepa (Varga, et al., 2011; G. Moore et al., 2015).

Durante muitos anos *A. flavus* foi descrito como o principal contaminante das castanhas, porém, com os avanços principalmente em biologia molecular, vários estudos têm destacado *A. nomius*, produtor dos 4 tipos de aflatoxinas, como importante contaminante deste substrato (Olsen et al., 2008; Freitas-Silva e Venâncio, 2011; G.

Moore et al., 2015). Estas espécies com características morfológicas idênticas podem ter sido confundidas, visto que sua identificação era bastante subjetiva (Moore et al., 2015).

A identificação correta das espécies pertencentes à seção *Flavi*, é importante para o conhecimento da microbiota presente em castanhas-do-Brasil, e para que assim, seja possível, definir métodos para redução da sua contaminação, uma vez, que os micro-organismos apresentam características distintas de resistência (Fraise et al., 2004). Desta forma, esta pesquisa teve como objetivo a identificação de uma espécie de *Aspergillus* seção *Flavi* isolada de amostra de castanha-do-Brasil, através da abordagem polifásica.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Cepa *Aspergillus* seção *Flavi***

A cepa de *Aspergillus* seção *Flavi* foi isolada de amostras de castanha-do-Brasil e cedida pelo Laboratório de Resíduos e Contaminantes da Embrapa Agroindústria de Alimentos-RJ.

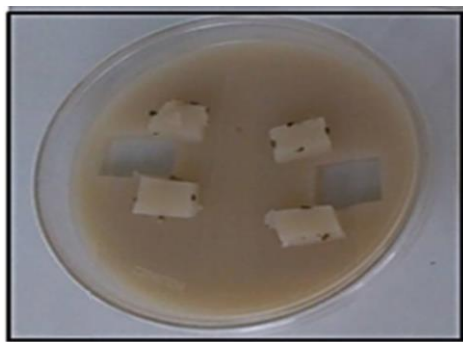
### **2.2 Identificação da cepa de *Aspergillus* seção *Flavi***

#### **2.2.1 Caracterização macro e micromorfológica.**

A análise macromorfológica avaliou o desenvolvimento da macrocolônia do isolado de *Aspergillus* seção *Flavi* sobre meio de cultura. Para isto, uma porção de conídeos foi depositada sobre o centro de uma placa de petri, contendo meio de cultura ágar Lactrimel. A placa foi incubada por 5-10 dias, em temperatura de 27°C. Após este período, foram analisadas características como coloração do verso e reverso da colônia, textura e relevo.

Para a caracterização do isolado fúngico por meio dos aspectos micromorfológicos foi realizada a técnica de microcultivo em lâmina utilizando Agar

Lactrimel segundo a técnica de Riddell (1950) com modificações para observação das estruturas de reprodução assexuada. Blocos de 1 cm<sup>3</sup> do ágar Lactrimel foram mantidos sobre o meio de cultura em placas de petri. Em seguida as amostras foram semeadas na lateral dos blocos de Agar e cobertas com lamínula (Figura 1A). Após inoculação a placa foi incubada a 30°C durante 5 dias. Após este período, as lamínulas contendo o crescimento fúngico foram postas sobre lâminas contendo solução de Lactofenol azul de algodão e/ou Lactofenol de Amman. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico com Objetivas de 40X e 100X. O ensaio foi realizado em duplicata.



**Figura 1.** Microcultivo em placa de Petri contendo ágar Lactrimel do isolado fúngico de *Aspergillus* seção *Flavi*. Fonte: autor.

### 2.2.2 Identificação Molecular do fungo

O DNA genômico foi extraído de culturas micelares puras do isolado fúngico cultivado em ágar Lactrimel, utilizando metodologia proposta por Najafzadeh et al. (2010).

A identificação inicial utilizando técnicas moleculares foi baseada no sequenciamento da região ITS do rDNA (ITS 1, 5.8S e ITS 2). Os primers ITS1 (F) TCCGTAGGTGAACCTGCGG e ITS4 (R) TCCTCCGCTTATTGATATGC foram termociclados (PX2 Thermo Hybaid - Reino Unido) sob condições de 95°C por 5 minutos como desnaturação inicial, 35 ciclos de 94°C por 1 minuto de desnaturação,

55.5°C por 2 minutos como temperatura de anelamento dos primers 72°C por 2 minutos como extensão, e por fim, uma fase de extensão final de 72°C por 10 minutos (Chen et al., 2001; Fugita et al., 2001).

A reação de amplificação foi realizada com 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM de cada dNTP (desoxinucleotídeo trifosfato), 1 mM dos primers, 0,1 µL de DNA polimerase Taq (Platinum® Taq, Invitrogen, Brasil) e 2 µl de DNA, em volume total de 25µL. A PCR foi realizada no termociclador Thermo Hybaid PX2 (Kingdom United). O produto de amplificação foi desenvolvido por eletroforese em gel de agarose a 2%. Posteriormente, a purificação dos aplicons foi realizada utilizando o mini kit HiYield Gel / PCR DNA (Royal Biotech Corporation, China) de acordo com as recomendações do fabricante.

Após a purificação, o material seguiu para a reação de sequenciamento, onde foi realizada uma nova PCR e posteriormente o material seguiu para o sequenciador ABI 3130/3130XL Genetic Analyser, essa plataforma utiliza o método de terminação de cadeia por dideoxinucleotídeo de acordo com Sanger et al., (1977).

As sequências obtidas no sequenciamento foram submetidas à curadoria manual para análise da qualidade e à ferramenta de análise online Eletropherogram Analysis Quality, disponível em <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>. As sequências foram anotadas utilizando o software BioEdit v. 7.2.5 (Hall, 1999). E então comparadas com o banco de dados GenBank utilizando a ferramenta Blast (disponível em <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), as sequências com identidade >98% foram consideradas.

### 2.2.3 Avaliações do potencial de produção de aflatoxinas B1, B2, G1, G2 e M1 por *Aspergillus*.

O potencial toxigênico da cepa para a produção de aflatoxinas foi realizado no Laboratório de Resíduos de contaminantes da Embrapa Agroindústria de Alimentos. A cepa de *Aspergillus* foi cultivada em meio de YES- Yeast Extrat Sucrose á 25°C por 10 dias.

Decorrido o período de incubação, para a extração de aflatoxinas, foram retirados 3 discos de ágar de 0,5 cm do crescimento fúngico. Os discos foram colocados em vial, e ao conteúdo foi adicionado 1 mL de metanol grau HPLC. O conteúdo foi filtrado em membrana Milipore 0,22 µm com N2 para que o metanol fosse evaporado.

As amostras foram analisadas por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência), tendo como padrão um “pool” com as AFLAS B1, B2, G1 e G2.

As condições cromatográficas para análise de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 no extrato fúngico foram as seguintes: Fase móvel: Acetonitrila: Metanol: Água: KBr: HNO34M (290:390:1320:390:1,17mL; Fluxo: 0,8mL/min.; Coluna: XBridge™ C18 (250 x 4,6 mm, 5. µm); Detector: Fluorescência; Excitação: 360, emissão 440; Volume de injeção: 40 µL; corrente: 100 µA.

Para cálculo de derivatização pós-coluna (com Kobra-cell®) foi utilizada a seguinte expressão:

$$\text{Quantidade de aflatoxinas } (\mu\text{g/kg}): \frac{Ca \times V1 \times V3}{m \times V2}$$

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

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

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

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

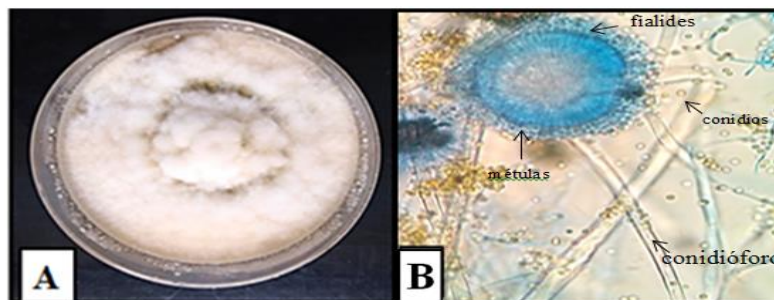
m= massa da amostra em kg.

Ordem de eluição: G2, G1, B2, B1

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Identificação do isolado de *Aspergillus* seção *Flavi*: Caracterização morfológica e identificação molecular.

O isolado de *Aspergillus* seção *Flavi* foi avaliado de acordo com suas características macromorfológicas e microscópicas após 5 dias de incubação a 30 °C (Figura 2).



**Figura 2.** A. Aspecto macroscópico colonial do isolado fúngico de *Aspergillus* seção *Flavi* semeado em Ágar Lactrimel. B. Aspectos Microscópicos.

A macrocolônia (Figura 2A) apresentou crescimento radial, de textura algodonosa com pontilhado amarelo-esverdeado sobre a colônia. Microscopicamente, foi possível observar estruturas de reprodução após o quinto dia de cultivo, o que pode estar relacionado ao meio de cultura utilizado, ágar Lactrimel, que tem como característica favorecer a rápida esporulação de fungos filamentosos (Jorgensen et al., 2015). Em outros meios de cultura como Agar Extrato de Malte, Ágar Sabouraud e Ágar Czapeck a esporulação ocorre após 7 dias de incubação a 25°C (Doster, et al., 2009).

