

Universidade Brasil
Campus de Fernandópolis

MIDIAN NIKEL ALVES DE SOUZA

OZONIZAÇÃO DE CASTANHAS DE CAJU E DO BRASIL PARA O
CONTROLE DE FUNGOS FILAMENTOSOS

EFFECT OF OZONIZATION OF CASHEW NUTS AND BRAZIL NUTS FOR THE
CONTROL OF FILAMENTOUS FUNGI

Fernandópolis, SP
2020

MIDIAN NIKEL ALVES DE SOUZA

OZONIZAÇÃO DE CASTANHAS DE CAJU E DO BRASIL PARA O CONTROLE
DE FUNGOS FILAMENTOSOS

Orientadora Prof^a. Dr^a. Danila Fernanda Rodrigues Frias

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Brasil, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Fernandópolis - SP

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

S713o Souza, Midian Nickel Alves de.
Ozonização de Castanhas de Caju e do Brasil para o Controle de Fungos Filamentosos/ Midian Nickel Alves de Souza.
São Paulo – SP: [s.n.], 2020.
69 p.: il.; 29,5cm.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Brasil, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Orientadora: Prof.^a. Dra. Danila Fernanda Rodrigues Frias.

1.Micotoxinas. 2.Ozônio. 3.Segurança dos Alimentos. I. Título.

CDD 576.163

TERMO DE AUTORIZAÇÃO



Termo de Autorização

Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do Respetivo Programa da Universidade Brasil e no Banco de Teses da CAPES

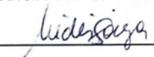
Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2006, autorizo(amos) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site <http://www.universidadebrasil.edu.br>, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://bancodeteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira.

A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

Título do Trabalho: **"OZONIZAÇÃO DE CASTANHAS DE CAJU E DO BRASIL PARA O CONTROLE DE FUNGOS FILAMENTOSOS"**

Autor(es):

Discente: Midian Nikel Alves de Souza

Assinatura: 

Orientadora: Danila Fernanda Rodrigues Frias

Assinatura: 

Data: 07/maio/2020

TERMO DE APROVAÇÃO**TERMO DE APROVAÇÃO****MIDIAN NIKEL ALVES DE SOUZA****“OZONIZAÇÃO DE CASTANHAS DE CAJU E DO BRASIL PARA O CONTROLE DE FUNGOS FILAMENTOSOS”**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:

Prof(a). Dr(á) Danila Fernanda Rodrigues Frias (Presidente)

Prof(a). Dr(a). Gisele Herbst Vazquez (Universidade Brasil)

Prof(a). Dr(a). Carlos Eduardo Maia de Oliveira (IFSP)

Fernandópolis, 07 de maio de 2020.



DEDICATÓRIA

À memória de minha mãe Elfride Nikel Alves, que embora tenha partido com Deus, continua sendo meu exemplo de força e inspiração na vida. Com todo meu amor e gratidão...

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, autor da minha vida, que me propiciou mais essa conquista.

Ao meu pai, pelo amor e constantes orações.

Ao meu querido esposo Fabiano, por me apoiar em todos os projetos e minha amada filha Laura, por ser o motivo dos meus melhores sonhos.

À minha irmã Cinthia e cunhado Otair Neto, incentivadores constantes.

À minha cunhada Luciana, que cuidou tão bem da minha filha para que eu pudesse estudar tranquilamente.

À Universidade Brasil, pela oportunidade de me aprofundar academicamente.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Danila Frias, pela confiança em mim, suporte e incentivo nessa jornada.

Aos professores do Mestrado em Ciências Ambientais pela riqueza dos conhecimentos recebidos, e a todos os funcionários, em especial as técnicas de laboratório Ana e Joelma.

Aos colegas de turma, pela amizade, apoio e as divertidas conversas nos intervalos de aulas e grupo de WhatsApp.

E por fim, a todos que me apoiaram de forma direta e indireta para que eu concluísse mais essa trajetória.

EFEITO DA OZONIZAÇÃO DE CASTANHAS DE CAJU E DO BRASIL PARA O CONTROLE DE FUNGOS FILAMENTOSOS

RESUMO

A contaminação de castanhas por fungos filamentosos, produtores de micotoxinas, é considerada um grave problema de saúde pública, o que torna fundamental seu controle para a obtenção de um produto de qualidade e seguro para o consumidor. Assim, o objetivo nesta pesquisa foi avaliar o efeito fungicida do ozônio contra fungos filamentosos isolados de castanhas de caju e do Brasil. Para isso, utilizou-se 10 amostras de castanhas comercializadas a granel no município de Fernandópolis - SP, no período de outubro a dezembro de 2019. A pesquisa de fungos filamentosos foi realizada por meio do método de diluição seriada e plaqueamento em Ágar Batata Dextrose. As placas foram incubadas a 25°C por 5 dias, e em seguida realizou-se a contagem de colônias e a identificação dos gêneros pela observação das características macroscópicas e estruturas micromorfológicas. Para o teste da eficácia do ozônio, 25g de castanhas foram diluídas em 225 mL de água peptonada a 1%. Este material foi exposto ao ozônio em diferentes tempos (5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos). Em cada intervalo de tempo, alíquotas de 0,1 mL foram inoculadas em triplicata, em placas de Petri contendo Ágar Batata Dextrose, para determinação da concentração fungicida mínima (CFM). Após a tabulação dos dados coletados foram exercidas duas funções de análises estatísticas: descritiva e inferencial. Os dados foram replicados de forma absoluta e relativa. Já no âmbito inferencial, utilizou-se, o teste Teste T Pareado. A microbiota fúngica foi detectada em todas as amostras analisadas, sendo que em 70% destas, mais de um gênero foi isolado. Foram isolados os gêneros: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Absidia* e *Rhizopus*. Com a utilização do ozônio pode-se constatar redução média de 96,5% dos fungos em até 30 minutos de exposição. Concluiu-se que a ozonização se mostrou eficiente na inativação de fungos filamentosos e conseqüentemente, na prevenção da síntese de micotoxinas.

Palavras-chave: micotoxinas, ozônio, segurança dos alimentos.

EFFECT OF OZONIZATION OF CASHEW NUTS AND BRAZIL NUTS FOR THE CONTROL OF FILAMENTOUS FUNGI

ABSTRACT

The contamination of chestnuts by filamentous fungi, which produce mycotoxins, is considered a serious public health problem, which makes its control essential to obtain a quality and safe product for the consumer. Thus, the objective of this research was to evaluate the fungicidal effect of ozone against filamentous fungi isolated from cashew nuts and Brazil nuts. For this, 10 samples of chestnuts commercialized in bulk were used in the municipality of Fernandópolis – SP, from October to December, 2019. The search for filamentous fungi was carried out using the serial dilution method and plating on Potato Dextrose Agar. The dishes were incubated at 25°C for 5 days, then the colony counts and genera identification were performed by observing the macroscopic characteristics and micromorphological structures. To test the effectiveness of ozone, 25g of chestnuts were diluted in 225 mL of 1% peptone water. This material was exposed to ozone at different times (5, 10, 15, 20, 25 and 30 minutes). In each time interval, 0,1 mL aliquots were inoculated in triplicate, in Petri dishes containing Potato Dextrose Agar, to determine the minimum fungicidal concentration (MFC). After tabulation of the collected data, two statistical analysis functions were performed: descriptive and inferential. The data were replicated in an absolute and relative way. In the inferential scope, the test Paired T Test was used. The fungal microbiota was detected in all samples analyzed, and in 70% of these, more than one genus was isolated. The genera were isolated: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Absidia* and *Rhizopus*. With the use of ozone, an average reduction of 96.5% of fungi can be seen in up to 30 minutes of exposure. It was concluded that ozonation was efficient in inactivating filamentous fungi and, consequently, in preventing mycotoxin synthesis.

Keywords: mycotoxins, ozone, food security.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma de processo de beneficiamento da castanha-do-Brasil com e sem casca.	25
Figura 2. Diluição seriada e plaqueamento	41
Figura 3. Ozonização das amostras.....	43
Figura 4. Gêneros de fungos filamentosos isolados em castanhas-do-Brasil e de caju comercializadas a granel no município de Fernandópolis, São Paulo, 2019.....	45
Figura 5. Gêneros de fungos filamentosos em porcentagem média de isolamento encontrados em castanhas-do-Brasil e de caju comercializadas a granel no município de Fernandópolis, São Paulo, 2019.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição centesimal e valor energético da castanha-do-Brasil comestível.	19
Tabela 2. Composição química da amêndoa da castanha de caju (crua e tostada) .	20
Tabela 3. Composição dos ácidos graxos encontrados na amêndoa da castanha-de-caju.....	21
Tabela 4. Valores de temperatura favoráveis para o desenvolvimento de determinadas espécies fúngicas.....	31
Tabela 5. Limites máximos tolerados (Lmt) para micotoxinas em castanhas.....	33
Tabela 6. Agentes oxidantes e respectivos potenciais de oxidação.....	36
Tabela 7. Gênero de fungos filamentosos, por amostra, isolados de castanha-de-caju e castanha-do-Brasil comercializadas a granel no município de Fernandópolis, São Paulo, 2019	44
Tabela 8. Valores médios referentes à contagem (UFC/g) de fungos filamentosos presentes em castanha de caju e castanha-do-Brasil comercializadas a granel no município de Fernandópolis, submetidas ao tratamento com ozônio, Fernandópolis, 2019.	49
Tabela 9. Evolução do tratamento com o gás ozônio, mensurado em porcentagem, de amostras de castanhas-do-Brasil e de caju comercializadas a granel no município de Fernandópolis, São Paulo, 2019.	52

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACC	Amêndoa de castanha-de-caju
AFB1	Aflatoxina B1
AFLs	Aflatoxinas
BPM	Boas práticas de manejo
CFM	Concentração Fungicida Mínima
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FDA	Food and Drug Administration
GRAS	Generally recognized as safe
kGy	kilogray
LCC	Líquido da casca da castanha de caju
LTM	Limites máximos tolerados
µg	micrograma
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mL	Mililitros
mV	Milivolt
O₃	Ozônio
ppb	Partes por milhão
PNCRC	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
s.d.	Sem data
SUDENE	Superintendência do Desenvolvimento do Nordeste
THMs	Trihalometanos
UFC	Unidades formadoras de colônias

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Relevância do tema e estado atual da arte	14
1.2. Fundamentação teórica.....	15
1.2.1. Castanha-do-Brasil.....	16
1.2.2. Castanha-de-caju	17
1.2.3. Produtos derivados das castanhas.....	18
1.2.4. Composição nutricional	19
1.2.5. Produção e Mercado de castanhas	21
1.2.6. Cadeia produtiva das castanhas	23
1.2.7. Micologia dos alimentos	26
1.2.7.1. Fatores que favorecem o crescimento fúngico e a produção de micotoxinas	29
1.2.8. Legislação sobre a Qualidade das castanhas no Brasil	32
1.2.9. Prevenção e controle de micotoxinas em alimentos.....	34
1.3. Objetivo geral	39
1.3.1. Objetivos específicos.....	40
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
2.1. Obtenção e preparo das amostras e análises microbiológicas	41
2.2. Contagem e identificação de fungos filamentosos	42
2.3. Processo de ozonização das castanhas	42
2.4. Análise estatística.....	43
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
3.1. Quantificação de fungos filamentosos.....	44
3.2. Quantificação de fungos filamentosos após ozonização/Eficácia do efeito fungicida do ozônio	48
4. CONCLUSÃO.....	43
REFERÊNCIAS	44

1. INTRODUÇÃO

1.1. Relevância do tema e estado atual da arte

As espécies de fungos produtoras de micotoxinas são encontradas em todas as partes do mundo e podem se desenvolver em inúmeros substratos, e sob variadas condições de temperatura, umidade e pH. Desta forma, as castanhas tornam-se sujeitas à ação desses fungos durante sua colheita, beneficiamento, transporte e armazenamento, quando em condições satisfatórias para o seu crescimento.

As micotoxinas compreendem um conjunto de substâncias tóxicas, produzidas especialmente por espécies de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, que dependendo da quantidade encontrada nos alimentos, causam graves problemas à saúde humana e animal, por serem capazes de induzir efeitos carcinogênicos, hepatotóxicos e mutagênicos. São conhecidos cerca de 400 tipos de micotoxinas, porém, apenas algumas são profundamente estudadas. Dentre elas, as aflatoxinas, produzidas por espécies do gênero *Aspergillus*, por serem consideradas as mais tóxicas (PINHEIRO, 2004).

Dentre todos os produtos agrícolas produzidos no mundo, sabe-se que cerca de 25% estão contaminados por alguma micotoxina (EMBRAPA, 2007). Os mais suscetíveis à contaminação, especialmente por aflatoxinas, são o amendoim, milho, algodão e castanhas, em especial, a castanha-do-Brasil (COELHO, 2012).

Devido a ocorrência de sérios problemas causados pelas micotoxinas, os consumidores estão cada vez mais preocupados com a qualidade do alimento que consomem e acabam exigindo produtos mais seguros e que produzam menor impacto ao meio ambiente e à saúde humana. Assim, a elaboração de legislações, no que se refere aos níveis máximos de micotoxinas permitidos, estão cada vez mais rígidas.

Com o objetivo de evitar a contaminação das castanhas por essas toxinas e atender aos padrões para consumo e comercialização, é fundamental o controle adequado durante todas as etapas da produção. No Brasil a Resolução - RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, dispõe sobre os limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos (ANVISA, 2011).

Além da ANVISA, o PNCRC (Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes) também inspeciona e fiscaliza as cadeias produtivas de alimento, por

meio da verificação da presença e dos níveis de resíduos de substâncias nocivas à saúde do consumidor (BRASIL, 2018).

Dentre as novas tecnologias no controle de microrganismos, o ozônio é uma alternativa ecologicamente correta e economicamente viável no contexto da manutenção e preservação da qualidade dos produtos de origem vegetal. Isso se deve ao fato do mesmo ser um produto seguro, não deixando resíduos nos alimentos, diferente de outros produtos utilizados também na desinfecção (CHIATTONE et al., 2008).

Quando comparado a outros agentes oxidantes, o ozônio se destaca por ser o sanitizante que além de potencial de oxidação, pode entrar em contato com o alimento. Em relação ao potencial de oxidação só perde para o flúor, desse modo, sua elevada capacidade de desinfecção e esterilização lhe permitem uma ação sanitizante em menor tempo de contato e concentração (SILVA et al., 2011).

Sendo assim, investigações de sua atuação sobre uma grande variedade de microrganismos, na forma de células vegetativas ou esporos, em ambientes industriais e também nos alimentos, têm despertado especial atenção de pesquisadores em todo o mundo (CHIATTONE et al., 2008). Por isso, o objetivo neste trabalho foi avaliar o efeito fungicida do gás ozônio sobre fungos filamentosos presentes em castanhas de caju e do Brasil, visando a oferta de alimentos mais seguros ao consumidor.

1.2. Fundamentação teórica

Os alimentos de origem vegetal são uma das principais fontes de compostos biologicamente ativos e de ácidos graxos poli-insaturados. Dentre estes as oleaginosas, em especial as castanhas, são alvo constantes de estudos com a finalidade de elucidar a composição de suas amêndoas e do óleo extraído das mesmas (COSTA e JORGE, 2011).

Segundo os autores supracitados, as castanhas e nozes são sementes riquíssimas em nutrientes, entre eles os ácidos graxos essenciais, que não podem ser sintetizados pelo ser humano. Nozes, amêndoas, castanhas e avelãs, são bastante conhecidas pelo alto teor calórico e diversos benefícios para a saúde.

As castanhas também são descritas como ricas em substâncias antioxidantes, como compostos fenólicos (taninos, ácido elágico, curcumina e flavonoides – luteolina,

quercetina, miricetina, kaempferol, resveratrol) e isoflavonas (genisteína e daidzeína). São normalmente utilizadas como aperitivo, em saladas ou em sobremesas. Em alguns lugares do mundo, onde a carne é proibida, são fundamentais na alimentação (KRIS-ETHERTON et al., 2002).

1.2.1. Castanha-do-Brasil

A Castanheira-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.), conhecida também como “castanha-do-Pará” ou castanha-da-Amazônia”, é uma árvore pertencente à família Lecythidaceae e está presente em regiões com solos arenosos ou argiloarenosos das terras não inundáveis da Floresta Amazônica, incluindo Estados como Amazonas, Acre, Mato Grosso, Pará, Roraima, Rondônia e Tocantins. Está presente também em países como Bolívia, Colômbia, Peru e Venezuela (SALOMÃO, 2009).

De acordo com a classificação botânica, a castanheira-do-Brasil pertence à Divisão: Angiospermae; Classe: Dicotiledônea; Ordem: Myrtiflorae; Família: Lecythidaceae; Gênero: *Bertholletia*; Espécie: *B. excelsa*. É considerada a “rainha” da Floresta Amazônica, pela beleza e porte que apresenta, podendo medir até 50 m de altura e 2 m de diâmetro na base, possui vida longa, chegando até 1.000 anos (BRASIL, 2002).

Embora descrita pela primeira vez em 1808, por Humboldt, Bonpland e Kunth, foi regulamentada como castanha do Brasil para efeito de comércio exterior pelo Ministério da Agricultura em 1961, pelo decreto nº51.209 de 18/08/61. Existe no Brasil cerca de 778.150 castanheiras, distribuídas em 14 milhões de hectares, sendo sua cultura caracterizada pelo extrativismo comunitário, atividade de simples coleta, cujas práticas de cultivo e beneficiamento não existem (TAVARES et al., 2010).

O fruto da castanheira é chamado de ouriço, constituindo-se de uma camada esférica de substância lenhosa, extremamente dura. Podem pesar de 0,5 a 5 kg e conter de 10 a 25 sementes, agudas, triangulares, envoltas em polpa amarela. São coletados nas estações mais chuvosas, durante 5 a 6 meses, quando caem das árvores (BRASIL, 2002).

