



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA
CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA
DOS ALIMENTOS**

MARISTELA MARTINS

**Métodos naturais de detoxificação de micotoxinas
em alimentos Amazônicos: guaraná (*Paullinia
cupana Kunth*) e castanha-do-Brasil (*Bertholletia
excelsa H.B.K.*)**

**Florianópolis
Março, 2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS
ALIMENTOS**

Maristela Martins

**Métodos naturais de detoxificação de micotoxinas em alimentos
Amazônicos: guaraná (*Paullinia cupana Kunth*) e castanha-do-
Brasil (*Bertholletia excelsa H.B.K.*)**

Tese submetida ao Programa de Pós –
Graduação em Ciência dos
Alimentos, da Universidade Federal
de Santa Catarina, como requisito
final para obtenção do título de
Doutor em Ciência dos Alimentos.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vildes Maria
Scussel. Coorientadora: Prof^a. Dr^a.
Ariane Mendonça Kluczcovski.

**Florianópolis
Março, 2014**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Martins, Maristela

Métodos naturais de detoxificação de micotoxinas em alimentos Amazônicos: guaraná (Paullinia cupana Kunth) e castanha-do-Brasil (Bertholletia excelsa H.B.K.) / Maristela Martins ; orientador, Vildes Maria Scussel ; coorientador, Ariane Mendonça Kluczcovski. - Florianópolis, SC, 2014.
159 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos Alimentos. 2. fungos. 3. jucá. 4. guaraná. 5. castanha-do-Brasil. I. Scussel, Vildes Maria. II. Kluczcovski, Ariane Mendonça. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. IV. Título.

MARISTELA MARTINS

**Métodos naturais de detoxificação de micotoxinas em alimentos
Amazônicos: guaraná (*Paullinia cupana Kunth*) e castanha-do-
Brasil (*Bertholletia excelsa H.B.K.*)**

Tese submetida ao Programa de Pós – Graduação em Ciência dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final para obtenção do título de Doutor em Ciência dos Alimentos.

Florianópolis, 10 de março de 2014.

Coordenador do Curso

Orientadora

Banca Examinadora

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que sempre esteve presente em minha vida, dando-me força de vontade, sabedoria e saúde.

Aos meus amados pais, Arlindo e Marilene, por toda educação, cuidados e amor dedicados com tanta constância em minha vida e que sempre me incentivaram e acompanharam, de perto ou de longe, todos os meus trabalhos.

Aos meus queridos irmãos Nilton e Mariléia, que acompanham todos os momentos de minha vida, sempre unidos numa torcida constante de um pelo melhor do outro.

Ao meu amado, Joel Fabrício, por sempre estar ao meu lado me oferecendo apoio, atenção e carinho, e principalmente por me agüentar com tanta paciência em todos os momentos e enfrentar comigo a longa distância entre Manaus e Florianópolis durante esses três anos do doutorado.

À minha orientadora, Profa Vildes Scussel, pela oportunidade, experiência e aprendizado contínuo.

Um agradecimento especial as minhas colegas e grandes amigas que Florianópolis me deu, Juliane Pereira, Geovana Savi, Janaína Nones e Laura Garcia pela amizade e presença nos mais diversos momentos, tornando mais fácil a caminhada, bem como todo o grupo LABMICO.

À Profa Ariane Kluczkovski, pela amizade, prestatividade, apoio, compreensão e ensinamentos transmitidos com tamanha dedicação, competência e carinho, sendo uma verdadeira “mãe científica” para mim, desde o meu mestrado, acompanhando de perto todos os trabalhos e participando ativamente de tudo.

Aos professores da banca examinadora, pelo gentil aceite do convite para participar desse trabalho com suas valiosas contribuições. Muito obrigada pela grande honra e prazer de poder contar com suas presenças, apoio, interesse, colaboração, competência e respeito.

À Dra Tatiane Pereira de Souza, da UFAM, pelas valiosas contribuições e sugestões no decorrer deste trabalho.

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado do Amazonas pelo suporte financeiro.

Aos funcionários e colegas do programa de Ciências de Alimentos da UFSC, pelas sugestões, amizade e disponibilidade.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste sonho, o meu mais sincero MUITO OBRIGADA!!

de Martins. M. **Métodos naturais de detoxificação de micotoxinas em alimentos Amazônicos: guaraná (*Paullinia cupana Kunth*) e castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa H.B.K.*)**. 2014. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos)-Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis

RESUMO

As micotoxinas são contaminantes naturais produzidas por fungos e são comumente encontrados em uma grande variedade de produtos alimentares, incluindo cereais, leguminosas, nozes e seus produtos. Entre as mais de 300 micotoxinas identificadas, as aflatoxinas são as mais estudadas devido ao seu potencial toxigênico. A contaminação com aflatoxinas por espécies de *Aspergillus* está diretamente relacionada com as condições climáticas na Amazônia (clima quente e úmido) durante o período de colheita. A crescente demanda por alimentos seguros e naturais, sem conservantes químicos, levou muitos pesquisadores a investigar os efeitos antimicrobianos de compostos naturais. Por isso, é necessário desenvolver tratamentos alternativos para substituir os aditivos sintéticos. O objetivo deste estudo foi encontrar alternativas para melhorar a qualidade da castanha-do-Brasil buscando métodos eficientes, naturalmente seguros e economicamente viáveis para o controle da contaminação por fungos toxigênicos bem como a redução da produção de micotoxinas. As amostras de castanha-do-Brasil foram coletadas em uma usina de beneficiamento localizada no Estado do Pará e os frutos de guaraná e jucá para obtenção dos extratos hidroalcoólicos foram adquiridos no mercado público da cidade de Manaus e no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia (INPA), respectivamente. A metodologia deste trabalho foi realizada em quatro etapas sendo a primeira para coleta, identificação, elaboração e caracterização dos extratos de guaraná e jucá. Na segunda etapa, foram realizados ensaios para observação do efeito da concentração de cafeína presente no fruto do guaraná sobre o crescimento de fungos e a produção de ocratoxina. Na terceira, foram realizados testes in vitro para observar o efeito dos extratos de guaraná e jucá e também do óleo extraído da castanha-do-Brasil sobre cepas toxigênicas e sua relação com a inibição da produção de aflatoxinas. Na quarta e última etapa, foram realizados ensaios de aplicação do extrato de jucá (em 3 concentrações diferentes) em castanha-do-brasil com

casca armazenada para verificação do seu efeito na inibição da produção de aflatoxinas pelo *Aspergillus parasiticus*. Os resultados deste estudo mostram que os níveis de ocratoxina A estavam abaixo do LOQ (2,0 mg/kg), provavelmente devido às altas concentrações da cafeína no guaraná, confirmando as propriedades antifúngicas desses alcalóides. Os extratos de jucá apresentaram-se mais eficientes no controle do crescimento do *Aspergillus parasiticus*, bem como na inibição da produção de aflatoxinas quando comparados com os extratos de guaraná, sugerindo que os compostos fitoquímicos do jucá poderiam ser usados sozinhos ou em conjunto com outras substâncias ou processos no controle da produção de metabólitos tóxicos. O óleo de castanha-do-brasil foi eficiente na redução do crescimento fúngico e produção de aflatoxinas, o que pode ser explicado pela composição rica do óleo de castanha-do-Brasil em ácidos graxos, uma vez que a atividade dos ácidos graxos pode agir contra o metabolismo de alguns fungos, inibindo seu crescimento. Os extratos de jucá apresentaram efeito significativo sobre a inibição da produção de aflatoxinas em castanha-do-Brasil armazenada. Como conclusões, considerando que o extrato de jucá é um produto naturalmente seguro, há uma necessidade de explorar o seu uso potencial como um inibidor eficaz para o crescimento de fungos e a produção de aflatoxinas, por isso mais estudos devem ser realizadas para isolar e identificar os principais componentes. Os resultados do presente estudo mostraram a possibilidade da utilização de compostos naturais como alternativas aos pesticidas para controlar o crescimento de fungos e produção de aflatoxinas.

Palavras-chave: castanha-do-Brasil, fungos, aflatoxinas, guaraná, jucá, controle

de Martins. M. Methods of mycotoxins detoxification in foods Amazon: guarana (*Paullinia cupana* kunth) and Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H. B. K.). 2014. Thesis (Doctorate in Food Science)-Program of Post Graduation in Food Science, Federal University of San of Santa Catarina, Florianopolis

ABSTRACT

Mycotoxins are natural contaminants produced by fungi and are commonly found in a wide variety of food products, including cereals, legumes, nuts and their products. Among the more than 300 identified mycotoxins, aflatoxins are the most studied due to their toxigenic potential. The aflatoxin contamination by *Aspergillus* species is directly related to the climatic conditions in the Amazon (hot and humid) during the collection period. The growing demand for safe and natural foods without chemical preservatives, led many researchers to investigate the antimicrobial effects of natural compounds. Therefore it is necessary to develop alternative treatments to replace synthetic additives. The aim of this study was to find alternatives to improve the quality of the Brazil nut seeking eficientes naturally safe and economically viable for the control of contamination by toxigenic fungi and reduction of mycotoxin production methods. Brazil nut samples were collected in a beneficiation plant located in the state of Pará and fruit guarana and jucá to obtain the hydroalcoholic extracts were acquired in the public market in the city of Manaus and the National Institute for Research in Amazonia (INPA), respectively. The methodology of this work was carried out in four stages the first being for the collection, identification, preparation and characterization of extracts of guarana and jucá. In the second step, testing for observing the effect of concentration of caffeine in guarana result of fungal growth and production of ochratoxin were performed. In the third, in vitro tests were performed to observe the effect of extracts of guarana and jucá and also the Brazil nut oil on toxigenic strains and their relationship to the inhibition of aflatoxin production. The fourth and final step, application essays jucá extract were performed (in 3 different concentrations) in Brazil nut shell stored for verification of its effect on the inhibition of aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. The results of this study show that the levels of ochratoxin A were below the LOQ (2.0 mg / kg), probably due to high concentrations of caffeine in guarana, confirming the antifungal properties of these alkaloids. Jucá extracts were more effective in controlling the growth of *Aspergillus parasiticus*, as well as inhibition of

aflatoxin production when compared to extracts of guarana, suggesting that the jucá phytochemical compounds may be used alone or in combination with other substances or processes in controlling the production of toxic metabolites. The Brazil nut oil was effective in reducing fungal growth and aflatoxin production, which can be explained by the rich composition of the Brazil nut oil fatty acids, since the activity of fatty acids can counteract the metabolism of fungi by inhibiting their growth. Extracts jucá significant effect on the inhibition of aflatoxin production in Brazil nut stored. As conclusions, whereas the extract jucá is a naturally safe product, there is a need to explore its potential use as an effective inhibitor for the growth of fungi and aflatoxins production, so further studies should be conducted to isolate and identify the main components. The results of this study indicate the potential use of natural compounds as alternatives to pesticides for controlling fungal growth and aflatoxin production.

Key-words: Brazil nut, fungi, aflatoxins, guaraná, jucá, control.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. A castanheira-do-Brasil: (a) árvore da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.); (b) fruto (ouríço) e sementes; (c) castanha-do-Brasil com casca e sem casca 24

Figura 2. Distribuição da castanheira-do-Brasil entre as regiões (Oeste e Leste) da Bacia Amazônica 25

Figura 3. Fluxograma de beneficiamento da castanha-do-Brasil 32

Figura 4. Estrutura química das aflatoxinas: AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ 45

Figura 5. Guaraná: (a1) Pomar de guaranazeiros. (a2) Flores de guaraná. (a3) Fruto com suas sementes (pardo-negra) entre a polpa (branca). (a4) Torrefação das sementes. (a5) Sementes isoladas de guaraná. 60

Figura 6. Fluxograma do beneficiamento do guaraná..... 61

Figura 7. Jucá (*Libidibia ferrea* Mart): (a) Árvore. (b) Folhas. (c) Frutos e sementes..... 64

CAPÍTULO 2

Figura 1. Illustrations of different forms of guarana (*Paullinia cupana* Kunth)..... 106

Figura 2. Flowchart of powdered guarana (*Paullinia cupana* Kunth) processing 107

CAPÍTULO 3

Figura 1. Effect of the Brazil nut oil on aflatoxins production by *Aspergillus parasiticus*. Chemical structure of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂..... 122

Figura 2. Effect of the Brazil nut oil on aflatoxins production by *Aspergillus parasiticus*. Antifungal activity of guaraná (a) and jucá (b) extracts on *A. parasiticus* on MEA at different concentrations Effect of guaraná extracts treatment on aflatoxin production by *A. parasiticus* ... 123

Figura 3. a) Effect of *guaraná* extracts treatment on aflatoxin production by *A. parasiticus* [(1) Control: no treatment; (2) *Guaraná* extracts treated: (2a) 1.08% (2b) 1.62% and (2c) 3.24%]. b) Effect of *jucá* extracts

treatment on aflatoxin production by *A. parasiticus* [(1) Control: no treatment; (2) *Jucá* extracts treated: (2a) 1.08% (2b) 1.62% and (2c) 3.24%] by thin layer chromatography (TLC) 123

CAPÍTULO 4

Figura 1. Growth of *A. parasiticus* on effect of Brazil nut oil in different concentrations: 500 (T1); 1000 (T2) e 1500 μ L (T3), for 8 dias / 28 °C 132

Figura 2. Effect of the Brazil nut oil on aflatoxins production by *Aspergillus parasiticus*..... 133

CAPÍTULO 5

Figura 1. *Libidibia ferrea*: juca (a) tree, (b) leaves and (c) fruits & seeds144

Figura 2. Flowchart of sample preparation (Brazil nuts), inoculation (*A. parasiticus*) and juca (*Libidibia ferrea* M.) extract application..... 150

Figura 3. Spectrum of the extract of *Libidibia ferrea* Mart fruits at 265 nm..... 152

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Teor de selênio em castanha-do-Brasil 27

Tabela 2. Composição química centesimal da castanha-do-Brasil..... 29

Tabela 3. Teor de minerais da castanha-do-Brasil 29

Tabela 4. Composição em ácidos graxos do óleo extraído da castanha-do-Brasil..... 34

Tabela 5. Limites máximos permitidos para aflatoxinas em alimentos estabelecido em diversos países..... 52

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Natural elements of powdered guarana (*Paullinia cupana* Kunth) and OTA distribution..... 108

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Growth constant (k) of colonies of *A. parasiticus* subjected to different types and concentrations of extract 124

CAPÍTULO 4

Tabela 1. Physico-chemical characterization of Brazil nut oil..... 130

Tabela 2. Characterization fatty acids of Brazil nut oil..... 131

CAPÍTULO 5

Tabela 1. Aflatoxin production by *A. parasiticus* on in-shell Brazil nut in different treatments with juca extract..... 153

LISTA DE ABREVIATURAS

AFL	Aflatoxina
AFLs	aflatoxinas
AFB1	aflatoxina B1
AFB2	aflatoxina B2
AFG1	aflatoxina G1
AFG2	aflatoxina G2
AOAC	Association of Official Analytical Chemistry
a_w	atividade de água
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CYA	Czapek yeast autolysate
DG18	Dichloran Glycerol
FNT	Fração não-tanante
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LOD	limite de detecção
LOQ	limite de quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MEA	Malt Extract <i>Agar</i>
mc	moisture content
MS/MS	massa/massa
NTF	Non-Tannin Fraction
OTA	ocratoxina A
PDA	Potato Dextrose Agar
P.A.	pureza analítica
TFA	trifluoroacetic acid
TLC	Thin Layer Chromatography
TPC	Total Polyphenols Content
TTC	Total Tannin Content
U.R	Umidade Relativa
UV-vis	Ultravioleta visível

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	19
CAPÍTULO 1.....	21
1.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
1.1.A Castanha-do-Brasil (<i>Bertholettia excelsa</i> H. B.K.).....	22
1.1.1.Distribuição.....	22
1.1.2.Aspectos Nutricionais.....	25
1.1.3.Cadeia produtiva e beneficiamento.....	30
1.1.4.Produtos derivados da castanha do Brasil.....	33
1.2.Fungos e micotoxinas.....	37
1.2.1.Fatores que interferem no crescimento.....	37
1.2.2.Fungos em castanha-do-Brasil.....	41
1.3.Aflatoxinas.....	43
1.3.1.Toxicidade.....	44
1.3.2.Aflatoxinas em castanha-do-Brasil.....	48
1.3.3.Legislação.....	50
1.3.4.Metodologias analíticas para aflatoxinas.....	54
1.4.Métodos de descontaminação para micotoxinas.....	54
1.4.1.Métodos químicos.....	55
1.4.2.Métodos físicos.....	55
1.4.3.Métodos biológicos.....	56
1.5.Substâncias antifúngicas naturais.....	57
1.5.1.Antifúngicos naturais.....	57
1.5.2.Métodos de aplicação em alimentos.....	57
1.6.Guaraná (<i>Paullinia cupana</i> Mart.).....	58
1.6.1.Produção.....	58
1.6.2.Composição Química, atividade biológica e antimicrobiana.....	61
1.7.Jucá (<i>Libidibia ferrea</i> Mart.).....	63
1.7.1.Produção.....	63
1.7.2.Composição Química, atividade biológica e antimicrobiana.....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	66
CAPÍTULO 2.....	96
EVALUATION OF OCHRATOXIN A AND FUNGI IN POWDERED GUARANA (<i>PAULLINIA CUPANA KUNTH</i>), A CAFFEINE RICH PRODUCT FROM AMAZON FOREST.....	97
Abstract.....	97
Introduction.....	98
Material and Methods.....	99

Results and Discussion.....	101
References.....	103
CAPÍTULO 3.....	109
INHIBITION OF GROWTH AND AFLATOXIN PRODUCTION OF ASPERGILLUS PARASITICUS BY GUARANÁ (PAULLINIA CUPANA KUNTH) AND JUCÁ (LIBIDIBIA FERREA MART) EXTRACTS.....	110
Abstract.....	110
Introduction.....	111
Material and Methods.....	112
Results and Discussion.....	115
Conclusions.....	118
References.....	119
CAPÍTULO 4.....	125
IN VITRO ACTIVITY OF THE BRAZIL NUT (BERTHOLLETIA EXCELSA H.B.K.) OIL IN AFLATOXIGENIC STRAINS OF ASPERGILLUS PARASITICUS.....	126
Abstract.....	126
Introduction.....	126
Material and Methods.....	127
Results and Discussion.....	130
Conclusions.....	135
References.....	136
CAPÍTULO 5.....	142
INHIBITION OF AFLATOXINS PRODUCTION ON BRAZIL NUT (BERTHOLLETIA EXCELSA H.B.K.) TREATED BY JUCA (LIBIDIBIA FERREA MART.) AMAZONIAN EXTRACT.....	143
Abstract.....	143
Introduction.....	144
Material and Methods.....	146
Results and Discussion.....	151
Conclusions.....	154
References.....	155
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	159

INTRODUÇÃO

As micotoxinas são contaminantes naturais produzidas por fungos e são comumente encontrados em uma grande variedade de produtos alimentares, incluindo cereais, leguminosas, nozes e seus produtos. Sempre que o consumo desses produtos, incluindo a castanha-do-Brasil, é importante na dieta das populações, tal infecção representa um alto risco de exposição crônica. As micotoxinas podem causar efeitos adversos para a saúde. Entre as mais de 300 micotoxinas identificadas, as aflatoxinas são as mais estudadas devido ao seu potencial toxigênico.

A contaminação com aflatoxinas por espécies de *Aspergillus* está diretamente relacionada com as condições climáticas na Amazônia (clima quente e úmido) durante o período de colheita (PACHECO e SCUSSEL, 2006; OLSEN et al., 2008; FAO, 2010). *Aspergillus* seção *Flavi* compreende um grupo estreitamente relacionado de fungos, que são amplamente distribuídos no solo, ar, matéria orgânica, e partes de plantas em todo o mundo (RAPER e FENNELL, 1965; COTTY e CARDWELL, 1999). Três espécies deste grupo (*A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*) têm recebido atenção considerável por causa da sua capacidade para produzir aflatoxinas.

A crescente demanda por alimentos seguros e naturais, sem conservantes químicos, levou muitos pesquisadores a investigar os efeitos antimicrobianos de compostos naturais (RASOOLI et al., 2008). Por isso, é necessário desenvolver tratamentos alternativos para substituir os aditivos sintéticos (PHILLIPS et al, 2012).

O guaraná (*Paullinia cubana* Kunth) é uma das espécies nativas mais conhecidas da biodiversidade amazônica brasileira, além de possuir grande valor econômico. Em relação à sua composição química, estão presentes derivados de xantinas (cafeína, teobromina e teofilina), taninos (catequina, epicatequina, proantocianidinas), saponinas e pigmentos (KUSKOSKI et al., 2005). Devido ao seu elevado conteúdo de cafeína, sugere-se que sua semente possua uma proteção natural contra fungos, incluindo os toxigênicos, e bactérias.

O jucá (*Libidibia ferrea* Mart.), também conhecido como pau-ferro, é uma espécie vegetal que está distribuída por toda região tropical do Brasil. É especialmente utilizada na indústria de fármacos ou na construção civil, apresentando certa importância econômica. As propriedades terapêuticas da *Libidibia ferrea* Mart, têm sido descritas e estudadas ao longo dos anos, e incluem tratamento de ferimentos e contusões, alívio de tosse crônica e asma (HASHIMOTO, 1996). O jucá

é antiulcerogênico (BACCHI e SERTIE, 1994; BACCHI *et al.*, 1995), anti-inflamatório e apresenta propriedades analgésicas (CARVALHO *et al.*, 1996). Algumas pesquisas apontam que o jucá possui atividade antimicrobiana e antifúngica (Sampaio *et al.*, 2009). Diversos substratos naturais com atividade antifúngica têm sido estudados como alternativa para prevenir a ação dos fungos. Foi verificado que os compostos fenólicos do guaraná são ativos contra bactérias e fungos, além de possuírem atividade antioxidante (BASILE *et al.*, 2005; Majhenic *et al.*, 2007).

Esta tese é apresentada em forma de capítulos, sendo o capítulo 1 uma breve revisão bibliográfica sobre os fatores que determinam a qualidade da castanha-do-Brasil incluindo sua relação com a contaminação por fungos e aflatoxinas, bem como os principais métodos de descontaminação, entre eles substâncias antifúngicas naturais, como o guaraná e o jucá. Os demais capítulos foram elaborados em forma de artigo científico.

No capítulo 2, uma abordagem é apresentada para avaliar o efeito de substâncias alcolóides presentes no guaraná sobre o crescimento de fungos e a produção de ocratoxina A.

O capítulo 3 apresenta uma avaliação da atividade antifúngica e controle da produção de aflatoxinas de extratos hidroalcoólicos de guaraná e jucá sobre cepas toxigênicas de *Aspergillus parasiticus*.

O capítulo 4 apresenta uma avaliação das características físico-químicas do óleo extraído da castanha-do-Brasil e seu efeito contra cepas de *Aspergillus* com caráter toxigênico.

O capítulo 5 apresenta uma avaliação do efeito de extratos de jucá na inibição da produção de aflatoxinas por *A. parasiticus* em castanha-do-Brasil armazenada.

O objetivo deste estudo foi encontrar alternativas para melhorar a qualidade da castanha-do-Brasil buscando métodos eficientes, naturalmente seguros e economicamente viáveis para o controle da contaminação por fungos toxigênicos bem como a redução da produção de micotoxinas.

CAPÍTULO 1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. A Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H. B.K.)

1.1.1. Distribuição

Pertencente ao grupo das nozes de árvores, a castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*, H.B.K) foi descrita pela primeira vez em 1808, quando Humboldt e Bonpland, e posteriormente Kunth, denominaram a árvore majestosa presente na Floresta Amazônica (MENNINGER, 1777). O Ministério da Agricultura por meio do Decreto 51209 de 18/09/1961, para efeito de comércio exterior, regulamentou a denominação de castanha-do-Brasil (BRASIL, 1961). A castanheira (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) é conhecida também como castanha-do-Brasil, castanha-do-Pará e Brazil nut ou Para nut.