Inicialmente, observou-se a formação de uma ampla estrutura branca enovelada, o micélio aéreo com pouca esporulação, e no centro da colônia (Figura 2 A) a formação de conídios amarelo esverdeados (esporos). Com o passar do tempo e, conseqüentemente, amadurecimento da colônia, o centro verde tornou-se mais escuro, além disso, o reverso das placas permaneceu incolor. A coloração das colônias é uma das características macroscópicas que permite a diferenciação entre as seções de *Aspergillus*. Como pode-se observar na Figura 2 A, os conídios esverdeados da cultura confirmam que a cepa é pertencente a seção *Flavi* (Varga et al., 2009).

Na observação microscópica (Figura 2 B) após coloração com lactofenol azul de algodão, pode-se identificar as estruturas reprodutivas típicas do gênero *Aspergillus*, composto por conidióforo, apresentando em sua extremidade a formação de uma vesícula globosa bisseriada, composta por fiálides e métulas de onde emergem os conídios. Este último aspecto citado, referente à bisseriação vesicular exclui a possibilidade da cepa se tratar de um *Aspergillus parasiticus*, entretanto, somente por meio da análise morfológica da cepa estudada, torna-se difícil distinguir entre as espécies de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus nomius*, uma vez que estas culturas apresentam características muito similares (Midorikawa, et al., 2014; Samson et al., 2014).

Diversos trabalhos relatam a dificuldade de identificação de membros pertencentes à seção *Flavi*, seja pela semelhança entre as espécies ou ainda pelo fato de que, constantemente, novas espécies têm sido descobertas e agrupadas na seção. Atualmente para que se possa realizar a identificação correta de uma espécie é necessária uma abordagem polifásica, em que são avaliadas as características macro e micromorfológicas, a identificação molecular e o perfil de produção de metabólitos (Varga et al., 2011; Samson et al., 2014; Garcia et al., 2018).

Neste sentido, para que fosse realizada a identificação correta do isolado fúngico utilizado neste estudo, foi realizada a identificação molecular da espécie, após a comparação da sequência obtida com o banco de dados *GenBank*. Com a utilização da ferramenta *Blast* a cepa foi identificada como *Aspergillus nomius* (Número de acesso MK397788) apresentando 100% de semelhança.

### 3.2 Potencial de produção de aflatoxinas B1, B2, G1, G2 E M1 do isolado fúngico.

Foi detectado que a cepa avaliada é produtora das quatro tipos de aflatoxinas (Tabela 1), esta informação corrobora com a análise molecular que identifica a cepa como *Aspergillus nomius*, além de descartar a hipótese levantada na caracterização morfológica de que o isolado poderia se tratar de *Aspergillus flavus*, uma vez que devido a uma mutação genética esta espécie produz apenas aflatoxinas B (P-K. Chang, 2010).

**Tabela 1.** Potencial aflatoxigênico do isolado fúngico

Aflatoxinas (ng/mL)				
AFG2	AFG1	AFB2	AFB1	AFM1
1177,23	2458,90	860,23	2370,06	0

AFG2: Afatoxin G2, AFG1: Aflatoxin G1, AFB2: Aflatoxin B2, AFB1:Aflatoxin B1, AFM1:Aflatoxin M1

Moore et al., (2015) destaca que muitos caminhos ainda precisam ser explorados em relação ao fungo aflatoxigênico *A. nomius*, que pode ser indicado como uma espécie ancestral aflatoxigênica a partir de comparações genômicas com outros membros da seção *Flavi*. Enfatizando que comparações genômicas futuras deverão incluir mais espécies a esta seção bem como elucidar as razões para o surgimento de outras espécies aflatoxigênicas, bem como o propósito da produção de aflatoxinas.



Historicamente, perfis de aflatoxinas têm sido usados para distinguir entre *A.flavus* e *A. nomius*, uma vez que suas macro e micro-morfologias são altamente similares. Se um isolado produzisse apenas aflatoxinas-B, ele seria classificado como *A. flavus* e, se aflatoxinas B e G fossem produzidas, seria considerado *A. nomius* (Moore et al., 2015).

Nielsen et al., (2011) e Kildgaard et al., (2014) enfatizam que a produção de um determinado metabólito secundário consiste em um eficiente modo para a alocação de uma cepa em uma seção, assim como, a identificação de vários metabólitos secundários podem garantir de forma eficaz a identificação de uma espécie. Embora a identificação polifásica seja recomendada, ocasionalmente, os perfis dos metabólitos secundários podem ser suficientes para identificar as espécies de isolados de *Aspergillus*.

#### **4. CONCLUSÃO**

A junção de técnicas distintas para identificação da cepa de *Aspergillus* seção *Flavi* permitiram uma identificação mais acurada da espécie. A identificação da espécie como *Aspergillus nomius* com potencial aflatoxigênico em castanhas-do-Brasil, comprova a afinidade destes micro-organismos para este substrato.

#### **5. REFERENCIAS**

- Arrus, K., Blank, G., Clear, R., Holley, R.A. e Abramson, D. (2005). Microbiological and aflatoxina evaluation of Brazil nut pods and the effects of unit processing operations. *Journal Food Prot.* v. 68, p. 1060-1065.
- Baquião, A.C., Zorzete, P., Reis, T. A., Assunção, E.; Vergueiro, B.C. (2012). Myclora and mycotoxins in field samples of Brazil nuts. *Food Control.* v. 28, p. 224-229.
- Baquião, A. C., de Oliveira, M. M. M., Reis, T. A., Zorzete, P., Atayde, D. D., & Corrêa, B. (2013). Monitoring and Determination of Fungi and Mycotoxins in Stored Brazil Nuts. *Journal of Food Protection*, 76(8), p. 1414–1420.
- Chen, Y. C., Eisner, J. D., Kattar, M. M., Rassouliau-Barrett, S. L., Lafe, K., Bui, U., & Sara, L. (2001). Polymorphic internal transcribed spacer region 1 DNA sequences identify medically important yeasts. *Journal of Clinical Microbiology*, 39 (11), p. 4042– 4051.

- Doster, M.A, Cotty. P.J, Michailides, T.J. (2009). Description of a distinctive aflatoxin producing strain of *Aspergillus nomius* that produces submerged sclerotia. *Mycopathologia*, 168, p. 193-201.
- Fraise, A.P., Lambert, P.A., Maillard, J-Y (Eds.). (2004). *Principles and Practice of Disinfection, Preservation & Sterilization*. 4. ed. Oxford, Blackwell Inc.. p. 678.
- Freitas-Silva, O., Venâncio, A. (2011). Brazil nuts: benefits and risks associated with contamination by fungi and mycotoxins. *Food Research International*, vol. 44, no. 5, p. 1434–1440.
- Fujita, S., Senda, Y., Nakaguchi, S., Hashimoto, T. (2001). Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 39 (10), p. 3617-3622.
- Klitgaard, A., Iversen, A., Andersen, M.R. (2014). Aggressive dereplication using UHPLC-DAD-QTOF – screening extracts for up to 3000 fungal secondary metabolites. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406, p. 1933 –1943.
- G. Moore, Brian M., Mack e Shannon B. Beltz. (2015). Genomic sequence of the aflatoxigenic filamentous fungus *Aspergillus nomius* Geromy. *BMC Genomics*, p. 16-551.
- Garcia, M.V., Prussolo, G., Moro, C.B., Bernardi, A. O., Copetti, M.V. (2018). Fungi in spices an mycotoxigenic potential of some *Aspergillus* isolated. *Rev Food Microbiology*. 73, p. 90-96.
- Hall, T.A. Bio Edit: A user friendly biologic sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98NT. *Nucleic Acids Symposium series*.41, p. 95-98.
- Jorgensen, J.H. et al. *Manual of clinical microbiology*. (2015)11th ed. 2 v. Washington: ASM Press.
- Midorikawa, G.E.O.(2014). *Aspergillus* seção *Flavi*: caracterização molecular de espécies aflatoxigênicas da castanha-do-brasil e análise do transcrito de *Aspergillus oryzae* em relação a degradação enzimática do bagaço da cana-de açúcar. (Tese de doutorado), Universidade de Brasília.
- Najafzadeh, M.J., Sun, J., Vicente, V., XI, L. Gerrits Van Denende, A.H.G., De HOOG, G.S. (2010). *Fonsecaea nubica* sp. nov, a new agent of human chromoblastomycosis revealed using molecular data. *Medical Mycology*. 48 (September): p. 800–6.
- Nielsen, K.F. Mansson, M.; Rank, C. (2011). Dereplication of microbial natural products by LC-DAD-TOFMS. *Journal of Natural Products*, 74: 2338 -2348.
- Olsen, M., Johnsson, P., Moller, T., Paladino, R., Lindblad, M. (2008). *Aspergillus nomius*, an important producer in Brazil nuts? *World Mycotoxin Journal*, v 1, n. 2, p. 123-126.
- P-K. Chang. (2010). *Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons*, DOI: 10.1007/978-3-642-00725-56, M. RAI and A. VARMA (eds.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg .
- Pedrozo, E.A., Silva, T.N., Sato, A.A.S., Oliveira, N.D.A. (2011). Produtos Florestais Não Madeiráveis (PFNMS): as Filières do Açaí e da Castanha da Amazônia. *Revista de Administração e Negócios da Amazônia*, v.3, n.2, mai/ago.
- Riddell, R.W. (1950). Permanent stained mycological preparation obtained by slide culture. *Mycologia* 42: 265–70.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chainterminating inhibitors. *Proceedings National Acad. Sci. USA*. 74 (12), p. 5463–7.
- Samson, R.A., Visagie, C.M., Houbraken, J., Hong, S.B., Hubka, V., Klaassen, C.H.; Perrone, G. ; Susca, K.A., Tanney, J.B., Varga, J., Kocsubé, S., Szigeti, G., Yaguchi, T., Frisvad, J.C . (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol.* Jun;78, p. 141-73.