Segundo Apiz (2009) a castanheira produz frutos anualmente, porém a quantidade de fruto varia ano a ano. As mais novas produzem de 30 a 50 ouriços ao ano, enquanto que as maduras de 200 a 400 anos de idade, podem chegar a produzir até 1.000 em apenas um ano.

Por ser um produto de extrativismo com manejo precário, os ouriços são abertos na floresta, para a retirada de suas sementes, sob condições que favorecem a contaminação por microrganismos, como fungos e coliformes (FIGUEIREDO et al., 2001). A semente, frequentemente chamada de amêndoa, é encontrada em diversos tamanhos, e comercializada de acordo com a classificação do Ministério de Agricultura, Pecuária e do Abastecimento em: com casca e sem casca (BRASIL, 1976).

1.2.2. Castanha-de-caju

O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), pertencente à família Anacardiaceae, é uma planta encontrada em quase todo o mundo tropical, embora em termos de importância econômica sua exploração restrinja-se à Índia, Brasil, Moçambique e Tanzânia (EMBRAPA, 2000). É uma árvore de aparência singular, troncos retorcidos, folhas glabras e frutos reniforme, representando uma cultura perene (OLIVEIRA, 2016).

Historicamente é uma planta nativa do Brasil, isto de acordo com a mais antiga referência conhecida sobre a mesma, feita pelo monge naturalista francês André Thevet (1502-1590) em seu livro “Singularidades da França Antártica”, em 1557, escrito após sua passagem pela costa do Nordeste e Norte do Brasil (ALVES, 2013).

Existem dois tipos de cajueiro bem definidos em relação ao porte, denominados comum e anão. O cajueiro comum, que é mais difundido, possui porte mais elevado, com altura que varia entre 8 e 15 m e envergadura da copa que chega a atingir 20 m. Possui grande variação na distribuição dos ramos e no formato da copa, que vai desde ereta e compacta até espaiada. Sua capacidade produtiva é muito variável, com plantas que produzem menos de 1 kg até cerca de 180 kg de castanha por safra, sendo a idade mínima de estabilização da produção das plantas superior a 8 anos (BARROS, 1988).

Da árvore pode ser obtido um conjunto de produtos, dentre os quais o principal é a castanha de caju de onde se extrai a amêndoa da castanha, que pode atingir até 2 cm de comprimento, utilizada como alimento humano de maneiras variadas. O pedúnculo ou pseudofruto, ainda pouco aproveitado, pode ser consumido *in natura* ou ser utilizado para a fabricação de doces e também para a extração de polpas para sucos e outras bebidas, com o bagaço resultante podendo ser utilizado para ração animal, por meio de processamento adequado (FIGUEIRÊDO JUNIOR, 2006).

1.2.3. Produtos derivados das castanhas

Segundo pesquisa realizada pela EMBRAPA (2008), a castanheira possui várias aplicações. A amêndoa, que apresenta o maior valor, pode ser consumida *in natura* ou ser usada para a extração de óleo; do resíduo da extração do óleo obtém-se torta ou farelo, usada como misturas em farinhas ou rações; o “leite” de castanha, também é de grande valor na culinária regional; além disso, os “ouriços” podem ser usados como combustível ou na confecção de objetos e a madeira com boas propriedades, é indicada para reflorestamento e empregada tanto na construção civil como naval.

O grande mercado da castanha-do-Brasil é justificado pelo seu uso na indústria alimentícia, podendo ser utilizada na produção de farinha desengordurada, panificação, confeitarias, mingaus, doces, suplementos proteicos, leites, bebidas dietéticas, sorvetes, entre outros (MARTINS et al., 2008).

O óleo obtido da castanha tem uma composição muito parecida com a do óleo de gergelim e possui amplas aplicações na indústria de cosméticos. Além de aumentar a hidratação da pele, é usado em repositores faciais, pós-barba e produtos anti-idade. Utilizado, também, na fabricação de produtos para tratamento capilar como cremes, loções, xampus, condicionadores, sabonetes, entre outros (SEBRAE, 2016).

Frequentemente, as amêndoas inteiras e em pedaços maiores são destinadas ao consumo direto, enquanto as quebradas ou em pó são destinadas às indústrias. Por seu padrão de consumo final, integra também o mercado mais amplo de nozes (nuts), do qual fazem parte outras castanhas, nozes e o amendoim, produtos estes que podem funcionar como complementares, compondo uma mistura aperitiva e acessível em termos de preço. Esta complementaridade também pode ocorrer com frutas secas e cristalizadas como uvas passas, tâmaras, damascos e figos (LEITE, 1994).

Quanto à castanha-de-caju, Osmari et al. (2015) relata que suas utilizações são tão diversas que, da casca pode ser extraído o Líquido da Casca da Castanha-de-Caju (LCCC), com aplicações nobres em indústrias químicas (fabricação de tintas, vernizes, inseticidas, fungicidas, adesivos, isolantes, entre outros). Ainda da casca dos galhos podados da árvore, da folha, da película da amêndoa da castanha de caju ou mesmo do bagaço do pedúnculo pode ser extraído o tanino, composto químico

com vastas aplicações industriais, como na substituição do cromo no curtimento de couro (FIGUEIRÊDO JUNIOR, 2006).

1.2.4. Composição nutricional

A amêndoa da castanha do Brasil é um alimento bastante apreciado não só pelo sabor, como também pelas suas qualidades nutricionais (Tabela 1). Sua composição tem sido vastamente estudada e tem demonstrado ser rica fonte de nutrientes, sendo popularmente chamada de “carne vegetal”, por ser um alimento energético, rico em proteínas e ainda pela presença de antioxidantes (COZZOLINO, 2001).

Tabela 1. Composição centesimal e valor energético da castanha-do-Brasil comestível.

Informação nutricional	Porção de 100g	%VD
Valor calórico	676 Kcal	34%
Carboidratos	79g	26%
Proteínas	14g	19%
Gorduras totais	67g	122%
Gorduras saturadas	15g	69%
Gorduras trans	0g	VD não estabelecido
Colestreol	0mg	0%
Fibra alimentar	8g	32%
Sódio	<5mg	0,08%
Cálcio	146mg	18%
Ferro	2mg	16%
Selênio	204mg	600%

Fonte: COOPERACRE (2011) Adaptado.

Como descrito por Souza e Menezes (2008) a amêndoa da castanha do Brasil apresenta a seguinte composição química centesimal: 3,13% de umidade; 14,26% de proteína bruta; 67,3% de lipídios; 3,42% de carboidratos e 676,56 Kcal de valor energético.

Estudos sugerem que pode haver relação entre a frequência de consumo de nozes com a redução da incidência de doenças cardiovasculares apesar de serem ricas em teor lipídico. Na castanha-do-Brasil, o teor atinge nível de 73% de ácido oleico e linoleico, superior a outras nozes (RYAN et al., 2006).

A castanha-do-Brasil tem sido muito estudada quanto à presença do selênio, devido à ação antioxidante nos processos metabólicos (PACHECO e SCUSSEL, 2006). A atuação desse mineral está relacionada com a enzima glutatona-peroxidase, no que se refere à formação de radicais livres no organismo, proteção contra a ação

nociva de metais pesados, prevenção de doenças crônicas não transmissíveis e ainda, aumento da resistência do sistema imune (COZZOLINO, 2001). Além disso, apresenta altos níveis de ferro (Fe), magnésio (Mg) e manganês (Mn), também interessantes do ponto de vista nutricional (CHUNHIEG et al., 2008).

As amêndoas de castanha-de-caju são também importantes fontes de lipídeos e proteínas, sendo encontrados na literatura teores muito variados para essas características (Tabela 2). Dados de novos genótipos produzidos pela Embrapa indicam valores médios de 23% para proteínas e 45% para lipídeos (LIMA, 2013).

Tabela 2. Composição química da amêndoa da castanha de caju (crua e tostada)

Componentes	Amêndoa crua da castanha-de-caju	Amêndoa tostada da castanha-de-caju
	%	%
Lipídios	46,28	48,35
Proteínas	22,11	21,76
Amido	16,07	17,30
Açúcares totais	7,93	8,23
Umidade	5,05	1,18
Cinzas	2,40	2,43

Fonte: Melo et al. (1998) Adaptado.

O óleo da amêndoa da castanha-de-caju é constituído, na sua maior parte, de ácidos graxos insaturados, sendo eles, em média, 60% ácido oleico e 21% de linoleico (Tabela 3) (LIMA; GONÇALVES, 1998; LIMA et al., 2004). O ácido linoleico (C18:2) é um ácido graxo essencial, muito importante do ponto de vista nutricional. É importante ressaltar que algumas constatações sugerem que a redução quantitativa no consumo de lipídeos, por si só, não pode ser efetiva na proteção contra distúrbios metabólicos, o ideal é a alteração qualitativa, ou seja, aumento na concentração de ácidos graxos com reconhecido papel protetor e redução na concentração daqueles que podem resultar em impactos negativos na saúde humana. Entre os ácidos graxos benéficos, estão os do grupamento chamado ômega 6 (ácido linoleico – C18:2 n-6), presente no óleo de amêndoa de castanha-de-caju (LIMA, 2013).

Tabela 3. Composição dos ácidos graxos encontrados na amêndoa da castanha-de- caju.

ÁCIDO GRAXO	%
Ácido oléico	68,2-80,4
Ácido palmítico	4,1-17,3
Ácido esteárico	1,5-11,2
Ácido linoléico	0-21,7

Fonte: Ecky (1954) Adaptado.

1.2.5. Produção e Mercado de castanhas

A castanha-do-Brasil atualmente é o produto vegetal mais importante da Amazônia nas áreas ecológica, social, econômica e alimentar (WADT; KAINER, 2009).

No Brasil, ações governamentais de apoio à produção extrativista têm gerado resultados muito positivos, uma vez que as cooperativas e organizações têm mostrado maior poder de negociação, embora a cadeia produtiva, por ser muito vulnerável, depende de compradores que praticamente estabelecem o preço (PENNACCHIO, 2012).

Ainda segundo Pennacchio (2012), a produção brasileira da castanha-do-Brasil no que se refere ao comércio obedece a dois fluxos, comércio interno e externo. No caso de exportações do produto *in natura*, o destino principal é a Bolívia, seguido dos Estados Unidos e Peru, já da castanha beneficiada, Hong Kong, Europa e Austrália. De acordo com Formigoni (2018), no ano de 2015 o Brasil exportou o equivalente a US\$ 41,56 milhões em castanha-do-Brasil. Entretanto, em 2017, a receita da exportação foi de apenas US\$ 11,96 milhões, o valor mais baixo desde o ano 2009.

A região Norte é responsável por 98% da produção nacional (IBGE, 2016), sendo assim, a castanha-do-Brasil é o produto vegetal mais importante da Amazônia nas áreas ecológica, social, econômica e alimentar.

Segundo dados do IBGE (2016), a produção brasileira de castanha-do-Brasil no ano de 2012 foi de 38.805 toneladas, sendo o Acre o Estado com maior participação na produção (36,3%), seguido por Amazonas (27%), Pará (26,9%), Rondônia (4,4%), Mato Grosso (4%), Amapá (1,1%) e Roraima (0,3%) (OLIVEIRA, 2018).

Embora o Brasil possua a maior área de concentração de castanhais, o país perdeu seu posto de maior exportador mundial do produto para a Bolívia, que lidera o mercado. Este está entre os países que mais importam castanha com casca da Amazônia brasileira, isso se deve à falta de políticas públicas que possibilitem tratar de forma eficaz a cadeia produtiva no Brasil. Além disso, a redução da produtividade nos castanhais, a escassez de políticas de incentivo à comercialização e dificuldades de atendimento às exigências fitossanitárias para a exportação impedem o desenvolvimento do setor (BRASIL, 2010).

Em 2010, a “European Commission” (EC) por meio da Diretiva 165/2010 estabeleceu limites máximos para aflatoxinas, determinando os limites para castanhas que são submetidas a processo de triagem ou tratamento físico antes do consumo humano em 8,0µg/kg para AFB1 e 15,0µg/kg para as aflatoxinas totais; e para as castanhas destinadas diretamente ao consumo humano os limites foram de 5,0µg/kg AFB1 e 10,0µg/kg AFs totais (CALDERARI, 2011).

Ainda segundo o mesmo autor, esses limites restringiram as exportações desse produto para a União Européia (EU), com a devolução de lotes contaminados. Nos últimos anos, aproximadamente 10% da castanha do Brasil exportada para o mercado europeu foi devolvida aos portos de origem, por causa do elevado índice de contaminação por aflatoxinas. Desta forma, as barreiras sanitárias impostas têm dificultado as exportações especialmente de castanha com casca que não passam por processamento.

No setor de cajucultura, apenas 20% são destinados ao consumo interno e os 80% restantes são para exportação. Devido à importância das exportações para os grandes processadores, o mercado interno não é regularmente acompanhado nem bem-atendido (FIGUEIRÉDO JUNIOR, 2006).

De acordo com dados do IBGE (2005), o Brasil possui cerca de 680 mil hectares destinados a cajucultura, cuja produção vem oscilando em torno de 170 mil toneladas por ano, em um crescimento muito lento de produtividade. A área geográfica de amplo domínio está na região Nordeste, que concentra praticamente 100% da produção de castanha-de-caju, com destaque para os Estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte.

Segundo Lopes (2017), o Brasil também é importador da castanha de caju em casca. No produto sem casca, chegou-se a exportar 25.000 toneladas em 2015, mas

só nos nove primeiros meses de 2017 comprou-se do mercado externo 22.000 toneladas. Essa inversão ocorreu por problemas com seca e doenças, fazendo com que a queda na produção de castanha influenciasse o recuo na produção como um todo. Situações semelhantes podem ser observadas com a macadâmia e com as nozes, já que o Brasil teve uma participação de aproximadamente 0,92% em relação à produção de todas as nozes no mundo.

1.2.6. Cadeia produtiva das castanhas

Grande parte da produção da castanha-do-Brasil é originária de coleta nativa. No Estado do Amazonas há plantações experimentais, mas a grande maioria é nativa. O processo é relativamente simples: entre dezembro e abril o ouriço da castanha amadurece e, graças à chuva e ao vento, cai da árvore, sendo coletados por coletores autônomos (seringueiros, indígenas e trabalhadores contratados) que partindo-os com a ajuda de um facão, levam a castanha bruta para um paiol na floresta. Os coletores trabalham após receberem um adiantamento do comprador, e quando acumulam castanhas suficientes, levam-nas para a beneficiadora para saldar o contrato e, em alguns casos, receber o saldo (GIORDANO, 2009).

A cadeia produtiva do caju apresenta várias ramificações dado ao elevado número de produtos derivados. Da castanha obtém-se a amêndoa de castanha de caju (ACC) e o líquido da casca de castanha de caju (LCC). Da película que cobre a amêndoa é extraído tanino e a casca pode ser utilizada como combustível nas caldeiras das próprias fábricas. Há ainda, o pseudofruto que, por sua vez, proporciona a obtenção de inúmeros produtos. Desses produtos, a amêndoa de castanha de caju (ACC) constitui o mais importante (PESSOA; LEITE, s.d.).

A cultura do cajueiro foi considerada por algum tempo como atividade extrativista, entretanto, a existência de um mercado promissor para a exportação dos seus derivados e a instituição dos incentivos fiscais e subsídios creditícios, por meio da Superintendência do Desenvolvimento do Nordeste – SUDENE, entre outros programas, fizeram com que se estabelecessem plantios organizados e induziram rápida expansão na área cultivada. O cajueiro é encontrado em todo o território brasileiro, entretanto, tem uma relevância econômica na região Nordeste, principalmente nos estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte (EMBRAPA, 2009). O principal produtor em 2019 foi o estado do Ceará, com produção estimada

de 66,3 mil toneladas. Sua produção vem crescendo à expressiva taxa média de 12,8% ao ano entre 2014 e 2018. Esse estado representou 58,7% da produção nacional em 2018 (CONAB, 2019).

Seguindo as Boas Práticas de Manejo (BPM), a etapa de pré-colheita inclui desde a fase pré-exploratória até a colheita da castanha-do-Brasil. Antes de iniciar a coleta das castanhas é imprescindível investir tempo e trabalho nessas práticas, pois irão facilitar a coleta e armazenamento das mesmas, evitar perdas, conseguir melhores preços, fiscalizar territórios e dessa forma, aumentar a qualidade das castanhas produzidas (APIZ, 2009).

Dentre as inovações tecnológicas encontradas, inclui-se o manejo de espécie que tem sido adotado por um número crescente de extrativistas. O manejo compreende o mapeamento e marcação das castanheiras, seleção de árvores, corte de cipós e planejamento da colheita (EMBRAPA, 2004).

Ainda segundo a Embrapa (2004), é comum encontrar alguns ouriços que caem após a coleta ou que por alguma razão, não foram coletados durante a safra da castanha-do-Brasil. Estes ouriços ficam em contato com o solo ao longo do ano, expostos à elevada umidade e temperatura, favorecendo assim o desenvolvimento de microrganismos, como o *Aspergillus flavus*, por exemplo, conhecido por seu potencial toxígeno. Na safra seguinte, esses ouriços velhos são coletados com os novos, favorecendo ou potencializando a contaminação da castanha por toxinas e outros contaminantes. Diante disto, faz-se necessária a limpeza na base das castanheiras antes do início da nova safra, podendo ser feita por volta dos meses de setembro a final de outubro, eliminando ouriços e restos de castanhas da safra anterior.