A castanheira-do-Brasil é uma árvore de grande porte, atingindo até 50 metros de altura e 2 metros de diâmetro na base (Figura 1a). Possui caule cilíndrico, liso, desprovido de ramos até a fronde, casca escura e fendida, ramos encurvados nas extremidades (PACHECO e SCUSSEL, 2006).

A castanheira floresce nos meses de outubro a dezembro e o amadurecimento dos frutos dá-se de 12 a 15 meses depois. A época da safra (janeiro a março) a coleta estende-se por até seis meses e uma árvore pode produzir entre 100 a 150 litros de castanha (2 a 3 Hectolitros). Entre a queda das flores e a maturação do fruto decorrem 15 meses. Em regiões específicas da Amazônia brasileira a floração começa no final da estação chuvosa em que o período de pico ocorre nos meses de outubro, novembro e dezembro. (BRASIL, 1976; MORITZ, 1984).

A castanheira apresenta várias aplicações: a) “ouriços” (fruto): como combustível ou na confecção de objetos, mas o maior valor é a amêndoa, alimento rico em proteínas, lipídios e vitaminas podendo ser consumida ou usada para extração de óleo; b) do resíduo da extração do óleo obtém-se torta ou farelo usada como misturas em farinhas ou rações; c) “leite” de castanha: de grande valor na culinária regional; c) madeira: com boas propriedades, sendo indicada para reflorestamento e empregada tanto na construção civil como naval (EMBRAPA, 2005).

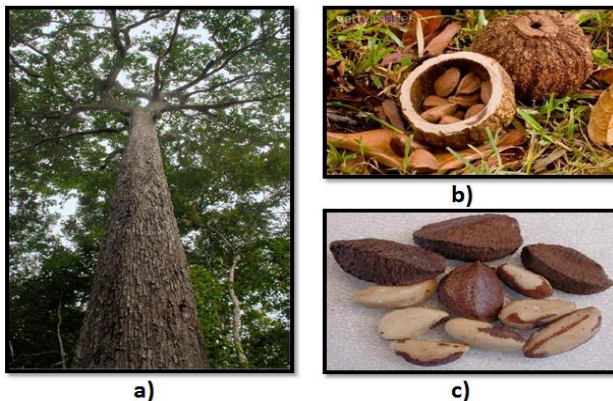
O fruto da castanheira (ouriço), constituindo-se uma camada de substância lenhosa (Figura 1b). É uma cápsula (pixídio) globosa deprimida, quase esférica, de 08 a 16 cm de diâmetro, tendo visível na parte superior o resto do cálice. A casca do fruto é espessa, lenhosa, dura, de cor castanha, repleta de células resinosas. Podem pesar de 0,5 a 5 kg e conter de 10 a 25 sementes, angulosas, agudas, mais ou menos triangulares, transversalmente rugosas, estreitamente comprimidas, envoltas em polpa amarela, dispostas em três séries (BRASIL, 2002).

A amêndoa é a parte comestível da castanha com casca ou descascada (Fig. 1c). A castanha é beneficiada e comercializada com casca e sem casca e pode ser classificada em diversos tamanhos segundo o Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento (BRASIL, 1998). A amêndoa é composta principalmente por tecidos parenquimáticos delimitados por um anel de tecido meristemático, envoltos por uma camada epidérmica e uma película lignificada. A parte aérea e a raiz primária são formadas dos tecidos meristemáticos preexistentes localizados, preferencialmente, nas regiões dos pólos caulinar e radicular. A descrição dos tecidos em diversas etapas do processo germinativo indica que a amêndoa da castanheira, no momento da maturação e dispersão da semente, não apresenta tecidos em estágio avançado de diferenciação celular, como os que formam a plúmula, radícula e cotilédones, normalmente observados em sementes. A organização dos tecidos indica que a denominação de embrião hipocotilar parece ser a mais correta para esta espécie, pois, de tecidos meristemáticos preexistentes formam-se o epicótilo e a raiz primária (CAMARGO et al., 2000).

Em 2012, a baixa produtividade nos castanhais do Estado do Amazonas e o baixo preço praticado no mercado no Estado de Rondônia foram os principais motivos do decréscimo da produção em relação ao ano anterior. A produção de castanha-do-Brasil em 2012 foi de 38 805 toneladas, 7,9% menor que a obtida em 2011. Os principais estados produtores foram o Acre (14 088 toneladas), Amazonas (10 478 toneladas), e o Pará (10 449 toneladas) (IBGE, 2012).

Dos 20 municípios maiores produtores, o primeiro colocado é o município acreano de Brasiléia, com 4 169 toneladas, fazem parte deste ranking, outros seis do Estado do Acre, sete do Amazonas, quatro do Pará e dois de Rondônia. Juntos, são responsáveis por 71,1% da produção nacional (IBGE, 2012).

Figura 1. A Castanheira-do-Brasil: (a) árvore da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*); (b) fruto (ouriço) e sementes; (c) castanha-do-Brasil com casca e sem casca.



Fonte: APIZ (2008); GIORDANO (2009) e PACHECO (2007), respectivamente.

A castanheira é uma planta encontrada em sua maioria, em estado nativo na Amazônia, e localiza-se em maiores concentrações na porção brasileira, como apresentado na figura 2 (PACHECO e SCUSSEL, 2007). No Estado do Amazonas, a castanheira é distribuída uniformemente em todo o território, porém, sua ocorrência é mais frequente ao longo das calhas dos rios Madeira, Purus e Solimões. (PACHECO e SCUSSEL, 2007).

Figura 2. Distribuição da Castanha-do-Brasil entre as regiões (Oeste e Leste) da Bacia Amazônica.



Fonte: PACHECO e SCUSSEL (2007)

1.1.2. Aspectos Nutricionais

A castanha-do-Brasil é considerada como um dos alimentos humanos mais nutritivos, devido ao seu elevado conteúdo de proteínas, carboidratos, lipídios insaturados, vitaminas e minerais essenciais. A castanha do Brasil desidratada possui cerca de 18% de proteína, 13% de carboidratos e 69% de lipídios. A relação entre os saturados, monoinsaturados e poliinsaturados é 25:41:34 (USDA, 2008), isto representa que o teor de gordura insaturada na castanha do Brasil é mais elevado do que em qualquer outra noz. A castanha é uma fonte rica de vitamina E (COSTA et al., 2011), e uma excelente fonte de aminoácidos essenciais (SOUZA e MENEZES, 2004; SILVA et al., 2010).

A castanha-do-Brasil é uma boa fonte de micronutrientes, especialmente selênio, fitoesteróis, tocoferol, esqualeno e compostos fenólicos, todos relacionados a vários benefícios potenciais de saúde. Além disso, a FDA aprovou a seguinte alegação de saúde para a castanha-do-Brasil: "Evidências científicas sugerem, mas não provam, que a ingestão de 1,5 amêndoas por dia, da maioria das nozes, como a castanha do Brasil, como parte de uma dieta baixa em gordura saturada e colesterol, pode reduzir o risco de doença cardíaca (FDA, 2008)". Na

castanha-do-Brasil, β e γ tocoferol são os mais predominantes em relação à quantidade de tocoferóis. Segundo Costa et al. (2010), o conteúdo de α e γ tocoferol presente na castanha-do-Brasil é de 72.55 ± 0.00 , 74.35 ± 0.00 , $\mu\text{g/g}$ de óleo respectivamente e o conteúdo de b-sitosterol, campesterol, e estigmasterol é de 79.00 ± 33.45 , 4.00 ± 0.00 e 11.33 ± 6.51 , mg/g de óleo, respectivamente.

Dentre as nozes de árvores, a castanha-do-Brasil é reconhecida como a melhor fonte de selênio (Se) (CHUNHIENG et al., 2004; PACHECO e SCUSSEL, 2007; CHUNHIENG, et al., 2008; WELNA, et al., 2008; MARTINS et al., 2012) e outros minerais importantes como cálcio, magnésio, fósforo e potássio (USDA, 2008; YANG, 2009). A tabela 1 traz o teor de selênio na castanha-do-Brasil observado por diversos autores.

Tabela 1 - Teor de Selênio em Castanha-do-Brasil.

Amostras			Método	Teor Médio de Se mg/kg (Min-Máx)						Autores
Origem	Local de Coleta	Nº de Amostras		Com Casca	Min.	Máx.	Sem Casca	Min.	Máx.	
-	Itália	-	CLAE-UV-HG-AFS	-	-	-	82,9	-	-	Bodó et al. (2003)
Brasil	Acre	-	HG AAS-ICP	49,9	-	-	5,1	-	-	Souza; Menezes (2004)
Brasil	-	-	CLAE-MS	-	-	-	126,0	-	-	Chunhieng et al. (2004)
Bolívia	Bélgica °	-	ICP-MS	49,9	-	-	-	-	-	Dumont et al. (2006)
-	África do Sul	-	ICP-OES	36,1	-	-	-	-	-	Moodley et al. (2007)
Brasil	Brasil	80	ICP-OES	20,5	11,1	34,7	43,7	23,7	61,0	Pacheco e Scussel (2007)
	-Itacoatiara			29,2	12,9	38,6	43,9	20,7	69,7	
	-Autazes			13,5	9,7	18,5	25,3	13,8	35,1	
	-Boca do Acre			11,9	9,2	16,7	21,8	8,5	29,1	
	-Amaturá									
	Suécia	-	ICP-SFMS	33,0	-	-	-	-	-	Rodushkin et al.(2008)
Brasil							3,6			
Bolívia							1,6			
Peru		-	INAA	-	-	-	6,5	-	-	Parekh et al. (2008)
Norte da América do Sul	Estados Unidos						20,2			
		-		36,1						Yang (2009)
Brasil	Amazonas	-	ICP-OES	-			22,7	9,4	39,0	Martins et al (2012)

A ingestão adequada de Se é essencial para várias selenoenzimas envolvidas na proteção contra o estresse oxidativo, a manutenção do estado redox, sistema imunológico e regulação da tireóide (REEVES e HOFFMANN, 2009). Esse mineral pode também proteger contra cânceres de próstata, fígado e pulmões devido a elevados níveis de fitonutrientes (YANG, 2009). THOMSON et al. (2008) demonstraram que 100µg de selênio/dia, o equivalente a duas unidades de castanhas-do-Brasil, durante três meses, foi eficiente tanto quanto a selenometionina na elevação plasmática do selênio e da glutatona-peroxidase, em indivíduos saudáveis. GONZALES e SALAS-SALVADO (2006) sugeriram que o risco desenvolvimento de doenças crônicas foi reduzido com o consumo frequente de castanha-do-Brasil bem como aumento da capacidade para regular os níveis hormonais no organismo. Além disso, experimentos científicos em culturas de células, estudos experimentais realizados em animais, e estudos epidemiológicos observacionais indicam que os antioxidantes podem impedir o desenvolvimento de câncer e doenças cardiovasculares (KRIS-ETHERTON et al., 2001). Segundo THOMSON et al. (2008) duas castanhas por dia seria a ingestão diária recomendada para obtenção dos efeitos antioxidantes do selênio. STOCKLER-PINTO et al. (2010) relataram que o consumo de apenas uma castanha-do-Brasil (5g) ao dia durante três meses é eficaz para aumentar a concentração de selênio e atividade da glutatona peroxidase em pacientes com deficiência, melhorando a sua capacidade antioxidante. COMINETTI et al., (2011) confirma que o consumo de apenas uma castanha aumenta a concentração de selênio e atividade da glutatona peroxidase.

Conforme MANFIO et al. (2012) além da amêndoa, a película, de diferentes procedências geográficas, apresentou teor de Se médio de 6,34 a 20,58 mg/kg. Na pesquisa de STRUNZ et al. (2008) foi observado que a concentração do selênio plasmático aumentou significativamente após o consumo de 45g de castanhas-do-Brasil por dia, durante duas semanas). Outros elementos minerais, como o Bário (Ba) e o Rádio (Ra) também são encontrados na castanha-do-Brasil (MARTINS et al., 2012). As concentrações variáveis dos níveis de Ra em castanhas parecem ser influenciadas por bioacumulação na árvore e transferida à semente, em função da concentração de Ra no solo absorvida pela árvore. Em consequência, as concentrações de Se e Ba nas castanhas apresentam maior variabilidade, provavelmente devido aos elementos nos solos (PAREKH et al., 2008). As Tabela 2 e 3 apresentam a composição química centesimal e os principais minerais,

respectivamente, encontrados na castanha-do-brasil segundo diversos autores.

Tabela 2 – Composição química centesimal e valor calórico da amêndoa de castanha-do-Brasil.

	Almeida (1963)	Andrade et al. (1999)	Souza; Menezes (2004)	Venkatashalam; Sathe (2006)	Moodley et al. (2007)	USDA (2008)	Felberg et al. (2009)
Valor calórico (kcal)	666,0	-	676,5	-	-	-	-
Lipídios (g)	65,9	66,8	67,3	66,7	66,8	69	70,62
Proteínas (g)	14,40	13,60	14,29	19,93	13,60	18	14,35
Carboidratos (g)	11,00	10,30	3,42	0,69	10,30	13	11,61
Fibra total (g)	2,10	-	8,02	-	-	-	-

Fonte: adaptado Pacheco (2007).

Tabela 3 – Conteúdo de minerais na castanha-do-Brasil.

Componente ^a	Furr et al. (1979) ^b	Andrade et al. (1999)	Gonçalves et al. (2002) ^c	Chunhieng et al. (2004)	Ferberg et al. (2004)	Moodley et al. (2007) ^b	Yang (2009)	Naozuka et al. (2010)	Silva et al (2010)
Cálcio	1592	132	206,75	606	159,04	743,28	743,28	-	205
Cobre	1,9	1,3	1,17	-	2,22	5,944	5,944	11,0	1,35
Ferro	93	3,4	9,67	8	2,82	7,426	7,426	18,3	-
Fósforo	1,7	674	564,50	2380	721,25	-	-	-	563
Magnésio	3370	160	312,50	1338	381,90	967,85	967,85	-	310,10
Manganês	8	0,6	6,85	5	1,34	0,34	0,34	5,02	5,99
Potássio	5405	644	514,75	1969	717,25	-	-	-	512,70
Zinco	41	3,5	7,1	11,5	4,72	11,031	11,031	92,8	6,90

Fonte: adaptado Pacheco (2007).

^a mg%, ^b embalagens de varejo, ^c origem: árvores perto de Manaus (AM) Brasil

1.1.3. Cadeia Produtiva e beneficiamento

A cadeia produtiva da castanha-do-Brasil começa quando os frutos, “ouriços”, são coletados entre os meses de janeiro a maio, quando caem ao solo, na estação chuvosa. Nesta etapa, de cata dos ouriços, o extrator os coloca em um cesto que leva às costas. Quando o cesto está carregado, são transportados aos barracões (de palha ou cobertos com lonas), denominadas de “região de quebramento” ou “comunidades”, destinadas à operação de extração das sementes. A segunda parte consiste na quebra manual dos ouriços, para a retirada das castanhas. Uma vez extraídas, são lavadas para eliminar impurezas, classificadas e armazenadas a granel, para transporte até o beneficiamento (BRASIL, 2010).

O produto é armazenado em barracões e levado aos portos primários de comercialização e daí, até a sede do município, sendo o transporte feito por embarcações de pequeno porte, em face da difícil navegabilidade dos rios. Nesta etapa, as maiores dificuldades de transposição surgem em trechos de cachoeiras dos rios, sendo possível somente na estação chuvosa, quando o nível das águas o permite, apesar de que em algumas localidades, o transporte ocorre via terrestre, como no Estado do Acre. Dos portos de convergências secundários, a castanha é transportada a granel em embarcações, tais como “alvarengas”, uma embarcação fechada ou barcos de passeio e ensacada em balsas até a usina, onde será desembarcada, para o beneficiamento (PACHECO e SCUSSEL, 2006).

Após as etapas de pré e pós-colheita a castanha é beneficiada em usinas com equipamento para produção em larga escala, sendo obtida com e sem casca. A sequência de procedimentos é variável de acordo com a usina, porém está apresentado na figura 3 um fluxograma do beneficiamento. Após o beneficiamento, o produto *com casca* é acondicionado em *big bags*, normalmente de 1000 kg, sacos de juta ou polietileno, e o produto *sem casca* em embalagem aluminizada a vácuo ou sacos revestidos com caixas de papelão.

Para a preservação da qualidade da castanha devem ser observadas certas recomendações durante as etapas de beneficiamento, tais como:

a) Recepção: retirada de amostra para avaliação da qualidade das castanhas (amostra será avaliada quanto às: castanhas mofadas, manchadas, deterioradas e vazias por meio de uma inspeção visual). Esta atividade é denominada de corte (PACHECO e SCUSSEL, 2006).

b) Armazenamento na usina: as castanhas com casca devem ser armazenadas em ambiente ventilado, protegido de insetos, roedores e outros animais, piso impermeável e lavável, e isolados de outros materiais (BRASIL, 2010).

c) Lavagem: objetiva a retirada de excesso de matéria orgânica, identificando e descartando as castanhas chocas, promovendo choque térmico antes da quebra (PACHECO e SCUSSEL, 2006).

d) Tratamento térmico: as castanhas com casca são submetidas a tratamento em autoclave, com pressão e temperatura, controladas durante tempo determinado, permitindo a separação da amêndoa da casca, facilitando o descascamento do produto (BRASIL, 2010).

e) Descasque: os equipamentos e as superfícies de contato devem ser impermeáveis e bem conservados, de material liso, atóxico, laváveis, assim como sanitizados a cada processamento. Deve haver área separada e isolada para o descascamento, com aeração natural ou ventilação ou climatização, adequadamente iluminada, protegida contra pragas, roedores e outros animais, com piso, paredes e coberturas impermeáveis, de cor clara e que permita fácil higienização (BRASIL, 2010).

f) Seleção: nesta fase, a esteira ou mesa de seleção deve ser sanitizada a cada processamento, de acordo com as normas e padrões vigentes, com anotação dos dados dos produtos utilizados (BRASIL, 2010).

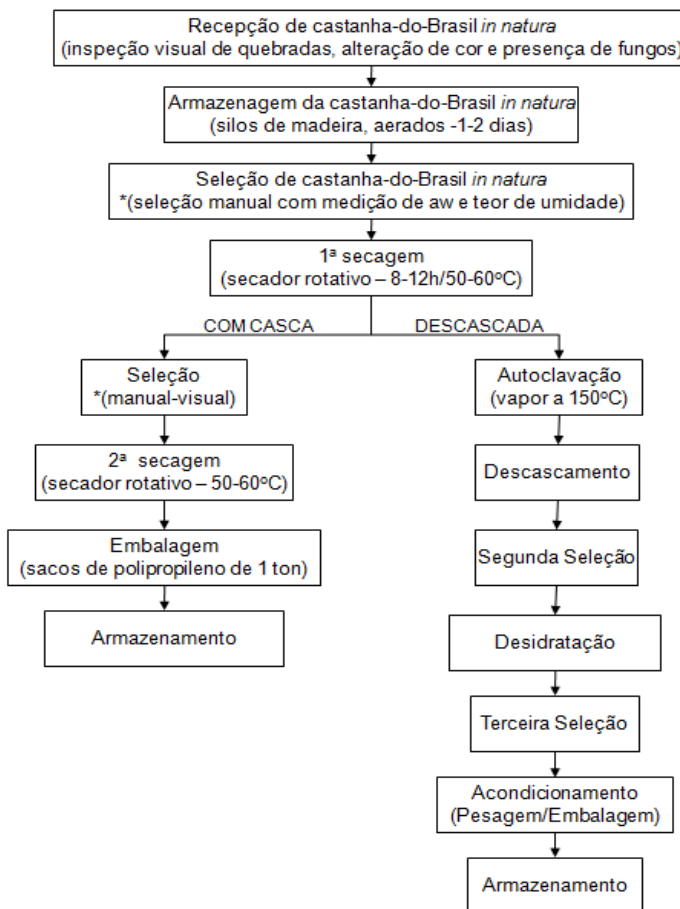
g) Desidratação: as bandejas ou outros equipamentos usados para desidratação devem ser de material impermeável e atóxico, sendo sanitizados após o processamento. Monitorar e registrar, em ficha específica, a temperatura da estufa e o tempo de desidratação de cada lote de amêndoas. Verificar e registrar em ficha própria, por meio de medidor de umidade e por operador treinado, o teor de umidade de cada lote de amêndoas após a desidratação (BRASIL, 2010).

i) Embalagem: as embalagens devem ser de material atóxico e que mantenham a integridade e inocuidade do produto, com identificação que permita a rastreabilidade do mesmo. Os equipamentos ou máquinas para o processo de embalagem das amêndoas de castanha-do-brasil devem ser de materiais atóxicos, de fácil higienização e que mantenham a integridade e inocuidade do produto (BRASIL, 2010).

j) Armazenamento: as instalações para armazenamento devem ser exclusivas para esta finalidade, com piso, paredes e cobertura adequadas, impermeáveis, de fácil higienização, proteção contra pragas, roedores e outros animais, assim como aeração, ventilação e iluminação apropriadas; e os lotes em caixas de papelão devem estar sobre estrados

limpos, respeitadas as dimensões técnicas recomendáveis de afastamento das paredes, tetos, laterais, altura e distância entre pilhas (BRASIL, 2010).

Figura 3 - Fluxograma de beneficiamento da castanha-do-Brasil [*] etapas de seleção.



Fonte: BRASIL (2010).

1.1.4. Produtos derivados da castanha do Brasil

Dentre os produtos obtidos do processamento industrial da amêndoa inteira ou pedaços estão o óleo e a torta, parcialmente ou completamente desengordurada, obtidos da prensagem da amêndoa e/ou por meio da extração do material graxo (SOUZA e MENEZES, 2004). O óleo pode ser obtido da extração como, por exemplo, n-hexano e etanol (FREITAS et al., 2007). O óleo pode ser utilizado na gastronomia ou na formulação cosmética. Da torta se obtém o extrato, também chamado de “leite”, por meio da diluição com água quente e seguida de centrifugação. O “leite” é destinado para o uso culinário e principalmente ao público intolerante à lactose. Outro processo industrial na obtenção de produtos alimentícios é a extrusão. Esta técnica converte um material sólido ao estado da massa fluída, pela combinação de umidade, calor, compressão e tensão de cisalhamento, promovendo a gelatinização do amido e forçando a sua passagem através de uma matriz (BORBA et al., 2005). Por esse processo produz-se *snacks*, rações, cereais matinais, etc. Esta revisão relata os diversos produtos da castanha-do-Brasil e os processos da sua obtenção.

a) Óleo

O óleo da castanha do Brasil pode ser utilizado para fins cosméticos, farmacêuticos e alimentícios (SANTOS et al., 2010). De forma geral o método de extração do óleo é realizado por prensagem mecânica ou hidráulica, via reagentes ou utilizando CO₂ (NETO et al., 2009). O meio mais comumente utilizado para extração de óleos de muitas sementes oleaginosas, em escala industrial, é a prensagem a quente ou a frio. Em escala laboratorial, comumente utiliza-se a extração sólido-líquido, com utilização de solventes como n-hexano e etanol (SANTOS et al., 2012). As limitações em termos de recuperação de óleo e a possibilidade de danificar o óleo e a torta, devido ao aumento de temperatura que ocorre durante a prensagem, traz a necessidade de desenvolver meios de extração a temperaturas mais baixas (GUEDES, 2006). Extração supercrítica com o dióxido de carbono pode ser aplicada como um método alternativo para desengordurar a castanha do Brasil (RODRIGUES et al., 2005). Para obtenção de melhores resultados é fundamental a verificação da eficiência da extração em pressões adequadas, pois o aumento da pressão é um parâmetro decisivo para o aumento da eficiência da extração do óleo de vegetais (PENEDO et al., 1997). Ao analisar a composição do óleo bruto da castanha, encontra-se uma constituição que evidencia alto teor de ácidos graxos

insaturados, representado por 36,21 a 51% de ácido graxo monoinsaturado Oléico e de 34 a 38,28 % de ácido graxo Linoléico (SILVA et al., 2010; FERREIRA et al., 2006; GONÇALVES et al., 2002). Segundo Silva et al. (2010) o ácido graxo oléico é o constituinte majoritário presente no óleo de amêndoa, porém a castanha também é fonte de ácido graxo linoléico (SILVA et al., 2010; FERREIRA et al., 2006; GONÇALVES et al., 2002). Segundo Saraiva et al. (2009), o óleo de castanha-do-Brasil é conhecido por conter entre 30-47% de ácido graxo linoléico. De acordo com Funasaki et al. (2012) devido o óleo da castanha-do-Brasil ser rico em ácidos graxos insaturados, sensíveis a oxidação, o nível de oxidação deve ser monitorado, uma vez que representa um importante parâmetro de qualidade. A tabela 4 apresenta os principais ácidos graxos presentes no óleo da castanha-do-Brasil, segundo diferentes autores

Tabela 4 - Principais ácidos graxos presentes no óleo bruto da castanha-do Brasil.