- Taniwaki, M.H., Frisvad, J.C., Ferranti, L.S., Lopes, A.S., Larsen, T.O., Fungaro, M.H.F., Iamanka, B.T. (2016). Biodiversity of mycobiota throughout the Brazil nut supply chain: From rainforest to consumer. *Food Microbiology*, v, 61 p.14-22.
- Varga, J., Frisvad, J.C., Samson, R.A. (2011). Two new aflatoxin producing species and an overview of *Aspergillus* section Flavi. *Studies in Mycology*, v. 69, p. 57-80

## **Eficiência do hipoclorito de sódio e ácido peracético sob *Aspergillus nomius* em castanha-do-Brasil.**

*Artigo em fase de revisão para ser submetido a revista Food Microbiology  
(Configurações conforme normas da revista)*

### **Resumo**

Este trabalho teve como objetivo, avaliar a eficácia do hipoclorito de sódio e ácido peracético na sanitização de castanhas-do-Brasil. Para avaliação da microbiota natural das castanhas, foram realizadas contagens de bactérias, fungos totais, *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. Determinações de atividade de água e umidade e quantificação de aflatoxinas. Foi utilizada metodologia de superfície de resposta para determinar a influência do tempo e concentração dos sanitizantes sob a redução de *Aspergillus nomius* inoculado em castanhas, e a avaliação microbiológica, sensorial e de aflatoxinas na condição proposta sob a microbiota natural das castanhas. As castanhas apresentaram elevada contaminação microbiológica, umidade e atividade água. Em nenhuma amostra foi detectada aflatoxinas. A superfície de resposta e a função desejabilidade no planejamento proposto, indicaram como condições ótimas para a sanitização 250 mg / L e 8,5 minutos e 140 mg / L e 15 minutos para o hipoclorito e ácido peracético, respectivamente. Sendo obtidas reduções superiores a 2 log UFC / g para o hipoclorito e de 1 log UFC / g para o ácido peracético. Nas condições otimizadas, foi obtida redução inferior a 2 log UFC/g. Os sanitizantes não tiveram ação sob aflatoxinas, sendo eficientes somente para controle de fungos. Os tratamentos não causaram impacto sensorial inaceitável nas amostras.

**Palavras-chaves:** *Aspergillus nomius*, castanha-do-Brasil, sanitizantes..

## **Efficiency of sodium hypochlorite and peracetic acid on *Aspergillus nomius* in Brazil nuts.**

*Article under review for submission to Food Microbiology*  
(Shape according to the norms of the journal)

### **Abstract**

The objective of this work was to evaluate the efficacy of sodium hypochlorite and peracetic acid in Brazil nut sanitization. To evaluate the natural microbiota of the nuts, counts of bacteria, total fungi, *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* were performed, as well as measurement of water activity, moisture content and quantity of aflatoxins. Response surface methodology was used to determine the influence of time and concentration of the sanitizers on the reduction of *Aspergillus nomius* inoculated on nuts, and the microbiological, sensorial and aflatoxin evaluation in the proposed condition on the natural microbiota of the nuts. The nuts presented high microbiological contamination, moisture content and water activity. Aflatoxins were not detected in any sample. The response surface and the desirability function in the proposed design indicated as optimal conditions for sanitization 250 mg / L and 8.5 minutes and 140 mg / L and 15 minutes for hypochlorite and peracetic acid, respectively. Reductions of more than 2 log CFU / g for hypochlorite and 1 log CFU / g for peracetic acid were obtained. Under optimized conditions, a reduction of less than 2 log CFU / g was obtained. The sanitizers had no action on aflatoxins, being efficient only for fungi control. The treatments did not cause unacceptable sensory impact on the samples.

**Keywords:** *Aspergillus nomius*, Brazil nuts, sanitizers.

## 1. INTRODUÇÃO

A castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*, H. B. K) é uma importante espécie de exploração extrativista da Amazônia, e suas amêndoas têm elevado valor nutritivo, promovendo benefícios à saúde, o que tem contribuído para o reconhecimento deste produto no mercado internacional (Cardoso et al., 2017). Contudo, por conta das condições precárias de armazenamento e processamento a castanha está sujeita a contaminações (Freitas - Silva e Venancio, 2011).

Entre os principais contaminantes da castanha-do-Brasil, destaca-se o *Aspergillus nomius* que é um fungo pertencente à seção *Flavi*, com potencial para produzir os quatro tipos de aflatoxinas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>) (Olsen et al., 2008, Moore et al., 2015, Taniwaki et al., 2017). As aflatoxinas são um grupo de metabólitos secundários extremamente tóxicos e cancerígenos que podem contaminar os alimentos no campo, no armazenamento ou após o processamento (Arrus et al., 2005; Baquião et al., 2012, Taniwaki et al., 2017).

Portanto, o desenvolvimento de intervenções que reduzam o crescimento de fungos aflatoxigênicos e conseqüentemente a produção de aflatoxinas são do interesse da indústria, principalmente para castanhas que serão consumidas sem nenhum processo validado de conservação (ICMSF, 2015). Neste sentido, para assegurar a qualidade deste produto, a descontaminação das superfícies de castanhas através da sanitização quando realizada de forma ideal consiste em uma boa técnica para o controle da contaminação (Gil et al., 2009).

O hipoclorito de sódio tem sido amplamente empregado para sanitização de vegetais minimamente processados, apesar de sua eficiência ser reduzida na presença de matéria orgânica (Finten et al., 2017). Além deste problema, a possível formação de compostos clorados cancerígenos na água (Meireles et al., 2016) tem promovido a utilização de medidas alternativas ao uso do cloro, como o a utilização do ácido peracético (Olmez e Kretschmar, 2009). O Acido peracético é um sanitizante que possui efeitos antimicrobianos contra um amplo espectro de bactérias, vírus e fungos, e tem sido usado para controlar bactérias em alimentos, utensílios e equipamentos, aprovado pela Food and Drug Administration para descontaminação de frutas (FDA, 2001, Olmez e Kretschmar et al., 2009, Zoelner et al., 2018).

Embora *A. nomius* seja frequentemente isolado em castanhas-do-Brasil, não há relatos que tenham avaliado a eficácia dos tratamentos de sanitização contra esse fungo potencialmente aflatoxigênico. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia

dos sanitizantes hipoclorito de sódio e ácido peracético frente a conídios de *A.nomius* intencionalmente aderidos na superfície de castanhas-do-Brasil. Assim como, o efeito da aplicação dos sanitizantes, na condição proposta, sobre as características microbiológicas e sensoriais das castanhas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Amostras de castanha-do-Brasil

Os ouriços de castanha-do-Brasil foram coletadas em uma área de produção localizada no município de Tomé-açu, PA. As amostras foram separadas em três grupos: grupo 1- amostras que foram submetidas a análises microbiológicas e físico-químicas; grupo 2- amostras que foram enviadas para Laboratório de Resíduos e Contaminantes da Embrapa Agroindústria de Alimentos-RJ, para quantificação de aflatoxinas; grupo 3- amostras para a avaliação da eficiência dos sanitizantes e determinação da melhor condição de concentração e tempo de contato. Para as análises microbiológicas, físico-químicas e aflatoxinas as amostras foram coletadas em triplicata.

### 2.2 Análises Microbiológicas

Em todas as amostras foram realizadas a contagem de bactérias aeróbias mesófilas e de fungos totais que seguiram metodologias descritas no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Downes; Ito, 2001) e a contagem de *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, de acordo com metodologia proposta por Pitt et al. (1983). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Foi utilizada metodologia de lavagem superficial (Silva, Junqueira et al., 2017), onde após a pesagem de cada amostra de 50g (3 castanhas inteiras com cascas) as diluições iniciais ( $10^{-1}$ ) foram preparadas com água peptonada a 0,1 %. Para a contagem de bactérias aeróbias mesófilas, foi utilizado o meio ágar PCA- (Plate Count Agar) (Merck), com incubação a 35 °C por 48 horas  $\pm$  2h. Na contagem de fungos totais utilizou-se o meio ágar DRBC- (Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol) (Merk), com incubação das placas em DBO a 25 °C durante 5 dias. Para *Aspergillus flavus* e *A.parasiticus* foi utilizado o meio AFPA- (*Aspergillus Differentiation* Agar base) (Sigma-Aldrich), com incubação em DBO a 30 °C durante o tempo de 42 a 48 horas. Todos os resultados foram expressos em log UFC / g.

### 2.3 Análises Físico-Químicas

Foram feitas as determinações da atividade de água, através do aparelho Aqualalab (Decagon Modelo–série 4 TEV) e umidade de acordo com AOAC (2005), através de secagem em estufa a 105 °C com circulação de ar.

### 2.4 Quantificação de aflatoxinas

A quantificação de aflatoxinas foi realizada no Laboratório de Resíduos e Contaminantes da Embrapa Agroindústria de Alimentos-RJ, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) com detector de fluorescência com excitação de 360 nm e emissão de 440 nm, sistema de derivatização Kobra-cell®.