Já na etapa de pós-colheita, as castanhas são armazenadas em barracões e levadas aos portos primários de comercialização e posteriormente até a sede do município, sendo transportadas por embarcações de pequeno porte, devido à difícil navegabilidade. As principais dificuldades de transposição surgem em trechos de cachoeiras dos rios, sendo possível somente na estação chuvosa, quando o nível das águas o permite; em alguns locais, o transporte é terrestre, como no Acre. A partir dos portos de convergência secundários, as mesmas são transportadas em embarcações até a usina, onde ficará em "montanhas", ou seguirá direto para o beneficiamento, onde será submetida à diversos processos (PACHECO; SCUSSEL, 2006).

A castanha-do-Brasil é beneficiada em usinas com equipamentos para a produção em larga escala, sendo obtidas com e sem casca. Nas etapas de

beneficiamento (Figura 1) devem ser observadas algumas recomendações para que seja preservada a qualidade das castanhas.

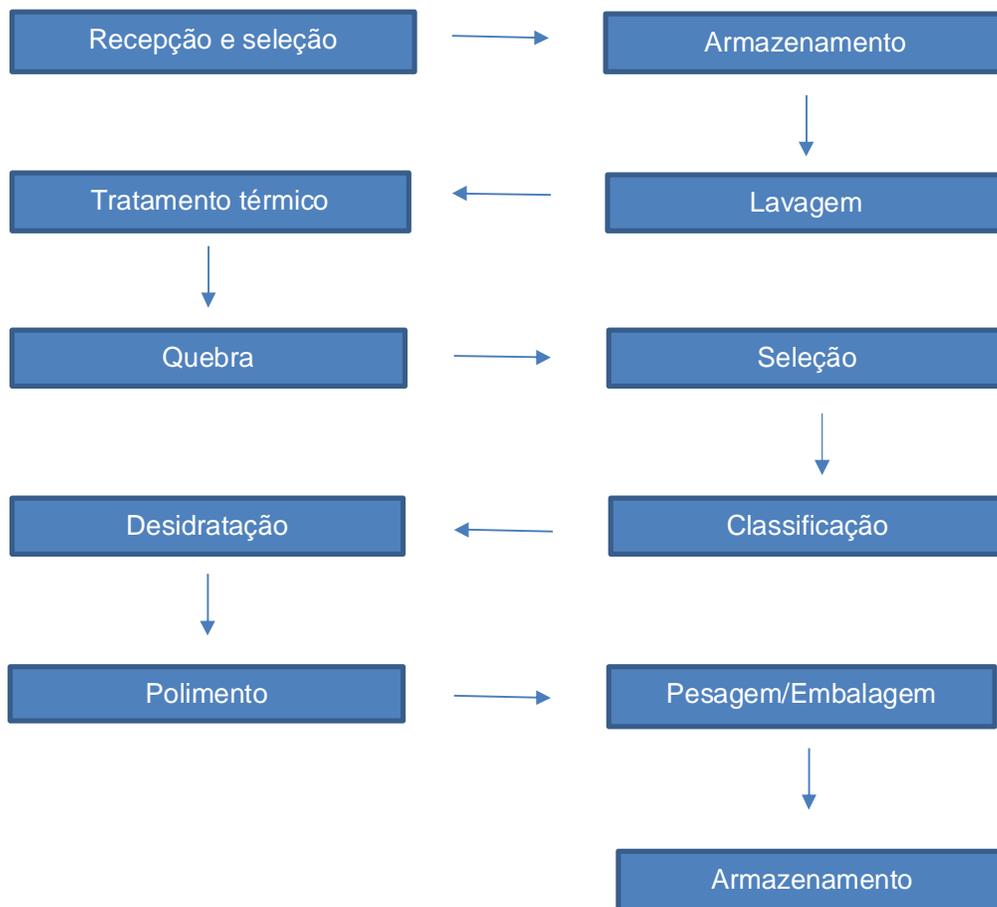


Figura 1. Fluxograma de processo de beneficiamento da castanha-do-Brasil com e sem casca.
Fonte: Embrapa (2004) Adaptado.

De acordo com Embrapa (2004), a castanha-do-Brasil em casca deve ser armazenada em galpões com boa ventilação, paredes e pisos impermeáveis e laváveis, além de janelas protegidas para impedir a entrada de animais. O processo de lavagem é feito por imersão, em água potável à temperatura ambiente, tendo como objetivos remover o excesso de impurezas e auxiliar também na identificação de castanhas chochas por diferença de densidade.

O tratamento térmico da castanha pode ser realizado por imersão em água em ebulição, durante 1 a 2 minutos ou em autoclave por 2 a 5 segundos, imediatamente após a lavagem. Esse procedimento ajuda a reduzir a carga microbiológica e a retirada da casca. Após esse tratamento, as castanhas são

transferidas para as mesas de quebra, onde é feita a pré-seleção de castanhas que apresentem sinais visuais de contaminação fúngica, apodrecimento, chochas e quebradas. Posteriormente, sofrem a quebra com auxílio de uma prensa manual (AGEITEC, s.d.).

Após o descascamento, as amêndoas sofrem uma nova seleção com objetivo de eliminar as deterioradas ou danificadas fisicamente. As que estiverem em bom estado de conservação seguem para a classificação e posterior desidratação e secagem (PACHECO e SCUSSEL, 2006). A separação é realizada em peneiras vibratórias ou manualmente. No caso de classificação manual, procedimentos de higiene pessoal e de superfícies evitam riscos biológicos, químicos e físicos ao produto. As castanhas são classificadas conforme as especificações definidas pelo Ministério da Agricultura, por tamanho, em seis classes em casca e oito classes para amêndoa descascada (BRASIL, 2002).

As amêndoas são transferidas para as estufas com circulação forçada de ar, a uma temperatura de 60°C por 24 horas ou até atingirem 8% de umidade. Quando comercializadas com casca, as mesmas devem chegar a um teor de 10 a 12% de umidade e são polidas mecanicamente para melhoria da aparência da casca por meio da eliminação das arestas. As amêndoas descascadas são polidas e depois pesadas e embaladas a vácuo em sacos aluminizados, de forma a retardar o processo de oxidação. Já as com casca, o empacotamento ocorre em sacos de polipropileno de 60 kg. Esses, devem ser empilhados sobre estrados de madeira, em depósito arejado, limpo e com iluminação, obedecendo o espaçamento entre pilhas e altura de empilhamento (EMBRAPA, 2004).

1.2.7. Micologia dos alimentos

Durante muito tempo os fungos foram considerados vegetais. Só a partir de 1969 passaram a pertencer ao reino Fungi. Essa mudança se deve ao fato de que os fungos são desprovidos de clorofila e, portanto, não realizam fotossíntese. São seres eucarióticos unicelulares como as leveduras, ou pluricelulares como os fungos filamentosos ou bolores e os cogumelos (TRABULSI et al., 1999).

Nos bolores, as células estão ligadas nas extremidades para formar um filamento chamado hifa, que pode apresentar esporos. Individualmente, as hifas são

microscópicas, caracterizadas como cenocíticas ou septadas, de acordo com a ausência ou presença de septo (formado por invaginação da parede celular entre as células). Porém, quando se acumulam em grande quantidade formam uma massa fúngica denominada micélio, que pode ser vista a olho nu. Os bolores têm importante valor ecológico e também econômico, visto que são usados na produção de alimentos, antibióticos e muitos outros produtos. Eles podem também causar doenças em plantas, animais e inclusive em seres humanos, como por exemplo as micoses (PELCZAR JR. et al., 2009).

Segundo Fonseca (2012), os esporos dos fungos são abundantes na natureza e germinam rapidamente no solo, plantas e alimentos. Quando os alimentos passam por processo de secagem e armazenamento inadequados, tornam-se um excelente campo para a proliferação de fungos.

Assim como as bactérias, os fungos se nutrem por absorção de nutrientes, e este processo é auxiliado por enzimas secretadas no meio em que se encontram, que quebram moléculas orgânicas em porções menores, facilmente absorvíveis. Em laboratório, muitos fungos podem crescer em uma mistura simples de açúcar, uma fonte de nitrogênio e alguns minerais. Outros, só crescem em meio complexo, com grande variedade de compostos orgânicos. Em geral, os meios de cultivo para crescimento fúngico possui concentração maior de açúcar (4%) e pH menor (3,8 a 5,6) comparado aos meios para cultivo bacteriano (PELCZAR JR. et al., 2009).

Sob condições favoráveis de temperatura e umidade, os fungos podem se desenvolver em certos alimentos, resultando na produção de micotoxinas que trazem malefícios a saúde dos consumidores (BAPTISTA et al., 2002). O nome micotoxina deriva da palavra grega “Mykes” que significa fungo e “Toxicum” que significa veneno ou toxina e a condição patológica decorrente da ingestão destas toxinas é denominada micotoxicose (SCUSSEL, 2002). O conhecimento sobre a relação das micotoxicoses com o metabolismo fúngico é algo recente, já que a doença não está diretamente ligada à presença ou contaminação de fungos, mas sim ao consumo de alimentos contaminados pelas toxinas produzidas por estes (GIORDANO, 2009).

A castanha-do-Brasil, por ser um excelente substrato para fungos, está sujeita à contaminação por micotoxinas, principalmente aflatoxinas (AFLs), que são produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* (PAYNE e BROWN, 1998). Esta contaminação pode ocorrer nas diversas etapas do desenvolvimento da planta, colheita ou armazenamento das sementes (FREIRE et al., 2007).

Segundo Pelczar Jr. et al. (2009) as micotoxinas são substâncias mutagênicas e carcinogênicas potentes, sendo que duas das mais potentes pertencem ao grupo de compostos denominado aflatoxinas, nome que vem do isolamento inicial em amendoim contaminado por *Aspergillus flavus*. A espécie *A. flavus* destaca-se por ser uma das mais importantes produtoras de aflatoxinas, sendo capaz de produzir as aflatoxinas B1 e B2 (COELHO, 2012).

Com base em estudos realizados com animais, as aflatoxinas são um perigo potencial para a saúde humana; podem ser um dos fatores responsáveis pelo alto índice de câncer de fígado na África tropical e na Ásia. Foram notificadas no Quênia surtos de AFLs em uma grande área geográfica, que resultou em mais de 123 mortes (GIORDANO, 2009). Oliveira (2018) ressalta em seu trabalho que essas substâncias são de elevada toxidez, aguda e crônica, sendo o fígado o órgão mais afetado.

De acordo com Kempken e Rohlf (2010), as micotoxinas causam grandes impactos econômicos na agricultura brasileira, tornando os grãos e subprodutos inviáveis para consumo. Estima-se que 25% dos alimentos em todo o mundo são afetados pelo crescimento de fungos durante algum estágio de produção, transporte ou armazenamento.

O ser humano pode ser infectado por micotoxinas por meio do consumo de alimentos processados ou *in natura*. Também pode ingerir toxina proveniente de animais alimentados com ração contaminada, pois a toxina pode ser eliminada pelo animal por meio de sua carne, leite e ovos (FREIRE et al., 2007).

Os fungos produzem micotoxinas em circunstâncias específicas, como uma forma de se proteger das agressões do meio em situações de estresse. As condições mais favoráveis para o desenvolvimento e proliferação dos fungos não são as mais favoráveis para a produção de micotoxinas. Dessa forma, mesmo após a morte dos mesmos, as micotoxinas permanecem no substrato por muito tempo e são levadas para outros ingredientes ou componentes derivados de processamento (NOVINSKY, 2013).

Segundo Pinheiro (2004) alguns fatores afetam a síntese de micotoxinas, como a variação entre as linhagens dos fungos, suscetibilidade genética do substrato, temperatura do ambiente, umidade da matéria-prima, aeração e fatores de estresse. Dentre as distintas toxinas, no mínimo 17, são produzidas por fungos, têm-se as aflatoxinas, fumonisinas, tricotecenos, zearalenona, ocratoxina A, aflatoxina B1 e patulina. A aflatoxina B1 é considerada o agente natural mais carcinogênico que se

conhece, provocando como primeiro efeito dano estrutural e funcional no fígado, incluindo necrose celular, hemorragias, lesões, fibrose e cirrose (EATON et al., 1994).

A intoxicação por micotoxinas pode ser aguda ou crônica, dependendo da concentração consumida. As enzimas do fígado fazem a ativação das moléculas da toxina surtindo assim os efeitos toxicológicos (HUSSEIN; BRASEL, 2001).

O efeito agudo ocorre devido à ingestão de doses elevadas, sendo irreversível, com aparecimento rápido de sintomas e pode ser letal. Os efeitos crônicos são resultados de ingestão de menores quantidades durante um longo período de tempo e causa distúrbio em órgãos, geralmente no fígado. Os sintomas dependem da dose e frequência de exposição, da espécie, sexo, idade, genética, dieta e estado nutricional do indivíduo infectado. A gravidade da intoxicação pode ser agravada também por fatores como deficiência de vitamina A, alcoolismo, doenças infecciosas e desnutrição (BENNETT; KLICH, 2003).

Segundo Moss (2002) as toxinas, facilmente absorvidas no trato gastrointestinal, são distribuídas pelo organismo após caírem na corrente circulatória, seguindo para diferentes órgãos, como rins, músculos, tecidos adiposos e fígado, onde passam por transformação. Os sintomas incluem diarreia com sangue, cirrose, hemorragia nos rins, imunodepressão e síndrome de Reye (encefalopatia de rápida progressão). Ainda, de acordo com Pitt (1989), pode causar perda de apetite e peso, palidez, convulsões, anormalidades neurológicas, necrose e aumento do tamanho do fígado. Exposições prolongadas a baixas doses resultam em tumores no fígado, prejudicam o sistema nervoso central, causam doenças de pele e defeitos hormonais.

1.2.7.1. Fatores que favorecem o crescimento fúngico e a produção de micotoxinas

Em condições ambientais favoráveis, como de umidade e de temperatura, os esporos dos fungos germinam, desenvolvendo hifas, que contaminam grãos e outros substratos (RUPOLLO et al., 2006).

Na castanha-do-Brasil, um dos fatores que podem afetar a produção de AFLs é a umidade que durante a colheita na floresta é bem elevada (30%). Desta forma, é necessário reduzir esta umidade durante o armazenamento na floresta para evitar a

proliferação durante seu transporte até as usinas de beneficiamento (EMBRAPA, 2004).

Durante o processamento, a castanha é seca atingindo teor de umidade que varia de 3 a 6,5%, faixa considerada segura para controlar a proliferação fúngica (GIORDANO, 2009). Além disso, deve ser seca uniformemente, evitar quebra de amêndoas durante o descasque, secagem e armazenagem e manter sempre o ambiente bem ventilado (PACHECO; SCUSSEL, 2006).

Segundo Jay (1994), todos os fungos toxigênicos apresentam valores mínimos, ótimo e máximo de atividade de água para o seu crescimento, sendo 0,85 a média para a maioria deles.

Lacey e Magan (1991) afirmam que espécies de fungos comuns no armazenamento, como *Aspergillus flavus*, germinam com atividade de água de 0,72 a 0,80, sendo que para a produção de aflatoxinas a atividade de água varia de 0,83 a 0,87.

Com relação ao pH, os fungos normalmente desenvolvem-se em pH ácido. Em altas atividades de água os fungos competem com as bactérias como deteriorantes de alimentos, assim o pH tem um papel decisivo nesta competição (SCUSSEL, 2002).

Segundo Pacheco e Scussel (2006), a composição dos alimentos, em relação ao teor de proteínas, carboidratos, lipídios e outros componentes, inclusive antioxidantes, influenciam diretamente no crescimento de microrganismos, como também no processo de deterioração dos alimentos.

Para o metabolismo dos fungos, o substrato mais adequado é o abundante em carboidratos. Glicose e sacarose são fontes de carbono que favorecem a produção de aflatoxinas, enquanto que a frutose, a galactose e o manitol restringem a produção das mesmas. As castanhas, que possuem proteínas, carboidratos e lipídios em sua composição, apresentam as condições necessárias para o crescimento de fungos, assim como a possível produção de aflatoxinas (KLICH, 2007).

Para várias espécies de fungos, a temperatura de 30° C, própria de regiões tropicais, é ideal para o crescimento. Porém, os valores de temperatura mínima, ótima e máxima para o crescimento de bolores varia para cada espécie (Tabela 4). Segundo Pitt e Hocking (2009), as espécies de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, têm como temperatura ótima para a produção de aflatoxinas a faixa de 30° a 40°C.

Tabela 4. Valores de temperatura favoráveis para o desenvolvimento de determinadas espécies fúngicas.

FUNGOS	Mínima (T ⁰ C)	Ótima (T ⁰ C)	Máxima (T ⁰ C)
<i>A. restrictus</i>	5 - 10	10 - 35	40 - 45
<i>A. candidus</i>	10 - 15	45 - 50	50 - 55
<i>Penicillium spp.</i>	-5 - 0	20 - 25	35 - 40
<i>A. glaucus</i>	0 - 5	30 - 35	40 - 45
<i>A. parasiticus</i>	12	32	42
<i>A. flavus</i>	10 - 12	33	43 - 48

Fonte: EMBRAPA, 2004; PITT; HOCKING, 2009. Adaptado.

Alguns fungos conseguem se desenvolver em baixas concentrações de oxigênio, desde que não sejam menores que 0,2%. A maioria dos fungos que causam deterioração parece ser sensível aos altos níveis de dióxido de carbono e nitrogênio. Misturas de gases têm se mostrado eficientes na redução de oxigênio, formando ambientes com atmosfera controlada, as quais podem prevenir a contaminação por microrganismos e possíveis toxinas durante o transporte e armazenamento de alimentos (PITT; HOCKING, 2009).

Em grande parte, as condições climáticas de um país definem as classes de fungos que crescerão e os tipos de micotoxinas que podem produzir. No Brasil, existem condições que favorecem o crescimento de todo tipo de fungos produtores dessas toxinas (MAZIERO; BERSOT, 2010). Dessa forma, têm sido frequente estudos que associam diversos fungos filamentosos, inclusive os aflatoxigênicos, com amostras de castanhas.