Componente	Gonçalves <i>et al.</i> (2002)	Ryan <i>et al.</i> (2006)	Ferreira <i>et al.</i> (2006)	Venkatachalam; Sathe (2006)	Freitas <i>et al.</i> (2007)	Chunhieng (2008)	Yang (2009)	Silva <i>et al.</i> (2010)	Santos <i>et al.</i> (2012)
Ácido palmítico (C16)	13,15	13,5	13	-	16,38	13	13,5	13,33	14,24
Ácido esteárico (C18)	10,36	11,77		9,51	10,84	11	11,77	10,78	11,19
Ácido oléico (C18:1, W-9)	37,42	29,09	51	28,75	26,98	39,3	29,09	36,21	36,26
Ácido linoléico (C18:2, W-6)	37,75	42,8	34	45,43	45,01	36,1	42,8	38,28	37,53
Ácido linolênico (C18:3, W-9)	-	0,20	-	0,18	-	-	0,20	-	0,076

Fonte: adaptado Pacheco (2007)

b) Torta e farinha

O resíduo da castanha obtido por meio da extração do óleo por prensagem da amêndoa é em geral chamado de torta, que gera grande interesse para estudos devido ao seu elevado teor de proteína (GLORIA e REGITANO - D'ARCE, 2000). Segundo Ferreira (2006) a torta, além de conter em média 19,17% de lipídios, 28,34% de proteínas e 39,63% de carboidratos, também é uma excelente fonte de selênio. Souza e Menezes encontraram 0,714 mg de Se/100g de torta, quantidade 3,56 vezes maior que o teor encontrado na amêndoa de castanha (0,204 mg /100g). Essa diferença pode ser explicada pela grande quantidade de castanhas (amêndoas) com películas que geralmente são utilizadas para obtenção da torta e ao seu menor percentual lipídico, sugerindo que a película da amêndoa poderá possivelmente, conter elevada concentração de selênio (BERNO et al., 2010). É considerada uma excelente fonte de proteína vegetal em função de sua qualidade, rica em aminoácidos sulfurados, metionina e cisteína, geralmente insuficientes em proteínas vegetal (COHEN, 2006). Experimentos com ratos demonstraram que a farinha obtida no processo possui qualidade superior quando comparada à soja e inferior à caseína. A torta apresenta inúmeras possibilidades de aplicação, visando o enriquecimento de uma grande variedade de grupos de alimentos como: produtos de panificação, bebidas, embutidos, farinhas, leites, cereais, snacks, salgados, doces, sorvetes, chocolates, além de muitos outros (SOUZA e MENEZES, 2004).

c) Extrato “leite”

Obtém-se o “leite” da castanha por meio da despeliculação das amêndoas frescas. Em seguida, essas amêndoas são raladas, produzindo “leite” grosso e branco e posteriormente são diluídas em água. Este produto é similar ao leite de côco, rico em proteína e é utilizado como ingrediente na culinária (PACHECO e SCUSSEL, 2006). Segundo Cardarelli e Oliveira (2000), quando a torta é diluída com água, produz-se o “leite”. Este, depois de pasteurizado e refrigerado se mantém estável aproximadamente por 30 dias. Tais autores verificaram que o efeito de aditivo de pasteurização, refrigeração e adição de conservante aumentou a sua vida de prateleira para 180 dias. No estudo de Ferberg et al. (2002) foram avaliados os efeitos das condições de extração no rendimento e qualidade do extrato de castanha-do-Brasil despeliculada. Na etapa de desintegração foram estudadas quatro temperaturas (25 °C, 50 °C, 75 °C e 100 °C) com uma ou duas extrações. As amostras experimentais obtidas foram avaliadas quanto à composição, rendimento em extração e avaliação sensorial de doçura. Os “leites” de castanha

obtidos a 75 °C com uma e duas extrações apresentaram rendimento em sólidos, proteínas e óleo significativamente superiores aos demais. Quanto ao teor de açúcar, foram testadas concentrações diferentes (2%, 3% e 4%) e submetidas à análise sensorial. O “leite” de castanha obtido a 75°C e formulado com 3% de açúcar foi preferido pela maioria dos provadores (78%). Ferberg et al. (2004) elaboraram uma bebida mista de extrato de soja integral e extrato de castanha-do-Brasil, por ser um alimento de alto valor nutritivo. A bebida de extrato soja, adicionada 3% de açúcar e 0,2% de sal, foi formulada com diferentes concentrações de extrato de castanha (10%, 20%, 30%, 40% e 50%). A formulação da bebida de soja integral aceita pela maioria dos provadores foi de 40% de extrato de castanha com 3% de açúcar e 0,2% de sal.

d) Extrusado

A tecnologia da extrusão tornou-se um dos principais processos de desenvolvimentos de produtos alimentícios. Este processo envolve mistura, cozimento, amassamento, cisalhamento, formação e moldagem, podendo ser a quente ou a frio. A extrusão a quente é um processo de alta temperatura e curto tempo cuja perda de nutrientes é mínima e reduz a contaminação microbiana. Já, a extrusão a frio, o produto é extrusado sem cozimento ou distorção do alimento (FELLOWS, 2006). O princípio de extrusão promove a gelatinização do amido, a desnaturação e a re-orientação das proteínas, a inativação enzimática, destruição de algumas substâncias tóxicas e a redução da contagem microbiana (BORBA et al., 2005; MENEGASSI et al., 2007). Com esta tecnologia se produz bebidas em pó instantâneas, amidos modificados para uso industrial, rações pré-cozidas para animais, refeições rápidas, cereais pré-cozidos, molhos semiprocessados, produtos de confeitaria, cereais matinais e outros produtos diversos (SOUZA e MENEZES, 2008a). A extrusão termoplástica se destaca na tecnologia de alimentos por sua versatilidade, possui alta produtividade, baixo custo e não gera resíduos durante ou após o processamento. Para Souza e Menezes (2008b), esta tecnologia é um processo pelo qual o atrito mecânico é combinado com o calor para misturar, plasticizar e gelatinizar o amido, ocorrendo uma fluidização do mesmo, permitindo criar novas texturas e formas para o produto final. A extrusão permite a obtenção de um efeito nutricional benéfico do produto, uma vez que viabiliza a mistura de diferentes matérias-primas e outros nutrientes (CARVALHO *et al.*, 2010). Souza e Menezes (2006) avaliaram a aceitabilidade de cereais de torta de amêndoa de castanha-do-Brasil com mandioca extrusados nos sabores doce, salgado e natural em função da aceitação global, sabor, crocância

e intenção de compra por seis meses de armazenagem à temperatura ambiente. Os resultados mostraram que os três tipos de cereais matinais de castanha-do-Brasil com mandioca alcançaram maiores notas em todos os quesitos do que o cereal matinal similar comercializado. Dos três cereais matinais estudados o de sabor doce recebeu maiores notas que o natural e salgado. Souza e Menezes (2008a) tinham objetivo de encontrar a fórmula ideal da mistura com castanha-do-Brasil e farinha de mandioca processadas por extrusão com a finalidade de obter um produto rico em proteína vegetal pronto para o consumo. Verificaram que formulações com maiores quantidades de castanha se apresentaram mais expandidas, de cor clara e, quantidades de proteínas, lipídios e cinzas mais elevadas. Já as formulações com menores teores de castanha não se expandiram, tinham cor acinzentada e apresentaram maiores percentuais de carboidratos. Outra pesquisa de Souza e Menezes (2008b), sobre a otimização das condições de processamento por extrusão termoplástica de mistura de torta de castanha-do-Brasil com farinha de mandioca em função da aceitabilidade, indica que aumentos na quantidade de castanha-do-Brasil, temperatura e umidade elevam as notas de aceitação global e intenção de compra do produto. Além disso, torta de castanha em temperatura e umidade da mistura muito alta e ou muito baixa diminuem as notas de aceitação global e intenção de compra dos extrusados. As maiores notas de aceitação global e a intenção de compra neste experimento estão nos pontos centrais e indicam a validade do modelo.

1.2. Fungos e micotoxinas

1.2.1. Fatores que interferem no crescimento

Alguns fatores intrínsecos dos alimentos podem fornecer substratos para os fungos produtores de aflatoxinas (AFLs). Outros fatores externos também precisam ser controlados para a segurança do alimento. Esses fatores podem ser divididos em:

a) Fatores Intrínsecos

Composição nutricional: a composição dos alimentos, em termos de teor de proteínas, carboidratos, lipídios e outros componentes, influencia diretamente na curva de crescimento dos microorganismos, assim como na natureza do processo de deterioração dos alimentos. A castanha-do-Brasil por possuir elevado teor lipídico (68,2%) é um alimento muito suscetível a rancificação. Além disso, fungos

produtores de AFLs usam glicerina (componente dos óleos) como fonte de energia. Dentre os ácidos graxos presentes na castanha, temos em ordem decrescente, os monoinsaturados, polinsaturados e saturados na proporção de 25,8; 23,0 e 16,6% (respectivamente) que podem ser utilizados por fungos. Também é rica em açúcares, principalmente a sacarose tornando-se um ótimo substrato para os microrganismos (PACHECO e SCUSSEL, 2006).

Umidade: Outro fator no desenvolvimento de fungos em alimentos é o conteúdo de umidade, que é usualmente expresso em termos de umidade absoluta do material e das exigências mínimas apresentadas pelos fungos com relação ao seu desenvolvimento. Em geral, os fungos são mais tolerantes que as bactérias aos meios com baixa umidade. Entretanto, este fator, não garante armazenagem segura, pois outros fungos podem crescer e liberar água e calor, aumentando a temperatura e umidade nos grãos adjacentes. A castanha-do-Brasil, durante a colheita na floresta possui um conteúdo de umidade elevado (30%) propício ao desenvolvimento de fungos. É necessário reduzir esta umidade durante o tempo de armazenamento na floresta para evitar proliferação durante seu transporte até as usinas de beneficiamento. Durante seu processamento, ela é seca atingindo conteúdo de umidade que varia de 3 a 6,5%. Faixa esta considerada segura para controlar a proliferação fúngica (PACHECO e SCUSSEL, 2006).

Atividade de água: O teor de atividade de água (aw) também pode interferir no metabolismo de fungos, já que é medido em escala de 0 a 1 (relação entre a pressão de vapor da água no alimento e a pressão de vapor da água pura) e reflete o grau em que a água está ligada aos componentes do substrato, não se encontrando disponível para as reações bioquímicas e para o crescimento de microrganismos. A maioria das leveduras não cresce em aw abaixo de 0,65 e os fungos em aw abaixo de 0,70. Com poucas exceções, é possível afirmar que alimentos desidratados serão estáveis, à deterioração por microorganismos, quando $aw < 0,70$ (CODEX ALIMENTARIUS, 2006), apesar de que as reações químicas e enzimáticas prosseguem até aw próximo de zero. Quanto ao pH (potencial hidrogeniônico), há microrganismos menos tolerantes aos meios ácidos. Os fungos, entretanto, têm condições favoráveis em $pH < 4,5$. A faixa de pH ótimo, para a formação das AFLs e o crescimento do fungo é principalmente de 5 a 6.

O potencial de oxidação-redução, por sua vez, representa a disponibilidade de O_2 no alimento, e, nesse aspecto, o potencial dos fungos pode ser: *aeróbio* (+); *anaeróbio* (-) e *facultativo* (tolerantes a presença ou ausência de O_2).

Cepas de *A. flavus* demonstraram ser altamente influenciadas, pela associação de pH e aw, em temperaturas específicas, quanto à produção de AFLs (ARRUS, 2005b).

b) Fatores Extrínsecos

A alternância de períodos de chuva e sol da região Amazônica dificulta o controle dos fatores extrínsecos determinantes para o metabolismo de cepas aflatoxigênicas, como a temperatura e a umidade.

A *temperatura* é o fator que interfere mais diretamente no desenvolvimento fúngico, pois é menos restritiva que a umidade. Várias espécies de fungos crescem durante a armazenagem com média de 30°C (ambiente), em regiões tropicais, mesmo que sejam afetadas por outros fatores (ARRUS, 2005a).

Umidade Relativa: da mesma forma, umidades relativas entre 60 e 90%, também estão associadas com a produção de aflatoxinas em nozes (SCUSSEL, 1998). O efeito de diferentes umidades relativas e temperaturas na produção de aflatoxinas, em castanha-do-Brasil processada, foi efetivo para controlar a contaminação abaixo de 4 ug.kg⁻¹ (ARRUS et al., 2005b), que parece ser favorecida entre 27 e 30°C.

Microclima: o crescimento de fungos depende também de outras condições ambientais que envolvem o substrato, tais como, o ambiente gasoso (composição da atmosfera gasosa). Alguns fungos podem crescer em baixas concentrações de O₂ sendo afetados somente em concentrações inferiores a 0,2 %, ocorrendo pouco crescimento em ambientes com dióxido de carbono (CO₂) ou nitrogênio (N₂). Portanto, misturas de gases podem ser usadas para reduzir a concentração de O₂. Ambientes com atmosfera controlada/modificada também têm sido estudados durante o transporte e armazenamento de alimentos para prevenir o crescimento e formação de toxinas. (PACHECO e SCUSSEL, 2006).

Tempo de armazenagem: a armazenagem é considerada uma etapa crítica, pois dependendo de sua duração e condução, poderá ocorrer o desenvolvimento do fungo e a produção de aflatoxinas (CIRAD, 2008). O período entre extração/coleta até o transporte seja nas embarcações ou caminhões, em ambientes com elevada umidade relativa, pode ser superior a 50 dias. Considerando as condições de temperatura e umidade da região, mesmo a armazenagem por 30 dias ou menos é para ser considerada preocupante (PACHECO e SCUSSEL, 2006).

Competição microbiológica: a produção de AFLs também pode ser afetada pela competição microbiológica entre diferentes cepas de

Aspergillus. Martins et al. (2000) confirmaram a interação sinérgica do desenvolvimento de fungos e um potencial aumento de produtividade da aflatoxina.

Fungicidas: os fungicidas são bastante utilizados para controlar e prevenir o crescimento de fungos nos produtos agrícolas. Contudo, existem limitações no uso destes compostos tais como: toxicidade para animais, excessivo custo, dificuldade de aplicação, efeitos indesejáveis na qualidade dos grãos e pouca toxidez para os fungos de estocagem (LORINI et al., 2002).

Danos mecânicos: os danos mecânicos favorecem a absorção de umidade e facilitam a invasão e a penetração dos esporos de fungos no interior altamente nutritivo, desses substratos, levando ao desenvolvimento rápido dos fungos e conseqüentemente aumento dos níveis de toxinas (PACHECO e SCUSSEL, 2006).

Luz: a produção de toxina é inibida na presença de luz ultravioleta e infravermelha (SCUSSEL, 1998).

As AFLs podem ser produzidas por três espécies de *Aspergillus*: *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*. O *A. flavus* produz apenas AFLs do grupo B, enquanto as outras duas espécies produzem AFLs dos grupos B e G (CREPPY, 2002). Os fungos se desenvolvem em condições ambientais favoráveis, semelhantes ao clima (temperatura de 30°C-35°C) e umidade relativa (80% - 95%) encontrados na Região Amazônica. Região esta onde se concentra a maior parte de área extrativista da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) (PACHECO et al., 2006).

A produção de micotoxinas está ligada ao crescimento do fungo; sem o crescimento geralmente a produção não ocorre. Entretanto, a presença do fungo produtor não indica a presença da micotoxina, especialmente se o crescimento não ocorrer. Portanto, o entendimento dos fatores que permitem o crescimento do fungo e a produção de micotoxinas é de grande importância para o desenvolvimento de métodos de controle (BULLERMAN et al., 1984).

Condições de umidade e temperatura aumentam a probabilidade de desenvolvimento do *Aspergillus* e produção de AFLs, situação agravada no período chuvoso. A biodegradação de sementes e grãos, no campo e durante o armazenamento, limita o acondicionamento seguro e o valor nutricional desses alimentos (TEIXEIRA, 2008).

Os fungos e insetos são provavelmente os mais importantes organismos que provocam deterioração. Eles podem afetar cor, odor, sabor, valor nutricional, bem como produzir AFLs (SABINO, 1996).

1.2.2. Fungos em castanha-do-Brasil

A castanha-do-Brasil contém uma variedade de fungos. O gênero *Aspergillus* da seção *Flavi* é de grande preocupação, pois alguns têm o potencial para a produção de AFLs. Um grande desafio para a produção de castanha-do-Brasil é o controle da contaminação por fungos e AFLs (OLSEN et al., 2008; GONÇALVES et al., 2012; CALDERARI et al., 2013).

A infecção fúngica em castanha-do-Brasil é conhecida desde o início do século passado. Um dos primeiros relatos descritos na literatura sobre a perda de qualidade da castanha-do-Brasil foi feito por Spencer (1921). Este autor descreveu um porcentual de perdas causadas pela contaminação microbiológica entre 10 e 25% em castanha-do-Brasil exportada da Amazônia para os EUA. Naquela época, ele descobriu que as perdas pós-colheita da castanha-do-Brasil eram predominantemente devido à contaminação por fungos.

O autor, que descreveu a presença de *Aspergillus flavus* em amêndoa de castanha-do-Brasil, também descreveu outros fungos que infectam os grãos. Entre eles, foram detectados, *Penicillium spp.*, *Pellionella macrospora*, *Cephalosporium bertholletianum*, *Fusarium spp.* e *Phomopsis bertholletianum*.

Em um estudo sobre a micobiota da castanha-do-Brasil, uma nova espécie (não produtora de aflatoxina) de *Aspergillus* na seção *Aspergillus Flavi* foi encontrada no solo e em várias amostras de castanha coletadas em várias fases da cadeia de produção. Esta espécie foi descrita por Taniwaki et al. (2012) como *Aspergillus sp bertholletius*.

Outros autores, que mais tarde estudaram a micobiota fúngica em castanha-do-Brasil, também destacaram a diversidade de espécies, com a predominância de fungos mitosporicos. Visto que o *Aspergillus* é nomeadamente o fungo predominante, especialmente as espécies da seção *Flavi*, há grande preocupação com a produção de aflatoxinas neste produto. Estudos posteriores demonstraram também a predominância de *A. flavus*.

Foi relatado que entre as dezessete espécies encontradas em castanha-do-Brasil, o *A. flavus* foi uma das espécies dominantes, seguido por *A. niger*, *Penicillium citrinum* e *Penicillium glabrum* (FREIRE et al., 2000). Segundo este estudo, algumas espécies foram primeiramente isoladas da castanha-do-Brasil, incluindo *Acremonium curvalum*, *Cunninghamella elegans*, *Exophiala SP.*, *Fusarium oxysporum*, *Pseudoallescheria boydii*, *Rhizopus oryzae*, *Scopulariopsis sp.*,

Thielavia terrestris e *Trichoderma citrinoviride*. As espécies encontradas por Freire et al. (2000) inclui os fungos associados a deterioração e espécies potencialmente toxigênicas, incluindo *A. flavus* e *P. citrinum*, produtoras de AFLs e citrinina, respectivamente. A presença destes fungos pode estar associada ao processo de secagem e de armazenamento inadequados.

Para responder a algumas perguntas sobre a distribuição de fungos, abundância, especificidade e implicações desses padrões de distribuição e sobre o controle da contaminação por aflatoxinas em castanha-do-Brasil, Bayman et al. (2002) estudaram diferentes grupos de nozes de árvores (pistaches, amêndoas, nozes e castanha-do-Brasil). Estes autores notaram que a incidência de fungos em castanha-do-Brasil ocorreu na seguinte ordem decrescente: *A. flavus*, *Penicillium spp.*, *A. tamari*, *A. niger*, *A. fumigatus* e *Rhizopus spp.*

Esses autores afirmaram que as frequências de *A. flavus*, *A. tamarii*, *A. niger*, *Penicillium* e *Rhizopus* em castanha-do-Brasil eram as mesmas observadas em amostras esterilizadas e não esterilizadas. Desta forma, concluíram que a taxa de colonização interna em castanha-do-Brasil era muito maior do que em outras nozes de árvores estudadas. No entanto, *A. niger* foi menos comum em castanha-do-Brasil do que em outras nozes. Uma vez que a castanha-do-Brasil é proveniente de coleta rudimentar, sendo armazenada e transportada em condições que favorecem o crescimento de fungos, esses fungos podem ter mais oportunidades para colonizar os tecidos internos da castanha-do-Brasil do que de outras nozes. Este ponto de vista é contrário ao proposto por Freire et al. (2000), considerando-se que a penetração da germinação de esporos e infecção ocorre durante a inflorescência ou durante a formação das sementes, o que sugere uma invasão e colonização de tecidos jovens prematuros.

As infecções fúngicas podem ocorrer tanto nos estágios de colheita quanto na pós-colheita. Os fungos podem desenvolver-se durante o armazenamento, transporte do produto e em todas as fases de um diagrama de fluxo do processo. No entanto, existem faixas de atividade de água e umidade que são ideais para a produção de AFLs. O Código de Boas Práticas para o tratamento da castanha-do-Brasil publicado pelo CAC (Codex Alimentarius Commission) recomenda que a castanha-do-Brasil deve ser seca a um teor seguro de umidade (menos de 0,7 aw), dentro de dez dias após a coleta. (CAC, 2010).

1.3. Aflatoxinas

O nome micotoxina é derivado da palavra grega “Mykes” que significa fungo e “Toxicum” que significa veneno ou toxina. A doença ou síndrome (condição patológica) decorrente da ingestão de micotoxinas é denominada micotoxicose (SCUSSEL, 2002).

As micotoxinas são contaminantes provenientes do metabolismo secundário de fungos, com capacidade de causar alterações orgânicas. Podem ser letais em altas doses tanto para animais quanto seres humanos pela ingestão de alimentos contaminados (PACHECO et al., 2006).

A exposição humana a micotoxinas pelo consumo de alimento contaminado é questão de saúde pública no mundo todo. Programas de monitoramento dos níveis de contaminação de alimentos por micotoxinas são essenciais para estabelecer prioridades em ações de vigilância sanitária. O grupo mais importante de micotoxinas, considerando-se a toxicidade e as legislações mundiais, são as AFLs. Muitas das micotoxinas são termoestáveis, ou seja, não são inativadas pelo tratamento térmico e muitas vezes não têm seu efeito diminuído por processos de beneficiamento como peletização em rações e acondicionamento em latas. Pouco pode ser feito se houver a constatação de contaminação de um lote de produtos agrícolas. Alguns programas de descontaminação com produtos químicos são capazes de controlar o desenvolvimento de fungos e reduzir a concentração da micotoxina, mas deve-se levar em consideração a relação custo/benefício da atividade. Estes procedimentos de descontaminação não são eficientes em larga escala, tendo um custo muito elevado e com resultados ainda bastante discutíveis (BEZERRA, 2005).