As condições cromatográficas para análise de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 no extrato fúngico foram as seguintes: Fase móvel: Acetonitrila: Metanol: Água: KBr: HNO<sub>3</sub>4M (290: 390: 1320: 390: 1,17mL; Fluxo: 0,8mL / min.; Coluna: XBridge™ C18 (250 x 4,6 mm, 5. µm); Detector: Fluorescência; Excitação: 360, emissão 440; Volume de injeção: 40 µL; corrente: 100 µA. Para cálculo de derivatização pós-coluna (com Kobra-cell®) foi utilizada a seguinte expressão:

$$\text{Aflatoxinas } (\mu\text{g/kg}): \frac{Ca \times V1 \times V3}{m \times V2}$$

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

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

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

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

m= massa da amostra em kg.

Ordem de eluição: G2, G1, B2, B1.

### 2.6 Eficiência dos sanitizantes hipoclorito de sódio e ácido peracético para a redução de *A. niumus* intencionalmente inoculado em superfícies de castanhas-do-Brasil.

#### 2.6.1 Sanitizantes

Foram utilizados os sanitizantes Hipoclorito de sódio, solução comercial (2,5 % Qboa) e o ácido peracético PAC 200 (Adpro).



### 2.6.2 Preparo da suspensão de conídios de *A.nomius*

A cepa de *Aspergillus nomius* IEC-F01 foi isolada de amostras de castanha-do-Brasil e cedida pelo Laboratório de Resíduos e Contaminantes da Embrapa Agroindústria de Alimentos-RJ. O cultivo foi realizado, em tubos inclinados com meio Ágar Sabouraud e incubados por 7 dias a 27 °C. A suspensão foi preparada pela adição de 7 ml de peptona salina estéril com *tween* 80 à 0,01%. Em seguida o conteúdo foi transferido para um tubo *falcon* e a concentração ajustada a  $10^8$  conídios utilizando densitômetro (Densichek plus Instrument bioMeriux-SA) (Freitas-Silva et al., 2013).

### 2.6.3 Contaminação das castanhas e aplicação dos sanitizantes

As amostras de castanha-do-Brasil (44), inteiras e com cascas, foram lavadas com água para retirada do excesso de matéria orgânica, em seguida, foram pesadas e armazenadas em frascos de vidro, uma castanha por recipiente, esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 minutos (Freitas-Silva et al., 2013). Além dos frascos que seriam destinados aos ensaios com os sanitizantes, realizou-se a esterilização de um frasco adicional com castanha. A amostra deste frasco foi plaqueada diretamente em meio DRBC para controle do processo de descontaminação.

Para cada frasco composto por uma castanha previamente esterilizada, foram adicionados em 10 pontos diferentes da superfície da castanha 0,1 mL da suspensão de conídios (Salomão et al., 2008). Em seguida, os frascos permaneceram na câmara de fluxo por 24 horas, para que houvesse a fixação dos conídios. As castanhas foram tratadas com o sanitizante através da técnica de imersão, sendo adicionados 40 mL das soluções sanitizantes nos frascos. Foram realizados 11 tratamentos em duplicata, para cada sanitizante, variando o tempo de contato e a concentração do sanitizante (de acordo com delineamento experimental). Após o término de cada tratamento, foram adicionados 0,4 mL de solução de tiosulfato de sódio 0,6% para cessar a reação, então, as castanhas foram levemente agitadas por 1 minuto (Salomão et al., 2011).

Para avaliar a redução microbiológica provocada pela solução sanitizante, após o tempo de contato foi realizado o plaqueamento direto de 0,1 mL da solução de contato em placas com meio DRBC e incubadas a 25 °C por 5 dias.

Como controle da fixação de conídios, algumas amostras de castanhas foram contaminadas, mas não foram tratadas com os sanitizantes. Após o período destinado à contaminação, foram adicionados 40 mL de água com *tween* 80 aos frascos, as castanhas

permaneceram em contato com a água por 15 minutos em repouso, em seguida realizou-se a agitação por um minuto, após este período, 0,1 mL do conteúdo foi inoculado em meio DRBC para quantificação do número de conídios aderidos.

Para a avaliação do efeito dos tratamentos de sanitização foi realizado o cálculo de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Equação 1: RD} = \text{Log} \left( \frac{N_0}{N} \right)$$

Em que: RD: Número de reduções decimais;  $N_0$ : Concentração da população inicial de células (UFC / g); N: Concentração de sobreviventes após o tratamento aplicado (UFC / g).

## 2.7 Delineamento Experimental

Para a avaliação da eficiência dos sanitizantes sob a contaminação de *Aspergillus nomius* em castanha-do-Brasil utilizou-se a metodologia de superfície de resposta através da aplicação de um Delineamento Composto Central Radial (DCCR) tendo como objetivos a máxima redução do fungo. Sendo as variáveis independentes a concentração dos sanitizantes e o tempo de contato com superfície de castanha e como variável dependente a redução de *Aspergillus nomius*.

O Delineamento Composto Central Radial (DCCR) para duas variáveis independentes e dois níveis ( $2^2$ ) foi composto de quatro ensaios fatoriais, quatro ensaios nas condições radiais (interações com os pontos centrais) três repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios para cada sanitizante testado. Foi utilizado como controle a contagem de *Aspergillus nomius* em castanhas imersas em água.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatística versão 7.0. As matrizes do delineamento utilizadas neste trabalho estão apresentadas nas Tabelas 1.

**Tabela 1.** Níveis utilizados no delineamento experimental para a sanitização de castanha-do-Brasil com os sanitizantes hipoclorito de sódio e ácido peracético.

Sanitizante	Variáveis dependentes	Níveis		
		-1	0	+1
hipoclorito de sódio	Concentração (mg / L)	100	200	300
	Tempo (minutos)	2	8,5	15
ácido peracético	Concentração (mg / L)	20	80	140
	Tempo (minutos)	2	8,5	15

## **2.8 Avaliação da eficiência dos sanitizantes sob a condição ótima de tempo de contato e concentração em amostras de castanhas-do-Brasil.**

Após a obtenção das condições ideais para a aplicação dos sanitizantes, foi realizada uma nova coleta de amostras de castanhas-do-Brasil (n=3) para a avaliação dos tratamentos sob a redução da microbiota natural das castanhas. As amostras foram submetidas às análises microbiológicas descritas no tópico (2.2) e quantificação de aflatoxinas (tópico 2.4).

## **2.9 Análise Sensorial**

As castanhas com contaminação natural foram tratadas com os sanitizantes, descascadas e secas em estufa a temperatura de 60 °C até atingir umidade abaixo de 10% (PAS, 2004). Após processamento as castanhas foram armazenadas em frascos de vidro e no dia seguinte foram avaliadas sensorialmente por 100 provadores. Para cada provador foram servidas um grupo de três amostras (castanhas não tratadas; castanhas tratadas com hipoclorito; castanhas tratadas com ácido peracético) que foram codificadas e servidas aleatoriamente. Cada provador foi convidado a atribuir pontuações para os atributos aroma e sabor em uma escala hedônica estruturada em nove pontos. Para o cálculo do índice de aceitabilidade (I.A), foi utilizada a expressão:  $IA (\%) = A \times 100/B$  em que: A = nota média obtida para o atributo; B=nota máxima dada para o atributo (Teixeira et al., 1987). A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de ética da Universidade Federal do Pará (CAAE: 98215118.5.0000.0018) sob o parecer de número 3.040.313.

## **2.10 Análise Estatística**

Os resultados das análises microbiológicas e dos testes sensoriais foram avaliados através de análise de variância (ANOVA) e teste complementar de comparação de médias de Tukey à 5%, utilizando o programa Statistica 7.0.

# **3 RESULTADOS**

## **3.1 Análises Microbiológicas**

As amostras de castanhas-do-Brasil analisadas apresentaram uma elevada carga microbiológica superficial. Com valores médios (log UFC / g) de  $6,25 \pm 0,16$ ;  $6,02 \pm 0,11$  e  $3,74 \pm 0,75$ , para contagem de bactérias aeróbias mesófilas, fungos totais e *A.flavus* e *A.parasiticus*, respectivamente.

### 3.2 Análises Físico-Químicas

A média de umidade de castanhas com casca, e das amêndoas foi de  $32,6\% \pm 1,42$  e  $26,5\% \pm 0,90$ , respectivamente. Os valores médios de atividade de água em amostras de casca e amêndoas de castanhas-do-Brasil, encontrados foram de  $0,89 \pm 0,015$  e  $0,75 \pm 0,38$ , respectivamente.

### 3.3 Análise de aflatoxinas

Em nenhuma das amostras analisadas detectou-se a presença de aflatoxinas.

### 3.4 Condições ótimas de aplicação do hipoclorito de sódio e ácido peracético para a redução de *A. nomius* em castanhas-do-Brasil.

Os resultados de número de logs de reduções decimais (RD) para otimização das condições de tempo de contato e concentração dos sanitizantes hipoclorito de sódio e ácido peracético para a redução de *A. nomius*, intencionalmente inoculado em castanhas-do-Brasil, estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Resultados dos ensaios para otimização da aplicação de hipoclorito de sódio e ácido peracético para a redução de *A. nomius* inoculado em castanhas-do-Brasil.