Segundo Pacheco e Scussel (2007), as primeiras descrições de contaminação fúngica em castanha-do-Brasil ocorreram na década de 60, sendo isoladas espécies do gênero *Aspergillus*, que causaram podridão nas mesmas.

As castanhas estão propensas a danos mecânicos que podem ocorrer na floresta, durante o transporte e até mesmo nos processos de beneficiamento. Estes danos, favorecem a absorção de umidade, facilitando desta forma a infecção dos fungos em seu interior, que é altamente nutritiva (PACHECO; SCUSSEL, 2006).

Outro fator relevante, citado por Embrapa (2004) é a distribuição heterogênea de calor no interior da mesma durante a secagem. Esta diferença causa variação na temperatura e na umidade, podendo depois de misturados lotes de umidades diferentes favorecer a atividade de microrganismos durante a armazenagem. Para evitar tal situação, a umidade considerada segura é abaixo de 13%.

A incidência de aflatoxinas em castanhas-do-Brasil tem sido confirmada por vários estudos e constitui-se um problema para a exportação desse produto, desde 1998, quando a União Europeia restringiu os limites de tolerância de aflatoxinas (ARRUS et al., 2005).

Muitos lotes de castanhas foram devolvidos por países importadores devido ao alto nível de contaminação por toxinas e a União Europeia passou a exigir condições criteriosas para a compra do produto, dentre elas o atendimento às boas práticas extrativistas e a determinação dos teores de aflatoxinas por laboratórios credenciados junto ao MAPA (Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Desta forma, o Ministério passou a elaborar programas de monitoramento da cadeia produtiva da castanha-do-Brasil, objetivando a prevenção e o controle de contaminação (BRASIL, 2010).

Segundo dados da Embrapa (2012), a concentração de aflatoxinas reduz quando se adota boas práticas de beneficiamento, ou seja, se houver investimento tecnológico e organização da cadeia produtiva da castanha para se ter um escoamento mais rápido, diminuindo assim o tempo de armazenamento e adotando melhorias nas demais etapas, o nível dessas toxinas diminuirá.

Simões (2004) analisou amostras de castanhas provenientes do Estado do Amazonas, nos municípios de Democracia e Capanã Grande antes e depois da aplicação das Boas Práticas de Manejo (BPM). Antes, 98% das amostras apresentaram contaminação por fungos filamentosos, sendo que após as boas práticas os fungos isolados diminuiram e só uma amostra apresentou nível de aflatoxina de 1,1 µg/kg.

1.2.8. Legislação sobre a Qualidade das castanhas no Brasil

Diante dos riscos de saúde para o consumidor e visando a aquisição de produto com qualidade nutricional e livre de contaminantes, diversos países estabeleceram limite máximo permitido para as aflatoxinas, implicando assim no aumento do rigor para a importação de castanhas e seus subprodutos.

Os limites máximos estabelecidos pela legislação internacional para uma ou mais micotoxinas variam de acordo com o país e características do alimento que é consumido e/ou exportado/importado. Os limites estabelecidos pelo *Codex Alimentarius* se apresentam como intermediários entre países que não

possuem legislação e os mais exigentes quanto à limites para importação (SCUSSEL et al, 2010).

No Brasil, a Resolução – RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, dispõe sobre os limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos (Tabela 5). Para aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 os limites máximos tolerados para castanha-do-Brasil sem casca para o consumo direto é de 10 µg/kg. Para amêndoas que serão processadas, o limite máximo tolerado de aflatoxinas é de 15 µg.kg-1 e ainda, para castanha-do-Brasil com casca o limite é de 20 µg.kg-1 (ANVISA, 2011). No entanto, a União Europeia estabeleceu limite de 5 µg.kg-1 para aflatoxina B1 e 10 µg.kg-1 para aflatoxina total em castanha-do Brasil para consumo direto e de 8 µg.kg-1 para aflatoxina B1 e 15 µg.kg-1 para aflatoxina total em castanha-do-Brasil para processamento posterior (EUROPEAN UNION COMMISSION, 2010). Nos Estados Unidos, o limite para aflatoxinas em castanha-do-Brasil é 20 ppb (FDA, 2011).

Tabela 5. Limites máximos tolerados (Lmt) para micotoxinas em castanhas

Aflatoxinas B1, B2, G1 e G2	Castanhas exceto castanha-do-Brasil, incluindo nozes, pistachios, avelãs e amêndoas	10 µg.kg-1
	Castanha-do-Brasil com casca para consumo direto	20 µg.kg-1
	Castanha-do-Brasil sem casca para consumo direto	10 µg.kg-1
	Castanha-do-Brasil sem casca para processamento posterior	15 µg.kg-1

Fonte: ANVISA (2011) Adaptado.

Segundo Castro et al. (2015), falta no Brasil rigor maior no cumprimento das portarias, pois as fiscalizações são esporádicas e os laboratórios encarregados de realizar as análises, na maioria das vezes, desprovidos de material e pessoal especializado.

Outro problema encontrado são as discrepâncias observadas quanto aos limites tolerados sob legislação, não apenas nos países da América Latina como também nos continentes com países desenvolvidos. É esperado, mesmo que em futuro não muito distante, e em virtude do crescente intercâmbio de *commodities* entre os países, que ocorra uma harmonização da legislação para micotoxinas em nível mundial e uma redução dos limites máximos permitidos (EMBRAPA, 2007).

1.2.9. Prevenção e controle de micotoxinas em alimentos

Diante do cenário atual com relação a ocorrência de micotoxinas em castanhas, é essencial a melhoria de seu manejo, coleta, beneficiamento, empacotamento e armazenamento, tendo em vista a importância de se obter um produto de boa qualidade. Sendo assim, é de extrema significância a pesquisa de tecnologias que possam contribuir para a prevenção e controle de micotoxinas em alimentos (PINHEIRO, 2004).

De acordo com a Association of Official Analytical Chemists, a retirada das cascas e triagem das amêndoas deterioradas por fungos pode contribuir para a redução de aflatoxinas em castanha-do-Brasil, assim como o processo de secagem, que tem como finalidade controlar o crescimento fúngico e produção de aflatoxinas (VARGAS et al., 2011).

A eficiência de um método na detoxificação depende da natureza do alimento, das condições ambientais, como umidade e temperatura, e do tipo de micotoxina, assim como sua concentração no alimento (CALDERARI, 2011).

De acordo com Sekiyama (2007), processos químicos podem ser utilizados para destruir algumas micotoxinas, utilizando-se hidróxido de cálcio, ozônio ou amônia. A amonização, por exemplo, é um procedimento liberado em diversos países para a descontaminação por aflatoxinas, porém apresenta ineficiência na redução de outras micotoxinas e também pode causar problemas à saúde devido ao excesso de resíduos que permanecem no alimento.

Kabak et al. (2006) testaram compostos químicos como ácido clorídrico, amônia, peróxido de hidrogênio, bissulfito de sódio e cloro e obtiveram resultados satisfatórios na detoxificação de aflatoxinas, mas embora pareça ser eficiente, ocorre porém diminuição do valor nutricional dos alimentos e a produção de derivados tóxicos nos mesmos, o que dificulta o procedimento.

Processos biológicos estão em estudo e ainda não são utilizados na prática. Podem ser utilizados microrganismos que metabolizam as toxinas, como por exemplo, a conversão de aflatoxina B1 (AFB1) pelo *Flavobacterium auranticum* em produtos menos tóxicos, ou a degradação da AFB1 por *Aspergillus niger* (KRISHNAMURTHY; SHASHIKALA, 2006; SEKIYAMA et al., 2007).

Quanto aos processos físicos, Binder (2000) afirmou que geralmente as micotoxinas são compostos termoestáveis por isso a aplicação dos tratamentos físicos depende do grau de contaminação das toxinas no alimento. Corroborando, Van Der Zijden et al. (1962), afirmaram que as aflatoxinas são decompostas à temperatura de aproximadamente 220° C, não sendo favorável então a aplicação dos tratamentos físicos nos alimentos.

A radiação ionizante vem sendo aplicada também para obtenção de alimentos isentos de microrganismos patogênicos, favorecendo assim a preservação do produto (RUSTOM, 1997). Aquino (2003) comprovou que doses de irradiação de 2, 5 e 10 KGy foram eficientes para a diminuição de *Aspergillus flavus* em grãos de milho, porém, as doses de 5 e 10 kGy foram mais efetivas, e a dose de 10 kGy degradou totalmente as aflatoxinas.

Com relação ao uso do cloro, apesar da cloração diminuir a propagação de doenças infecciosas transmitidas por alimentos, o efeito dos compostos clorados no ambiente pode resultar na formação de trihalometanos em rios e desta forma, afetar o potencial de água potável e das espécies aquáticas e terrestres nativas. Dessa forma, diversas metodologias têm sido estudadas como alternativas para substituição destes compostos na sanitização de frutas e hortaliças (GUZEL-SEYDIM et al., 2004).

Devido a conscientização e a exigência cada vez maior dos consumidores quanto a produtos mais seguros e sustentáveis, torna-se crescente a busca por sanitizantes alternativos sem poder residual, sendo o ozônio uma opção segura, pois não deixa resíduos nos alimentos e é um agente microbicida com atuação sobre uma grande variedade de microrganismos, o que tem despertado a atenção de pesquisadores em todo o mundo (CHIATTONE et al., 2008).

O ozônio é um gás que se apresenta na forma triatômica do oxigênio (O₃), foi descoberto por Schonbein em 1840 e sua patente emitida por Fewson nos Estados Unidos em 1988, para utilização do mesmo na remoção de odores provenientes de esgotos. Desde então, ele tem sido utilizado no tratamento de água, na sanitização de equipamentos na indústria alimentícia, na degradação de pesticidas, na conservação de alimentos e controle de pragas (insetos) de grãos armazenados (PEREIRA et al., 2006; SOUZA et al., 2008).

Dentre suas características, podem ser destacadas: alta reatividade, a necessidade de ser gerado no próprio local de aplicação, a geração de oxigênio como

produto final de sua decomposição e sua eficácia contra uma variedade de microrganismos (OLIVEIRA, 2018).

De acordo com Lapolli et al. (2003), quando comparado a outros agentes oxidantes, o ozônio se destaca pelo alto potencial de oxidação (Tabela 6). Em solução aquosa, ele pode reagir com compostos orgânicos por meio de reações diretas, as quais envolvem o ozônio molecular, ou por reações indiretas, que envolvem reações com os radicais hidroxila (OH), formados da decomposição do ozônio (DI BERNARDO; DANTAS, 2005).

Tabela 6. Agentes oxidantes e respectivos potenciais de oxidação.

Agente oxidante	Potencial de oxidação (mV)
Flúor	3,06
Ozônio	2,07
Peróxido de hidrogênio	1,78
Permanganato	1,67
Dióxido de cloro	1,50
Hipoclorito	1,49
Cloro	1,36

Fonte: Guzel-Seydim et al. (2004) Adaptado.

A atuação biológica do ozônio se dá em dois níveis. A primeira agindo diretamente sobre as moléculas alvo, e a segunda de forma indireta, via radicais livres resultantes dos processos de peroxidação de ácidos graxos polinsaturados e oxidação de grupos sulfidrilas e aminoácidos de enzimas, proteínas e peptídeos. Considerando, portanto, esse mecanismo na destruição da membrana citoplasmática e parede celular, entende-se que a diferença entre a maior e menor tolerância ao ozônio ocorre, provavelmente em função da estrutura dos constituintes celulares (NAITO; TAKAHARA, 2006).

Ainda segundo Naito e Takahara (2006), em função da natureza de seu mecanismo de ação na destruição dos microrganismos, não ocorre resistência por parte destes ao ozônio. Seu amplo espectro de ação lhe permite a capacidade de inativar bactérias gram-negativas e gram-positivas, células vegetativas e esporos, vírus em concentrações relativamente baixas e em reduzido tempo de contato (OLIVEIRA, 2018).

Wickramanayake (1991), relatou ainda que os fungos são mais facilmente atingidos pela ação do ozônio e em menor período de tempo do que bactérias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus spp.* É importante ressaltar que o

ozônio pode ser utilizado na inativação de espécies aflatoxigênicas, e também é capaz de degradar micotoxinas (TIWARI; MUTHUKUMARAPPAN, 2012).

A desvantagem do uso de ozônio como desinfetante é a sua instabilidade. O grande desafio é prever como o ozônio reage com a matéria orgânica, pois o gás pode oxidar o composto ou espontaneamente decompor-se em oxigênio e radicais livres. Dessa forma, é difícil generalizar que uma dada concentração particular de ozônio num determinado percentual será efetiva para inibição dos microrganismos presentes nos produtos alimentícios (LANGLAIS et al., 1991).

O ozônio foi considerado em 1982 como um produto seguro ("General Recognized As Safe" - GRAS) para o tratamento de garrafas de água pela FDA (Food and Drug Administration), incluindo uma série de outras aplicações comerciais, como desinfecção de água de piscina e tratamento de águas residuais (GUZEL-SEYDIM et al., 2004).

A partir da década de 90, os Estados Unidos asseguraram o ozônio para aplicação direta em produtos alimentícios, havendo a partir de então um crescente interesse nesse método. Segundo Lapolli et al. (2003), no Brasil a ozonização passou a ser utilizada como alternativa aos métodos convencionais de pré-cloração e pré-aeração no tratamento de águas superficiais, em 1983. Já na área de alimentos, poucas pesquisas têm sido realizadas no Brasil e a legislação específica é escassa.

O ozônio pode ser utilizado também no tratamento de efluentes industriais. Giordano (2009) afirma que efluentes que possuam cor, como os da indústria de celulose e papel, podem ser descolorados por O_3 .

Considerando sua utilização associada aos alimentos, Kim et al. (1999) constataram que as concentrações de 0,6 a 1,5 ppm de ozônio têm ação contra o crescimento de bolores em ovos conservados a 0,6 °C e 90% de umidade relativa. As leveduras também são inativadas pelo ozônio e parecem ser mais sensíveis que os bolores. Segundo Allen et al. (2003) e Wu et al. (2006), estudos utilizando o ozônio como fungicida para preservar a cevada e o trigo armazenados mostraram que, o mesmo pode ser utilizado na inativação de fungos sem danificar a capacidade de germinação das sementes.

Nos alimentos, o ozônio tem uma ação rápida e, conseqüentemente, decompõe-se produzindo oxigênio, sem a presença de resíduo tóxico (CULLEN et al., 2010). Young et al. (2006) também ressalta que o ozônio não altera a composição

nutricional dos cereais e que não são formados metabólitos prejudiciais à saúde humana e animal.

Quanto à sua capacidade de eliminar aflatoxinas em grão, McKenzie et al. (1998) confirmaram com milho usado na dieta de perus. Os autores observaram alta capacidade de degradação da micotoxina pelo ozônio e que a dieta com milho ozonizado não afetou o desenvolvimento das aves. Essa capacidade também foi avaliada por Prudente e King (2002), alcançando redução de 92% no teor de aflatoxinas em grão de milho.

Outros estudos também confirmam a eficiência do ozônio como agente fungicida e na degradação de micotoxinas. Alencar et al. (2012) comprovaram esse fato em grãos de amendoim. Brito Júnior (2013) constatou uma redução de 78,5 e 98,0% no índice de ocorrência de *Aspergillus spp* e *Penicillium spp* em grãos de milho submetidos a ozonização à concentração de 2,14 mg L⁻¹, por um período de 50h, além disso houve também uma redução em 2,0 ciclos log na contagem de fungos filamentosos e leveduras.

Com relação a legislação, o ozônio, como já dito anteriormente, é seguro e vem sendo usado há muitos anos nos Estados Unidos e Europa, onde a legislação é extremamente rígida. A FDA (Food and Drugs Administration) confere ao O₃ a classificação "GRAS" (Generally Recognized as Safe), o mais alto padrão de segurança de um produto para os usuários. A partir da década de 90, houve um crescente interesse na aplicação do mesmo no processamento de alimentos (GRAHAM, 1997).

Como o ozônio se torna um gás tóxico acima de certas concentrações, limites máximos de exposição são definidos para as pessoas que trabalham em plantas de ozonização, além disso, devem ser submetidas a revisões médicas regulares. Existem em diversos países regulamentações que tratam dos níveis aceitáveis de concentração do gás e período de exposição, levando em consideração a segurança e saúde ocupacional dos trabalhadores. Nos Estados Unidos o limite de concentração é de 0,1 ppm por até 8 h por dia (CFR, 2011). Na Europa, é de 120 microgramas/m³, por até 8 h (WHO, 2000).

No Brasil, através da NR nº 15, portaria nº 3.214/78, foi estabelecido limite de 0,08 ppm ou 0,16 mg/m³, para jornada semanal de até 48 h, sendo máximo o grau de insalubridade a ser considerado (BRASIL, 1978). Já a portaria da Anvisa NR 25/76 publicada no Diário Oficial da União em 09/11/1977, regulamenta o uso do O₃.

Considerando que a ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists), órgão de referência na área, revisa e atualiza os limites de tolerância ocupacional anualmente, de modo que os referidos limites têm decrescido com o transcorrer do tempo, observa-se que a legislação brasileira está defasada em relação aos limites de tolerância a agentes químicos, já que não se atualiza desde 1978.

Muitos processos da indústria de alimentos são propícios à utilização do ozônio, como exemplo a aplicação em produtos agrícolas durante o armazenamento e o transporte e a sanitização da água de lavagem dos alimentos, equipamentos e materiais das embalagens (GRAHAM, 1997). De acordo com Kim et al. (1999) a destruição de microrganismos pelo ozônio é menos efetiva quando aplicada diretamente sobre a superfície do alimento do que o ozônio em demanda líquida e depende muito também da natureza e da composição da superfície dos alimentos, do tipo de contaminação, bem como do grau de associação de microrganismos com alimentos.