O homem pode ser contaminado por micotoxinas através do consumo de alimentos processados ou in natura. Também pode ingerir carne de animais alimentados com ração contaminada, pois a toxina pode ser transmitida pelo corpo do animal através de sua carne, leite ou ovos. Alguns alimentos com contaminação potencial como o milho podem ter seus produtos derivados como óleo refinado, isento da toxina, pois há a destruição da mesma no processo de transformação do produto (BEZERRA, 2005).

Estas toxinas podem causar diversos danos à saúde de humanos e animais. Além disso, a presença de AFLs em alimentos pode levar a sérias perdas econômicas em países exportadores de produtos agrícolas, pois lotes de alimentos contaminados são sistematicamente rejeitados por países importadores de alimentos (ZOLLNER et al., 2006). Em

1961 responsabilizou-se a ração proveniente do Brasil de conter o princípio tóxico causador da micotoxicose. Entretanto, o composto foi detectado também em rações de outros países. Estudos em 1962 identificaram a ingestão do alimento contaminado com grande número de hifas de *Aspergillus flavus* como causa da doença, sendo então, um fator tóxico detectado por *Cromatografia em Camada Delgada* (CCD) e denominado de *aflatoxina* (AF). Na detecção foram observados compostos com fluorescência azul e verde, sob luz ultravioleta (UV), isto é, AF B (*Blue*) e G (*Green*) e suas frações B₁, B₂, G₁ e G₂, em que AFB₁ é considerado o composto mais tóxico (KELLER et al., 2005).

1.3.1. Toxicidade

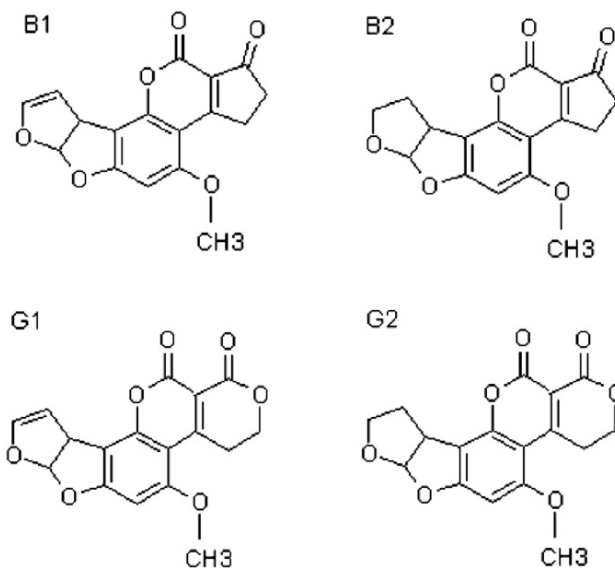
As micotoxinas são contaminantes naturais produzidas por fungos e são comumente encontrados em uma grande variedade de produtos alimentares, incluindo cereais, leguminosas, nozes e seus produtos (PATERSON e LIMA, 2010). Sempre que o consumo desses produtos, incluindo a castanha-do-Brasil, é importante na dieta das populações, tal infecção representa um alto risco de exposição crônica (JOLLY et al., 2009). As micotoxinas podem causar efeitos adversos para a saúde. Entre as mais de 300 tipos de micotoxinas, as AFLs são as mais estudadas devido ao seu potencial tóxico (KLICH, 2009). A ingestão de AF pode aumentar o risco de câncer do fígado e pulmão e também pode suprimir o sistema imunológico, aumentando o risco de infecções. Além disso, pode atravessar a barreira placentária (JOLLY et al., 2009; MEGGS, 2009 e PARTANEN et al., 2010).

A AFB₁ é responsável por carcinomas em animais, mostrando uma forte relação com a incidência de câncer em seres humanos (JOLLY et al., 2009; MEGGS, 2009). A exposição às AFLs pode ter efeito: agudo, imunossupressor, mutagênico, teratogênico, hepatotóxico, e a principal consequência da exposição crônica em humanos é o surgimento de carcinoma hepatocelular e outras patologias hepáticas (CHEN et al., 2007; HARRIS, 2007; TURNER et al., 2007; PHILIPS et al., 2008).

As AFLs são um grupo de compostos heterocíclicos estruturalmente relacionados oxigenados produzidos em condições favoráveis por várias espécies de *Aspergillus*. As AFLs mais conhecidas que ocorrem naturalmente são denominadas B₁, B₂, G₁, e G₂ (Figura 4). AFB₁ ocorre em maiores quantidades em produtos contaminados, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ (SOARES et al., 2010) geralmente não são

relatados na ausência de AFB₁. Aflatoxinas totais (AFT) referem-se à soma dos quatro compostos relacionados.

Figura 4: Estrutura química das aflatoxinas: AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂.



Fonte: Freitas-Silva e Venâncio (2011).

A série G das AFLs difere quimicamente da série B pela presença de um anel 3- lactona, no lugar do anel ciclopentanona. Uma dupla ligação entre o c8 e c9 é encontrada na forma de um éter vinil no anel terminal furano nas AFLs AFB₁ e AFG₁, mas não em AFB₂ e AFG₂. Essas variações que diferem as AFLs estruturalmente estão associadas também as suas atividades, sendo as AFLs B₁ e G₁ carcinogênicas e consideravelmente mais tóxicas que B₂ e G₂ (JAIMEZ et al., 2000).

As AFLs são furomarinas complexas contendo intensa fluorescência quando expostas à luz ultravioleta com comprimento de onda longo (365 nm). Esta propriedade é aproveitável para sua identificação e quantificação, quando presentes em diversos tipos de alimentos (PELLETIER e REIZNER, 1992).

São substâncias apolares, solúveis em solventes como o clorofórmio, metanol, benzeno, acetonitrila, etc. São instáveis a luz UV, mas bastante estáveis a temperatura acima de 250°C e não são afetadas pelo frio. Pequena ou nenhuma decomposição de AFLs é obtida sob condições normais de cozimento, pasteurização e torrefação de alguns tipos de alimentos (PATERSON e RUSSELL, 2006). Além disso, são incolores, inodoras e não alteram o sabor dos alimentos (PÁDUA et al., 2002). Agentes oxidantes, como água oxigenada e hipoclorito de sódio, reduzem o teor de AFLs no alimento, mas a utilização de tais soluções é impraticável uma vez que ocorre além da destruição de nutrientes, “flavor”, cor, textura e propriedades funcionais do alimento, a formação de resíduos tóxicos (PÁDUA et al., 2002).

Em seres humanos, estudos de biomonitoramento individual de derivados AFB1 N7 guanina tem demonstrado que as AFLs constituem importantes fatores de risco, com uma provável interação sinérgica com o vírus da hepatite B, para o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular (CHC) em populações expostas (OLIVEIRA e GERMANO, 1997).

As AFLs absorvidas pelo organismo são distribuídas na corrente sanguínea e seguem diretamente para o fígado, devido ao efeito de primeira passagem, onde parte passa por biotransformadores e poderá ser encontrada no sangue, cabelo, tecidos e produtos de excreção (CAVALIERE et al., 2006; JOLLY et al., 2006).

Há mais de 20 tipos de moléculas de AFLs e seus derivados isolados, porém os principais tipos estudados continuam sendo a B1, B2, G1 e G2 (HUSSEIN e BRASEL, 2001). Esses compostos caracterizam-se pela elevada toxicidade que apresentam (ROSA, 1995). As AFLs têm sido identificadas como fatores envolvidos na etiologia do câncer hepático no homem, conseqüente à ingestão de alimentos contaminados (MCLEAN e DUTTON, 1995)

A AFB1 é a aflatoxina que apresenta o binômio causa/efeito (ingestão de alimentos contaminados/efeitos tóxicos) bem determinado. Sabe-se que a ingestão de alimentos com baixos teores de AFLs com uma dada frequência e por tempo prolongado, pode levar ao aparecimento de carcinoma hepático. Por outro lado a ingestão de alimentos com alto grau de contaminação produz em geral, em curto prazo, efeitos agudos, caracteristicamente hepatotóxicos (HAAS, 2000).

A ação biológica da AFB1 ligada à formação do composto 8,9-epóxido ocorre por meio de biotransformação hepática, em reações de fase I e II, em que algumas delas ativam o composto, enquanto outras reduzem sua toxicidade. Com exceção da formação do aflatoxicol, que é

produto de enzimas da fração citossol do hepatócito, as demais reações são catalisadas por isoenzimas da fração microssômica hepática. A alta concentração do composto no fígado pode ser explicada pela alta permeabilidade da membrana do hepatócito, nos primeiros processos de biotransformação, requisito para sua carcinogenicidade e pela ligação covalente com macromoléculas hepáticas (PACHECO, 2007). A estimativa de risco para câncer de fígado humano decorrente da exposição à AFB₁ foi obtida a partir de estudos epidemiológicos e toxicológicos (FAO/WHO, 2008).

Aproximadamente 250.000 mortes são causadas por CHC anualmente na China e na África sub-saariana e são atribuídas aos fatores de risco entre os quais as AFLs e o vírus da hepatite B (HUSSEIN e BRASEL, 2001). As diferenças extremas observadas na incidência do CHC entre os diversos países sugerem o envolvimento de fatores ambientais em sua etiologia. Dentre os fatores identificados, os que apresentam maior importância são as AFLs e o vírus da hepatite B (HBV) (HARRIS, 1991).

A toxicidade das AFLs decresce de B1 para G2, ou seja, B1>G1>B2>G2. O efeito tóxico causado pelas AFLs pode ser de curta duração, ou seja, aflatoxicose aguda, ou de longa duração, determinado aflatoxicose crônica (SCUSSEL, 2002).

O efeito agudo é de manifestação e percepção rápidas, podendo levar o animal à morte, porque causa alterações irreversíveis, e é resultante da ingestão de doses geralmente elevadas. O efeito subagudo é o resultado da ingestão de doses não elevadas que provoca distúrbios e alterações nos órgãos do homem e nos animais, especialmente no fígado. Ambos os casos dependem da espécie animal (uma são mais susceptíveis que outras, da idade (os mais jovens são mais afetados), do estado nutricional e, também, do sexo. Sabe-se, também, que ela pode provocar cirrose, necrose do fígado, proliferação dos canais biliares, síndrome de Reye (encefalopatia com degeneração gordurosa do cérebro), hemorragias nos rins e lesões sérias na pele, pelo contato direto. Além disso, os produtos do seu metabolismo, no organismo (principalmente o 2,3 epóxioaflatoxina), reagem com DNA e RNA, a nível celular, interferindo com o sistema imunológico da pessoa ou do animal. Isto faz com que a resistência às doenças diminua (TEIXEIRA, 2008).

1.3.2. Aflatoxinas em castanha-do-Brasil

As AFLs são de ocorrência generalizada nas nozes e alguns cereais (PITT e HOCKING, 2009). As AFLs são cancerígenas e podem causar outros problemas à saúde humana, por isso muitos países impuseram regulamentos visando minimizar a exposição humana às AFLs. Isto resultou na rejeição de produtos, incluindo castanha, causando grandes perdas econômicas para produtores, processadores e comerciantes. A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer reconhece misturas de AFLs como carcinogênicos do Grupo 1 (IARC, 1993). Codex Alimentarius (CAC, 2010) recomenda um nível máximo de AFLs em castanha para posterior processamento de 15 ug/kg e para o consumo direto, de 10 ug/kg.

A ocorrência de AFLs em castanha-do-Brasil tem sido reportada em amostras vendidas em vários países, incluindo os Estados Unidos (POHLAND, 1993), Japão (JECFA, 1998), Reino Unido (FSA, 2004), Suécia (MARKLINDER et al., 2005) e o Brasil (DE MELLO e SCUSSEL, 2007; PACHECO e SCUSSEL, 2009 e REIS et al., 2012).

Alguns estudos mostram que todas as partes da castanha-do-Brasil (casca e amêndoa) são passíveis de contaminação por AFLs e que o maior risco da contaminação está nas frações defeituosas (grãos podres, cascas boas e cascas podres) (VARGAS et al., 2011; PACHECO e MARTINS, 2013).

A produção de AFLs é reforçada pelas condições ambientais (temperatura e umidade relativa) e condições de armazenamento. Outros fatores incluem características dos produtos agrícolas, tais como atividade de água, conteúdo de umidade em alimentos e substrato, além de danos causados por insetos (ARRUS et al., 2005a). Embora *A. flavus* e *A. parasiticus* sejam, sem dúvida, as espécies produtoras mais comuns e os produtores mais importantes das AFLs nos gêneros alimentícios (RODRIGUES et al., 2009), existem outras espécies na mesma seção (*A. arachidicola*, *A. avenaceus*, *A. bombycis*, *A. caelatus*, *A. Lepore*, *A. minisclerotigenes*, *A. nomius*, *A. oryzae*, *A. parvisclerotigenus*, *A. pseudotamarii*, *A. sojae*, *A. tamarii* e *A. toxicarius*) (ITO et al., 2001; SAMSON et al., 2006; PILDAIN et al., 2008).

Atualmente, existe uma controvérsia sobre quais as espécies que mais contribuem para a produção de AFLs em castanha-do-Brasil. Sabe-se que as micotoxinas podem existir em produtos sem que os fungos associados sejam detectados e vice-versa. No entanto, a detecção de AFG₁ e AFG₂ em castanha-do-Brasil é surpreendente, onde

apenas as cepas de *A. flavus* tenham sido previamente detectadas. Uma hipótese para apoiar esta controvérsia é a atribuição errônea para o táxon, especialmente após as orientações taxonômicas recentes da Seção *Flavi* (SAMSON et al., 2006). Neste caso, presume-se que existe uma maior contribuição por *A. nomius* (OLSEN ET AL., 2008) na contaminação de AFLs em castanha-do-Brasil, uma vez que *A. flavus* produz somente AFLs B₁ e B₂, enquanto *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. arachidicola*, *A. bombycis*, *A. parvisclerotigenus* e *A. toxicarius* adicionalmente podem produzir AFG₁ e AFG₂ (SAMSON ET AL., 2006; RODRIGUES ET AL., 2009).

A incidência e a frequência da contaminação de AFLs em castanha-do-Brasil foram monitoradas pelo Ministério da Agricultura desde 1998. Os dados referentes à ocorrência de AFLs em amostras de castanha-do-Brasil obtidas a partir de lotes de exportação e lotes rejeitados pelos países importadores, entre 2005 e 2006, analisando apenas a parte comestível (amêndoa), demonstraram que cerca de 85% de 294 amostras não apresentaram níveis detectáveis de AFB₁. Em amostras positivas, o limite inferior aflatoxina total variou de 0,4-2,42 mg/kg e apenas 13 amostras (4,4%) apresentaram níveis acima de 20 mg/kg (CAC, 2010). Estes resultados são favoráveis, em comparação com anos anteriores. Em 2003, o Brasil foi auditado pela União Europeia no que diz respeito à produção e processamento de castanha-do-Brasil. As exportações do produto foram totalmente restritas desde a publicação da Decisão 2003/493/CE (EU, 2003). Esta publicação estabeleceu critérios e condições para o Brasil, a fim de exportar castanha-do-Brasil com casca do Brasil para a União Europeia. Isto incluiu a implementação de boas práticas de fabricação, planos de amostragem adequados, condições favoráveis de análise e certificação do produto final (EU, 2003). Esta medida representou a suspensão das exportações brasileiras, o que causou um enorme impacto socioeconômico em toda a cadeia produtiva e levou a uma paralisação das exportações de castanha-do-Brasil para a União Européia.

De acordo com a Comissão Européia de Direção Geral para Saúde e Consumidores, através do Sistema de Alerta Rápido para Alimentos e Rações (RASFF), o número de notificações em AFLs em 2009 (638 notificações) diminuiu significativamente em relação a 2008 (902). Dados de AFLs em castanhas e produtos de nozes e sementes geraram 518 notificações. O Brasil recebeu 16 notificações, das quais 7 sobre castanha-do-Brasil (4 notificações sobre castanha com cascas e 3 notificações de castanha-do-Brasil descascada da Bolívia) (RASFF, 2010).

Estas descobertas resultaram em mudanças na legislação da União Europeia. Com a adoção do Regulamento (CE) n.º 1152/2009 de 27 de novembro de 2009, que impõe condições especiais à importação de certos gêneros alimentícios provenientes de certos países devido ao risco de contaminação por AFLs e que revoga a Decisão 2006/504/CE, as frequências de controle em importação foram aumentadas, mantidas ou diminuídas, principalmente com base nas conclusões apresentadas através do RASFF. A frequência de controle de importações se manteve inalterada para castanha-do-Brasil com casca (100%) (RASFF, 2010).

Estes números refletiram um pequeno progresso na cadeia produtiva da castanha-do-Brasil, sobre os passos representados por uma implementação de boas práticas de fabricação, planos de amostragem adequados, condições favoráveis de análise e certificação do produto final.

1.3.3. Legislação

As AFLs são as micotoxinas mais reguladas e muitos países têm legislação específica para a AFLs (VAN EGMOND et al., 2007). O limite de AFLs totais no Brasil é de 20 e 10 µg/kg para castanha-do-Brasil com e sem casca, respectivamente (BRASIL, 2011). Estes limites são comparáveis aos estabelecidos por países tais como Estados Unidos e Canadá e também recomendado pela Organização Mundial da Saúde e pela Organização para Alimentação e Agricultura, o que exigirá dos produtores brasileiros a implementação de medidas de qualidade para se adequarem a essa nova legislação.

Em 1998, a União Europeia (EU), através da Diretiva 98/53/CE (EU, 1998) estabeleceu exigências referentes aos métodos de colheita de amostras e os métodos de análises para o controle oficial de teores de certos contaminantes em alimentos, incluindo AFLs e a castanha-do-Brasil a serem cumpridas. Já em 2001, por meio do regulamento N.º 466/2001/EC foi estabelecido o limite máximo de AFLs para castanha-do-Brasil destinada ao mercado europeu, com redação no regulamento CE N.º 563/2002, fixando os limites de AFLs em: 2 µg/kg (AFB₁) ou 4 µg/kg (AFB₁ + AFB₂ + AFG₁ + AFG₂) e em 2003, por meio da Diretiva 2003/494/EC, estabeleceu condições especiais para a importação de castanha-do-Brasil com casca (EU, 2003). Isto levou o governo brasileiro a definir legislações com normas para cadeia produtiva, envolvendo a amostragem (coleta, preparo e tamanho da amostra), método analítico e de preparo, bem como diretrizes para aplicação dos princípios das boas práticas de fabricação/manejo (BPF/BPM) e do

sistema de análises e pontos críticos de controle (APPCC) pelos extrativistas e usinas de beneficiamento (BRASIL, 2010). Em 2010, a Comissão da União Europeia alterou os níveis de AFLs, fixando limites de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para AFB_1 e 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para AFLs totais em amêndoas prontas para consumo humano e, 8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ em castanhas para beneficiamento.

Apesar dos limites impostos pela EU serem muito restritivos, houve uma tentativa na recente regulamentação (EU, 2010) para respeitar os limites máximos permitidos pelo *Codex Alimentarius* para nozes de árvores.

A tabela 5 apresenta os limites máximos permitidos para AFLs em alimentos em diversos países.

Tabela 5 - Limites máximos estabelecidos para aflatoxinas em alimentos em diversos países.

País	Limite máximo (µg.kg-1)	Alimentos
África do Sul	5 (AFB1) 10 (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2)	Todos os alimentos
Austrália	5 (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2)	Todos os alimentos
Canadá	15 (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2)	Nozes e produtos
Estados Unidos	20 (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2)	Todos os alimentos
Filipinas	20 (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2)	Nozes e seus produtos
Índia	30 (AFB1)	Todos os alimentos
Israel	5 (AFB1) 15 (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2)	Nozes, amendoim, farelo de milho, figos e seus produtos
Japão	10 (AFB1)	Alimentos em Geral
Nova Zelândia	5(AFB1+AFB2+AFG1+AFG2)	Todos os alimentos
União Européia	2 (AFB1)	Amendoim, nozes em geral e frutas secas para consumo direto ou como ingrediente de alimentos.
	4 (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2)	
	10 (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2)	Castanha-do-Brasil sem casca para consumo direto
	15 (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2)	Castanha-do-Brasil sem casca para processamento posterior
América Latina		
Argentina	Zero (AFB1)	Alimento infantil
	20 (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2)	Derivados de amendoim
	5 (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2)	Milho
	30 AFB1	Farinha de Soja
Brasil	5 (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2)	Cereais e produtos de cereais, exceto milho e derivados, incluindo cevada malteada
	5 (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2)	Feijão
	10 (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2)	Castanhas exceto Castanha-do-Brasil, incluindo nozes, pistachios, avelãs e amêndoas.
	20 (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2)	Frutas desidratadas e secas
	10 (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2)	Castanha-do-Brasil com casca para consumo direto
	15 (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2)	Castanha-do-Brasil sem casca para consumo direto
	1 (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2)	Castanha-do-Brasil sem casca para processamento posterior
	1 (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2)	Castanha-do-Brasil sem casca para processamento posterior
	10 (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2)	Alimentos à base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)
	5 (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2)	
20 (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2)		

	20 (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2) 20 (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2)	Fórmulas infantis para lactentes e fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância Amêndoas de cacau Produtos de cacau e chocolate Especiarias: Capsicum spp. (o fruto seco, inteiro ou triturado, incluindo pimentas, pimenta em pó, pimenta de caiena e pimentão-doce); Piper spp. (o fruto, incluindo a pimenta branca e a pimenta preta) Myristica fragrans (noz-moscada) Zingiber officinale (gingibre) Curcuma longa (curcuma). Misturas de especiarias que contenham uma ou mais das especiarias acima indicadas Amendoim (com casca), (descascado, cru ou tostado), pasta de amendoim ou manteiga de amendoim. Milho, milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído), farinhas ou sêmolos de milho.
Bolívia ^a	NH ^b	NH ^b
Colômbia	20 (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2) 30 (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2) 10 (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2) 20 (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2)	Alimentos Cereal (sorgo, mileto) Oleaginosas Sementes de gergelim
Mercosul	20 (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2) 20 (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2) 20 (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2)	Amendoim (com/sem pele, torrado, pasta de amendoim) Farinha de milho (integral/sem germen) Milho
Peru	10 (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2)	Alimentos
Suriname	5 AFB1 5 AFB1 30 (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2)	Amendoim, Produtos de amendoim Leguminosas Milho
Uruguay	30 (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2) 20 (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2) 30 (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2) 30 (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2) 10 (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2) 3 (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2)	Amendoim (Produtos de amendoim) Alimentos e Especiarias Derivados de soja Frutas secas Côco Alimento infantil

Fonte: adaptado Pacheco, Scussel (2006)

^a maior exportador de castanha-do-Brasil

^b não há legislação

1.3.4. Metodologias analíticas para aflatoxinas

Os métodos utilizados para a análise de AFLs estão principalmente fundamentados em cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de fluorescência e imunoenaios (AOAC, 2005). Para a escolha de um método de avaliação de AFLs em castanha do Brasil é necessário levar em conta os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) a fim de atender as exigências da legislação.

A técnica de CCD é recomendada pela AOAC (2005) para determinação de AFLs em diversos produtos. O baixo custo e a simplicidade são as principais vantagens dos procedimentos analíticos baseados na CCD. O método tem sido eficiente na obtenção dos resultados em diversas pesquisas (PACHECO, 2003; SCUSSEL, 2004).

Xavier e Scussel (2008) desenvolveram um método para determinação de AFLs em castanha do Brasil utilizando espectrometria de massa/massa (MS/MS) acoplado a um cromatógrafo líquido (LC). O sistema LC-MS/MS mostrou alta sensibilidade, ou seja, capacidade de detecção de níveis muito baixos das toxinas (0, 195), além de rapidez e segurança dos resultados. Em outro estudo, Pacheco e Scussel (2007) confirmaram a sensibilidade do método por LC-MS/MS na avaliação de AFLs em castanha do Brasil tipo exportação onde o LOD e o LOQ obtidos foram 0, 195 e 0,39, respectivamente.