Tratamentos	Variáveis independentes Codificadas		Variáveis dependentes Log RD <i>A. nomius</i>	
	V1	V2	Hipoclorito de sódio *	Ácido peracético *
T1	-1	-1	$0,69 \pm 0,15$	$0,47 \pm 0,03$
T2	1	-1	$0,87 \pm 0,01$	$0,52 \pm 0,08$
T3	-1	1	$1,52 \pm 0,39$	$0,69 \pm 0,17$
T4	1	1	$1,78 \pm 0,01$	$1,02 \pm 0,10$
T5	-1	0	$1,24 \pm 0,60$	$0,72 \pm 0,08$
T6	1	0	$1,14 \pm 0,06$	$0,81 \pm 0,08$
T7	0	-1	$1,35 \pm 0,55$	$0,44 \pm 0,14$
T8	0	1	$1,60 \pm 0,02$	$0,76 \pm 0,04$
T9	0	0	$2,16 \pm 0,02$	$0,62 \pm 0,05$
T10	0	0	$2,14 \pm 0,04$	$0,59 \pm 0,01$
T11	0	0	$1,96 \pm 0,13$	$0,63 \pm 0,07$
T0			$3,34 \pm 0,18$	$3,59 \pm 0,04$

V1: tempo de contato das castanhas com o sanitizante (minutos); V2: Concentração de sanitizante (mg / L); RD: Log de reduções decimais de *A. nomius*; \* Valores médios  $\pm$  desvio padrão, T0: Tratamento controle (castanhas lavadas com água com tween 0,01% por 15 min).

Observa-se na Tabela 2 que o maior número de reduções para o hipoclorito de sódio ocorreu no ensaio T9 (RD: 2,16), correspondente ao ponto central (8,5 minutos/ 200 mg / L)

enquanto que, para o ácido peracético no ensaio T4 (RD: 1,02) onde as duas variáveis estudadas encontravam-se nos maiores níveis avaliados (15 minutos/ 140 mg / L).

A partir dos dados da Tabela 2, foram realizados os tratamentos estatísticos para avaliação da resposta (log de redução de *A. nomius*) em função das variáveis testadas. As variáveis significativas foram definidas através da análise do valor de  $P < 0,05$ , sendo consideradas como significativas para a aplicação do hipoclorito de sódio, as variáveis tempo quadrática (Q), concentração linear (L) e concentração quadrática (Q). Com relação aos tratamentos com ácido peracético, todas as variáveis foram consideradas significativas ( $P < 0,05$ ). Após a definição das variáveis foi avaliada a significância da regressão e da falta de ajuste do modelo através do teste F.

A análise de variância do tratamento com hipoclorito de sódio mostrou que o modelo ajustado para a RD *A. nomius* (Tabela 3) foi significativo (F calculado  $>$  F tabelado) com 95% de confiança. A falta de ajuste do modelo não foi significativa, e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi 0,80, indicando que o modelo explicou 80% da variação dos dados. Quanto mais próximo de 1 for  $R^2$ , melhor será o ajuste do modelo (Neto et al., 2001).

Os coeficientes de regressão, valor de F e p para as variáveis significativas, estão apresentados junto ao modelo ajustado proposto para redução de *A. nomius* em função da variação do tempo de contato e concentração do hipoclorito de sódio na Tabela 3.

**Tabela 3.** Coeficientes de regressão, valores F da ANOVA, níveis de probabilidade dos parâmetros (P), coeficiente de determinação ( $R^2$ ) do modelo de RD de *A. nomius* utilizando hipoclorito de sódio como sanitizante.

	Coef. de regressão	F	P
Média	1,95263	-	-
Tempo (Q)	-0,561579	65,84667	0,014849
Concentração (L)	0,331667	54,39698	0,017891
Concentração (Q)	-0,276579	15,97167	0,057284

**Modelo ajustado:**

$$*RD: 1,95 - 0,56V1^2 + 0,33V2 - 0,27 V2^2 \quad \text{Falta de ajuste } F= 7,23858 \quad P= 0,125818 \quad R^2 = 0,80836$$

\*RD: N° de reduções decimais; V1: tempo (minutos); V2: Concentração (mg / L)

Para os tratamentos com o ácido peracético, a análise de variância mostrou que o modelo ajustado para a RD *A. nomius* (Tabela 4) foi significativo com 95% de confiança, além de preditivo (Box & Wetz, 1973). A falta de ajuste do modelo não foi significativa, e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi 0,96.

Os coeficientes de regressão, valor de F e p para as variáveis significativas, estão apresentados junto ao modelo ajustado proposto para redução de *A. nomius* pelo ácido peracético na Tabela 4.

**Tabela 4.** Coeficientes de regressão, valores F da ANOVA, níveis de probabilidade dos parâmetros (p), coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) do modelo de RD de *A. nomius* utilizando ácido peracético como sanitizante.

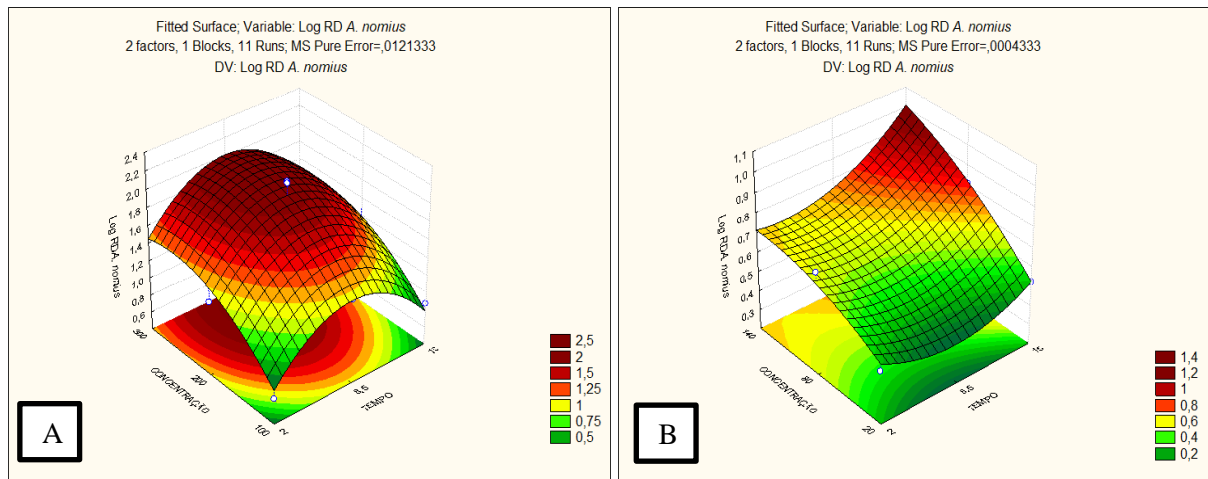
	Coef. de regressão	F	P
Média	0,629474	-	-
Tempo (L)	0,078333	84,9615	0,011566
Tempo (Q)	0,111316	72,4409	0,013525
Concentração (L)	0,173333	416,000	0,002395
Concentração (Q)	-0,053684	16,8486	0,054542
Interação	0,070000	5,83000	0,021402

**Modelo ajustado:**

**\*RD: 0,62 + 0,07 V1+ 0,11V1<sup>2</sup>+ 0,17V2- 0,05 V2<sup>2</sup> + 0,07V1V2** Falta de ajuste F= 5,83  
p= 0,14 R<sup>2</sup> = 0,96

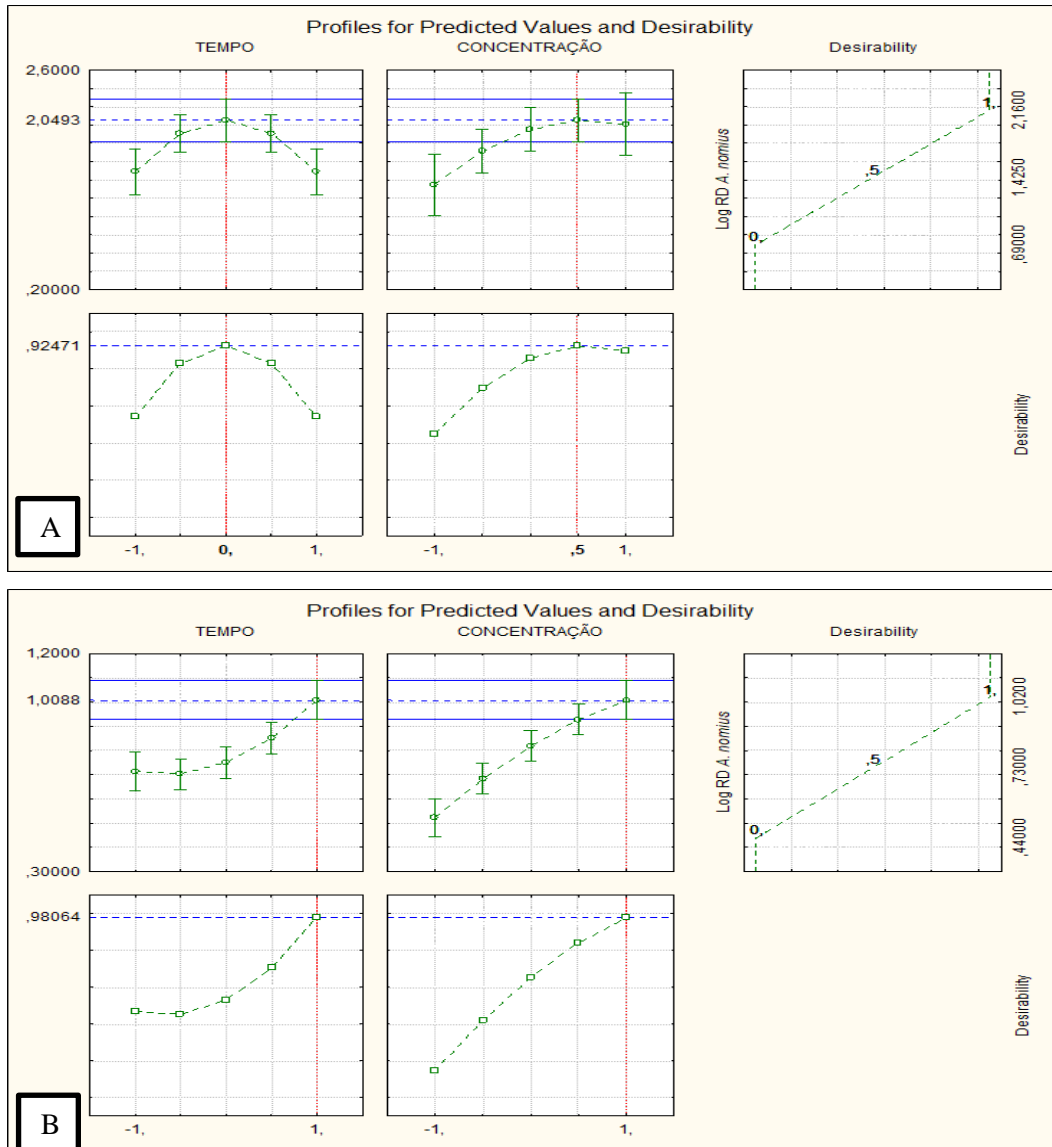
\*RD: N° de reduções decimais; V1: tempo (minutos); V2: Concentração (mg / L).