Quanto ao seu uso em castanhas, alguns trabalhos avaliaram o grau de degradação de aflatoxinas e de contaminação fúngica. Scussel et al. (2011) avaliando a aplicação de métodos com atmosfera modificada (ozônio, dióxido de carbono e absorventes), evidenciaram a inibição de crescimento de microrganismos e a degradação de aflatoxinas após aplicação do ozônio nas embalagens de castanha-do-Brasil.

Oliveira (2018) também realizou um estudo nesse sentido, obtendo expressiva redução na contagem de *Aspergillus flavus* em castanhas-do-Brasil, ozonizadas nas concentrações de 8,88 e 13,24 mg L⁻¹, em período de exposição de 240 min. A redução nessas condições foi superior a 3,1 ciclos log. Dessa forma, o ozônio demonstrou eficácia na inativação de microrganismos potencialmente aflatoxigênicos. Ressaltou ainda que nas condições adotadas no referido estudo, o ozônio não afetou a qualidade do produto, sobretudo no que se refere ao óleo bruto, inclusive o perfil lipídico.

1.3. Objetivo geral

Avaliar o efeito fungicida do gás ozônio sobre fungos filamentosos isolados de castanhas de caju e do Brasil, comercializadas no Município de Fernandópolis, São Paulo.

1.3.1. Objetivos específicos

- Isolar e identificar fungos filamentosos em amostras de castanhas de caju (*Anacardium occidentale* L.) e castanhas-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) comercializadas a granel, obtidas em 5 estabelecimentos no município de Fernandópolis, São Paulo.

- Avaliar a eficácia do gás ozônio frente aos fungos isolados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção e preparo das amostras e análises microbiológicas

O trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Universidade Brasil, campus Fernandópolis, São Paulo. As 10 amostras de castanha-de-caju e castanha-do-Brasil (5 de cada tipo, com aproximadamente 100 gramas) foram obtidas em 5 estabelecimentos no município de Fernandópolis (SP), no período de outubro a dezembro de 2019, sendo estas vendidas a granel, sem casca. As mesmas foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis, armazenadas em caixa isotérmicas e transportadas até o laboratório. A identificação das amostras foi realizada da seguinte forma: de 1 a 5 - castanhas de caju e de 6 a 10 - castanhas-do-Brasil.

Para isolamento da microbiota fúngica foi utilizado o método de diluição em seriada e plaqueamento (Figura 2). Foram pesados de forma asséptica 25 g de cada amostra de castanha, em seguida foram trituradas manualmente e diluídas em 225 mL de água peptonada a 1%, e depois procederam-se as diluições decimais seriadas consecutivas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}), sendo inoculadas alíquotas de 0,1 mL nas placas de Petri contendo o meio de cultura Agar Batata Dextrose, em triplicata. As mesmas foram incubadas em condições de temperatura controlada em estufa B.O.D. a 25° C por 7 dias.

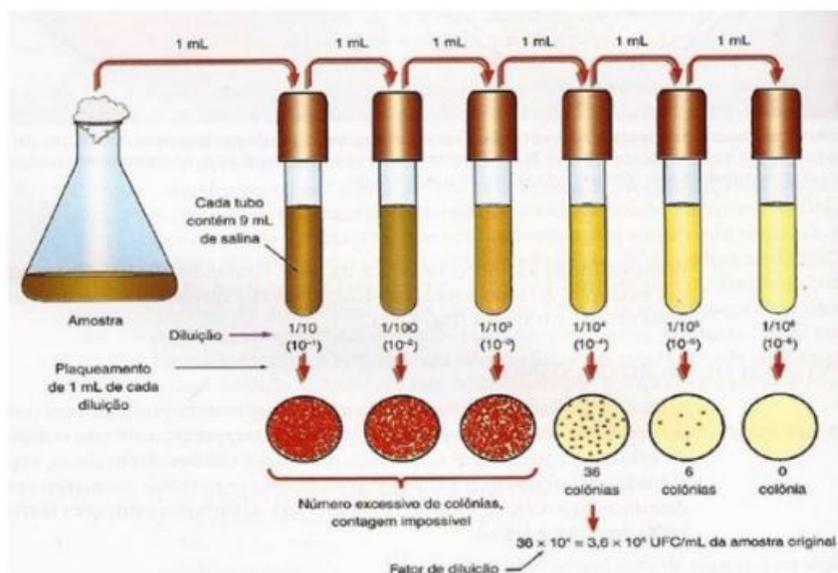


Figura 2. Diluição seriada e plaqueamento
Fonte: Universidade Federal de São Carlos – UFSCar (2018)

2.2. Contagem e identificação de fungos filamentosos

Após o período de incubação, foi realizada a contagem de colônias e a correção pelo fator de diluição, a fim de obter o número de unidades formadoras de colônia por grama de castanha (UFC/g).

Visando a identificação dos gêneros de fungos filamentosos, foram observadas as características macroscópicas das colônias (diâmetro, textura, forma, aspecto da superfície e do reverso, pigmentação dos conídios, produção e cor do exsudado).

As estruturas micromorfológicas, foram observadas por meio da confecção de lâminas coradas com Azul de Algodão, onde observou-se em microscópio óptico, com aumento total de 400 vezes estruturas como hifas, corpo de frutificação e esporos.

2.3. Processo de ozonização das castanhas

Para realização do processo de ozonização (Figura 3), o ozônio foi obtido por meio de um gerador corona (Ozone & Life®, MODELO O&L 3.0.RM). O oxigênio puro foi suprido via cilindro de oxigênio. O ozônio produzido de forma constante pelo equipamento foi conduzido por um tubo de silicone para o difusor por meio de pedra porosa, gerando assim 28mg.L^{-1} , em temperatura controlada de 22°C .

As amostras de castanhas (25g) assepticamente pesadas e trituradas foram diluídas em 225mL de água peptonada a 1%. O material diluído foi exposto ao ozônio em diferentes tempos (0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos), e em cada intervalo de tempo determinado, alíquotas de 0,1mL foram retiradas e inoculadas em triplicata, em placas de Petri contendo ágar Batata Dextrose, para determinação da concentração fúngica mínima (CFM).

Após a inoculação, as placas foram incubadas em temperatura de 25°C por 7 dias, para realização da quantificação de fungos filamentosos, utilizando-se o método de contagem em placa, com a correção pelo fator de diluição, a fim de obter o número de unidades formadoras de colônia por grama de castanhas (UFC/g).



Figura 3. Ozonização das amostras
Fonte: Própria Autora

2.4. Análise estatística

Após a tabulação dos dados coletados posteriormente a ozonização, foram exercidas duas funções de análises estatísticas: descritiva e inferencial. Dessa forma, de maneira descritiva, foi traçado o perfil da amostra estudada, contemplando as variáveis analisadas e seus desdobramentos. Os dados foram replicados de forma absoluta e relativa.

No âmbito inferencial, foi traçado como objetivo estatístico, a análise de independência e predição entre as variáveis propostas no escopo do trabalho. Para isso, utilizou-se, dentro dos padrões esperados, o teste de T Pareado. Vale ressaltar, que os resultados de independência entre as variáveis propostas, se deram por meio de análise entre os valores de p (significância). Todas estas análises foram obtidas pelo uso do *Software* SPSS Statistics (Versão 23) atreladas às funcionalidades da ferramenta Excel (versão 2.016).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Isolamento e identificação de fungos filamentosos provenientes de amostras de castanha de caju e castanha-do-Brasil

A microbiota fúngica foi detectada em todas as amostras analisadas, sendo que em 70% destas, mais de um gênero foi isolado (Tabela 7). Em pesquisa realizada por Lopes et al. (2017) também foram detectados fungos filamentosos em 100% das amostras de castanha-de-caju, comercializadas em Teresina - PI.

Tabela 7. Gênero de fungos filamentosos, por amostra, isolados de castanha-de-caju e castanha-do-Brasil comercializadas a granel no município de Fernandópolis, São Paulo, 2019

AMOSTRA	GÊNERO ISOLADO
1	<i>Aspergillus</i> sp.
2	<i>Aspergillus</i> sp.; <i>Cladosporium</i> sp.
3	<i>Penicillium</i> sp.; <i>Aspergillus</i> sp.
4	<i>Curvularia</i> sp.; <i>Cladosporium</i> sp.; <i>Aspergillus</i> sp.
5	<i>Aspergillus</i> sp.; <i>Cladosporium</i> sp.
6	<i>Curvularia</i> sp.; <i>Cladosporium</i> sp.; <i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.
7	<i>Absidia</i> sp.
8	<i>Penicillium</i> sp.; <i>Aspergillus</i> sp.; <i>Cladosporium</i> sp.
9	<i>Penicillium</i> sp.; <i>Rhizopus</i> sp.
10	<i>Penicillium</i> sp.

Fonte: Própria autora

A distribuição dos fungos em relação ao tipo de castanha se mostrou semelhante no presente trabalho, com uma leve tendência de maior incidência do fungo *Penicillium* sp nas castanhas-do-Brasil (amostras 6 a 10), como pode ser observado na Tabela 7. Santurio (2000) afirma que a contaminação depende do tipo de alimentos, já que alguns grãos são substratos mais aptos que outros para o crescimento de determinados fungos.

O isolamento e a caracterização morfológica dos fungos filamentosos encontrados revelaram a presença dos seguintes gêneros: *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp, *Cladosporium* sp, *Curvularia* sp, *Absidia* sp e *Rhizopus* sp (Figura 4).

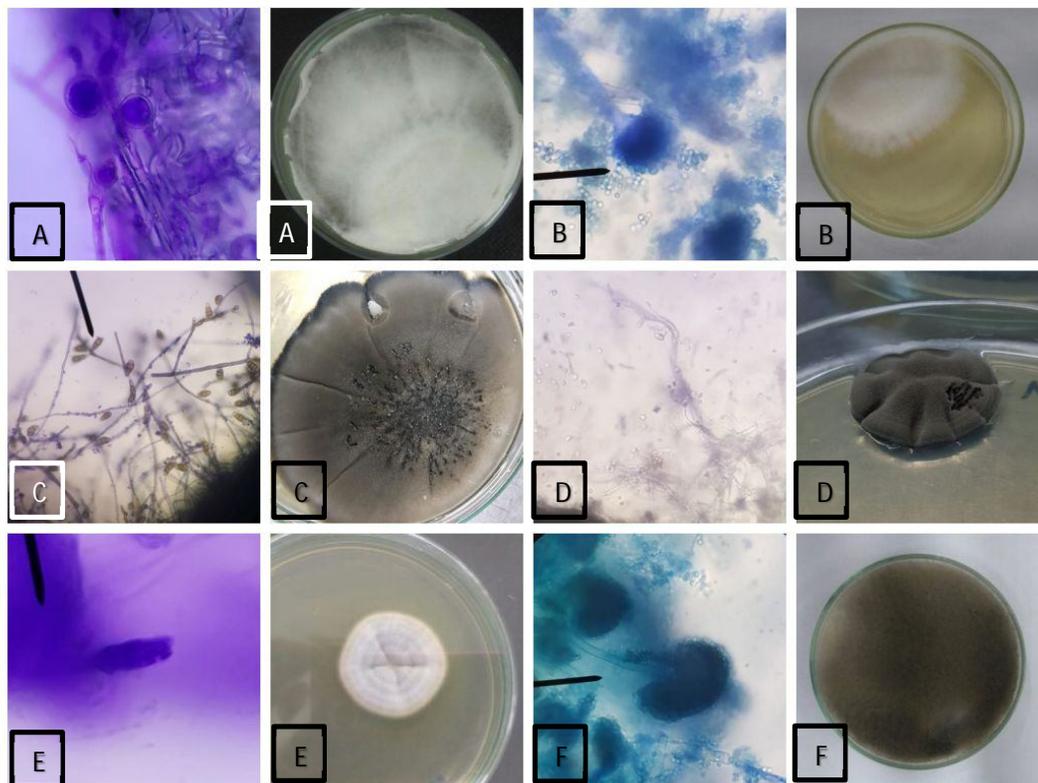


Figura 4. Gêneros de fungos filamentosos isolados em castanhas-do-Brasil e de caju comercializadas a granel no município de Fernandópolis, São Paulo, 2019.

Legenda: *A: *Absidia* sp; B: *Aspergillus* sp; C: *Curvularia* sp; D: *Cladosporium* sp; E: *Penicillium* sp; F: *Rhizopus* sp. Obs: As micrografias, que estão à esquerda das culturas vistas a olho nu, possuem aumento de 400X.

Fonte: Própria autora

A Figura 5 apresenta a microbiota em porcentagem média de isolamento, ressaltando que em 70% das amostras mais de um gênero fúngico foi isolado.

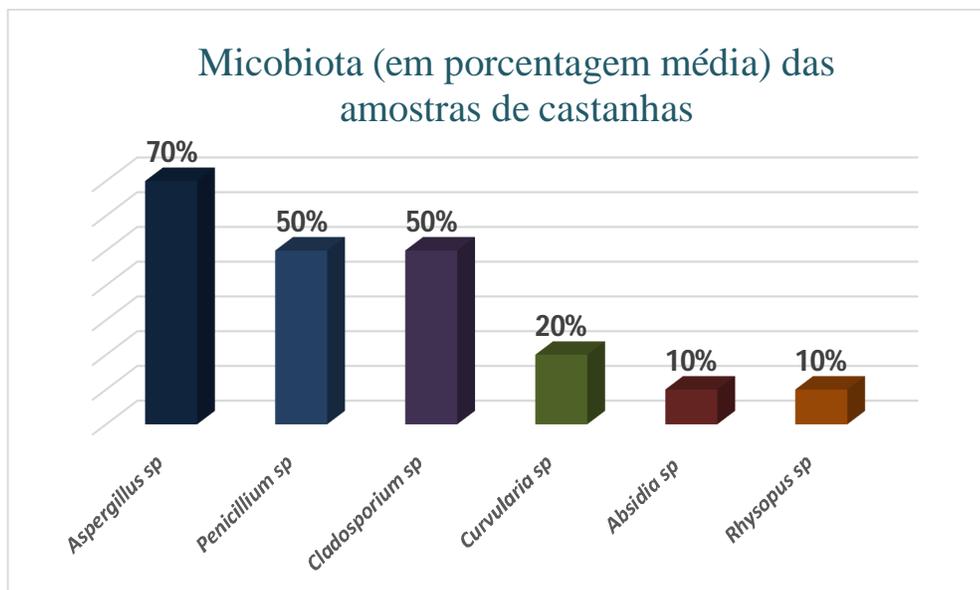


Figura 5. Gêneros de fungos filamentosos em porcentagem média de isolamento encontrados em castanhas-do-Brasil e de caju comercializadas a granel no município de Fernandópolis, São Paulo, 2019.

Fonte: Própria autora

De acordo com a prevalência de fungos filamentosos isolados das amostras analisadas, em 70% isolou-se o gênero *Aspergillus sp*, em 50% *Penicillium sp* e o mesmo para *Cladosporium sp*. Resultados semelhantes foram encontrados por Calderari (2011), que analisou amostras de amêndoas e cascas de castanha do Brasil, coletadas em diferentes etapas de processamento no Estado do Amazonas. Em ambas as amostras coletadas (amêndoas e cascas) os gêneros mais frequentes foram *Penicillium*, *Aspergillus* e *Mucor*.

Martins Junior et al. (2011), estudando a microbiota do ouriço (fruto) e da amêndoa (semente) com casca e sem casca, oriundos de castanheiras do estado do Amapá, isolaram também com maior incidência o gênero *Aspergillus* (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus spp.*). É importante ressaltar que esse gênero tem representantes produtores de aflatoxinas, que podem desencadear, por efeito cumulativo, processos carcinogênicos tanto no ser humano como em animais (PITT e HOCKING, 2009; MARTINS JUNIOR et al., 2011; SILVA et al., 2015; LOPES et al., 2017). De acordo ainda com Pitt e Hocking (2009) algumas espécies de *Penicillium* são importantes produtoras de micotoxinas, como a patulina, encontrada frequentemente em frutas, e a citrinina, em cereais utilizados para alimentação animal.

Moreira et al. (2016) investigando a presença de aflatoxinas em 23 amostras de castanha-do-Brasil, comercializadas na cidade de Fortaleza, em 2013, identificaram por meio de caracterização morfológica as seguintes espécies: *Aspergillus flavus* (21,4 %), *Aspergillus niger* (21,4 %), *Mucor* sp (14,3%), *Cladosporium sphaerospermum* (14,3%), *Cladosporium cladosporoides* (7,1 %), *Fusarium* sp (7,1%), *Aspergillus terreus* (7,1%). Desta forma, como no presente trabalho, os gêneros *Aspergillus* e *Cladosporium* estão entre os mais frequentes.

O gênero *Cladosporium*, isolado de 50% das amostras nesta pesquisa, é normalmente encontrado como contaminante e agente de deterioração nos alimentos ou produtos industriais (GUTAROWSKA, 2014). Para os seres humanos e animais, nem todas as cepas são patogênicas, entretanto algumas podem provocar ocasionalmente feohifomicose cutânea e cerebral independentemente do estado imunitário do hospedeiro (SOUMAGNE et al., 2015).

Pesquisa realizada por Rodrigues (2016) também corroborou com o presente trabalho. Avaliando amêndoas de castanha-do-Brasil, o autor identificou os gêneros *Aspergillus* spp. (87,55 %), *Rhizopus* spp. (3,07 %), *Penicillium* spp. (6,86%), *Curvularia* spp. (1,62%), *Paecilomyces* spp. (0,36%), *Trichoderma* spp. (0,18%), *Acremonium* spp. (0,18%) e *Verticillium* spp. (0,18%). *Rhizopus* spp. e *Curvularia* spp. foram isolados com prevalência mais baixa, assim como nessa pesquisa.