1.4. Métodos de descontaminação para micotoxinas

Atualmente não há tecnologia disponível para eliminar a contaminação de alimentos por micotoxinas (SHAPIRA e PASTER, 2004; HALÁSZ et al., 2009). A maioria das estratégias atuais de redução de micotoxinas são baseadas na prevenção, seja na fase pré ou pós-colheita, por exemplo, sobre a segregação de grãos contaminados após a colheita (VENÂNCIO e PATERSON, 2007). Estratégias para a remoção ou inativação de micotoxinas são aplicadas em uma abordagem caso a caso (SANT'ANA et al., 2008).

Métodos físicos, químicos ou biológicos são exemplos de métodos de controle que ainda não têm uma ampla aplicação (FREITAS-SILVA e VENÂNCIO, 2010). A falta de soluções práticas para controlar a contaminação por micotoxinas no campo, na colheita e nos produtos transformados leva à busca de alternativas para a sua eliminação parcial ou total.

1.4.1. Métodos químicos

A detoxificação de produtos contaminados por inativação através de reações químicas, alta pressão ou extração, usando um solvente orgânico ou uma combinação destes, tem sido avaliada para o problema de aflatoxina desde 1960. A degradação de AFLs também pode ocorrer, durante o processamento de alimentos e também pelo uso de aditivos, os quais são compostos relativamente seguros em certos níveis utilizados. Esta classe de micotoxinas tem sido a mais estudada pelos diferentes métodos de detoxificação. Quimicamente, algumas micotoxinas podem ser destruídas pelo uso de hidróxido de cálcio (BAUER, 1994), ozônio (MCKENZIE et al., 1997; INAN et al., 2007; FREITAS-SILVA e VENANCIO, 2010; ALENCAR et al., 2012; GIORDANO et al., 2012) ou amônia (THIESEN, 1977; PARK, 1993). Recentemente um estudo tem avaliado a aplicação de hidrossulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) sob diferentes pressões na redução de AFLs e ocratoxina A (OTA) em pimenta preta. As reduções máximas de OTA, AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 para o tratamento com 2% de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ foram 96,0 %, 96,1%, 77,7%, 100% e 100%, respectivamente (JALILI e JINAP, 2012).

1.4.2. Métodos físicos

O beneficiamento de grãos vem demonstrando ser capaz de reduzir os níveis tanto fúngicos como de micotoxina, sendo esta redução dependente da espécie fúngica e tipo de toxina. Recentemente um estudo realizado verificou a modelagem cinética de conversão de AFB1 em milho, amendoim e arroz durante os tratamentos térmicos, contribuindo com o desenvolvimento do processamento de alimentos (ZHANG et al., 2011).

Métodos físicos e eletrônicos de separação e controle de espécies contaminantes em amendoim têm sido extremamente usados por indústrias que beneficiam este produto para reduzir os níveis de AFLs, já que estes grãos estão destinados a consumo humano (ZOVICO et al., 1999). Mas esta não tem sido a forma mais eficiente de detoxificação, pois os produtos que não tem evidência visível do prejuízo ocasionando por fungo podem ainda assim conter micotoxinas em níveis significativos.

Durante o processo de algumas nozes de árvores, o desenvolvimento de sistemas informatizados e equipamentos para a triagem têm sido estudados (JARIMOPAS e JAISINI, 2008). De acordo

com De Mello e Scussel (2007), entre os fatores que podem ser considerados para a aplicação de uma triagem automatizada são: peso, comprimento, largura, espessura, mc, Aw e cromaticidade.

Outro método físico de descontaminação envolve a utilização de materiais adsorventes com capacidade para se ligarem eficazmente às micotoxinas. Exemplos destes materiais são o carvão ativado, a colestiramina (SORIANO e DRAGACCI, 2004), o aluminossilicato de cálcio e sódio hidratado e a montmorilonite egípcia (ALY et al., 2004). Di Natale et al. (2009) testaram diferentes tipos de adsorventes naturais para a remoção de aflatoxinas em leite bovino onde o carvão ativado mostrou a maior eficiência ($n > 90\%$ para AFMs = $0,5 \mu\text{g/kg}$). A radiação gama também tem sido utilizada para avaliar os efeitos sobre a carga fúngica e contaminação por micotoxinas em diferentes matrizes (AQUINO et al, 2005; BRAGHINI et al., 2009; AQUINO et al., 2010; IQBAL et al., 2012). Estudos recentes tem relatado a eficácia da extrusão termoplástica na redução de AFLs em farinha de amendoim (SAALIA e PHILLIPS, 2011a; SAALIA e PHILLIPS, 2011b). YAZDANPANA et al., (2005), investigaram o efeito da torrefação sobre a degradação das aflatoxinas em pistaches contaminados onde todos os tratamentos testados apresentaram índice de degradação de AFLs (variando de 17 a 63%), no entanto, o produto resultante não era comestível.

1.4.3. Métodos biológicos

Nos últimos tempos tem sido também referenciado o recurso a compostos presentes em extratos de plantas ou a modificações genéticas (SORIANO e DRAGACCI, 2004). Recentemente, foi descrito a inibição da produção de AFLs por *A. flavus* pela redução do stress oxidativo causado por antioxidantes naturais encontrados em nozes de árvores, tais como os taninos hidrolisáveis, flavonóides e ácidos fenólicos (MAHONEY et al., 2010). Os ácidos tânico, caféico e gálico encontrados na casca da amêndoa foram adicionados ao meio de cultura contendo *Aspergillus flavus* e a produção de AFLs foi reduzida em até 99,8%. Há evidências de que as tensões oxidativas das AFLs são exacerbados pelo fungo e, portanto, compostos que aliviam o stress oxidativo podem limitar a acumulação de AFLs. Portanto, o aumento da atividade antioxidante dos compostos na amêndoa pode restringir a capacidade de biossíntese de AFLs por *A. flavus* e, conseqüentemente, atingir a conformidade com os limites regulamentares (MAHONEY et al., 2010). Na mesma linha de pesquisa, o uso de agentes biológicos para controlar micotoxinas é possível. É notório que a ação do ácido

lático de muitas bactérias tem, inibido o crescimento de cepas, e a síntese de micotoxinas (HASKARD et al., 2001; MOKOENA et al., 2006; GRATZ et al., 2006; FUCHS et al., 2008).

1.5. Substâncias antifúngicas naturais

1.5.1. Antifúngicos naturais

Produtos antifúngicos químicos foram utilizados para a conservação de cereais armazenados (PASTER et al., 1995). Devido a considerações econômicas e de saúde, extratos de plantas naturais podem proporcionar um método alternativo para proteger os alimentos da contaminação por fungos e micotoxinas.

Óleos essenciais, bem como compostos derivados de plantas aromáticas possuem uma vasta gama de atividades das quais a atividade antimicrobiana é a mais estudada (BURT, 2004). As suas aplicações como conservantes em alimentos ou antissépticos e desinfetantes são amplamente estudadas (HOLLEY e PATEL, 2005). A este respeito, óleos essenciais de plantas e os seus compostos podem oferecer um grande potencial. Alguns óleos essenciais e os seus componentes são compostos bioativos de óleos essenciais que são utilizados comercialmente como aditivos alimentares por meio de tecnologias de encapsulamento (BURT, 2004; PRAKASH et al., 2010).

Diversos outros substratos de origem vegetal com atividade antifúngica também têm sido estudados como alternativa para prevenir a ação dos fungos toxigênicos (RAZZAGHI-ABYANEH et al., 2008; SINDHU et al., 2011; DURAI PANDIYAN e IGNACIMUTHU, 2011; SALAS et al., 2011; SHUKLA et al., 2012; MISHRA et al., 2012; TIAN et al., 2012; KOMALA et al., 2012).

1.5.2. Métodos de aplicação em alimentos

A gestão da contaminação fúngica de sementes/grãos colhidos é baseada em tratamentos físicos (resfriamento, aeração e secagem rápida) e químicos com amônia, conservantes de alimentos ou mesmo com pesticidas. Como a maioria destas estratégias de controle requer produtos químicos caros e conhecimentos técnicos para monitorar os parâmetros físicos (temperatura e pressão), eles não são acessíveis para agricultores de subsistência rural (ATANDA et al., 2007). Além disso, o uso generalizado e indiscriminado de conservantes químicos ou pesticidas tem desvantagens significativas por não ser econômico,

manipulação de perigos, resíduos tóxicos nos grãos e mais importante, o surgimento de microorganismos de origem alimentar (ISHII, 2006).

Estes riscos têm aumentado a consciência pública para alternativas mais seguras aos conservantes químicos, que sejam acessíveis, simples de aplicação, não-tóxico para seres humanos e plantas, e que tenha um amplo espectro de fungitoxicidade. Os óleos essenciais (EOS) foram classificados como GRAS (Geralmente Reconhecido como Seguro) (BURT, 2004) e têm sido recomendados como conservantes para produtos alimentares com base em seus efeitos antimicrobianos e anti-micotoxigênicos (MISHRA e DUBEY, 1994; VARMA e DUBEY, 2001; KUMAR et al., 2007; KUMAR et al., 2008; RASOOLI et al., 2008; RAZZAGHI-ABYANEH et al., 2008; TATSADJIEU et al., 2009).

Em todo o mundo, várias tentativas foram feitas para avaliar diferentes métodos de desintoxicação ou inibição da produção de AFLs por fungos (BULLERMAN et al., 1977; FARAG et al., 1989; PATKAR et al., 1993; SOHER, 1999; SOLIMAN e BADEAA, 2002; MARAQA et al., 2007). Alguns estudos foram realizados para investigar o efeito de substâncias naturais sobre o crescimento fúngico e produção de micotoxinas em uma matriz de alimento (MONTES-BELMONT e CARVAJAL, 1998; ATANDA et al., 2007; MORAIS et al., 2008; KOMALA et al., 2012; ESPITIA et al., 2012).

1.6. Guaraná (*Paullinia cupana* Mart.)

1.6.1. Produção

O guaraná – *Paullinia cupana* Kunth ex H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke, família Sapindaceae – é uma trepadeira lenhosa originária da Amazônia Central, podendo atingir 10 m de altura, gerando cachos com até 50 frutos, cada qual com uma a três sementes (Figura 5 a1 e 5 a2). Estas são valorizadas por seu alto conteúdo de cafeína, que pode variar de 2,5 e 6%, e ainda por seus efeitos estimulatórios quando consumidas como bebida; possui também propriedades adstringentes e antioxidantes, devidas à presença de taninos condensados ou proantocianidinas, que são polímeros de catequina e/ou epicatequina (HENMAN, 1982; CARLSON e THOMPSON, 1998; SIMÕES et al., 2003). O conteúdo de cafeína do guaraná é significativamente maior (4 vezes) que o do café, 10 vezes maior do que o do chá, e 30 vezes maior do que o do cacau (EDWARDS et al., 2005). Além disso, as sementes de guaraná são constituídas por polissacarídeos, como amido, celulose,

pectina, mucilagens, proteínas e óleo, além de teofilina, teobromina e saponinas (SIMÕES et al., 2003; HEARD et al., 2006).

Crescendo em “terra firme”, latossolo profundo e ácido, o guaranazeiro é uma trepadeira lenhosa, que busca a direção da luz disponível na parte superior da floresta. As inflorescências começam a se expandir no período menos chuvoso, de maio a junho, sinalizando a época de floração. Os frutos do guaraná apresentam coloração vermelha, com características capsulares, contendo de uma a três sementes (ERICKSON *et al.*, 1984), como mostrado na Figura 5 (a3). O fruto é pequeno e redondo, negro e brilhante, assumindo uma forma de capsula, em cujo interior há somente uma semente. Uma vez atingida a maturação completa, abre-se parcialmente, deixando a mostra o pericarpo de cor castanha parcialmente coberto por uma substância branca (arilo) (CORREA, 1984; FARIA et al., 2000). A colheita é realizada entre outubro e janeiro quando os frutos estão maduros. Os cachos são colhidos com as mãos e colocados em aturás ou jamaxis (semelhantes a paneiros) e transportados para os barracões.

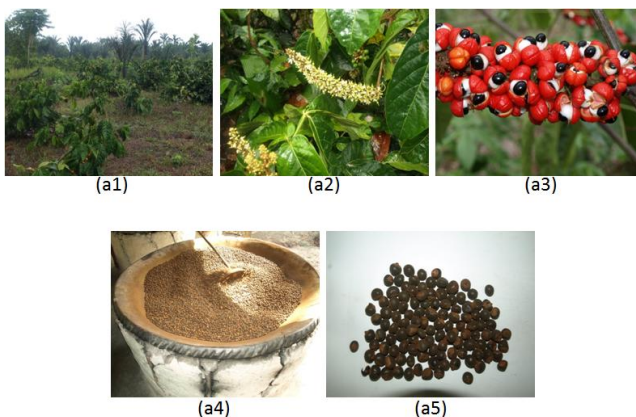
Ducke, um dos primeiros botânicos a estudar o guaraná, classificou a espécie em duas subespécies ou variedades geográficas: *Paullinia cupana* (Kunth) var. *typica* (existente principalmente na Venezuela e Colômbia) e *Paullinia cupana* (Kunth) var. *sorbilis* [(Mart.) Ducke] (oriunda da flora brasileira) (CORREIA, 1984). Há aproximadamente 195 espécies desse gênero distribuídas na América tropical e subtropical. Destas, pelo menos nove espécies são descritas como nativas do Brasil (ÂNGELO, 2008), que é praticamente o único país a produzir guaraná em escala comercial em cultivos racionais e sistemáticos, sendo que a maior parte é proveniente do Estado da Bahia, seguido por Amazonas e Mato Grosso (SUFRAMA, 2003).

A produção brasileira anual de sementes de guaraná é de cerca de 3 mil toneladas, sendo que a maior parte (70 a 80%) é usada na preparação de refrigerantes e bebidas energéticas. Parte (15%) das sementes também é industrializada na forma de bastão e o restante é utilizado na produção de pós, extratos e xaropes, vendidos diretamente no mercado brasileiro (MAGNA et al., 2003; SIMÕES et al., 2003; EDWARDS et al., 2005; PAGLIARUSSI et al., 2006). Nos Estados Unidos, o guaraná foi aprovado como suplemento alimentar e também é utilizado como aromatizante natural de bebidas (CARLSON e THOMPSON, 1998; HULBERT et al., 1998).

O rendimento das sementes é de 70%, sendo a forma seca e levemente torrada, a única apropriada para consumo (MORAES et al., 2003; MAJHENIC et al., 2007) e de acordo com o Centro de Pesquisa

Agroflorestal da Amazônia Ocidental (CPAA, 2008) são comercializados de quatro diferentes formas: guaraná em rama (grãos torrado), guaraná em bastão (guaraná em rama triturado e pilado, moldado em formato de bastão, seco e defumado), guaraná em pó (grão torrado e moído) e xaropes (produto exclusivo de indústrias de considerável tecnologia e nível de capitalização). O fluxograma do beneficiamento do guaraná esta descrito na Figura 6.

Figura 5. Guaraná: (a1) Pomar de guaranazeiros. (a2) Flores de guaraná. (a3) Fruto com suas sementes (pardo-negra) entre a polpa (branca). (a4) Torrefação das sementes. (a5) Sementes isoladas de guaraná.



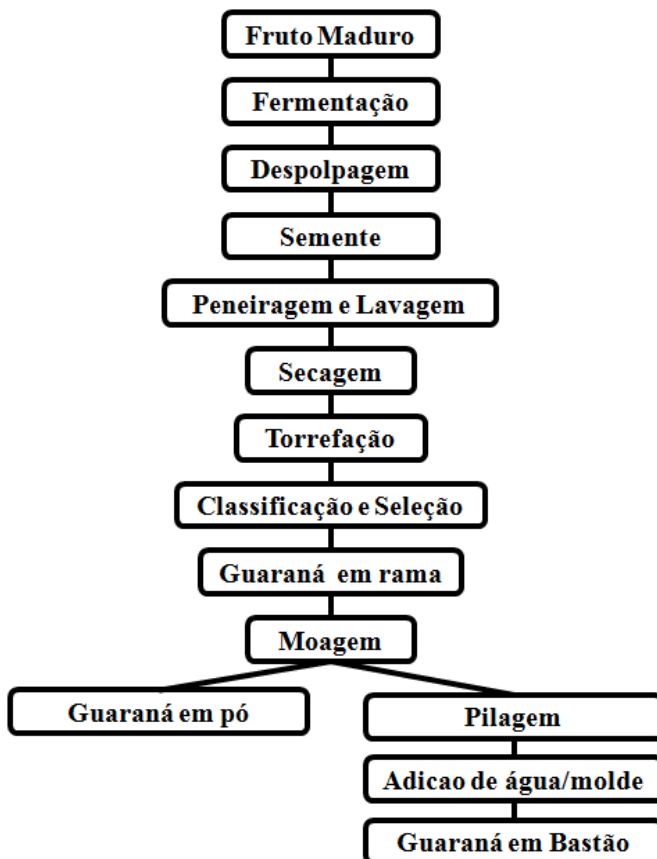
Fonte: autor (2012).

Os cachos são armazenados em galpões por quatro dias para sofrer leve fermentação e amolecimento das cascas. As sementes podem ser secas ao ar livre ou por processos artificiais. A separação das sementes da casca e do arilo e realizada em máquinas despulpadeiras. As sementes despulpadas são colocadas em uma peneira de arame e lavadas em água corrente, a fim de retirar os restos de casca e arilo que ficam na superfície da semente. Após este processo retira-se o raquis e os frutos são colocados para secar por 10 a 12 horas ao sol ou em estufas, no caso de empresas providas de mais tecnologia.

A torrefação das sementes e realizada em fornos de chapa (Figura 5 a4), com umidade entre 8 a 10%. Em seguida, as sementes são separadas em menores e maiores, em peneiras apropriadas. As sementes no ponto de torrefação ideal (Figura 5 a5) são selecionadas pela sua

coloração, descascadas e moídas em moinho de martelo, com peneiras finas, a fim de obter o produto na forma de pó.

Figura 6. Fluxograma do beneficiamento do guaraná.



Fonte: autor (2012).

1.6.2. Composição Química, atividade biológica e antimicrobiana.

A composição química do guaraná caracteriza-se pela presença de alcalóides tipo metilxantinas, tais como cafeína, teofilina e

teobromina, além de taninos, ácido gálico, saponinas, catequinas, epicatequinas e outros compostos em menor concentração (HERMAN, 1986; SEIDEMANN, 1998; MORAES et al., 2003; HEARD et al., 2006; USHIROBIRA et al., 2007). Podem ser identificados também as procianidinas B2, B3 e B4, que são dímeros compostos por unidades flavan-3-ol (USHIROBIRA et al., 2007).

O guaraná é um dos vegetais mais ricos em cafeína. O percentual de cafeína presente nas sementes do guaraná varia de 3,2 a 7%, sendo cerca de seis vezes superior ao encontrado nas sementes do café (BRENELLI, 2003; PAGLIARUSSI *et al.*, 2002). A cafeína é a substância psicoativa mais consumida em todo o mundo, sendo classificada entre os compostos com bases purínicas metiladas (metilxantinas), estruturalmente identificada como 1,3,7-trimetilxantina (TFOUNI *et al.*, 2007). Foi isolada pela primeira vez das sementes de café em 1819 por Friedlieb Ferdinand Runge (WALDVOGEL, 2003). Este alcalóide aumenta o estado de alerta do indivíduo, melhorando a capacidade cognitiva e a resistência ao cansaço físico (KUSKOSKI *et al.*, 2005).

A teobromina (3,7-dimetilxantina) tem ação diurética e a teofilina (1,3-dimetilxantina) tem predominantemente efeito broncodilatador (ALVES e BRAGAGNOLO, 2002; DE MARIA e MOREIRA, 2007). As substâncias catéquicas presentes no guaraná demonstram atividade antioxidante, antiviral, bactericida, moluscicida e de inibição de algumas enzimas extracelulares (SANTOS e MELLO, 2007; YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007).

As metilxantinas não são os únicos compostos responsáveis pelas propriedades terapêuticas do guaraná. A atividade antioxidante, por exemplo, está associada às elevadas concentrações de compostos fenólicos, como taninos, e a atividade antiinflamatória à presença de saponinas. A presença de teobromina e a teofilina nas sementes do guaraná justificam o efeito broncoprotetor, atividade imunomodulatória e antiinflamatória, além do melhoramento da circulação sanguínea e do retardo no envelhecimento precoce (KUSKOSKI *et al.*, 2005).

Diversas pesquisas sobre as propriedades medicinais do guaraná têm sido realizadas, principalmente nas últimas três décadas. Dentre as atividades verificadas destacam-se a inibição da agregação plaquetária *in vitro* e *in vivo* (BYDLOWSKI *et al.*, 1988; SUBBIAH e YUNKER, 2008), efeito protetor contra lesão gástrica induzida *in vivo* por etanol e indometacina (CAMPOS *et al.*, 2003), ações antígenotóxica *in vivo* (FUKUMASU *et al.*, 2006), antibacteriana e antioxidante *in vitro* (BASILE *et al.*, 2005).

Basile et al.(2005) avaliaram a peroxidação lipídica em adipócitos pelo método de MDA. Foi observada redução de 62,5% na peroxidação lipídica após tratamento com extrato etanólico de sementes de guaraná. Os autores também referem que o resultado esta relacionado à presença de polifenóis.

Resultado semelhante foi encontrado por Majhenic et al. (2007) em diferentes extratos (água, etanol, metanol e acetona) de sementes de guaraná, onde todos apresentaram elevado conteúdo de compostos fenólicos, capacidade de captação de radicais livres e efeito antioxidante.

1.7. Jucá (*Libidibia ferrea* Mart.)

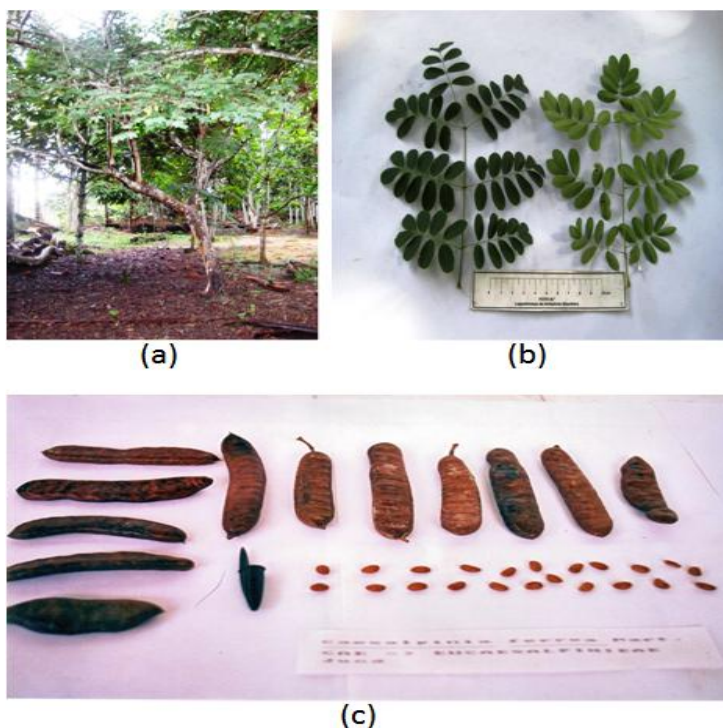
1.7.1. Produção

A espécie *Libidibia ferrea* Mart. é conhecida, principalmente, como jucá ou pau-ferro, havendo também outras designações populares como ibirá-obi, imirá-itá, muirá-obi, muiré-itá (CORRÊA, 1984). Os nomes populares refletem a diferença entre as variedades de *Libidibia ferrea*. As árvores da variedade *ferrea* são tratadas popularmente por “jucá” nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. Por outro lado, a variedade *leiostachya* é conhecida no sul e sudeste como “pau-ferro” (SILVA et al., 2004), nome atribuído a dureza de sua madeira. A árvore adulta de jucá (*Libidibia ferrea* Mart. var. *ferrea* Mart.) é descrita como árvores pequenas a medianas de até 10 m de altura (figura 7a), de tronco menor, ocorrendo comumente na vegetação de caatinga, no agreste e sertão nordestino onde seu crescimento é espontâneo em estados como o Ceará e na Bahia (PRANCE e SILVA, 1975). As folhas do jucá são bipinadas com ráquis de 16 cm de comprimento em média, e pínulas que variam de 5 a 11, opostas, em 1-5 pares (figura 7b).