Na Fig. 1 estão apresentadas as curvas de nível e superfície de respostas obtidas a partir dos modelos propostos.



**Fig. 1.** Superfície de respostas para os modelos de redução de *A. nomius* em função das condições de tempo de contato e concentração dos sanitizantes. **A.** hipoclorito de sódio. **B** ácido peracético.

A determinação da condição ideal para aplicação do hipoclorito e do ácido peracético em castanhas foi estimada baseado no modelo estatístico proposto e através da função desejabilidade (Fig. 2).



**Fig. 2.** Condições ótimas para aplicação de hipoclorito de sódio (A) e ácido peracético (B) na superfície de castanhas-do-Brasil.

De acordo com a análise dos gráficos, as linhas tracejadas vermelhas indicam as condições de máxima desejabilidade global. Desta forma, o ponto ótimo para maximização da redução de *A. nomius*, para o hipoclorito foram 8,5 minutos e 250 mg / L, e para o ácido peracético 15 minutos e 140 mg / L.

### 3.5 Avaliação microbiológica, sensorial e aflatoxinas das castanhas-do-Brasil tratadas com hipoclorito de sódio e ácido peracético, nas condições otimizadas.

Após a otimização das condições de aplicação dos sanitizantes, foi observado que a concentração proposta para o ácido peracético (140 mg / L) encontrou-se acima do limite permitido pela legislação (80 mg / L), desta forma, os testes microbiológicos, sensoriais e

aflatoxinas para as castanhas tratadas com ácido peracético foram realizados na condição de 80 mg / L por 15 minutos (FDA, 2001).

Nos resultados das análises microbiológicas (Tabela 5), as amostras de castanha que não foram tratadas apresentaram diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) das amostras sanitizadas para os resultados de bactérias e fungos totais. Entretanto, não foi detectada diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos com os sanitizantes, para estes micro-organismos.

Para a contagem de *A. flavus* e *A. parasiticus*, não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre as amostras não tratadas e as que foram sanitizadas, nem entre os tratamentos.

**Tabela 5.** Resultados das análises microbiológicas da superfície de amostras de castanha-do-Brasil e da redução microbiológica nas condições ótimas de aplicação dos sanitizantes hipoclorito de sódio e ácido peracético.

Amostras (n=3)	Bactérias aeróbias*	Log RD	Fungos*	Log RD	<i>A. flavus</i> e*	Log RD
	Mesófilas (log UFC / g)		totais (log UFC / g)		<i>A. parasiticus</i> (log UFC / g)	
NT	5,89 <sup>a</sup> ± 0,24		6,29 <sup>a</sup> ± 0,10		2,05 <sup>a</sup> ± 0,30	
HS	4,02 <sup>b</sup> ± 0,56	1,86	4,46 <sup>b</sup> ± 1,17	1,83	1,87 <sup>a</sup> ± 0,10	0,18
PAA	4,73 <sup>b</sup> ± 0,22	1,16	4,64 <sup>b</sup> ± 0,24	1,65	1,92 <sup>a</sup> ± 0,19	0,14

\*: Valores médios ± desvio padrão; NT: Não tratada; HS: Hipoclorito de sódio (250 mg / L / 8,5 min); PAA: Ácido peracético (80 mg / L / 15 min); RD: log Redução; letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras ( $P < 0,05$ ).

Com relação à redução microbiana provocada pelos tratamentos com os sanitizantes, o hipoclorito de sódio proporcionou as maiores logs de reduções, quando comparado ao ácido peracético. Entretanto, para os dois sanitizantes foram obtidas reduções inferiores a 2 logs.

Nos resultados da análise sensorial das amostras de castanha-do-Brasil (Tabela 6), não houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre as amostras não tratadas e tratadas com os sanitizantes para os atributos avaliados.

**Tabela 6.** Resultados da análise sensorial de amostras de castanha-do-Brasil nas condições ótimas de aplicação dos sanitizantes hipoclorito de sódio e ácido peracético.

Amostras (n=100)	Atributos*		Aceitabilidade global	
	Aroma	Sabor	Aroma	Sabor
NT	6,55 <sup>a</sup> ± 1,57	6,70 <sup>a</sup> ± 1,77	73%	74%
HS	6,58 <sup>a</sup> ± 1,43	6,87 <sup>a</sup> ± 1,83	73%	76%
PAA	6,31 <sup>a</sup> ± 1,59	6,92 <sup>a</sup> ± 1,46	70%	77%

\*: Valores médios ± desvio padrão; NT: Não tratadas; HS: Hipoclorito de sódio (250 mg / L / 8,5 min); PAA: Ácido peracético (80 mg / L / 15 min); letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras ( $P < 0,05$ ).



Com relação aos resultados de aflatoxinas, somente foram detectadas aflatoxinas B1. Sendo que, em uma amostra não tratada (1,51 µg/kg), em uma amostra tratada com hipoclorito de sódio (0,60 µg/kg) e em duas amostras tratadas com ácido peracético (0,64 e 0,72 µg/kg). Todos resultados encontraram-se abaixo do limite preconizado (20 µg/kg) pela Legislação (Brasil, 2011).

#### 4. DISCUSSÃO

Este estudo foi realizado para avaliar a eficiência do hipoclorito de sódio e do ácido paracético na descontaminação superficial de castanhas-do-Brasil. A quantificação da microbiota inicial das castanhas, revelou uma elevada carga microbiológica, o que pode ser explicado pelos focos de contaminação ao longo da cadeia produtiva, pelos quais, as castanhas são expostas, seja nas árvores através de animais que deixam inóculos nos ouriços, ou ainda após a queda e contato dos ouriços com o solo (Reis et al., 2012), inclusive a permanência dos ouriços no solo é sugerida como a principal via de contaminação das castanhas (Baquião et al., 2012). Os focos de contaminação aliados às condições climáticas da floresta amazônica, com elevada umidade e clima tropical favorecem o desenvolvimento de micro-organismos (Freitas-Venâncio, 2011, Baquião et al., 2013).

Os valores de umidade encontraram-se acima dos valores encontrados por Reis et al., (2012) (14,96% cascas e 4,37% amêndoas) e Pacheco et al., (2010) (22,43% amostras com casca). Alvares et al., (2012) afirmam que a umidade das castanhas é um fator que favorece a proliferação de fungos, inclusive de espécies produtoras de aflatoxinas, o que é considerado o maior perigo associado às castanhas-do-Brasil. Sendo válido enfatizar que a atividade de água das cascas encontra-se dentro da faixa mínima de 0,78 - 0,84 estabelecida para o crescimento de *Aspergillus* (Pitt Hocking, 2009) assim como, para a produção de micotoxinas (maior que 0,85) (Schmidt - Heydt et al., 2009). Taniwaki et al., (2017) também identificaram várias espécies micotoxigênicas nas cascas e nas amêndoas de castanha, estabelecendo a relação direta entre os parâmetros umidade e atividade de água e a proliferação destes micro-organismos.