Os fungos do gênero *Rhizopus* são considerados seguros para uso alimentar e são comumente utilizados na Ásia para produzir produtos alimentícios, e por sua capacidade de produção de compostos fenólicos (RANDHIR; SHETTY, 2007). Os fungos do gênero *Curvularia* são amplamente distribuídos ao redor do mundo, associados a espécies vegetais, na forma saprofítica, endofítica ou como parasita (MOURÃO et al., 2017). Maia (2014), avaliando o efeito da doença oídio na qualidade da castanha e amêndoa de caju, encontrou esse gênero nas amostras analisadas, indicando relação com a referida doença, que nos últimos anos vem provocando graves perdas para a cultura do cajueiro. A contaminação das castanhas por esse fungo pode estar relacionada desse modo com as etapas de pré-colheita, já que o mesmo foi associado a essa fitopatologia na referida cultura.

Observou-se no presente trabalho uma possível relação entre a alta ocorrência de fungos filamentosos nas castanhas (positividade em 100% das amostras) com a forma com que são comercializadas, pois nos locais de venda de

produtos naturais e supermercados em que foram adquiridas, as mesmas estavam em constante contato e manipulação, já que são vendidas a granel.

De acordo com a Instrução Normativa nº 13 de 27/05/2004/MAPA as castanhas podem ser vendidas a granel, portanto, como qualquer outro alimento, deve-se atender as condições higiênico-sanitárias especificadas na portaria nº 326 de 30 de julho de 1997 da Vigilância sanitária, visando a proteção da saúde da população (BRASIL, 2002; BRASIL, 2004). Mesmo observando essas condições, o risco de contaminação existe, pois, o manuseio constante do local onde as mesmas são acondicionadas e a exposição dos pegadores do produto são fatores críticos.

3.2. Avaliação do efeito do ozônio frente aos fungos filamentosos isolados de castanha-de-caju e castanha-do-Brasil

Os valores médios da quantificação de fungos filamentosos nas castanhas frente ao tratamento com ozônio nos períodos de exposição 0; 5; 10; 15; 20; 25 e 30 minutos estão apresentados na Tabela 8, respectivamente.

Tabela 8. Valores médios referentes à contagem (UFC/g) de fungos filamentosos presentes em castanha de caju e castanha-do-Brasil comercializadas a granel no município de Fernandópolis, submetidas ao tratamento com ozônio, Fernandópolis, 2019.

		AMOSTRAS									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
TEMPO	0	2000 A	2000 A	100 A	700 A	601 A	81 A	200 A	701 A	100 A	5 A
	5	2 B	2 B	75 A	1 B	1 B	20 B	50 B	10 B	7 B	3 A
	10	1 B	2 B	2 B	1 B	1 B	2 C	48 B	3 C	1 C	2 A
	15	1 B	2 B	2 B	1 B	1 B	1 C	45 BC	1 C	1 C	1 A
	20	1 B	1 B	1 B	1 B	1 B	1 C	36 CD	1 C	1 C	1 A
	25	0 B	0 B	1 B	0 B	0 B	1 C	30 DE	1 C	1 C	1 A
	30	0 B	0 B	1 B	0 B	0 B	1 C	24 E	1 C	1 C	1 A
	Média	340,48	316,14	41,1	100,62	102,14	12,52	61,86	101,24	3,14	2
	DP	703,18	707,96	36,53	250,9	212,23	28,68	58,9	250,77	3,58	1,58
	CV	206,53%	223,94%	88,89%	249,35%	207,78%	228,96%	95,22%	247,70%	113,96%	79,06%

Legenda: *Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas na contagem microbiana, relacionada aos minutos de exposição ao ozônio quando comparados pelo Teste de T pareado a $p < 0,05$.

Fonte: Própria autora.

Os resultados apresentados na Tabela 8 sugerem uma contaminação inicial maior (UFC/g) nas amostras de castanha-de-caju (1 a 5). Segundo Lima (2013), as amêndoas de castanha-de-caju apresentam problemas de estabilidade durante o armazenamento, sendo que o desenvolvimento de microrganismos pode ocorrer em função do aumento de umidade. Para minimizar tal circunstância, deve-se utilizar embalagens adequadas que limitem a absorção de umidade do ambiente. Esse procedimento, porém, não foi realizado nas amostras analisadas neste trabalho, pois eram comercializadas a granel.

Observou-se nas amostras 1; 2; 4; 5; 6; 7; 8 e 9 (Tabela 8) redução significativa na contagem de fungos filamentosos após 5 minutos de exposição ao ozônio, diferentemente das amostras 3 e 10 que não apresentaram tal redução.

Um fato importante a salientar é que para as amostras 1; 2; 4 e 5 que possuíam fungos dos gêneros *Curvularia* sp., *Cladosporium* sp. e *Aspergillus* sp., o ozônio apresentou ação fungicida após 25 minutos de exposição, porém, com 5 minutos já apresentou ação fungistática por não apresentar diferença significativa na quantidade de colônias entre os tempos seguintes.

Vijayanandraj et al. (2006), estudando o efeito do ozônio sobre *Aspergillus niger*, notaram alterações na morfologia do fungo, sendo que os conídios tratados com ozônio produziram colônias não-esporulantes, fato este que pode explicar o efeito fungicida do ozônio frente a este gênero nesse trabalho.

Realizando testes *in vitro*, Silva e Venâncio (2008) avaliaram a sensibilidade de *A. flavus* e *A. parasiticus* ao ozônio e obtiveram resultados semelhantes a esta pesquisa, pois as taxas de inativação dos fungos variaram entre 98 e 100%, para as concentrações de 10 e 20 mg.L⁻¹ de ozônio em tempo de exposição de 10 minutos. Os autores concluíram dessa forma que o ozônio é eficaz no controle de conídios das estirpes testadas.

Hsieh et al. (1998) relataram a eficácia de água ozonizada para o controle do fungo *Curvularia pallenscens* por meio da inibição da germinação de seus esporos. Já Hudson e Sharma (2009), constataram o efeito fungicida do ozônio frente a alguns gêneros fúngicos, dentre eles o *Cladosporium* sp.

Com relação as amostras 3; 6; 8 e 9 cujos gêneros de fungos isolados foram *Curvularia* sp., *Cladosporium* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp e *Rhizopus* sp., o ozônio apresentou efeito fungistático após 10 minutos de ação, porém sem apresentar efeito fungicida, pois não ocorreu inibição total do crescimento fúngico. A colônia que

não foi afetada pelo ozônio foi identificada como fungo do gênero *Penicillium* sp, comprovando novamente a ação fungicida do ozônio frente aos outros gêneros presentes.

Esses resultados corroboram com de outros autores como Pascual et al. (2007) que relataram a sensibilidade de microrganismos ao ozônio e a tolerância maior dos esporos fúngicos do que as células vegetativas. Segundo Naito e Takahara (2006) isso ocorre provavelmente em função da estrutura da parede e da membrana celular. Provavelmente características estas presente no gênero *Penicillium* sp.

Corroborando com o resultado nessa pesquisa, Silva (2011) ao ozonizar grãos de trigo, à concentração de 0,54 mg.L⁻¹, por período de 100 h, não obteve resultados significativos de efeito fungicida em relação à inativação de esporos de *Penicillium* sp. Assim como Beber-Rodrigues (2013), que também verificou redução na quantidade total de fungos, mas a resistência do gênero *Penicillium* sp. Brito Júnior (2013) destacou que em seu trabalho com grãos de arroz ozonizados, nem todos os esporos fúngicos deixaram de germinar, contudo produziram colônias de tamanho bastante reduzido, esparsas e com baixo vigor.

Mesmo o ozônio não apresentando efeito fungicida frente ao *Penicillium* sp., esse fator não inviabiliza o respectivo tratamento, pois apenas uma UFC permaneceu na amostra. A legislação não indica a quantidade mínima permitida dos fungos filamentosos em castanhas, apenas a quantidade máxima de micotoxinas que as mesmas podem conter.

A quantidade de micotoxina presente nas amostras de castanhas analisadas nesse trabalho não foi pesquisada, porém, Sahab et al. (2013) afirmaram que a exposição das castanhas a 40 ppm de ozônio por 10 minutos causa degradação significativa das aflatoxinas, indicando assim o uso do ozônio para descontaminação de sementes contaminadas.

A amostra 7, cujo gênero fúngico isolado foi *Absidia* sp foi a que apresentou maior resistência ao ozônio, pois ocorreu diminuição significativa de colônias após 5 minutos de exposição, porém o número manteve-se constante com pouca variação até os 30 minutos finais do tratamento, sem apresentar efeito fungicida.

De acordo com Khadre et al. (2001), a inativação dos microrganismos durante a ozonização ocorre a partir da oxidação de constituintes da parede, membrana e componentes do conteúdo celular, podendo ocorrer sua lise durante a exposição a esse gás. Dentre os compostos capazes de serem oxidados pelo ozônio tem-se

ácidos graxos poli-insaturados, polissacarídeos, enzimas e componentes nucleicos, como as bases timina e citosina. Pascual et al. (2007) também destacaram que o ozônio molecular e/ou radicais gerados durante sua decomposição podem atuar no processo de oxidação desses componentes celulares. Dessa forma, notou-se que o gênero *Absidia* sp. demonstrou-se resistente aos mecanismos de ação do ozônio.

Ainda em relação ao gênero *Absidia*, algumas espécies como *A. corymbifera* e *A. nidulans* são descritas como agentes de infecções, podendo causar a zigomicose em pessoas imunodeprimidas, como pacientes com Aids, neutropênicos, transplantados e leucêmicos e ainda, infecção pulmonar em humanos e animais. A segunda espécie citada é produtora de esterigmatocistina, uma micotoxina hepatocarcinogênica que inibe a síntese de DNA (HOOG et al., 2004). A contaminação das castanhas por esses fungos está associada principalmente as etapas de pré-colheita e armazenamento, já que os mesmos estão associados ao solo e excrementos de animais herbívoros, como também a alimentos estocados (ALVES, 2016).

A Tabela 9 apresenta uma análise descritiva da evolução do tratamento com ozônio. Esta tabela contém a porcentagem de fungos que se manteve viável a cada tempo de exposição, considerando-se o tempo 0 como 100% de UFC viáveis.

Tabela 9. Evolução do tratamento com o gás ozônio, mensurado em porcentagem, de amostras de castanhas-do-Brasil e de caju comercializadas a granel no município de Fernandópolis, São Paulo, 2019.

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
5	0,1	0,1	75	0,14	0,16	24,7	25	1,4	7	60
10	0,05	0,1	2	0,14	0,16	2,5	24	0,4	1	40
15	0,05	0,1	2	0,14	0,16	1,25	22,5	0,14	1	20
20	0,05	0,05	1	0,14	0,16	1,25	18	0,14	1	20
25	0	0	1	0	0	1,25	15	0,14	1	20
30	0	0	1	0	0	1,25	12	0,14	1	20

Fonte: Própria autora

A partir da análise dos resultados apresentados na Tabela 9, pode-se constatar que houve redução média de fungos filamentosos com a utilização do ozônio

em concentração de 28 mg.L¹, por tempo máximo de 30 minutos em 96,5% das UFC. Este tempo máximo foi escolhido com o propósito de viabilizar o uso desse método de descontaminação, pois o tempo muito prolongado pode ser visto como impedimento a adoção desse procedimento, além de induzir a uma possível alteração na qualidade do produto final.

Quanto a concentração do ozônio utilizada no tratamento, foi baseada em outros trabalhos semelhantes a este, levando-se em consideração que uma concentração maior tende a exigir um tempo de exposição menor. Oliveira (2018), avaliando a cinética de decomposição do ozônio e seu efeito fungicida na castanha-do-Brasil chegou à conclusão de que concentração inicial do ozônio influencia o tempo de saturação do meio contendo a castanha. À medida que se eleva a concentração inicial do gás, ocorre decréscimo linear do tempo de saturação e aumento linear da concentração de saturação.

Outros estudos também confirmam a eficiência do ozônio como agente fungicida. Alencar et al. (2012) comprovaram esse fato em grãos de amendoim, com inativação do fungo *Aspergillus* spp., reduzindo aproximadamente 3,0 ciclos log na concentração de 21 mg.L¹, por 96 h. Brito Júnior (2013) constatou uma redução de 78,5 e 98,0% no índice de ocorrência de *Penicillium* spp e *Aspergillus* spp em grãos de milho submetidos a ozonização à concentração de 2,14 mg.L¹, por um período de 50h, além disso, houve também redução em 2,0 ciclos log na contagem de outros fungos filamentosos e leveduras.

Oliveira (2018) realizou um estudo que obteve expressiva redução na contagem de *Aspergillus flavus* em castanhas-do-Brasil, ozonizadas nas concentrações de 8,88 e 13,24 mg.L¹, em período de exposição de 240 min. A redução nessas condições foi superior a 3,1 ciclos log., dessa forma, o ozônio demonstrou eficácia na inativação de microrganismos potencialmente aflatoxigênicos.

Como as amostras coletadas para essa pesquisa estavam sendo comercializadas a granel, sugere-se que os pontos de comercialização das castanhas, tratassem as mesmas com o ozônio e as embalsassem à vácuo posteriormente, para garantir assim um produto de melhor qualidade, já que esse desinfetante tem se mostrado muito eficiente na inativação de espécies aflatoxigênicas e também na degradação de micotoxinas, como constatado neste trabalho e já relatado por outros autores (SILVA e VENÂNCIO, 2008; TIWARI e MUTHUKUMARAPPAN, 2012; BRITO JÚNIOR, 2013; SAHAB *et al.*, 2013).

É importante destacar que para o uso eficaz e seguro no processamento de alimentos, a concentração de ozônio, tempo de exposição e outras condições de tratamento, devem ser definidos para cada produto, com avaliações preliminares antes do início de sua aplicação comercial (COELHO et al., 2015).

4. CONCLUSÃO

Conclui-se que as amostras de castanhas apresentaram alto índice de contaminação por fungos filamentosos, pois todas as amostras continham pelo menos um gênero fúngico. Desta forma, representam risco potencial a saúde pública, já que alguns gêneros encontrados são possíveis produtores de micotoxinas.

A alta incidência destes fungos nas castanhas demonstra a importância do monitoramento dos mesmos em toda a sua cadeia produtiva, até a comercialização. A adoção de boas práticas devem ser realizadas e podem auxiliar na redução de espécies toxigênicas, assim como a legislação deve ser mais criteriosa, discriminando valores limites desses fungos nas castanhas, não apenas das toxinas que os mesmos podem produzir.

Estudos com esse cunho chamam à atenção para uma reflexão quanto à atuação da vigilância sanitária e demais órgãos competentes que objetivem o controle sanitário dos gêneros alimentícios destinados ao consumo humano, bem como para a sensibilização da sociedade quanto à segurança alimentar, principalmente quando se refere a um alimento tão apreciado pela população.

Os resultados desta pesquisa também demonstraram que o ozônio se mostrou eficiente na inativação dos gêneros de fungos filamentosos. Assim, a ozonização é uma técnica efetiva e segura, que pode atuar na descontaminação das castanhas e, conseqüentemente, na prevenção da síntese das micotoxinas.

Por fim, sugere-se que os pontos de comercialização das castanhas, principalmente as vendidas a granel, utilizem a técnica de ozonização nas mesmas e posteriormente as embalem à vácuo, garantindo assim um produto de melhor qualidade e segurança alimentar para o consumidor.

REFERÊNCIAS

- ADS. Agência de Desenvolvimento Sustentável do Amazonas. *O Amazonas é o maior produtor de Castanha-do-Brasil, um dos produtos mais característicos da Região Amazônica*. Disponível em: <www.ads.com.br>. Acesso em: jan. de 2019.
- AGEITEC (Agência Embrapa de Informação Tecnológica). *Beneficiamento manual da castanha-do-Brasil*. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/castanha-do-brasil/arvore/CONT000fzgyoyya02wx5ok0cpoo6an8lg4e4.html>>. Acesso em: dez. de 2019.
- ALENCAR, E.R.; FARONI, L.R.A.; SOARES, N.F.F.; SILVA, W.A.; CARVALHO, M.C.S. Efficacy of ozone as a fungicidal and detoxifying agent of aflatoxins in peanuts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.92, n.4, p.899–905, 2012.
- ALLEN, B.; WU, J.; DOAN, H. Inactivation of Fungi Associated with Barley Grain by Gaseous Ozone. *Journal of Environmental Science and Health, Part B-Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, v.B38, n.5, p.617–630, 2003.
- ALVES, A. L. S. M. *Diversidade de mucorales em solos de brejo de altitude do semiárido de Pernambuco*. 2016. Dissertação (mestrado em Biologia de Fungos) – Universidade Federal de Pernambuco. 2016.
- ALVES, L. F. Produção de fitoterápicos no Brasil: história, problemas e perspectivas. *Revista Virtual de Química*, v. 5, n. 3, p. 450-513, 2013. DOI: 10.5935/1984-6835.20130038. Acesso em: nov. de 2019.
- AMARAL K.A.S., JÚNIOR M.M. Métodos analíticos para a determinação de aflatoxinas em milho e seus derivados: uma revisão. *Revista analytica*, n.24, 2006.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução RDC Nº7 de 18 de fevereiro de 2011*. Diário Oficial da União. n. 37, seção 1, 22 de fevereiro de 2011.
- APIZ. Associação do povo indígena Zoró. In: *Boas práticas de coleta, armazenamento e comercialização da castanha do Brasil*. 2ª edição. Cuiabá: Defanti editora, 2009.
- AQUINO, S. *Efeitos da radiação gama no crescimento de Aspergillus flavus produtor de aflatoxinas e no emprego da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostras de grão de milho inoculadas artificialmente*. 2003. 89 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo.
- ARRUS, K.; BLANK, G.; CLEAR, R.; HOLLEY, R. A.; ABRAMSON, D. Microbiological and aflatoxin evaluation of Brazil nut pods and the effects of unit processing operations. *Journal of Food Prot*, v.68, p.1060 -1065, 2005.