Esta variedade foi introduzida na Amazônia por imigrantes nordestinos, possivelmente nos dois principais ciclos de migração caracterizados como a “época da borracha”, e hoje em estados como o Acre é uma planta presente nos quintais, sendo aproveitada como árvore de sombra e para produção de frutos com fins medicinais.

O fruto (figura 7c) é uma vagem lisa de até 9,6 cm de comprimento por 2,1 cm de largura, 1 cm de espessura, irregular, apresentando pericarpo duro, indeiscente, castanho avermelhados. As sementes marrom-claras, duras, lisas e sem arilo (PRANCE e SILVA, 1975) (figura 7c), classificando-se como ortodoxas segundo o seu padrão de armazenamento.

Figura 7. Jucá: (a) Árvore. (b) Folhas. (c) Frutos e sementes.



Fonte: Souza, L. A. – Departamento de Ciências Agrônômicas– INPA / AM.

O cultivo do jucá pode ser realizado em áreas bem drenadas, seu crescimento é rápido e pode ser consorciada com outras espécies, podendo ser cultivado em praças, quintais e jardins. Na Amazônia Central estudos de fenologia registraram que o jucá floresce nos meses de março e abril e frutifica de maio a agosto (PORTELA et al., 2001).

1.7.2. Composição Química, atividade biológica e antimicrobiana.

Os estudos preliminares do extrato hidroetanólico da casca do caule e das folhas de jucá demonstraram a presença de flavonóides, saponinas, taninos, cumarinas, esteróides e substâncias fenólicas (GONZÁLES et al., 2004). Dentre os constituintes químicos destacam-

se a presença de polifenóis, onde o ácido gálico e o ácido elágico podem ser as possíveis substâncias responsáveis por parte da atividade biológica e terapêutica dos frutos da espécie (UEDA et al., 2004).

Adicionalmente, o extrato aquoso dos frutos do jucá foi caracterizado contendo alcalóides, antraquinonas, açúcares, flavonóides, taninos, saponinas, sesquiterpenos, lactonas e triterpenos. Destes, os taninos são os compostos majoritários do extrato, podendo ser os responsáveis pela atividade antidiabética (BALBACH, 1988; CARVALHO, 1993).

Coelho (2004) descreve o perfil químico do extrato metanólico das folhas de jucá, contendo uma mistura de triterpenos, um derivado do ácido gálico e três flavonóides C-glicosilado: isoorientina, orientina e vitexina. Além dos flavonóides C-glicosilados, foi isolado o galato de metila, que pode ser precursor biossintético de metabólitos secundários naturais (cumarinas, lignanas e neolignanas) (DEWICK, 1998). Os triterpenos, isolados desta espécie, são os mais comuns encontrados em plantas superiores e, dentre as atividades biológicas atribuídas a estas substâncias, pode-se citar a atividade anti-inflamatória do lupeol e da alfa e beta amirina (GEETHA et al., 2001).

Bariani (2007) demonstrou que o extrato de sementes de jucá não teve efeito sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum guaranicola*, mas teve efeito sobre a esporulação, o que indica que a atividade antifúngica *in vitro* destes extratos sobre este fungo está baseada fundamentalmente na inibição da esporulação, uma vez que a diminuição do número de conídios das colônias foi crescente de acordo com as concentrações de proteínas totais testadas. A atividade antimicrobiana foi testada, utilizando extrato do fruto de jucá, com resultado favorável contra patógenos orais (SAMPAIO et al., 2009).

Apesar das suas propriedades antimicrobianas, a maioria dos estudos com o extrato bruto de jucá é focado em seu elevado teor de polifenóis, analgésico, anti-inflamatório, anti-úlceras, e as propriedades quimiopreventivas do cancro (BACCHI et al., 1995; QUEIROZ et al., 2001; NAKAMURA et al., 2002).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, E. R.; FARONI, L. R.; SOARES, Nde F.; DA SILVA, W.A.; CARVALHO, M. C. Efficacy of ozone as a fungicidal and detoxifying agent of aflatoxins in peanuts. **Journal of the Science and Food Agriculture**, v. 92, n. 4, p. 899-905, mar. 2012.

ALMEIDA, C. P. **Castanha-do-pará, sua exportação e importância na economia amazônica**. SAI n. 19. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 86 p, 1963.

ALVES AB, BRAGAGNOLO N. Determinação simultânea de teobromina, teofilina e cafeína em chás por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, p. 237- 243, 2002.

ALY, S.E.; ABDEL-GALIL, M.; ABDEL-WAHAB, M.A. Application of adsorbent agents technology in the removal of aflatoxin B1 and fumonisin B1 from malt extract. **Food Chemical and Toxicology**, v. 42, p. 1825-1831, 2004.

ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J.G. S.; STREICH, R.; MARX, F. Seed Composition of Amazonian *Lecythidaceae* Species: Part 3 in the Series .Studies of Edible Amazonian Plants. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 12, p. 37- 51, 1999.

ÂNGELO, P.C.; NUNES-SILVA, C.G.; BRÍGIDO, M.M.; AZEVEDO, J.S.; ASSUNCAO, E.N.; SOUSA, A.R.; PATRÍCIO, F.J.; REGO, M.M.; PEIXOTO, J.C.; OLIVEIRA, W.P. Jr.; FREITAS, D.V.; ALMEIDA, E.R.; VIANA, A.M.; SOUZA, A.F.; ANDRADE, E.V.; ACOSTA, P.O.; BATISTA, J.S.; WALTER, M.E.; LEONIL, L.; ANJOS, D.A.; COIMBRA, R.C.; BARBOSA, M.H.; HONDA, E.; PEREIRA, S.S.; SILVA, A.; PEREIRA, J.O.; SILVA, M.L.; MARINS, M.; HOLANDA, F.J.; ABREU, R.M.; PANDO, S.C.; GONCALVES, J.F.; CARVALHO, M.L.; LEAL-MESQUITA, E.R.; da SILVEIRA, M.A.; BATISTA, W.C.; ATROCH, A.L.; FRANCA, S.C.; PORTO, J.I.; SCHNEIDER, M.P.; ASTOLFI-FILHO, S. Guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*), an anciently consumed stimulant from the Amazon rain forest: the seeded-fruit transcriptome. **Plant Cell Reports**, v. 27, p. 117–124, 2008.

AOAC – Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis of AOAC International 18th*, Horwitz, W. and Latimer, G. W. Jr. eds. Gaithersburg, Maryland, USA. 2005.

AQUINO, S.; GONCALEZ, E.; ROSSI, M.H.; NOGUEIRA, J.H.C.; REIS, T.A.; CORREA, B. . Evaluation of Fungal Burden and Aflatoxin Presence in Packed Medicinal Plants Treated by Gamma Radiation. **Journal of Food Protection**, v. 73, p. 932-937, 2010.

AQUINO, S.; FERREIRA, F.; RIBEIRO, D.H.B.; CORRÊA, B.; GREINER, R.; VILLAVICENCIO, A.L.C.H. Evaluation of viability of *Aspergillus flavus* and aflatoxins degradation in irradiated samples of maize. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n.4, p. 352-356, 2005.

ARRUS, K.; BLANK, G.; CLEAR, R.; HOLLEY, R.A. e ABRAMSON, D. Microbiological and aflatoxin evaluation of Brazil nut pods and the effects of unit processing operations. **Journal of Food Protection**, v. 68, p. 1060-1065, 2005b.

ARRUS, K.; BLANK, G.; ABRAMSON, D.; CLEAR, R.; HOLLEY, R.A. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. **Journal of Stored Products Research**, v. 41, p. 513-527, 2005a.

APIZ, Associação do Povo Indígena Zoró. **Boas práticas de coleta, armazenamento e comercialização da castanha-do-Brasil: Capacitação e intercâmbio de experiências entre os povos da Amazônia mato-grossense com manejo de produtos florestais não-madeireiros**. Projeto de Conservação e Uso Sustentável da Biodiversidade das Florestas do Noroeste de Mato Grosso Programa Integrado da Castanha - PIC, Cuiabá/MT, Defanti Editora, 42 p., 2008.

ATANDA, O.O.; AKPAN, I.; OLUWAFEMI, F. The potential of some spice essential oils in the control of *A. parasiticus* CFR 223 and aflatoxin production. **Food Control**, v. 18, p. 601–607, 2007.

BACCHI, E.; SERTIÉ, J. A. Antiulcer action of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea* in rats. **Planta Medica**. V. 60, n. 2, p. 118-20, 1994.

BACCHI, E.M.; SERTIÉ, J.A.; VILLA, N.; KATZ, H. Antiulcer action and toxicity of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea*. **Planta Medica**, v. 61, n.3, p. 204-207, 1995.

BALBACH, A. **As plantas curam**. 3ed. São Paulo, Editora Missionária, p.428, 1988.

BARIANI, A. **Propriedades bioquímicas e biológicas de proteínas de sementes de leguminosas arbóreas da Amazônia**. 2007. 122 f. Dissertação de mestrado (Ciências de Florestas Tropicais) - INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia), 2007.

BASILE, A.; FERRARA, L.; PEZZO, M. D.; MELE, G.; SORBO, S.; BASSI, P.; MONTESANO, D. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n.1, p. 32-36, 2005.

BAUER, J. Möglichkeiten zur Entgiftung mykotoxin-haltiger Futtermittel. **Monatsh. Veterinärmed.** V. 49, p. 175-181, 1994.

BAYMAN, P.; BAKER, J.; MAHONEY, N. *Aspergillus* on tree nuts: incidence and associations. **Mycopathologia**, v. 155, p. 161-169, 2002.

BERNO, L.I.; POETA, P.T.; MARÓSTICA JÚNIOR, M.R. Effects of selenium derived Pie Brazil-nut on the concentration of reduced glutathione (GSH) in Wistar rats. **Feeding and nutrition**, v. 21, n. 2, p. 231-239, 2010.

BEZERRA, V.S. **As toxinas nos alimentos**. Disponível em: <http://www.embrapa.br/embrapa/imprensa/artigos/2005/artigo.2005-06-14.3711997257>. Acesso em 16 jul 2012, 16:45:40.

BODÓ, E.T.; STEFÁNKA, Z.; IPOLYI, I.; SÖRÖS, C.; DERMOVICS, M.; FODOR, P. Preparation, homogeneity and stability studies of a candidate LRM for Se speciation. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 377, p. 32-38. 2003.

BORBA, A.M.; SARMENTO, S.B.S.; LEONEL, M. Efeito dos parâmetros de extrusão sobre as propriedades funcionais de extrusados da farinha de batata- doce. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 835, 843, 2005.

BRAGHINI, R.; SUCUPIRA, M.; ROCHA, L.O.; REIS, T.A.; AQUINO, S.; CORRÊA, B. Effects of gamma radiation on the growth of *Alternaria alternata* and on the production of alternariol and alternariol monomethyl ether in sunflower seeds. **Food Microbiology**, p. 1-5, 2009.

BRASIL. **Decreto nº 51.209, de 18/08/1961.** *Aprova as novas especificações para a classificação e fiscalização da exportação da Castanha-do-Brasil.* Brasília/DF: Diário Oficial de Brasília, p.853-855. 1961.

BRASIL. Ministério do Interior. **Estudos e Pesquisas sobre a Castanha-do-Pará.** Belém/PA: SUDAM, p.97. 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. **Especificações para a padronização, classificação e comercialização interna da Castanha do Brasil.** Brasília/DF: v.08, nº19, Dez.1998.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 11, 22/03/2010.** Critérios e procedimentos para o controle higiênico-sanitário da castanha-do-brasil e seus subprodutos, destinados ao consumo humano. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 23 mar. 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução n.7, de 18 de Fevereiro de 2011.** Brasília/DF: Diário Oficial da União. Seção 1, 22 de Fevereiro de 2011.

BRENELLI, E.C.S. A extração de cafeína em bebidas estimulantes: uma nova abordagem para um experimento clássico em química orgânica. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 136-138, 2003.

BULLERMAN, L.B.; LIEW, F.Y.; SEIER, S.A. Inhibition of growth and aflatoxin production by cinnamon and clove oils, cinnamic aldehyde and eugenol. **Journal of Food Science**, v. 42, n. 6, p. 1107-1109, 1977.

BULLERMAN, L.B.; SCHROEDER, L.L.; PARK, K.Y. Formation and control of mycotoxins in food. **Journal Food Protection**, v.47, n.8, p. 637-646, 1984.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

BYDLOWSKI, S.P., YUNKER, R.L., SUBBIAH, M.T.R. A novel property of an aqueous guarana extract (*Paullinia cupana*): inhibition of platelet aggregation in vitro and in vivo. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 21, p. 535– 538, 1988.

CAC - Codex Alimentarius Commission. **Proposed draft maximum level for total aflatoxins in brazil nuts**. ALINORM 10/33/41 Appendix V, p.47. Joint FAO/WHO Food Standards Program, FAO, Rome, 2010.

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

CAMARGO, I.P.; CASTRO, E.; GAVILANES, M.L. Aspectos da anatomia e morfologia de amêndoas e plântulas de castanha-do-Brasil. **CERNE**, v. 6, n. 2, p. 011-018, 2000.

CAMPOS, A.R.; BARROS, A.I.S.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) offers protection against gastric lesions induced by ethanol and indomethacin in rats. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 10, p. 1199-1202, 2003.

CARDARELLI, H.R.; OLIVEIRA, A.J. Conservação do leite de Castanha-do-Brasil. **Scientia Agricola**, v. 57, p. 617- 622, 2000.

CARLSON, M.; THOMPSON, R. D. Liquid chromatographic determination of methylxanthines and catechins in herbal preparations containing guaraná. **Journal of AOAC International**, v. 81, n. 4, p. 691-701, 1998.

CARVALHO, J.C.T.; TEIXEIRA, J.R.M.; SOUZA, P.J.C. Preliminary studies of analgesic and Anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 53, p. 175-178, 1996.

CARVALHO, J.C.T. *Caesalpinia ferrea* (Pau-ferro): **Avaliação da atividade antiinflamatória e analgésica**. 1993. 125 f. (Dissertação Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - FCF/USP, Ribeirão Preto-SP, 1993.

CARVALHO, A.V.; VASCONCELOS, M.A.M.; SILVA, P.A.; ASSIS, G.T.; ASCHERI, J.L.R. Technological characterization of third generation extruded from cassava (*Manihot esculenta* crantz) and pupunha (*Bactris gasipaes* kunth.) flour. **Science and Agro-technology**, v. 34, n. 4, p. 995-1003, 2010.

CAVALIERE, C.; FOGLIA, P.; GUARINO, C.; MARZIONI, F.; NAZZARI, M.; SAMPERI, R.; LAGANA, R. Aflatoxin M1 determination in cheese by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1135, p. 135-141, 2006.

CHEN, C.H.; WANG, M.H.; WANG, J.H.; HUNG, C.H.; HU, T.H.; LEE, S.C.; TUNG, H.D.; LEE, C.M.; CHANGCHIEN, C.S.; CHEN, P.F.; HSU, M.C.; LU, S.N. Aflatoxin exposure and hepatitis C virus in advanced liver disease in a hepatitis C virus- Endemic area in Taiwan. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 4, p. 747-752, 2007.

CHUNHIENG, T.; PÉTRITIS, K.; ELFAKIR, C.; BROCHIER, J.; GOLI, T.; MONTET, D. Study of selenium in the protein fractions of the Brazil nut, *Bertholletia excelsa*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 4318-4322, 2004.

CHUNHIENG, T.; HAFIDI, A.; PIOCH, D.; BROCHIER, J.; MONTET, D. Detailed study of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) oil micro-compounds: phospholipids, tocopherols and sterols. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.19, p. 1374–1380, 2008.

CIRAD - Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement. **Validation and transfer to the**

key stakeholders of a sustainable and effective aflatoxin management system in the Brazil nut production chain for recovering and consolidating export markets, particularly in Europe. CIRAD, 2008. STDF 114. Final Report, 2008.

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

COELHO, R.G. **Estudo químico de *Zollernia ilicifolia* (Fabaceae), *Wilbrandia ebracteata* (Cucurbitaceae) e *Caesalpinia ferrea* (Caesalpinaceae).** 2004. 183 f. (Tese de Doutorado) Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, SP, 2004.

COHEN, K. O.; CHISTE, R.C.; MATHIAS, E.A. **Production of flour partially defatted Brazil-nut.** Embrapa Eastern Technical Circular, 42pp, 2007.

COMINETTI, C.; BORTOLI, M.C.; PURGATTO, E.; ONG, T.P.; MORENO, F.S.; GARRIDO, A.B.; COZZOLINO, S.M.F. Associations between glutathione peroxidase-1 Pro198Leu polymorphism, selenium status, and DNA damage levels in obese women after consumption of Brazil nuts. **Nutrition**, v. 27, p. 891–896, 2011.

CORREIA, P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil**, Ed. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, v. 3, p. 545, 1984.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Vol. I, Imprensa Nacional (Ed.) Rio de Janeiro, p. 458-459.1984.

COSTA, P.A.; BALLUS, C.A.; TEIXEIRA-FILHO, J.; GODOY, H.T. Phytosterols and tocopherols content of pulps and nuts of Brazilian fruits. **Food Research International**, v. 43, p. 1603–1606, 2010.

COTTY, P.J., CARDWELL, K.F. Divergence of West African and North American communities of *Aspergillus* section *Flavi*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 2264-2266, 1999.

CPAA - Centro de Pesquisa Agroflorestral da Amazônia Ocidental. **O que é o guaraná?**

Disponível em: [HTTP://www.cpaa.embrapa.br/portfolio/sistemadeproducao/guarana/docs/oque.html](http://www.cpaa.embrapa.br/portfolio/sistemadeproducao/guarana/docs/oque.html). Acesso em 23 jan 2011, 20:23:15.

CREPPY, E.E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicology Letters**, v. 127, p. 19-28, 2002.

DE MARIA, C.A.B.; MOREIRA, R.F.A. Cafeína: revisão sobre métodos de análise. **Química Nova**, v. 30, p. 99-105, 2007.

DE MELLO, F.R.; SCUSSEL, V.M. Characteristic of in-shell Brazil nuts and their relationship to aflatoxin contamination: criteria for sorting. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 9305-9310, 2007.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products**. Chichester: John Wiley & Sons, 1998.

DI NATALE, F.; GALLO, M.; NIGRO, R. Adsorbents selection for aflatoxins removal in bovine milks. **Journal of Food Engineering**, v. 95, n. 1, p. 186-191, 2009.

DUMONT, E.; DePAUW, L.; VANHAECKE, F.; COMELIS, R. Speciation of Se in *Bertholletia excelsa* (Brazil nut): a hard nut to crack? **Food chemistry**, v. 95, n. 4, p. 684-692, 2006.

DURAI PANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Antifungal activity of traditional medicinal plants from Tamil Nadu, India. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 2, p. 204-215, 2011.

EDWARDS, H.G.M.; FARWELL, D.W.; OLIVEIRA, L.F.C.; ALIA, J.M.; LE HYARIC, M.; AMEIDA, M.V. FT-Raman spectroscopic studies of guarana and some extracts. **Analytica Chimica Acta**, v. 532, p. 177-186, 2005.

EMBRAPA (2005). **Cultivo da Castanha-do-Brasil em Rondônia**. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Castanha/CultivodaCastanhadoBrasilRO/index.htm>. Acesso em 13 jun 2012, 21:12:03.

ERICKSON, H.T.; CORRÊA, M.P.F.; ESCOBAR, J.R. Guaraná (*Paullinia cupana*) as a commercial crop in Brazilian Amazonia. **Economic Botany**, v. 38, n. 3, p. 273-286, 1984.

ESPITIA, P.J.P.; SOARES, N.F.; BOTTI, L.C.M.; MELO, N.R.; PEREIRA, O.L.; SILVA, W.A. Assessment of the efficiency of essential oils in the preservation of postharvest papaya in an antimicrobial packaging system. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 4, p. 307-316, 2012.

EU - European Union Commission Regulation 1525/98 of 16 July 1998, **amending Regulation (EC) N. 194/97 of January 1997 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuff**. Official Journal of European Communities.1998.

EU - European Union Commission. N. 493/2003/EC **imposing special conditions on the import of Brazil nuts in shell originating in or consigned from Brazil**. Official Journal of the European Union, 46(L 168), 33–38, 2003.

EU - European Union Commission. Commission regulation N. 165/2010 amending Regulation (EC) N. 1881/2006. 2010. **Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins**. Official Journal of the European Union, 53(L 50), 8–12, 2010.

FARAG, R.; DAW, Z.; ABO-RAYA, S. Influence of some spice essential oil on *A. parasiticus* growth and production of aflatoxins in a synthetic medium. **Journal of Food Science**, v. 54, n. 1, p. 74-76, 1989.

FARIA, J.J.P. **Manual de produção do Guaraná**. Edição SEBRAE. Cuiabá. 2000.

FAO/WHO. In F. A. Series (Ed.), **Safety evaluation of certain food additives and contaminants** (Sixty-eighth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), Vol. 59. (pp. 305) Rome, 2008.

FDA webpage. **Qualified claims about cardiovascular disease risk: Nuts & heart disease**. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/wdms/qhc-sum.html#nuts>, 2008.

FELLOWS, P.J. **Tecnologia do Processamento de Alimentos**. 2th ed., Artmed: Porto Alegre, 2006.

FERBERG, I.; CABRAL, L.C.; GONCALVES, E.B.; DELIZA, R. Effect of extraction in yield and quality of skinned Brazilian nuts milk. **Boletim CEPPA**, v. 20, n. 1, p. 75-88, 2002.

FELBERG, I.; DELIZA, R.; GONÇALVES, E.B.; ANTONIASSI, R. Bebida mista de extrato de soja integral e castanha-do-Brasil: caracterização físico-química, nutricional e aceitabilidade do consumidor. **Alimentação e Nutrição**, v. 15, n. 2, p. 163-174, 2004.

FELBERG, I.; ANTONIASSI, R.; DELIZA, R.; FREITAS, S.C.; MODESTA, R.C.D. Soy and Brazil nut beverage: processing, composition, sensory, and color evaluation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 609-617, 2009.

FERREIRA, E.S.; SILVEIRA, C.S.; LUCIEN, V.G.; AMARAL, A.S. Physico-chemical characterization of almond cake and fatty acid composition of the majority of the crude oil nut Brazil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). **Food and Nutrition**, v. 17, n. 2, p. 203-208, 2006.

FSA - Food Standards Agency. 2004. **Survey of edible nuts for aflatoxins**. UK Food Standards Agency, London. Disponível em: <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/summarynuts.pdf>. Acesso em: 10 Jul 2012, 21:34:10..

FREITAS, S.P.; FREITAS-SILVA, O.; MIRANDA, I.C.; COELHO, M.A.Z. Extraction and simultaneous separation of the Brazil nuts oil with ethanol. **Brazilian Journal of Science and Food Technology**, v. 27, p. 14-17, 2007.

FREITAS-SILVA, O.; VENANCIO, A. Ozone applications to prevent and degrade mycotoxins: a review. **Drug Metabolism Reviews**, v. 42, p. 612-620, 2010.

FREITAS-SILVA, O.; VENANCIO, A. Brazil nuts: Benefits and risks associated with the contamination by fungi and mycotoxins. **Food Research International**, v. 44, p. 1434-1440, 2011.

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

FUCHS, S.; SONTAG, G.; STIDL, R.; EHRlich, V; KUNDI, M.; KNASMULLER, S. Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 4, p. 1398-1407, 2008.