Em nenhuma das amostras analisadas detectou-se a presença de aflatoxinas. Embora a contaminação por fungos totais e por *A. flavus* e *A. parasiticus* ter sido considerada elevada. A presença de fungos produtores de aflatoxinas não implica necessariamente na presença destes

compostos em castanhas-do-Brasil (Arrus et al., 2005, Baquião et al., 2013). A ausência de aflatoxinas nas amostras de castanhas neste trabalho não era um resultado esperado, devido aos elevados valores de atividade de água e umidade. Entretanto, para que as aflatoxinas possam ser produzidas, adicionalmente a estes parâmetros, são necessários um conjunto de fatores tais como a temperatura, disponibilidade de substrato, umidade relativa do ambiente em níveis ideais (Rodrigues et al., 2012). Além disso, ressalta-se que as castanhas foram analisadas pouco tempo após a coleta, conseqüentemente, o tempo de interação do fungo com o substrato pode não ter sido suficiente para a produção das aflatoxinas (Johnson et al., 2008). Estes resultados reforçam a hipótese de que a intensificação das coletas, ou seja, a redução do tempo de permanência dos ouriços em contato com o solo corresponde a uma boa estratégia para minimizar a contaminação por fungos aflatoxigênicos em castanhas.

Neste contexto, constata-se a importância da inserção de melhorias no processamento da castanha que possam proporcionar uma redução da contaminação fúngica e conseqüentemente resultar na redução de aflatoxinas. Com relação aos modelos de otimização para a aplicação dos sanitizantes em superfícies de castanhas-do-Brasil intencionalmente contaminadas, para o modelo proposto para o hipoclorito, pode se destacar o tempo como principal interferente sobre a resposta. A variável quadrática tempo apresentou um efeito negativo sobre a resposta, indicando que um aumento deste fator resultou em uma menor redução de *A. nomius*. Ao analisar os gráficos de superfície de resposta (Fig. 1A) é possível identificar que as maiores reduções de *A. nomius* ocorreram em 8,5 minutos, em concentrações de 200 a 300 mg / L., entretanto, ao aumentar o tempo de contato acima de 8,5 minutos, a superfície começa a ter um declínio nos valores de resposta. Este comportamento é um indicativo de que foi alcançada a condição ótima para este parâmetro, conseqüentemente, valores acima deste ponto podem resultar em uma redução menor que o esperado. Santos et al., (2012) avaliando a sanitização de alfaces com hipoclorito também observou uma diminuição na redução microbiológica aumentando o tempo de contato de 15 para 30 minutos, além disso o aumento do tempo não interferiu significativamente nas cargas microbianas presentes.

Com relação à concentração, as duas variáveis (linear e quadrática) apresentaram significância ( $P < 0,05\%$ ). A variável linear apresentou um efeito positivo na resposta, a análise da superfície de resposta (Fig. 1A), indica que inicialmente ocorre um aumento do número de log de RD proporcional ao aumento da concentração, além disso, em ampla faixa de concentração, variando de 200 mg / L a, aproximadamente, 300 mg / L são obtidas as

maiores reduções de *A.nomius*. Estes resultados, estão de acordo com os resultados obtidos por Salomão et al., (2008) que em estudo aplicando hipoclorito em maçãs inoculadas com *penicilium* obteve um aumento no valor de RD ao aumentar a concentração de 50 para 200 mg / L.

A variável concentração quadrática apresentou um efeito negativo, sugerindo que após a região ótima, ocorre um declive na superfície de resposta, causado pela redução de *A. nomius*. É importante frisar que mesmo após o ponto ótimo, para valores de concentrações maiores, é mantido um comportamento de elevada redução de *A. nomius*. Para o modelo proposto para o ácido peracético, as variáveis lineares tempo e concentração, variável quadrática tempo e a interação entre as duas variáveis foram significativas ( $P < 0,05\%$ ), e apresentaram efeito positivo sobre a resposta, indicando que o aumento do tempo e concentração causam um aumento na redução de *A. nomius* em castanhas-do-Brasil. A variável concentração quadrática apresentou um efeito negativo, porém menor em relação às demais.

Diferentemente da superfície de resposta obtida para o hipoclorito, ao observar a superfície de resposta para o ácido peracético (Fig. 1 B) observamos uma tendência de maximização da resposta nas maiores concentrações e tempo de contato, na região de 12 a 15 minutos e concentração de 100 a 140 mg / L, não sendo observada uma curva de maximização, bem acentuada, apesar de atingida a otimização, visto que termos quadráticos foram incluídos no modelo (Tabela 6). Estes resultados diferiram do modelo proposto por Vandekinderen et al., (2009), que utilizando o PAA para sanitização da alface, obteve um modelo linear.

Ao comparar os dois modelos observa-se uma maior redução provocada pelo hipoclorito (Tabela 4). Com uma redução de até 2,16 log UFC / g quase o dobro da redução causada pelo ácido peracético 1,02 log UFC / g nas castanhas inoculadas com *A.nomius*. Bernardi et al., (2018) estudando os principais sanitizantes utilizados na indústria de alimentos frente a vários fungos, aponta o hipoclorito como o sanitizante mais eficiente seguido do ácido peracético.

O perfil de desejabilidade (Fig. 2) apresenta como condições ótimas para aplicação do hipoclorito o tempo de 8,5 minutos e concentração de 250 mg / L, e para o ácido peracético o tempo de 15 minutos e concentração de 140 mg / L. Para o hipoclorito os valores estiverem de acordo com a Legislação (RS, 2009). Entretanto, para o ácido peracético, a condição proposta encontrou-se acima do limite permitido para uso em alimentos. Por conta disso, os ensaios

com ácido peracético em amostras naturalmente contaminadas foram realizados na concentração de 80 mg / L por 15 minutos, concentração recomendada pela FDA (FDA, 2001).

Após a otimização, ao aplicar os sanitizante hipoclorito na condição otimizada e o ácido peracético na condição imposta pela legislação, observamos uma redução microbiológica inferior as amostras contaminadas artificialmente, o que pode ser justificado pelas forças de ligação dos micro-organismos pertencentes a flora natural da castanha. Neo et al., (2013), justifica que os micro-organismos da flora natural têm tempo suficiente para aderir fortemente à superfície dos vegetais, diferindo dos micro-organismos inoculados. Além disso, foi visto que o hipoclorito apresentou maiores reduções em relação as amostras tratadas com ácido peracético, embora não tenha ocorrido diferença estatística entre as contagens de bactérias, fungos totais e *A.flavus* e *A.parasiticus* entre os tratamentos sanitizantes. A redução provocada pelos tratamentos foi considerada baixa, pois em outros estudos a aplicação de vários sanitizantes em baixas concentrações mostrou alcançar 2 – 3 logs de reduções nas populações microbianas naturais em produtos frescos (Gil et al., 2009; Kim et al., 2018; Bernardi et al., 2018). Entretanto, é válido enfatizar que a matriz vegetal também influencia na intensidade de redução dos tratamentos (Vandekinderen et al., 2009). Da mesma forma, o pH interfere na ação dos sanitizantes, em condições típicas de lavagem a eficiência do cloro é limitada, alcançando a redução de um a dois ciclos logarítmicos na população microbiana (Park et al., 2009).

Foi detectada a presença de aflatoxinas B1 nas amostras não tratadas e nas amostras tratadas com os sanitizantes. Estes resultados indicam que os sanitizantes são importantes para a redução dos fungos, mas não eliminam as aflatoxinas, caso já tenham sido produzidos (WHO, 1979, Carjaval 2013). Com relação aos resultados sensoriais, os tratamentos sanitizantes apresentaram boa aceitação para consumo. Não havendo diferença entre as amostras não tratadas e as tratadas com relação aos atributos sabor e aroma. Confirmando que, do ponto de vista sensorial as condições testadas para o hipoclorito e para o ácido podem ser aplicadas para descontaminação superficial de castanhas-do-Brasil.

## CONCLUSÃO

A contaminação microbiológica da castanhas-do-Brasil, incentiva o desenvolvimento de técnicas que assegurem a qualidade deste produto. O sanitizante hipoclorito de sódio foi mais eficiente que o ácido peracético na redução de *A. nomius* intencionalmente inoculado e ligeiramente superior sob a flora contaminante natural de castanhas. Apesar de não apresentarem efeito sob as aflatoxinas, o uso dos sanitizantes é importante para o controle de fungos. Do ponto de vista sensorial, as amostras tratadas com os dois sanitizantes apresentaram boa aceitação, indicando sua aplicabilidade para a redução da contaminação de fungos aflatoxigênicos em castanhas-do-Brasil.

## REFERENCIAS

- Association of official analytical chemists (AOAC). Official methods of analysis of the 18 th international AOAC. Published by AOAC International. Gaithersburg, 2005.
- Arrus, K., Blank, G., Clear, R., Holley, R.A. e Abramson, D., 2005. Microbiological and aflatoxina evaluation of Brazil nut pods and the effects of unit processing operations. *Journal Food Prot.* v. 68, 1060-1065.
- Álvares, V. S., Castro, I. M., Costa, D.A.; Lima, A.C.; Madruga, A.L.S., 2012. Qualidade da castanha-do-brasil do comércio de Rio Branco, Acre. *Rev. Acta Amazônica.* v. 42 (2), 269 – 274.
- Barros Neto, B., Scarmínio, I.S., Bruns, R.E., 2001. Como fazer experimentos-pesquisas e desenvolvimento na ciência e na indústria. Campinas: Unicamp. 401.
- Baquião, A.C, Zorzete, P., Reis, T. A; Assunção, E.; Vergueiro, B.C., 2012. Myclora and mycotoxins in field samples of Brazil nuts. *Food Control.* v. 28, 224-229.
- Baquião, A. C., de Oliveira, M. M. M., Reis, T. A., Zorzete, P., Atayde, D. D., & Corrêa, B., 2013. Monitoring and Determination of Fungi and Mycotoxins in Stored Brazil Nuts. *Journal of Food Protection,* v. 76 (8), 1414–1420.
- Bernardi, Angé.Olivier., Stefanello, A., Garcia, M.V., Parussolo, G., Stefanello, R.F., Moro, C.B., Copetti, M.V., 2018. Efficacy of commercial sanitizers against fungi of concern in the food industry, *LWT- Food Science and Technology.*
- Box, G.E.P., Wetz, J., 1973. Criteria for judging adequacy of estimation by an approximate response function. University of Wisconsin Technical Report, n.9.