BAKER, S.E.; BENNETT, J.W. An overview of the genus *Aspergillus*. In: *The Aspergilli: Genomics, medical aspects, biotechnology, and research methods*. New York: CRC Press, 2007, p.3-13.

BAPTISTA, A.S.; HORII, J.; CALORI-DOMINGUES, M. A.; GLÓRIA, E. M.; SALGADO, J. M.; VIZIOLI, M. R. Utilization of thermolysed and active yeast to reduce the toxicity of aflatoxin. *Scientia Agricola*, v.59, n.2, p.257-260, 2002.

BARROS, L.M. Melhoramento. In: LIMA, V. de P.M.S. *A cultura do cajueiro no Nordeste do Brasil*. Fortaleza: BNB, 1988. p. 321-356.

BENNET J.W.; KLICH M. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, v.16, n.3, 497-516, 2003.

BEBER-RODRIGUES, M. *Efeito do gás ozônio na qualidade micotoxicológica de arroz (*Oryza sativa* L.) em casca durante a armazenagem*. Florianópolis, Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2013.

BINDER, E. New descontamination techniques. In: SCUSSEL, V. M. (Ed.) *Atualidades em micotoxinas e armazenagem de grãos*. Florianópolis, 2000. p.186-194.

BRASIL - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Especificações para padronização, classificação e comercialização interna da castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.)*. Portaria N°846, de 08 de novembro de 1976. Diário Oficial da União de 19/11/1976, Seção 1, 1976. D.O.U. de 19/11/1976.

BRASIL. NR 15 - Atividades e Operações Insalubres: *Portaria MTb n.º 3.214, de 08 de junho de 1978*. DOU de 06/07/78. Disponível em:<
<http://www.ctpconsultoria.com.br/pdf/Portaria-3214-de-08-06-1978.pdf>> Acesso em: nov. de 2019.

BRASIL - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Portaria no 326, de 30 de julho de 1997*. D.O.U. n 206, de 23/10/2002, Seção 1, pág. 126.

BRASIL - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Projeto de Monitoramento da Castanha do Brasil - Relatório de Atividades*. Brasília, p.110, 2002.

BRASIL - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Instrução Normativa n° 13, de 30 de Novembro de 2004*. D.O.U. de 01/12/2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Cenário de exportações de castanha-do-Brasil 2000-2010*. Apresentação câmara setorial de fruticultura, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, 2010. 15 p.

BRASIL - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Instrução Normativa n° 20, de 26 de julho de 2018*. DOU de 31/07/2018.

BRITO JÚNIOR, J.G. *Ozônio como agente fungicida e seu efeito na qualidade dos grãos de milho*. 2013. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – UFV, Viçosa.

CALDERARI, T.O. *Biodiversidade de fungos aflatoxigênicos e aflatoxinas em castanha do Brasil*. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

CARVALHO, I.M.M.; QUEIROZ, J.H.; BRITO, L.F.; TOLEDO, R.C.L.; SOUZA, A.L. *O consumo de castanhas pode reduzir o risco de processos inflamatórios e doenças crônicas*. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 8, n.15, 2012.

CASTRO, I.C.D.; OLIVEIRA, H.F.; MELLO, H.C.; MASCARENHAS, A.G. *Micotoxinas na produção de suínos*. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. p. 6-13, 2015.

CFR - Code of Federal Regulations. *Air contaminants*. Title 29, part 1910. Washington, D.C.: Office of Federal Register, 2011.

CHIATTONE, P. V.; TORRES, L. M.; ZAMBAZI, R. C. Application of ozone in industry of food. *Alimentos e Nutrição*, v.19, p.341-349, 2008. Disponível em: <<https://go.gale.com/ps/anonymous?id=GALE%7CA202074074&sid=googleScholar&v=2.1&it=r&linkaccess=abs&issn=01034235&p=HRCA&sw=w>> Acesso em: Nov. de 2018.

CHUNHIENG, T.; HAFIDI, A.; PIOCH, D.; BROCHIER, J.; DIDIER, M. Detailed study of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) oil micro-compounds: phospholipids, tocopherols 57 and sterols. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.19, n.7, p.1374-1380, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0103-50532008000700021>> Acesso em: nov. de 2018.

COELHO, C. C. de S.; FREITAS-SILVA, O.; CAMPOS, R. da S.; BEZERRA, V.S.; CABRAL, L. M. C. Ozonização como tecnologia pós-colheita na conservação de frutas e hortaliças: Uma revisão. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.19, n.4, p.369–375, 2015. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbeaa/v19n4/1415-4366-rbeaa-19-04-0369.pdf>> Acesso em: nov. de 2018.

COELHO, E. A. A. *Efeitos da radiação gama e feixe de elétrons sobre amostras de castanhas-do-Brasil inoculadas artificialmente com Aspergillus flavus*. 2012. Dissertação (Mestrado em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. *Análise mensal da castanha de caju*. Agosto de 2019. Disponível em: <www.conab.gov.br>. Acesso em: fev. de 2020.

COOPERACRE. Cooperativa central de comercialização extrativista do estado do Acre. *Ficha técnica de produtos - castanha-do-Brasil*. Disponível em: www.cooperacre.gov.br. Acesso em: nov. de 2018.

COSTA, A. K. F. da; FREIRE, F. das C. O.; VIEIRA, I. G. P.; ANDRADE, J. A.; MENDES, F. N. P. Fungos associados à Castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bompl) e ao amendoim (*Arachis hypogaea* L.) comercializados em Fortaleza (Ceará). *Revista Ciência Agronômica*, Fortaleza, v. 40, n. 3, p. 455-460, jul./set, 2009. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAT2010/11636/1/PB09017.pdf>. Acesso em: nov. de 2018.

COSTA, T.; JORGE, N. Compostos Bioativos Benéficos Presentes em Castanhas e Nozes. *UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde*, v. 13, n. 3, p. 195-203, 2011. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/122387>>. Acesso em: nov. de 2018.

COZZOLINO, S. M. F. *Usos e aplicações das dietary reference intake*. DRIs. ILSI BRASIL. São Paulo, 2001. Disponível em:< http://www.ufjf.br/renato_nunes/files/2014/03/Como-usar-DRIs-Brasil.pdf>. Acesso em: jan. de 2019.

CULLEN, P.J.; VALDRAMIDIS, V.P.; TIWARI, B.K.; PATIL, S.; BOURKE, P.; C.P. Ozone processing for food preservation: an overview on fruit juice treatments. *Ozone: Science & Engineering*, v.32, p.166-179, 2010.

DA SILVA, F. C.; CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R.; SANTOS, C.; LIMA, N. Use of a polyphasic approach including MALDI-TOF MS for identification of *Aspergillus* section *Flavi* strains isolated from food commodities in Brazil. *Annals of Microbiology*, p. 1-11, 2015.

DI BERNARDO, L.; DANTAS, A. D. B. *Métodos e técnicas de tratamento de água*. 2. ed. São Carlos: Rima, 2005.

EATON, D.L.; RAMSDELL, S.; NEAL, G.E. Biotransformation of aflatoxins. In: EATON, D.L., GROOPMAN, J.D. (Ed.) *The Toxicology of Aflatoxins*. San Diego: Academic Press, 1994. p.45-72.

ECKY, E.W. *Vegetable Fats and Oils*. New York: Reinhold Publishing Corp, 1954.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. *Zoneamento pedoclimático para a cultura do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) no nordeste do Brasil e norte de Minas Gerais*. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical / Recife: Embrapa-CNPS-ERP-NE, Boletim de pesquisa nº27. 2000. 30p. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAT-2010/6558/1/Bp-027.pdf>>. Acesso em: jan. de 2019.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. *Manual de Segurança e Qualidade para a cultura da castanha-do-Brasil*. Série Qualidade e Segurança dos alimentos. Brasília, DF: Campo PAS, 2004. 61p. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/111880/1/MANUALSEGURANCAQUALIDADEParaaculturadacastanhadoBrasil.pdf>>. Acesso em: fev. de 2019.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. *Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal*. Fortaleza, 2007. 48 p.

Disponível em: <http://www.cnpat.embrapa.br/cd/jss/acervo/Dc_110.pdf> Acesso em: fev. de 2019.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. *Castanha-do-Brasil (Bertholletia excelsa Humb. & Bonpl.)*. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental. 2008. 22p. Disponível em:<
www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/684044/1/CastanhadoBrasilBertholletiaexcelsaHumb.eBonpl..pdf> Acesso em: jan. de 2019.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. *Importância socioeconômica do caju*. 2009. Disponível em:
<<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/caju/arvore/CONT000fobhagqo02wyiv8065610d00dl9xp.html>>. Acesso em: jan. de 2019.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. *Pesquisas tentam livrar castanhas-do-Brasil da contaminação por fungos*. Embrapa Amazônia Ocidental. 2012. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/amazonia-ocidental/busca-de-noticias/-/noticia/1482203/pesquisas-tentam-livrar-castanha-do-brasil-da-contaminacao-por-fungos>>. Acesso em: jan. de 2020.

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

FDA - Food and Drug Administration. *Mycotoxin Regulatory Guidance: A Guide for Grain Elevators, Feed Manufacturers, Grain Processors and Exporters*. 2011. Disponível em: <https://www.ngfa.org/newsletter/ngfa-publishes-updated-resources-on-mycotoxins/>>. Acesso em: jan. de 2020.

FIGUEIREDO E.O., SANTOS J.C., FIGUEIREDO S.M.M. *Demandas tecnológicas para o manejo florestal da castanha-do-Brasil (Bertholletia excelsa)*. Embrapa Acre. Rio Branco, 2001, 15p.

FIGUEIRÊDO JUNIOR, H.S. Desafios para a cajucultura no Brasil: O comportamento da oferta e da demanda da castanha de caju. *Revista Econômica do Nordeste*, Fortaleza, v. 37, n. 4, out-dez. 2006. Disponível em:
<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Desafios_Cajucultura_000g08adodl02wx5ok026zxpffc6gb2e.pdf> Acesso em: jan. de 2019.

FONSECA, H. *Os fungos e a deterioração de alimentos*. 2012. Disponível em:<
<https://pt.engormix.com/micotoxinas/artigos/fungos-deterioracao-alimentos137652.htm>> Acesso em: nov. de 2019.

FORMIGONI, I. *Exportação de Castanha do Pará é recorde em 2018*. 2018. Disponível em:<
<http://www.farmnews.com.br/mercado/exportacao-de-Castanha-do-para/>>. Acesso em: fev. de 2020.

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

19, 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11229375>> Acesso: nov. de 2018.

FREIRE, F.C.O.; VIEIRA, I.G.P.; GUEDES, M.I.F.; MENDES, F.N.P. Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal. Fortaleza, *Embrapa, Agroindústria Tropical*, p. 49, 2007.

FREITAS, J. B.; NAVES, M. M. V. Composição química de nozes e sementes comestíveis e sua relação com a nutrição e saúde. *Rev. Nutr.*, v. 23, n. 2, p. 269-279, 2010.

GIORDANO, B. N. E. *Efeito do ozônio sobre a micoflora e aflatoxinas durante a armazenagem de castanha-do-brasil com casca (BERTHOLLETIA EXCELSA H.B.K.)*. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

GOGATE, P.R.; PANDIT, A.B. A review of technologies for wastewater treatment I: oxidation technologies at ambient conditions. *Advances in Environmental Research*, Amsterdã, v. 8, p. 501-551, 2004.

GRAHAM, D. M. Use of ozone for food processing. *Food Technology*, Chicago, v. 51, n. 6, p. 72-75, 1997.

GUTAROWSKA, B. Moulds in biodeterioration of technical materials. *Folia Biologica et Oecologica*, 10(1): 27-39, 2014. DOI: <https://doi.org/10.2478/fobio-2014-0012>.

GUZEL-SEYDIM, Z. B.; GREENE, A. K.; SEYDIM, A. C. Use of ozone in the food industry. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, San Diego, v. 37, n. 4, p. 453-460, 2004.

HOOG, G. S; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUERAS, M. J. *Atlas of clinical fungi*. 2. ed. Washington: ASM Press, 2004.

HSIEH, S.PY.; NINQ, S.S.; TZENG, D.S. Control of turf grass seedborne pathogenic fungi by ozone. *Plant Pathology Bulletin*, v.7, p.105-112, 1998. Disponível em: <<http://140.112.183.156/pdf/07-2/7-2-5.pdf>> Acesso em: jul. de 2019.

HUDSON, J.B.; SHARMA, M. The practical application of ozone gas as an anti-fungal (anti-mold) agent. *Ozone-Science & Engineering*, v.31, n.4, p.326-332, 2009. DOI: 10.1080/01919510903043996.

HUSSEIN S.H., BRASEL J.M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, v.167, p.101-134, 2001. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00471-1](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00471-1)> Acesso em: Jul. de 2019.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Sistema IBGE de Recuperação Automática: SIDRA*. 2005. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: jul. de 2019.

IBGE - Instituto Brasileiro De Geografia e Estatística. *Produção extrativa vegetal (anos 1990 a 2006) - Quantidade produzida na extração vegetal por tipo de produto extrativo*. 2016. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>> . Acesso em: jan. de 2019.

JAY, J. M. *Microbiologia moderna de los alimentos*. 3. ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 1994. 753 p.

KABAK B., DOBSON A.D.W., VAR I. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed. *Critical reviews in food science and nutrition*, v.46, p.593-619, 2006.

KEMPKEN, F.; ROHLFS, M. Fungal secondary metabolite biosynthesis – a chemical defence strategy against antagonistic animals. *Revista.Fungal Ecology*, v. 3, n. 3, p. 107-114, 2010. Disponível em: < <http://www.journals.elsevier.com/fungalecology>> Acesso em: fev. de 2019.

KHADRE, M. A.; YOUSEF, A. E.; KIM, J. G. Microbiological aspects of ozone applications in food: a review. *Journal of Food Science*, v. 66, n. 9, p. 1242-1252, 2001. Disponível em: < <http://www.ecosafeusa.com/documents/toxinprevention/Listeria3.pdf>> Acesso em: abr. de 2020.

KIM, J. G.; YOUSEF, A. E.; DAVE, S. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 62, n. 9, p. 1071-1087, 1999.

KIM, J.G.; YOUSEF, A.E.; KHADRE, MA. Ozone and its current and future application in the food industry. In: TAYLOR, S.L. (Ed.) *Advances in Food and Nutrition Research*. New York: Academic Press, v.45, p.167-218, 2003.

KLICH, M. A. Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Mycoscience*, v.48, p.71-80, 2007. Acesso em: <<https://doi.org/10.1007/S10267-006-0336-2>> Acesso em: fev. de 2020.

KRIS-ETHERTON, P.M.; HECKER, K.D.; BONANOME, A. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *American Journal of Medicine*, v.113, n.9, p.71-88, 2002. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(01\)00995-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(01)00995-0)> Acesso em: fev. de 2020.

KRISHNAMURTHY, Y. L.; SHASHIKALA, J. Inhibition of aflatoxin B1 production of *Aspergillus flavus*, isolated from soybean seeds by certain natural plant products. *Journal Comp. Letters in Applied Mycro*, n. 43, p. 469-474, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02011.x>> Acesso em: fev. de 2020.

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

- LANGLAIS, B.; RECKHOW, D. A.; BRINK, D. R. *Ozone in water treatment: application and engineering*. Chelsea: AWWARF and Lewis Publishers, 1991. 568p.
- LAPOLLI, F. R.; SANTOS, L. F.; HÁSSEMER, M. E. N.; AISSE, M. M.; PIVELI, R. P. Desinfecção de efluentes sanitários por meio da ozonização. In: GONÇALVES, R. F. (Coord.). *Desinfecção de efluentes sanitários, remoção de organismos patogênicos e substâncias nocivas: aplicação para fins produtivos como agricultura, aquicultura e hidropônica*. Vitória: PROSAB, 2003. p. 169-208.
- LEITE, L. A. de S. *A agroindústria do caju no Brasil: políticas públicas e transformações econômicas*. Fortaleza: EMBRAPA CNPAT, 1994. 195 p.
- LIMA, A. C.; GARCÍA, N. H. P.; LIMA, J. R. Obtenção e caracterização dos principais produtos do caju. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, Curitiba, v. 22, p. 133-144, 2004.
- LIMA, J. R. Valor nutricional da amêndoa de castanha-de-caju e seu processamento e embalagem. In: Araújo, J. P. P. de (Ed.). *Agronegócio caju: práticas e inovações*. Brasília, DF: Embrapa, parte 6, cap. 2, p. 389-393, 2013.
- LIMA, J. R.; GONÇALVES, L. A. G. Caracterização da fração lipídica de amêndoas de castanha de caju fritas e salgadas. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, Curitiba, v. 16, p. 131-138, 1998.
- LOPES, R. *Produção de castanhas e nozes no Brasil está aquém de seu potencial*. Agência Indusnet Fiesp. 2017. Disponível em: <<http://www.fiesp.com.br/noticias/producao-de-castanhas-e-nozes-no-brasil-esta-aquem-de-seu-potencial-dizem-especialistas/>> Acesso em: Fev. de 2019.
- LOPES, L.O.; ANJOS, V.G.; VASCONCELOS, V.M.S. Fungos em castanhas de caju comercializadas por ambulantes em Teresina-PI: uma análise microbiológica. *R. Interd.*, v. 10, n. 4, p. 105-111, 2017. Disponível em: <<https://revistainterdisciplinar.uninovafapi.edu.br/index.php/revinter/article/view/1211>> Acesso em: fev. de 2019.
- MAIA, L. K. R. *Influência do oídio no fruto de cajueiro anão*. Fortaleza, Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal do Ceará, 2014.
- MARTINS JUNIOR, P.O.; SOUSA, V.Y.K.; CORREIA, A.F.; MATA, E.C.G.; KANZAKI, L.I.B. Fontes de contaminação microbiana da castanha-do-pará. Amazônia. *Ci. & Desenv.*, v. 6, n. 12, 2011. Disponível em: <https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/13296/1/ARTIGO_FontesContamina%C3%A7%C3%A3oMicrobiana.pdf> Acesso em: Fev. de 2019.
- MARTINS, L.; SILVA, Z.P.G.; SILVEIRA, B.C. Produção e comercialização da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*, H.B.K) no Estado do Acre – Brasil, 1998-2006. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, 45., 2008, Rio Branco. *Anais...* Rio Branco: UFAC, 2008. p.14.