FUKUMASU, H.; AVANZO, J.L.; HEIDOR, R.; SILVA, T.C.; ATROCH, A.; MORENO, F.S.; DAGLI, M.L.Z. Protective effects of Guarana (*Paullinia cupana* Mart. var. *Sorbilis*) against DEN-induced DNA damage on mouse liver. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 862–867, 2006.

FUNASAKI, M.; OLIVEIRA, R.S.; ZANOTTO, S.P.; CARIOCA, C.R.F.; SIMAS, R.C.; EBERLIN, M.N.; ALBERICI, R.M. Brazil Nut Oil: Quality Control via Triacylglycerol Profiles Provided by Easy Ambient Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 11263–11267, 2012.

FURR, K.A.; MACDANIELS, L.H.; ST JOHN, L.E. JR.; GUTENMANN, W.H.; PAKKALA, I.S.; LISK, D.J. Elemental Composition of tree nuts. **Bull. Environm. Contam. Toxicology**, v. 21, p. 392-396, 1979.

GEETHA, T.; VARALAKSHMI, P.; LATHA, M. R. Anti-inflammatory activity of lupeol and lupel linoleate in rats. **Journal Ethnopharmacology**, v. 76, p. 77-80, 2001.

GIORDANO, B.N.E.; NONES, J.; SCUSSEL, V.M. Susceptibility of the In-shell Brazil Nut Mycoflora and Aflatoxin Contamination to Ozone Gas Treatment during Storage. **Journal of Agricultural Science**, v. 4, p. 24-32, 2012.

GIORDANO, B.N.E. **Efeito do ozônio na contaminação por fungos e aflatoxinas na armazenagem de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.)**. 2009. 183 f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos). Florianópolis/SC: Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.

GLÓRIA, M.M.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B. Brazil nut protein concentrate and isolate production: chemical and functional properties. **Brazilian Journal of Science and Food Technology**, v. 20, n. 2, p. 240-245, 2000.

GONÇALVES, J.F.; FERNANDES, A.V.; OLIVEIRA, A.F.M.; RODRIGUES, L.F.; MARENCO, R.A. Primary metabolism components of seeds from brazilian amazon tree species. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 14, n. 2, p. 139-142, 2002.

GRATZ, S.; TÄUBEL, M.; JUVONEN, R.O.; VELUKSELA, M.; TURNER, P.C.; MYKKÄNEN, H.; EL-NEZAMI, H. Lactobacillus ramosus strain GG modulates Intestinal absorption of aflatoxin B1 and its fecal excretion and toxicity in rats. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 7398–7400, 2006.

GONÇALVES, J. S.; FERRACIN, L. M.; VIEIRA, M. L. C.; IAMANAKA, B. T.; TANIWAKI, M. H.; FUNGARO, M. H. P. A análise molecular de *Aspergillus* secção *Flavi* isolado do Brasil nozes Mundo, **Jornal de Microbiologia e Biotecnologia**, v. 28, p. 1817-1825, 2012.

GONZÁLEZ, C.A.; SALAS-SALVADO. The potencial of nuts in the prevention of câncer. **The British Journal of Nutrition**, v. 96, p. 87-94, 2006.

GUEDES, A.M.M. **Estudo da extração de óleo da polpa de tucumã por CO2 supercítico**. 2006. 80 f. Dissertação (Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, 2006.

HAAS, P. **Exposição da população a aflatoxina B1 e ocorrência de carcinoma hepatocelular nos estados de São Paulo e Santa Catarina**. 2000. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.

HALÁSZ, A.; LÁSZTITY, R.; ABONYI, T.; BATA, Á. Decontamination of mycotoxincontaining food and feed by biodegradation. **Food Reviews International**, v. 25, p. 284–298, 2009.

HARRIS, C.C. Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. **Cancer Research**, v.51, p. 5023-44, 1991.

HASHIMOTO, G. (ed.): **Illustrated Cyclopedia of Brazilian Medicinal Plants**. Aboc-Sha, Kamakura, p. 646, 1996.

HASKARD, C.A.; EL-NEZAMI, H.S.; KANKAANPÄÄ, P.E.; SALMINEN, S.; AHOKAS, J.T. Surface binding of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 3086–3091, 2001.

HEARD, C.M.; JOHNSON, S.; MOSS, G.; THOMAS, C.P. In vitro transdermal delivery of caffeine, theobromine, theophylline and catechin from extract of Guarana, *Paullinia cupana*. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 317, n. 1, p. 26-31, 2006.

HENMAN, A. R. Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*): Ecological and social perspectives on an economic plant of the Central Amazon basin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 6, n. 3, p. 311-338, 1982.

HERMAN, A.R. Vida Natural. **O guaraná: sua cultura, propriedades, formas de preparação e uso**. 2nd Ed. Global/Ground, São Paulo, Brasil, 77p, 1986.

HOLLEY, R.A.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 273-292, 2005.

HULBERT, G.J.; BISWAL, R.N.; MEHR, C.B.; WALKER, T.H.; COLLINS, J.L. Solid/liquid extraction of caffeine from guarana with methylene chloride. **Food Science and Technology International**, v. 4, n. 1, p. 53-58, 1998.

HUSSEIN, S.H.; BRASEL, J.M. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, n. 2, p. 101-134, 2001.

IARC - International Agency for Research on Cancer. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, Vol. 56. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and

Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. IARC Press, Lyon.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da extração vegetal e da silvicultura**. Retirado em 20 de Junho de 2012. <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pevs/2010/pevs2010.pdf>, 1993, 2010.

INAN, F.; PALA, M.; DOYMAZ, I. Use of ozone in detoxification of aflatoxin B₁ in red pepper. **Journal of Stored Products Research**, v. 43, n. 4, p. 425-429, 2007.

IQBAL, S.Z.; BHATTI, I.A.; ASI, M.R.; ZUBER, M.; SHAHID, M.; PARVEEN, I. Effect of γ irradiation on fungal load and aflatoxins reduction in red chillies. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 82, p. 80–84, 2013.

ISHII, H. Impact of fungicide resistance in plant pathogens on crop disease control and agricultural environment. **Japan Agricultural Research Quarterly**, v. 40, p. 205–211, 2006.

ITO, Y.; PETERSON, S.W., WICKLOW, D. T.; GOTO, T. *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section Flavi. **Mycological Research**, v. 105, p. 233–239, 2001.

JAIMEZ, J. Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 882, p. 1-10, 2000.

JALILI, M.; JINAP, S. Role of sodium hydrosulphite and pressure on the reduction of aflatoxins and ochratoxin A in black pepper. **Food Control**, v. 27, n. 1, p. 11-15, 2012.

JARIMOPAS, B.; JAISIN, N. An experimental machine vision system for sorting sweet tamarind. **Journal of Food Engineering**, v. 89, p. 291–297, 2008.

JECFA - Joint WHO/FAO Expert Committee on Food Additives. **Toxicological Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants in Food: Aflatoxins**. Fortyninth Meeting of the Joint

FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Food Additives Series 40 (Geneva: WHO), pp. 359–469, 1998.

JOLLY, C.M.; BAYARD, B.; VODOUHE, S. Risks of ingestion of aflatoxin contaminated groundnuts in Benin: scale measurements, beliefs and socioeconomic factors. **Risk Analysis**, v. 29, p. 1395–1409, 2009.

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

KLICH, M. A. Health effects of *Aspergillus* in food and air. **Toxicology and Industrial Health**, v. 25, p. 657–667, 2009.

KOMALA, V.V.; RATNAVATHI, C.V.; VIJAY KUMAR, B.S.; DAS, I.K. Inhibition of aflatoxin B1 production by an antifungal component, eugenol in stored sorghum grains. **Food Control**, v. 26, p. 139–146, 2012.

KRIS-ETHERTON, P.M.; ZHAO, G.; BINKOSKI, A.E.; COVAL, S.M.; ETHERTON, T.D. The effect of nuts on coronary heart disease risk. **Nutrition Review**, v. 53, p. 103–111, 2001.

KUSKOSKI, E.M.; ROSEANE, F.; GARCÍA, A.A.; TRONCOSO G.A. M. Chemical and pharmacological properties of the fruit Guaraná (*Paullinia cupana*). **Vitae**, v. 12, n. 2, p. 45–52, 2005.

KUMAR, R.; MISHRA, A.K.; DUBEY, N.K.; TRIPATHI, Y.B. Evaluation of *Chenopodium ambrosioides* oil as a potential source of antifungal, antiaflatoxigenic and antioxidant activity. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, p. 159–164, 2007.

KUMAR, A.; SHUKLA, R.; SINGH, P.; PRASAD, C.S.; DUBEY, N.K. Assessment of *Thymus vulgaris* L. essential oil as a safe botanical preservative against post harvest fungal infestation of food commodities. **Innovative Food Science and Emerging Technology**, v. 9, p. 575–580, 2008.

KUSHIRO, M. Effects of Milling and Cooking Processes on the Deoxynivalenol Content in Wheat. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, p. 2127-2145, 2008.

LORINI, I. **Armazenagem de Grãos**. 1ªed. Campinas/SP: IBG, 2002. 1.000p.

MAGNA, A.; SALOMÃO, A.A.; VILA, M.M.D.C.; TUBINO, M. Comparative Study of Two Spectrophotometric Reagents for Catechol Analysis in Guarana Seeds Powder. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 1, p. 129-132, 2003.

MAHONEY, N.; MOLYNEUX, R.; KIM, J.; CAMPBELL, B.; WAISS, A.; HAGERMAN, A. Aflatoxigenesis induced in *Aspergillus flavus* by oxidative stress and reduction by phenolic antioxidants from tree nuts. **World Mycotoxin Journal**, v. 3, p. 49–57, 2010.

MAJHENIČ, L.; ŠKERGET, M.; KNEZ, Ž. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1258-1268, 2007.

MANFIO, D.; BEIRAO, L.H.; DAMIAN, C.; SAVI, G.D.; SCUSSEL V.M. Brazil Nut (*Bertholettia excels* H.B.K.) Brown Skin Characterization – a Waste Product Generated from Shelled Dry Nut Factories of Amazon Region. **Agricultural Science Research Journals**, v. 2, n. 5, p. 253-260, 2012.

MARAQA, A.; ALSHAROA, N. F.; FARAH, H.; ALBJEIRAMI, W. M.; SHAKYA, A. K.; SALLAL, A. J. Effect of *Nigella sativa* extract and oil on aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. **Turkish Journal of Biology**, v. 31, p. 155-159, 2007.

MARKLINDER, I.; LINDBLAD, M.; GIDLUND, A.; OLSEN, M. Consumers' ability to discriminate aflatoxin contaminated brazil nuts. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, p. 56-64, 2005.

MARTINS, H.; MARTINS, M.; BERNARDO, F. Interaction of strains of non-toxigenic *Aspergillus flavus* with *Aspergillus parasiticus* on aflatoxin production. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 6, 2000.

MARTINS, M.; PACHECO, A. M. ; LUCAS, A. C. S. ; ANDRELO, A. C. ; APPOLONI, C. R.; XAVIER, J.J.M. . Brazil nuts: natural elements and aflatoxin contamination. *Acta Amazônica*, v. 42, p. 157-164, 2012.

MCLEAN, M.; DUTTON, M.F. Cellula interactions and metabolism of aflatoxin: an update. **Pharmacology and therapeutics**, v. 65, n. 2, p. 163-192, 1995.

MEGGS, W.J. Epidemics of mold poisoning past and present. **Toxicology and Industrial Health**, v. 25, p. 571–576, 2009.

MCKENZIE, K.S., SARR., A. B., MAYURA, K., BAILEY., R. H., MILLER, D. R., ROGERS, T. D., NORRED, W. P., VOSS, K. A., PLATTNER, R. D., KUBENA, L. F., PHILLIPS, T. D. Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone. **Food and Chemical Toxicology**, v. 35, n. 8, p. 807-820, 1997.

MENEGASSI, B.; LEONEL, M.; MISCHAN, M.M.; PINHO, S.Z. Effect of extrusion parameters on color and pasting properties of peruvian carrot flour (*Arracacia xanthorrhiza*). **Science and Agro-technology**, v. 31, n. 6, p. 1780-1792, 2007.

MENNINGER, E.A.. Edible nuts of the world. **Brazil nut family**. 174p. 1977.

MISHRA, A.K.; DUBEY, N.K. Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 1101–1105, 1994.

MISHRA, P.K.; SHUKLA, R.; SINGH, P.; PRAKASH, B.; KEDIA, A.; DUBEY, N.K. Antifungal, anti-aflatoxigenic, and antioxidant efficacy of *Jamrosia* essential oil for preservation of herbal raw materials. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 74, p. 11-16, 2012.

MOKOENA, M.P.; CHEULE, P. K.; GQUALINI, N. The toxicity and decreased concentration of aflatoxin B1 in natural lactic acid fermented maize meal. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, p. 773–777, 2006.

MONTES-BELMONT, R.; CARVAJAL, M. Control of *Aspergillus flavus* in maize with plant essential oils and their components. **Journal Food Protection**, v. 61, n. 5, p. 616-619, 1998.

MOODLEY, R.; ANDREW, K.; JONNALAGADDA, S. B. Elemental composition and chemical characteristics of five edible nuts (almond, Brazil, pecan, macadamia and walnut) consumed in Southern Africa. **Journal of Environmental Science and Health**. Part B, v. 42, n. 5, p. 585 – 591. 2007.

MORAES, M.L.L.; MICKE, G.A.; FUJIYA, N.M.; TAVARES, M.F.M. Separação e análise de metilxantinas em extratos de guaraná e erva mate por eletroforese capilar. **Revista Analytica**, v. 5, p. 44-50, 2003.

MORAIS, L.A.S.; RAMOS, N.P.; GONÇALVES, G.G.; BETTIOL, W.; CHAVES, F.C.M. Atividade Antifúngica De Óleos Essenciais Em Sementes De Feijão Cv. Cariquinha. **Horticultura brasileira**, v. 26, n. 2, 2008.

MORITZ, A. *Estudos biológicos da floração e da frutificação da castanha-do-Brasil (Bertholletia excelsa) H. B. K.* Belém: EMBRAPA. CPATU, 81P. (Documento, 29). 1984.

NAKAMURA, E.S., KUROSAKI, F., ARISAWA, M., MUKAINAKA, T., OKUDA, M., TOKUDA, H., NISHINO, H., PASTORE, F. Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. **Cancer Letters**, v. 177, p. 119–124, 2002.

NAOZUKA, J; MARANA, S.R., OLIVEIRA, P.V. Water-soluble Cu, Fe, Mn and Zn species in nuts and seeds. **Journal of food composition and analysis**, v. 23, p. 78-85, 2010.

NETO, V.; BAKKE, O.A.; RAMOS, C.M.P.; BORA, P.S.; LETELIER, J.C.; CONCEICAO, M.M. Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) seed kernel oil: characterization and thermal stability. **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 3, n. 1, p. 33-42, 2009.

OLIVEIRA, C.A.F.; GERMANO P. M. L. Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular. **Revista Saúde Pública**, v. 31, n. 4, p. 417-424, 1997.

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

PACHECO, A.M. **Ocorrência de aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2) na análise de perigos e pontos críticos de controle em três etapas da cadeia produtiva da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) na safra de 2002**. 2003. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Manaus/AM: Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do Amazonas, 2003.

PACHECO, A.M. Florianópolis. **Selênio e aflatoxinas em castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) e qualidade de produtos derivados**. 2007. 144 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Florianópolis/SC: a – Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

PACHECO et al. Detecção de aflatoxinas em Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) na safra de 2005. **Revista Analytica**, v. 22, p. 64-65, 2006.

PACHECO, A.; SCUSSEL, V. Aflatoxins evaluation on in-shell and shelled dry Brazil nuts for export analysed by LC–MS/MS – 2006 and 2007 harvests. **World Mycotoxin Journal**, v. 2, p. 295–304, 2009.

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

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

PACHECO, A.M.; MARTINS, M. Brazil nut sorting for aflatoxin prevention: a comparison between automatic and manual shelling methods. **Food Science and Technology**, v. 33, n. 2, p. 369-375, 2013.

PÁDUA, I.P.M.; SILVEIRA I.A.; MARTINS, C.E.C.B. Aflatoxinas e risco de contaminação do leite humano. **Pro Homine**, v. 1, n. 1, 2002.

PAGLIARUSSI, R.S.; BASTOS, J.K.; FREITAS, L.A.P. Fluid Bed Drying of Guarana (*Paullinia cupana* HBK) Extract: Effect of Process

Factors on Caffeine Content. *AAPS PharmSciTech*, v. 7, n. 2, p. 160-166, 2006.

PAREKH, P.P.; KHAN, A.R.; TORRES, M.A.; KITTO, M.E. Concentrations of selenium, barium, and radium in Brazil nuts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 332–335. 2008.

PARK, DL. *Perspectives on mycotoxin decontamination procedures*. **Food Additives and Contaminants**, v. 10, p. 49–60, 1993.

PARTANEN, H.A.; EL-NEZAMI, H.S.; LEPPÄNEN, J.M.; MYLLYNEN, P.K.; WOODHOUSE, H.J.; VÄHÄKANGAS, K.H. Aflatoxin B1 transfer and metabolism in human placenta. **Toxicological Sciences**, v. 113, p. 216–225, 2010.

PASTER, N.; NEMASHEROV, M.; RAVID, U.; JUVEN, B. Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attaching stored grain. **Journal of Food Protection**, v. 58, p. 81-85, 1995.

PATERSON, R.; RUSSELL, M. Fungi and fungal toxins as weapons. **Mycological Research**, v. 110, n. 9, p. 1003-1010, 2006.

PATERSON, R.R.M.; LIMA, N. How will climate change affect mycotoxins in food? **Food Research International**, v. 43, p. 1902–1914, 2010.

PATERSON, R.R.; M.; LIMA, N. Further mycotoxin effects from climate change. **Food Research International**, v. 44, p. 2555–2566, 2011.

PATKAR, K.; USHA, C.; SHETTY, H.; POSTER, N.; LACEY, J. Effect of spice essential oils on growth and aflatoxin B1 production by *A. flavus*. **Letter in Applied Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 49-51, 1993.

PELLETIER, M.J.; REIZNER, J.R. Comparison of fluorescence sorting and color sorting for the removal of aflatoxin from large groups of peanuts. **Peanut Science**, v. 19, n. 1, p. 15-20, 1992.

PENEDO, P.L.M.; COELHO, G.L.V. Purification of vegetable oils by extraction with supercritical CO₂. **Brazilian Journal of Science and Food Technology**, v. 17, n. 4, 1997.

PILDAIN, M.B.; FRISVAD, J.C.; VAAMONDE, G.; CABRAL, D.; VARGA, J.; SAMSON, R.A. Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 725–735, 2008.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. 3rd ed. New York: Springer, 2009.

PHILLIPS, T.D.; AFRIYIE-GYAWU, E.; WILLIAMS, J.; HUEBNER, H.; ANKRAH, N.A.; OFORI-ADJEI, D.; JOLLY, P.; JOHNSON, N.; TAYLOR, J.; MARROQUIN-CARDONA, A.; XU, L.; TANG, L.; WANG, J.S. Reducing human exposure to aflatoxin through the use of clay: a review. **Food additives and contaminants**, v. 25, n. 2, p. 134–145, 2008.

PHILLIPS, C.A.; LAIRD, K.; ALLEN, S.C. The use of Citri-V™® — An antimicrobial citrus essential oil vapour for the control of *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus niger* and *Alternaria alternata* in vitro and on food. **Food Research International**, v. 47, n. 2, p. 310–314, 2012.

POHLAND, A. E. Mycotoxins in review. **Food Additives and Contaminants**, v. 10, p. 17-28, 1993.

PORTELA, A.C., SOUZA, L.A.G., LOPES, M.C. **Organização do germoplasma de leguminosas arbóreas do INPA/CPCA: fenologia e desenvolvimento inicial das espécies**. In: Jornada de Iniciação Científica, 10., 2001, Manaus, PIBIC CNPq/INPA, Resumos Expandidos, p.223-226, 2001.

PRANCE, G.T.; SILVA, M.F. **Árvores de Manaus**. INPA, Manaus, 312p., 1975.

PRAKASH, B.; SHUKLA, R.; SINGH, P.; KUMAR, A.; MISHRA, P. K.; DUBEY, N. K. Efficacy of chemically characterized Piper betle L. essential oil against fungal and aflatoxin contamination of some edible

commodities and its antioxidant activity. **International Journal of Food Microbiology**, v. 142, p. 114-119, 2010.

QUEIROZ, M.L.; JUSTO, G.Z.; VALADARES, M.C.; PEREIRA-DA-SILVA, F.R. Evaluation of *Caesalpinia ferrea* extract on bone marrow hematopoiesis in the murine models of listeriosis and Ehrlich ascites tumor. **Immunopharmacology and Immunotoxicology** v. 23, p. 367–382, 2001.

RAPER, K.B.; FENNELL, D.I. **The genus *Aspergillus***. Williams and Wilkins, Baltimore, MD. 686 pp, 1965.

RASFF (2010). The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF). Annual Report. **The Health and Consumers Directorate-General of the European Commission manages the Rapid Alert System for food and Feed (RASFF)**. Luxembourg. : Publications Office of the European Union European Commission 70pp., 2009.

RASOOLI, I.; FAKOOR, M.H.; YADEGARINIA, D.; GACHKAR, L.; ALLAMEH, A.; REZAEI, M.B. Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils. **International Journal of Food Microbiology** v. 122, p. 135–139, 2008.

RAZZAGHI-ABYANEH, M.; SHAMS-GHAHFAROKHI, M.; YOSHINARI, T.; REZAEI, M.B.; JAIMAND, K.; NAGASAWA, H.; SAKUDA, S. Inhibitory effects of *Satureja hortensis* L. essential oil on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 123, p. 228–233, 2008.

REIS, T.A.; OLIVEIRA, T.D.; BAQUIAO, A.C.; GONCALVES, S.S.; ZORZETE, P.; CORREA, B. Mycobiota and mycotoxins in Brazil nut samples from different states of the Brazilian Amazon region. **International Journal of Food Microbiology**, v. 159, n. 2, p. 61-8, 2012.

REEVES, M.A; HOFFMANN, P.R. The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, p. 2457-2478, 2009.

RODRIGUES, P.; VENÂNCIO, A.; KOZAKIEWICZ, Z.; LIMA, N.A. polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Portuguese almonds. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, p. 187–193, 2009.

RODRIGUES, J.E.; ARAÚJO, M.E.; AZEVEDO, F.F.M.; MACHADO, N.T. Phase equilibrium measurements of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) oil supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 34, p. 223-229, 2005.

RODUSHKIN, B.; ENGSTRÖM, E.; SÖRLIN, D.; BAXTER, D. Levels of inorganic constituents in raw nuts and seeds on the Swedish market. **Science of the Total Environment**, v. 392, p. 290-304. 2008.

ROSA, M.F.A.P. **Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de aflatoxina B1, aflatoxicol M1 e aflatoxicol por Cromatografia por camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência em amostras de patê de fígado industrializado**. 1995. 60 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1995.

RYAN, E.; GALVIN, 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. **International Journal of Food Science and Nutrition**, v. 57, p. 219-228, 2006.

SAALIA, F.K.; PHILLIPS, R.D. Reduction of aflatoxins in peanut meal by extrusion cooking in the presence of nucleophiles. **LWT – Food Science and Technology**, v. 44, n. 6, p. 1511-1516, 2011a.

SAALIA, F.K.; PHILLIPS, R.D. Degradation of aflatoxins by extrusion cooking: Effects on nutritional quality of extrudates. **LWT - Food Science and Technology**, n. 44, n. 6, p. 1496-1501, 2011b.

SABINO, M. **Micotoxinas em Alimentos**. In: OGA, S.(ed) Fundamentos de Toxicologia. São Paulo: Atheneu Editora, 461-472, 1996.