Brasil, Ministério da Saúde, 2009. Portaria nº 78, de 30 de janeiro de 2009, aprova a Lista de Verificação em Boas Práticas para Serviços de alimentação, aprova Normas para Cursos de Capacitação em Boas Práticas para Serviços de Alimentação e das outras providencias, Secretaria de Saúde, Porto Alegre, RS, 30 de janeiro de 2009.

Brasil, Resolução RDC n. 7 de 18 de fevereiro de 2011, dispõe sobre os limites de aflotoxinas totais para diversos substratos produzidos no Brasil. Disponível em < [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)> Acesso em 24/05/2017.

Cardoso, B.R., Silva Duarte,G.B., Reisa, B.Z., Cozzolino, S,M.F., 2017. Brazil nuts: Nutritional composition, health benefits and safety aspects. *Food Research International*, v. 100, 9–18.

Carvajal, M., 2013. Transformación de la aflatoxina b1 de alimentos, en el cancerígeno humano, aducto AFB1 -ADND.R. *Rev. Especializada en Ciências Químico-Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México* v. 16 (2), 109-120.

Downes, F.P.; Ito, K. (Ed.), 2001. *Compendium of methods for the microbiological examinations of foods*.4<sup>th</sup> ed. Washington (DC): APHA.

Finten, G., Agüero, M.V., Jagus, R.J., 2017. Citric acid as alternative to sodium hypochlorite for washing and disinfection of experimentally-infected spinach leaves. *LWT-Food Science and Technology*, v. 82, 318-325.

Food And Drug Administration. Department of Health and Human Services. Secondary direct food additives permitted in food for human consumption: 21 CFR part 173.315 de 2001, peroxyacetic acid, sodium dichloroisocyanurate, sodium hypochlorite and chlorine dioxide atualizado em 2017. Disponível em <<https://www.accessdata.fda.gov>> Acesso em janeiro de 2018.

Freitas-Silva, O., Venâncio, A., 2011. Brazil nuts: benefits and risks associated with contamination by fungi and mycotoxins. *Food Research International*, v. 44, n. 5, 1434–1440.

Freitas-Silva, O., Morales-Valle, H., Venâncio, A., 2013. Potential of Aqueous Ozone to Control Aflatoxigenic Fungi in Brazil Nuts. *Ver. Hindawi Publishing Corporation ISRN Biotechnology*, V. 2013, 1-6.

Gil, M. I., Selma, M. V., López-Gálvez, F., Allende, A., 2009. Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: problems and solutions. *International Journal of Food Microbiology*, v. 134, 37- 45.

International Commission on Microbiological Specification for Foods - ICMSF. *Microrganismos em alimentos* 8, 2015: utilização de dados para avaliação do controle de processo e aceitação de produto. São Paulo: Blucher.

Johsoon, P., Linblad, M., Thim, A.M., Johnsson, N., Vargas, E. A., Medeiros, N.L.; Brabet, C., Quaresma de Araújo, M.; Olsen, M., 2008. Growth of aflatoxigenic moulds and aflatoxin formation in Brazil nuts. *World Mycotoxin Journal*, v. 1, n.2, 127-137.

Kim, S.A., Park, S.H., Knueven, C., Basel, R., Ricke, S.C., 2018. A decontamination approach using a combination of bisulfate of soda and peracetic acid against *Listeria innocua* inoculated on whole apples. *Food Control*, v. 84, 106-110.

Meireles, A., Giaouris, E. & Simões, M., 2016. Alternative disinfection methods to chlorine for use in the fresh-cut industry, *Food Research International*. doi: 10.1016 / Journal food research 2016.01.02.

Moore, G., Mack, B. M., Beltz, S.B., 2015. Genomic sequence of the aflatoxigenic filamentous fungus *Aspergillus nomius* Geromy. *Biomed Central Genomics*. 16, 551.

Neo, S.Y., Lim, P.Y., Phua, L.K., Khoo, G. H., Kim, S.J., Lee, S.C., Yuk, H.G., 2013. Efficacy of chlorine and peroxyacetic acid on reduction of natural microflora, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. on umng bean sprouts. *Food Microbiology*. v. 36, 75-480.

Olsen, M., Johnsson, P., Moller, T., Paladino, R., Lindblad, M., 2008. *Aspergillus nomius*, an important producer in Brazil nuts? *World Mycotoxin Journal*, v 1, n. 2, 123-126.

Olmez, H., Kretzschmar, U., 2009. Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. *LWT - Food Science and Technology*, v.42, 686–693.

PAS. Programa alimentos Seguros. Safety Manual for the quality of the Brazil nut., 2004. Brasília, DF: Campo PaS, 62 pp. (Série Qualidade e Segurança dos alimentos). (in Portuguese).

Pacheco, A. M., Lucas, A. C. S., Parentes, R., Pacheco, N., 2010. Association between aflatoxin and aflatoxigenic fungi in Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). *Food Science and Technology*, v. 30, 1-6.

Park, E.J., Alexander, E., Taylor, G.A., Costa, R. e Kang, D.H., 2009. The decontaminative effects of acidic electrolyzed water for *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* on green onions and tomatoes with differing organic demands. *Food Microbiology*, v. 26, n. 4, 386-390.

Pitt, J .I., Hocking, A. D., G., Iannre., 1983. An improved medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 54, 109-114.

Pitt, J.I, Hocking, A.D., 2009. *Fungi and food spoilage*. 3 rd ed. Dordrecht: Springer.

- Reis, T.A., Oliveira, T.D., Baquião, A.C., Gonçalves, S.S., Zorzete, S.S, Correa, B., 2012. Mycobiota and mycotoxins in Brazil nut samples from different states of the Brazilian Amazon region. *International Journal of Food Microbiology*, v. 159, 61-68.
- Rodrigues, P., Venâncio, A., & Lima, N., 2012. Mycobiota and mycotoxins of almonds and chestnuts with special reference to aflatoxins. *Food Research International*, v. 48(1), 76–90.
- Santos, H.S., Muratori, M.C.S., Marques, A.L.A., Alves, V.C., Filho, F.C.C., Costa, A.P.R., Pereira, M.M.G., ROSA, C.A.R., 2012. Evaluation of the efficacy of sodium hypochlorite in sanitization of lettuce (*Lactuca sativa*). *Rev Inst Adolfo Lutz*, v, 71(1), 56-60.
- Salomão, B.C.M., Aragão, G.M.F., Churey, J.J., Worobo, R.W., 2008. Efficacy of Sanitizing Treatments against *Penicillium expansum* Inoculated on Six Varieties of Apples. *Journal of Food Protection*, v. 71, 643-647.
- Salomão, B.C.M., Müller, C. Massaguer, P.R., Aragão, G. M. F., 2011. Aplicação de dicloroisocianurato de sódio e ácido peracético para redução de esporos de *Penicillium expansum*, *Byssosclamyces fulva* e *Alicyclobacillus acidoterrestris* na superfície de maçãs e em soluções aquosas. *Rev. Alim. Nutr.*, Araraquara v. 22, n. 2, 219-230.
- Silva, N., Junqueira, V.C.A., Silveira, N. F. A., Taniwaki, M.A., Gomes, R.A.R.; Okazaki, M.M., 2017. Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos e água. 5ª Edição, Blucher.
- Schmidt-Heydt, M., Abdel-Hadi, A., Magan, N., Geisen, G., 2009. Complex regulation of the aflatoxin biosynthesis gene cluster of *Aspergillus flavus* in relation to various combinations of water activity and temperature. *International Journal of Food Microbiology*. V. 135, 231–237.
- Taniwaki, M.H., Frisvad, J.C., Ferranti, L.S., Ferranti, L.S., Lopes, A.S., Larsen, T.O., Fungaro, M.H.F., Iamanka, B.T., 2017. Biodiversity of mycobiota throughout the Brazil nut supply chain: From rainforest to consumer. *Food Microbiology*. v, 61, 14-22.
- Teixeira, E., Meinert, E. M., & Barbeta, P. A., 1987. Análise Sensorial de Alimentos. Série Didática. Florianópolis: Editora UFSC, 18 - 102.
- Vandekinderen, F. Devlieghere, B. De Meulenaer, P. Ragaert, J. Van Camp., 2009. Optimization and evaluation of a decontamination step with peroxyacetic acid for fresh-cut produce. *Food Microbiology*., v. 26, 882-888.
- World Health Organization (WHO) Micotoxins (Environmental Health criteria) Geneva p. 21-84, 1979.
- Zoellner, C., Aguayo-Acosta, A., Mohammed Wasim Siddiqui, J.E. Dávila-Aviña., 2018. Peracetic Acid in Disinfection of Fruits and Vegetables Postharvest Disinfection of Fruits and Vegetables. Elsevier. doi.org/10.1016/B978-0-12-812698-1.00002-9.