MAZIERO, M.T.; BERSOT, L.S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande, v.12, n.1, p.89-99, 2010.

MCKENZIE, K.S.; KUBENA, L.F.; DENVIR, A.J.; ROGERS, T.D.; HITCHENS, G.D.; BAILEY, R.H.; HARVEY, R.B.; BUCKLEY, S.A.; PHILLIPS, T.D. Aflatoxicosis in turkey poults is prevented by treatment of naturally contaminated corn with ozone generated by electrolysis. *Poultry Science*, v.77, p.1094–1102, 1998.

MELO, M.L.P.; MAIA, G.A.; SILVA, A.P.V.; OLIVEIRA, G.S.F.; FIGUEIREDO, R.W. Caracterização físico-química da amêndoa da castanha de caju (*Anacardium occidentale* L.) crua e tostada. *Ciê. Tecnol. Aliment.*, v. 18, n. 2, 1998. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20611998000200008>. Acesso em: nov. de 2018.

MOREIRA, M. F.; OLIVEIRA, T. R.; VIEIRA, I. G. P.; FREIRE, F. C. O.; SILVA, S.C; RIBEIRO, L. M. Occurrence of fungi and aflatoxins B in nuts and products marketed the Brazilian northeastern regions. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 75, 01-06, 2016. Disponível em: http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/10/rial75_completa/artigos-separados/1698.pdf Acesso em: fev. de 2019.

MOSS, M.O. Risk assessment for aflatoxins in foodstuffs. *Int. Biod. & Biodegradation*, v.50, p.37-142, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(02\)00078-1](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(02)00078-1) Acesso em: fev. de 2019.

MOURÃO, D. S. C.; SÁGIO, S. A.; DE SOUZA, M. R.; DOS SANTOS, G. R. Identificação morfológica e molecular de *Curvularia* sp. agente causal da mancha foliar do milho. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v.16, n.1, p. 1-12, 2017. DOI: <https://doi.org/10.18512/1980-6477/rbms.v16n1p1-12>. Acesso em: fev. de 2019.

NAITO, S.; TAKAHARA, H. Ozone contribution in food industry in Japan. *Ozone: Science & Engineering*, v.28, n.6, p.425-429, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1080/01919510600987347>. Acesso em: fev. de 2019.

NOVAK, J.S.; YUAN, J.T.C. The Ozonation Concept: Advantages of Ozone Treatment and Commercial Developments. In: Tewari, G.; Juneja, V.K. (Eds.) ***Advances in Thermal and Non-Thermal Food Preservation***. Ames: Blackwell Publishing, p.185- 193, 2007.

NOVINSKY, C.O. *Composição de micotoxinas e bromatologia de silagens de milho em silos de grande porte utilizando imagens de infravermelho*. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. 85p.

OLIVEIRA, J.M. *Cinética de decomposição do ozônio, efeito fungicida e na qualidade de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.)*. 2018. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de Brasília, Brasília.

OLIVEIRA, N. F. *Isolamento dos constituintes do tegumento da castanha de caju (TCC) e avaliação do seu potencial como antioxidante natural*. 2016. Tese

(Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

OSMARI, M.P.; MATOS, L.F.; SALAB, B.L.; DIAZ, T.G.; GIOTTO, F.M. Líquido da casca da castanha de caju: características e aplicabilidades na produção animal. *PubVet*. Maringá, v. 9, n. 3, p. 143- 149, Mar. 2015. Disponível em: <<https://www.pubvet.com.br/uploads/91d8fbf2ea53745dcaa2e5152572a681.pdf>> Acesso em: nov. de 2019.

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

PACHECO A.M; SCUSSEL V.M. Selenium and aflatoxin levels in raw Brazil nuts from the Amazon basin, *J. Agric. Food Chem*, v.55, p.11087-11092, 2007.

PASCUAL, A.; LLORCA, I.; CANUT, A. Use of ozone in food industries for reducing the environmental impact of cleaning and disinfection activities. *Food Science & Technology*, v.18, p.29-35, 2007. DOI: 10.1016/j.tifs.2006.10.006. Acesso em: dez. de 2019.

PAYNE, G. A.; BROWN, M. P. *Genetics and physiology of aflatoxin biosynthesis*. Annual Review of Phytopathology, 36, p. 329-362, 1998.

PELCZAR JR.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. M. *Microbiologia: Conceitos e Aplicações* - v. 1. Markronbooks, 2ª ed., 2009.

PENNACCHIO, H. L. *Conjuntura mensal castanha-do-Brasil*. Brasília: Conab/Mapa, 2012. 3 p.

PEREIRA, A.M.; FARONI, L.R.A.; SOUSA, A.H.; PAES, J.L.; SILVA, M.T.C. Evaluation of oil extracted from corn grains ozonized at different levels of grain mass temperature. In: INTERNATIONAL WORKING CONFERENCE ON STORED PRODUCT PROTECTION, 9, 2006, Campinas. *Proceedings...* Campinas: Associação Brasileira de Pós-Colheita – ABRAPÓS, 2006.

PESSOA, P.F.A.P.; LEITE, L.A.S. *Cadeia Produtiva do Caju: subsídios para pesquisa e desenvolvimento*. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Cadeia_Produtiva_Caju_000g058xcal02wx5ok0q43a0rr72kg7v.pdf> Acesso: nov. de 2019.

PINHEIRO, M. *Estudo de variabilidade genética de Aspergillus flavus como base para o desenvolvimento de PCR multiplex para a detecção de fungos produtores de aflotoxinas em castanha-do-brasil e castanha-de-caju*. Brasília, Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas, Genética Molecular e de Populações, Biotecnologia Molecular) - Universidade Católica de Brasília, 2004.

PITT, J.I. *Toxigenic Aspergillus and Penicillium Species*. Department of Agriculture, Bangkok, Thailand, 1989.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. *Fungi and Food Spoilage*. Springer, 3ª ed., 2009.

PRESTES, E. B. *Avaliação da eficiência do ozônio como sanitizante em hortaliças folhosas minimamente processadas*. 2007. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

PROCTOR, A.D.; AHMEDNA, M.; KUMAR, J.V.; GOKTEPE, I. Degradation of aflatoxins in peanut kernels/flour by gaseous ozonation and mild heat treatment. *Food Additives and Contaminants*, 21, 786–793, 2004.

PRUDENTE, A.D.; KING, J.M. Efficacy and safety evaluation of ozonation to degrade aflatoxin in corn. *Journal of Food Science*, v.67, n.8, 2002. Disponível em:< <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb08830.x>> Acesso em: nov. de 2019.

RANDHIR, R.; SHETTY, K. Mung beans by solid-state bioconversion improves phenolic content and functionality relevant for diabetes and ulcer management. *Inovative Food Science Emerging Technologies*, p.197-204, 2007.

RODRIGUES, K.S. *Ocorrência de fungos com potencial toxígeno em castanha-do-Brasil no Estado de Roraima*. Boa Vista, Dissertação (Mestrado em Agroecologia) - Universidade Estadual de Roraima, 2016.

RUSSEL, A. D.; HUGO, W. B.; AVLIFFE, G. A. J. *Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization*. 3. ed. Oxford: Blackwell Science, 1999. 826 p.

RUPOLLO, G.; GUTKOSKI, L.C.; MARTINS, I.R.; ELIAS, M.C. Efeito da umidade e do período de armazenamento hermético na contaminação natural por fungos e a produção de micotoxinas em grãos de aveia. *Ciênc. Agrotec*, v. 30, n. 1, Lavras, Jan/Fev, 2006. Disponível em:< <https://doi.org/10.1590/S1413-70542006000100017>> Acesso em: nov. de 2019.

RUSTOM, I. Y. S. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chem.*, v. 59. n. 1, p. 57-67, 1997.

RYAN, E.; GAVIN, K.; O'CONNOR, T. P.; MAGUIRE, A. R.; O'BRIEN, N. M. Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of Brazil, pecan, pine, pistachio and cashew nuts. *Int. J. of food Sci. and Nutrition*, 57, p.219-228, 2006. Disponível em:< <https://doi.org/10.1080/09637480600768077>> Acesso em: Nov. de 2019.

SAHAB, A.F.; HASSANIEN, F.R.; EL-NEMR, S.E.; ABDEL-ALIM, H.A.; ABDEL-WAHHAB, M.A. Effect of ozone gaseous on aflatoxin degradation and fat and protein content in peanut seeds. *Journal of Applied Sciences Research*, 9(3): 2170-2175, 2013. Disponível em:<https://www.researchgate.net/publication/282915315_Effect_of_ozone_gaseous_on_aflatoxin_degradation_and_fat_and_protein_content_in_peanut_seeds> Acesso em: abr. de 2020.

SALOMÃO, R.P. Densidade, estrutura e distribuição espacial da castanheira-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H. & B.) em dois platôs de floresta ombrófila densa na Amazônia setentrional. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi Ciências Naturais*, v.4, n.1, p.11-25, 2009.

SANTOS M.M. *Ocorrência de fungos filamentosos e micotoxinas em bagaço de cevada destinado à alimentação do rebanho bovino leiteiro no mercado da Bahia*. 2004. Dissertação (Mestrado em Medicina veterinária tropical) - Universidade Federal da Bahia, Bahia.

SANTURIO, J. M. Micotoxinas e Micotoxicoses na Avicultura. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* [online], v.2, n.1, 01-12, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-635X2000000100001>. Acesso em: jan. de 2019.

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

SCUSSEL, V. M.; BEBER, M.; de SOUZA KOERICH, K. *Problemas de micotoxinas nos grãos e os novos limites toleráveis na cadeia alimentar*. Palestra. 2010. Disponível em: http://eventos.abrapos.org.br/anais/paperfile/16_20160821_20-54-53_439.pdf. Acesso em: mar. de 2020.

SCUSSEL, V. M.; GIORDANO, B. N.; SIMÃO, V.; MANFIO, D.; GALVAO, S.; NAZAR, M. N. F. Effect of oxygen-reducing atmospheres on the safety of packaged shelled Brazil nuts during storage. *Int. J. Anal. Chem.*, p. 1-9, 2011.

SEBRAE. *O cultivo e o mercado da castanha do Brasil*. 2016. Disponível em: www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/o-cultivo-e-o-mercado-da-castanha-do-brasil,c0ca9e665b182410VgnVCM100000b272010aRCRD. Acesso em: jan. de 2019.

SEKIYAMA, B. L.; FERRARI, G.; JUNIOR, M. M. Processos de descontaminação de rações contendo micotoxinas. *Rev. Analytica*, n. 26, p. 64-67, 2007.

SHEPARD Jr., G.H.; RAMIREZ, H. "Made in Brazil": human dispersal of the Brazil nut (*Bertholletia excelsa*, Lecythidaceae) in ancient Amazonia. *Economic Botany*, p. 44-65, 2011. DOI: 10.1007/s12231-011-9151-6. Acesso em: mar. de 2020.

SILVA, M. V.; JANEIRO, V.; BANDO, E.; MACHINSKI JR., M. Occurrence and estimative of aflatoxin M1 intake in UHT cow milk in Paraná State, Brazil. *Food Control*, v.53, p. 222-225, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.025>. Acesso em: jan. de 2020.

SILVA, O.F.; VENÂNCIO, A. Supressão de *Aspergillus* produtores de aflatoxinas e ácido ciclopiazonico por ozônio. *Revista de Ciências da Vida*, v.28, 198-200, 2008. Disponível em: http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/33228/1/document_19636_1.pdf > Acesso em: abr. de 2020.

SILVA, S.B.; LUVIELMO, M.M.; GEYER, M.C.; PRÁ, I. Potencialidades do uso do ozônio no processamento de alimentos. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 32, n. 2, p. 659-682, abr/jun. 2011. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/435c/1624630a940d5da5ee1c4cf2300192b1fe4e.pdf>. Acesso em: jan. de 2020.

SILVA, T.A. *Processo de ozonização dos grãos de trigo: cinética de reação e efeito na qualidade destes e da farinha*. Viçosa, Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 2011.

SILVEIRA, I. C. T. *Cloro e ozônio aplicados a desinfecção de efluente hospitalar tratado em contadores biológicos rotatórios, com avaliação de efeitos tóxicos em DAPHNIA SIMILIS*. 2004. Dissertação (Doutorado em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental) - Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SIMÕES, A. V. *Impactos de tecnologias alternativas e do manejo da Castanha-do-Brasil (Bertholletia excelsa, Humb. & Bonpl., 1808) no controle da contaminação por aflatoxinas em sua cadeia produtiva*. 2004. Dissertação (mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus/AM.

SOUMAGNE, T.; PANA-KATATALI, H.; DEGANNO, B.; DALPHIN, J.C. Combined pulmonary fibrosis and emphysema in hypersensitivity pneumonitis. *BMJ Case Reports*, 2015. Disponível em: <<https://casereports.bmj.com/content/2015/bcr-2015-211560.full>> Acesso em: abr. de 2020.

SOUZA, M.L. de; MENEZES, H.C.de; Extrusão de misturas de castanha do Brasil com mandioca. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 28(2): 451-462, abr.-jun. 2008. Disponível em:<<https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000200029>> Acesso em: nov. de 2019.

TANIWAKI, M.H.; SILVA, N. Fungos em alimentos: ocorrência e detecção. Campinas: *Núcleo de Microbiologia/ITAL*, 82p., 2001.

TAVARES F.F., FISCHER T.B., TONETTE R. *Agregação de valor na castanha do Brasil: o caso da Natura Ekos*. Núcleo de estudos do agronegócio, ESPM – SP, 2010. DOI:10.13140/RG.2.1.1308.2643. Acesso em: nov. de 2019.

TIWARI, B. K.; MUTHUKUMARAPPAN. Ozone in fruit and vegetable processing. In: O'donnell, C.; Tiwari, B.; Cullen, P.J.; Rice, R.G. (Eds.) *Ozone in food processing*. UK: The Atrium, p.55-80, 2012.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. *Microbiologia*. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 1999.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar. *Prática - Diluição seriada e plaqueamento*. 2018. Disponível em:<<https://www.studocu.com/pt-br/document/universidade-federal-de-sao-carlos/microbiologia-basica/pratico/pratica-diluicao-seriada-e-plaqueamento/4709302/view>> Acesso em: nov. de 2019.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. *Alternative disinfectants and oxidants guidance manual*. 1999. Disponível em: <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.exe/2000229L.TXT...> Acesso em: jan. de 2020.

VAN DER ZIJDEN, A. S. M. et al. Isolation in crystalline form of a toxin responsible for turkey X disease. *Nature*, London, v. 195, p. 1062, 1962. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/1951060a0>> Acesso em: mar. de 2020.

VARGAS, E. A.; SANTOS, E. A.; WHITAKER, T. B.; SLATE, A. B. Determination of aflatoxin risk components for in-shell Brazil nuts. *Food Addit. Contamin.*, v. 28, p. 1242- 1260, 2011. DOI: 10.1080/19440049.2011.596488. Acesso em: mar. de 2020.

VIDAL, F. J. R. *Proceso de potabilización del agua e influencia del tratamiento de ozonización*. Madrid : Ediciones Díaz de Santos, 2003, 253 p. Acesso em: nov. de 2019.

VIJAYANANDRAJ, V.R.; PRASAD, D.N.; MOHAN, N.; GUNASEKARAN, M. Effect of ozone on *Aspergillus niger* causing black rot disease in onion. *Ozone: Science and Engineering*, v.28, p. 347-350, 2006. DOI: 10.1080/01919510600900035. Acesso em: jan. de 2020.

WADT, L.H.O.; KAINER, K.A. *Introdução. Domesticação e Melhoramento de Castanha*. Cap.15, Universidade Federal de Viçosa. 2009. 299p.

WHO - World Health Organization. *Air Quality Guidelines for Europe*. WHO Regional Publications, European Series, Nº 91, Second Edition, 2000. 273p.
WICKRAMANAYAKE, G. B. Disinfection and sterilization by ozone. In: BLOCK, S. S. (Ed.). *Disinfection and sterilization and preservation*. 4. ed. Philadelphia: Lea and Febiyer, 1991. p. 182-190.

WU, J.; DOAN, H.; CUENCA, M.A. Investigation of gaseous ozone as an antifungal fumigant for stored wheat. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v.81, n.7, p.1288-1293, 2006. Disponível em:<<https://doi.org/10.1002/jctb.1550>> Acesso em: mar. de 2020.

YOUNG, J.C.; ZHU, H.; ZHOU, T. Degradation of trichothecene mycotoxins by aqueous ozone. *Food and Chemical Toxicology*, v.44, p.417-424, 2006. Disponível em:< <https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.08.015>>. Acesso em: nov. de 2019.