SALAS, M.P.; CÉLIZ, G.; GERONAZZO, H.; DAZ, M.; RESNIK, S.L. Antifungal activity of natural and enzymatically-modified flavonoids

isolated from citrus species. **Food Chemistry**, v. 124, p. 1411–1415, 2011.

SAMPAIO, F.C.; PEREIRA, M.S.V.; DIAS, C.S.; COSTA, V.C O.; CONDE, N.C.O.; MARÍLIA A.R.; BUZALAF, M.A.R. *In vitro* antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, p. 289–294, 2009.

SAMSON, R.A.; HONG, S.B.; FRISVAD, J. C. Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. **Medical Mycology**, v. 44, p. 133–148, 2006.

SANT'ANA, A.S.; ROSENTHAL, A.; MASSAGUER, P.R. The fate of patulin in apple juice processing: a review., **Food Research International**, v. 41, p. 441–453, 2008.

SANTOS, S.C.; MELLO, J.C.P. **Taninos**. In: Simões CMO (org.). *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 5. ed. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 615–656, 2007.

SANTOS, O.V.; LOPES, A.S.; AZEVEDO, G.O.; SANTOS, A.C. Processing of Brazil nut flour: characterization, thermal and morphological analysis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 264–269, 2010.

SANTOS, O.V.; CORRÊA, N.C.F.; SOARES, F.A.S.M.; GIOIELLI, L.A.; COSTA, C.E.F.; LANNES, S.C.S. Chemical evaluation and thermal behavior of Brazil nut oil obtained by different extraction processes. **Food Research International**, v. 47, p. 253–258, 2012.

SARAIVA, S.A.; CABRAL, E.C.; EBERLIN, M.N.; CATHARINO, R.R. Amazonian Vegetable Oils and Fats: Fast Typification and Quality Control via Triacylglycerol (TAG) Profiles from Dry Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry Fingerprinting. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 4030–4034, 2009.

SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis/SC: Editora Insular, 1998.

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

SCUSSEL, V.M. **Aflatoxin and food safety: Recent South American Perspectives**. J. of Toxicology. *Toxin Reviews*, 23:179-216. 2004.

SEIDEMANN, J. **Guaraná (Paullinia cupana H. B. K.) – an active agent from the tropical rain Forest**. Tropenlandwirt. 1998: 49-63.

SBRT - Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas. **Fabricação de xarope de guaraná, extrato de guaraná e guaraná em pó**. Disponível em: <http://www.sbrt.ibict.br/> . Acesso em 22 mai 2011, 15:32:10.

SHAPIRA, R.; PASTER, N. **Control of mycotoxins in storage and techniques for their decontamination**. In M. N. & O. M. (Eds.), *Mycotoxins in Food: Detection and Control* (pp. 190–223). Cambridge: England Woodhead Publishing Limited and CRC Press. 2004.

SHUKLA, R.; SINGH, P.; PRAKASH, B.; DUBEY, N. K. Antifungal, aflatoxin inhibition and antioxidant activity of *Callistemon lanceolatus* (Sm.) Sweet essential oil and its major component 1,8-cineole against fungal isolates from chickpea seeds. **Food Control**, v. 25, p. 27-33, 2012.

SILVA, M.F.; SOUZA, L.A.G.; CARREIRA, L.M.M. **Nomes populares das leguminosas do Brasil**. EDUA/INPA/FAPEAM, Manaus, Série Biblioteca Científica da Amazônia, 236p, 2004.

SILVA, R.F.; ASCHERI, J.L.A.; SOUZA, J.M.L. Influence of Brazil nut processing on the quality of nuts. **Science and agro-technology**, v. 34, n. 2, p. 445-450, 2010.

SIMÕES, C.L.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Editora UFRGS; Florianópolis: UFSC, 821 p, 2003.

SINDHU, S.; CHEMPAKAM, B.; LEELA, N.K.; SUSEELA BHAI, R. Chemoprevention by essential oil of turmeric leaves (*Curcuma longa* L.)

on the growth of *Aspergillus flavus* and aflatoxin production. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 1188–1192, 2011.

SOHER, E. A. Prevention of the growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by some spice essential oils. Minufiya. **Journal of Agricultural Research**, v. 24, n. 2, p. 563-576, 1999.

SOLIMAN, K.M.; BADEAA, R.I. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 1669-1675, 2002.

SORIANO, J.M.; DRAGACCI, S. Intake, descontamination and legislation of fumonisins in foods. **Food Research International**, v. 37, p. 367-374, 2004.

SOUZA, M. L. de. **Processamento de cereais matinais extrusados de castanha-do-brasil com mandioca**. Campinas. 2003. 191 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2003.

SOUZA, M.L; MENEZES, H.C. Processamento de amêndoa e torta de Castanha do Brasil e Farinha de Mandioca: parâmetros de qualidade - **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 1, p. 120-128, 2004.

SOUZA, M.L.; MENEZES, H.C. Sensorial evaluation of matutinal cereals of the Brazil nut with extruded cassava. **Brazilian Journal of Science and Food Technology**, v. 26, n. 4, p. 950-955, 2006.

SOUZA, M.L; MENEZES, H.C. Extrusão de misturas de castanha do Brasil com mandioca. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 2, p. 451-462, 2008a.

SOUZA, M.L.; MENEZES, H.C. Otimização do processo de extrusão termoplástica da mistura castanha do Brasil com farinha de mandioca. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, p. 659-667, 2008b.

SPENCER, E. R. **Decay of Brazil nuts**. The Botanical Gazette, 72, 265–288, 1921.

STOCKLER-PINTO, M.B.; MAFRA, D.; FARAGE, N.E.; BOAVENTURA, G.T.; COZZOLINO, S.M.F. Effect of Brazil nut

supplementation on the blood levels of selenium and glutathione peroxidase in hemodialysis patients. **Nutrition**, v. 26, p. 1065–1069, 2010.

STRUNZ, C.C.; OLIVEIRA, T.V.; VINAGRE, J.C.M.; LIMA, A.; COZZOLINO, S.; MARANHAO, R.C. Brazil nut ingestion increased plasma selenium but had minimal effects on lipids, apolipoproteins, and high-density lipoprotein function in human subjects. **Nutrition Research**, v. 28, p. 150-155, 2008.

SUBBIAH, M.T.; YUNKER, R. Studies on the nature of anti-platelet aggregatory factors in the seeds of the Amazonian Herb Guarana (*Paullinia cupana*). **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 78, n. 2, p. 96-101, 2008.

SUFRAMA - Superintendência da Zona Franca de Manaus. Projeto Potencialidades Regionais Estudo de Viabilidade Econômica. Guaraná. Julho, 2003. Disponível em: http://www.suframa.gov.br/publicacoes/proj_pot_regionais/guarana.pdf. Acesso em 28 jul 2011, 13:12:45.

TANIWAKI, M.H.; PITT, J.I.; IAMANAKA, B.T.; SARTORI, D.; COPETTI, M.V.; BALAJEE, A.; FUNGARO, M.H.P.; FRISVAD, J.C. *Aspergillus bertholletius* sp. nov. from Brazil Nuts. **PLOS ONE**, v. 7, n. 8. 2012.

TATSADJIEU, N.L.; DONGMO, P.M.J.; NGASSOUM, M.B.; ETOA, F.X.; MBOFUNG, C.M.F. Investigations on the essential oil of *Lippia rugosa* from Cameroon for its potential use as antifungal agent against *Aspergillus flavus* Link ex. Fries. **Food Control**, v. 20, p. 161–166, 2009.

TEIXEIRA, A.S. **Adequação e apresentação de parâmetros de validação intralaboratorial de um ensaio para a quantificação de aflatoxinas em Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K) através de cromatografia líquida de alta eficiência.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. 57p, 2008.

TFOUNI, S. A. V, CAMARGO, M. C. R.; MENEGARIO, T. F.; TOLEDO, M. C. F. Contribuição do guaraná em po (*Paullinia cupana*)

como fonte de cafeína na dieta. **Rev. Nutr Campinas**, v. 20, n. 1, p. 63-8, 2002.

TFOUNI, S.A.V.; CAMARGO, M.C.R.; VITORNO, S.H.P.; MENEGÁRIO, T.F.; TOLEDO, M.C.F. Contribuição do guaraná em pó (*Paullinia cupana*) como fonte de cafeína na dieta. **Revista de Nutrição**, v. 20, n. 1, p. 63-68, 2007.

THIESEN, J. Detoxification of aflatoxins in groundnut meal. **Animal Feed Science and Technology**, v. 2, n. 1, p. 67-75, 1977.

THOMSON, C.D.; CHISHOLM, A.; MCLACHLAN, S.K.; CAMPBELL, J.M. Brazil Nuts: an effective way to improve selenium. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 87, p. 379-384. 2008.

TIAN, J.; HUANG, B.; LUO, X.; ZENG, H.; BAN, X.; HE, J.; WANG, Y. The control of *Aspergillus flavus* with *Cinnamomum jensenianum* Hand.-Mazz essential oil and its potential use as a food preservative. **Food Chemistry**, v. 130, p. 520-527, 2012.

TURNER, P.C.; COLLINSON, A.C.; CHEUNG, Y.B.; GONG, Y.; HALL, A.J.; PRENTICE, A. M.; WILD, C.P. Aflatoxin exposure in utero causes growth faltering in Gambian infants. **International Journal of Epidemiology**, v. 36, n. 5, p. 1119 - 1125. 2007.

UEDA, N.; KAWANISHI, K.; MORIYASU, M. Effects of ellagic acid and 2-(2,3,6-trihydroxy-4-carboxyphenyl) ellagic acid on sorbitol accumulation in vitro and in vivo. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, p. 1584-1587, 2004.

USDA - National Nutrient Database for Standard Reference, Food Group: 12 Nut and Seed Products. Publication. Retrieved 15th November, 2010, from USDA, 2008.

USHIROBIRA, T.M.A.; YAMAGUTI, E.; UEMURA, L.M.; NAKAMURA, C.V.; FILHO, B.P.D.; MELLO, J.C.P. Chemical and microbiological study of extract from seeds of guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, p. 5-9, 2007.

VAN EGMOND, H.; SCHOTHORST, R.; JONKER, M. Regulations relating to mycotoxins in food. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v 389, p. 147–157, 2007.

VARGAS, E.A.; SANTOS, E.A.; WHITAKER, T.B.; SLATE, A.B. Determination of aflatoxin risk components for in-shell Brazil nuts. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 28, n. 9, p. 1242–1260, 2011.

VARMA, J., DUBEY, N.K. Efficacy of essential oils of *Caesulia axillaris* and *Mentha arvensis* against some storage pests causing biodeterioration of food commodities. **International Journal of Food Microbiology**, v. 68, p. 207–210, 2001.

VENÂNCIO, A.; PATERSON, R. **The challenge of mycotoxins. In A. McElhatton & R.J. Marshall (Eds.), Food Safety - A Practical and Case Study Approach** (pp. 26–49). Iceland Springer: Reykjavík, 2007.

VENKATACHALAM, M.; SATHE, S.K. Chemical composition of selected edible nut seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 4705-4714, 2006.

WALDVOGEL, S.R. **Caffeine - A Drug with a Surprise**. *Angewandte Chemie International Edition*, 42 (6): 604 – 605, 2003.

WELNA, M.; KLIMPEL, M.; ZYRNICKI, W. Investigation of major and trace elements and their distributions between lipid and non-lipid fractions in Brazil nuts by inductively coupled plasma atomic optical spectrometry. **Food Chemistry**, v. 111, p. 1012–1015, 2008.

XAVIER, J.J.M.; SCUSSEL, V.M. Development of methodology by LC MS/MS for aflatoxin B1, B2, G1 and G2 in Brazil nuts for export. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 88, n. 6, p. 425-433, 2008.

YAMAGUTI-SASAKI E.; ITO L.A.; CANTELI, V.C.D.; USHIROBIRA, T.M.A.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO; B.D.; NAKAMURA, C.V.; MELLO, J.C.P. Antioxidant capacity and *in vitro* prevention of dental plaque formation by extracts and condensed tannins of *Paullinia cupana*. **Molecules**, v. 12, p. 1950-1963, 2007.

YANG, J. Brazil nuts and associated health benefits: a review. **LWT Food Science and Technology**, v. 42, p. 1573–1580, 2009.

YAZDANPANA, H.; MOHAMMADI, T.; ABOUHOSAIN, G.; CHERAGHALI, A. M. Effect of roasting on degradation of Aflatoxins in contaminated pistachio nuts. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 7, p. 1135–1139, 2005.

ZHANG, C.; MA, Y.; ZHAO, X.; ZENG, Y.; WANG, F. Kinetic modelling of aflatoxins B₁ conversion and validation in corn, rice, and peanut during thermal treatments. **Food Chemistry**, v. 129, n. 3, p. 1114-1119, 2011.

ZOLLNER, P.; MAYER-HELM, B. Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography.atmospheric pressure ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1136, p. 123-169, 2006.

ZOVICO, C.; FONSECA, H.; CALORI-DOMINGUES, M. \A.; GLORIA, E. \M.; BORGUINI, R.G.; SILVEIRA, V.P.; PIEDADE, S.S.; BARBIN, D. Electronic color sorting in the decontamination of peanuts contaminated with aflatoxins. **Scientia Agricola**, v. 56, p. 371-376, 1999.

CAPÍTULO 2

EVALUATION OF OCHRATOXIN A AND FUNGI IN POWDERED GUARANA (PAULLINIA CUPANA KUNTH), A CAFFEINE RICH PRODUCT FROM AMAZON FOREST

Trabalho publicado:

African Journal of Microbiology Research (ISSN 1996-0808)
v. 8, n.6, p. 545-550, 2014.

**EVALUATION OF OCHRATOXIN A AND FUNGI IN POWDER
GUARANA (*PAULLINIA CUPANA* KUNTH) - A CAFFEINE
RICH PRODUCT FROM AMAZON FOREST**

**AVALIAÇÃO DE OCHRATOXINA A E FUNGOS EM GUARANÁ
EM PÓ (*PAULLINIA CUPANA* KUNTH) – UM PRODUTO DA
FLORESTA AMAZONICA RICO EM CAFÉINA**

**Maristela Martins¹ Ariane Mendonca Kluczcovski² Ana Cláudia
Silva dos Santos² Ormezinda Celeste Cristo Fernandes³ Vildes
Maria Scussel¹**

**¹Laboratory of Mycotoxicology and Food Contaminants –
LABMICO, Food Science and Technology Department, Center of
Agricultural Sciences, Federal University of Santa Catarina,
Florianopolis, SC, Brazil**

**²Faculty of Pharmaceutical Sciences, Federal University of
Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil.**

**³Oswaldo Cruz Foundation, Research Center, Leônidas Maria
Deane, CpqIMd., Manaus, Amazonas, Brazil**

Abstract

Guarana (*Paullinia cupana* Kunth) is a Brazilian commodity well known to stimulate human metabolism due to its alkaloid components (mainly caffeine rich) and is used as an ingredient in the beverage industries. Moreover the processed form (powder guarana), may have similarities to other products (coffee, tea, cocoa) regarding its effects on ochratoxin A. This study was to evaluate the effect of the alkaloids of powder guarana on the OTA production and the toxigenic fungal strains presence, with the specific aim of prevent risks to the consumers and to provide scientific data to those involved in the guarana productions chain. The ochratoxin A levels production of guarana were below the method LOQ (0.50µg/kg) and the presence of toxigenic strains was observed only in 2% of the samples. The average level of caffeine was 2.6% (min.1.8; max. 2.9%) and tannins of 14.7% (min. 10.0; max. 23.1%). The effects of alkaloids from guarana on OTA levels and fungal strains was studied and despite observed the presence of toxigenic strains in guarana, the OTA levels were below the LOQ (2.0 µg/kg), probably due to the high caffeine content fungi inhibition properties.

Keywords: tannin, caffeine, Aw, *Paullinia*, *Aspergillus*.

Introduction

The guarana (*Paullinia cupana* Kunth var. *sorbilis*), is one of the best-known *Sapindaceae* family from the Amazon biome, and it has an important economic value. The guarana tree provides a fruit with singularly shaped seed (Figure 1a) and is described by Amazonian Indians tribes in their legendary stories. Commercially traded, guarana products are mostly in the form of dried seeds (Figure 1b), which are de-shelled and then used for caffeine extraction by the food industry. Powder guarana has application in the beverage production and in medicine, as stimulatory and energetic of human metabolism (Kuskoski et al. 2005). These effects derived from chemical compounds present in the guarana seeds, particularly the xanthines, such as caffeine, theophylline and theobromine (Belliaro et al. 1985). The largest fraction of caffeine is located in different parts of the seed: the seed kernel (embryo with bulky cotyledons) and the seed coat (testa), that are high in caffeine content (i.e., 4.28 and 1.64%, respectively) (Weckerle et al. 2003). The different forms of guarana and its seed parts are described in Figure 1a to d. Powder guarana (Figure 1d) has high levels of antioxidant compounds, such as polyphenols (tannic/caffeic/gallic acids) and catechins, which have anti-bacterial and anti-fungal properties (Majhenic et al. 2007; Martins et al. 2014). However, the presence of tannins is notable because tannins are recognized as having anti-nutrient and carcinogenic effects, although they possess anti-microbial activity (Okuda, 2005). In addition, powder guarana is useful in medicinal formulations and is a major source of caffeine in the Brazilian diet, particularly for consumers of certain caffeinated beverages and athletes interested in its stimulatory effect. Tfouni et al. (2007) presented guarana as an important source of caffeine in the Brazilian diet and related it to other sources of caffeine whose ingestion should be controlled. Caffeine is described as a central nervous system stimulant that is distributed throughout the entire body after ingestion. The caffeine in guarana has pharmacological activity through transdermic diffusion (Heard et al. 2006), anti-plaque (Espinola et al. 1997), psychostimulatory (Otobone et al. 2007) and anti-hepatocarcinogenesis activities (Fukumasu et al. 2006). Powder guarana (Figure 1c) is the most common type of guarana product and is obtained from artisanal process, particularly in the Amazon region; which is described in Figure 2. The seeds are collected manually from the tree and transported in baskets to the artisanal facilities. They are fermented for several days under environmental conditions of relative humidity (RH) of >70% at approximately 25° C. Afterwards, the husk is removed from the seeds,

then oven roasted open and finely ground. The ground product is packaged in polyethylene bags under environmental conditions. This guarana processing involves several indian (Amazon natives) communities. Brazil also produces guarana by large-scale systematic cultivation. In addition to powder guarana, there are other forms of guarana products, such as sticks and husks.

Therefore, some of the guarana processing stages are susceptible to fungal contamination. The approximate composition of powder guarana is as follows: moisture content (*mc*) 8.8 g%; ashes, 1.0 %; lipids 2.7 %; carbohydrates 70.98% and protein 16.4 %. That composition shows its energetic properties and suggests the possibility of contamination taken place by fungal strains due to high *mc* and lipid/carbohydrate components. Those components could lead to spoilage and affect the organoleptic characteristics. Moreover some fungi could affect the guarana safety such as *Aspergillus sp.* because some species are mycotoxin producers. The mycotoxins are fungal metabolites, such as aflatoxins (AFLs) and ochratoxin A (OTA), recognized as being hepato and nephrotoxic, respectively apart from carcinogenic and teratogenic. Thus, some of those metabolites affect the safety of the food. In addition, some guarana samples evaluated by Bugno et al. (2006) contained toxigenic *Aspergillus* and *Penicillium* strains able to produce mycotoxins. Although, some fungal strains can spoil the guarana seeds, that subject has been considered controversial as Majhenic et al. (2007) reported that its seeds extract possess anti-bacterial and anti-fungal activities. Commodities with similar properties to those of guarana, such as cocoa and coffee, have been studied and found to allow/have OTA contamination (Sanchez-Hervas et al. 2008). The objective of the present study was to evaluate the effect of the alkaloids of powder guarana on the OTA production and the toxigenic fungal strains presence, with the specific aim of prevent risks to the consumers and to provide scientific data to those involved in the guarana productions chain.

Material and methods

Samples: powder guarana ($n=30$) were purchased from grocery stores in Brazil, from 2010 harvest, in the regular labelling form (packs: 500g each). They were homogenized (particle size $<100\ \mu\text{m}$) and divided into portions of 25 g for mycobiota tests and caffeine / tannin / OTA / *mc* / Aw analysis.

Mycobiota and toxigenic potential of guarana: 25g aliquot of each sample was diluted with 225 ml of sterile aqueous 0.1% peptone, then a

series dilutions were prepared and aliquots were inoculated on plates containing DG18 medium (Dichloran Glycerol). All analyzes are performed in triplicate. After incubation at 25°C for 7 days, plates were examined and all of the fungal species were transferred and isolated on plates containing Czapeck yeast extract agar. For identification of fungi genera and species, the isolated strains were sub-cultured on MEA (Malt Extract Agar), and Czapek yeast autolysate (CYA) agar for *Aspergillus* and *Penicillium* genera. On the other hand, species identification was performed through microculture in Czapek-dox as described by Weber and Pitt (2000) and Samson, Hong and Frisvad (2006). The isolates were examined under the light microscope and the species identification was carried out according to the taxonomic keys and guides available Pitt and Hocking, 1997. The isolated *Aspergillus* and *Penicillium* sp. were grown on malt extract agar and were screened for their ability to produce OTA by inoculating coconut agar medium and incubating it at 25° C for 10 days.

Caffeine: standard solutions were prepared and used to establish a calibration curve. The recovery rate for caffeine was 92 % (n=3). A portion (1g) of the sample was mixed with NH₄OH (1:2) and heated in a boiling water bath. Celite was added to the sample (5 mL), and then this mixture was passed through 150 mL acidic and basic columns to isolate caffeine. The caffeine content was determined at 256 nm, measured by spectrophotometry (Femto®).

Tannins: standard solutions were prepared and used to establish a calibration curve. The recovery rate was 90% (n=3). A sample portion (5 mL) was mixed with Folin-Denis mixture sodium carbonate (10 mL) and filtered. Tannin was expressed as mg/100mL of tannic acid after at 760nm by spectrophotometry (Femto®).

OTA: analysis carried out by high performance liquid chromatography (HPLC). A calibration curve was prepared by diluting appropriate volumes of an OTA stock solution with toluene-acetic acid (99:1). The Limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) for OTA were: 0.35 and 0.50µg/kg, respectively. To obtain those parameters, powdered guarana, previously tested in LABMICO was certified as free of OTA in a validation test. The OTA free powdered guarana sample was homogenized and spiked with OTA at three concentrations ranging from 1 to 5µg/kg prior extraction. Five points were used to build an analytical curve to obtain the R values for the LOD and LOQ. The recovery of OTA was 97.1%. A sample portion (15 g) was extracted using methanol- 3 % sodium bicarbonate (1:1) with mechanical stirring. For

quantification, HPLC (Shimadzu®) was performed using a C₁₈ column, with acetonitrile:methanol:acetic acid (35:35:28:) as the mobile phase, a flux of 0.8 ml/min and fluorescence detection with excitation of 332 nm and emission of 476 nm. Confirmation conducted with a methanol solution of BF3 (14%).

Water Activity (aw): the *aw* levels of the samples were determined in triplicate at $25 \pm 0.1^\circ$ C in Aqualab Series 3TE instrument (Decagon®).

Moisture content (mc): *mc* determined by the gravimetric method.

Statistical analysis: The relationships between the variables of caffeine, tannin, *mc* and *aw* were evaluated by Pearson test. The coefficients of the linear relationships were determined using the method of least squares. Normality of the distribution of the variables tested using the Shapiro-Wilk test. The statistical analyses were performed using R software.

Results and discussion

Fungal strains and OTA production: some of the fungal strains identified in the samples were previously described in medicinal plants in other researches. Two filamentous strains isolated from 2% of the positive samples were identified as *Penicillium sp* and *Aspergillus sp* both of which were OTA producers. The presence of mycotoxigenic strains in powdered guarana was previously reported by Bugno et al. (2006). Our findings emphasize the importance of monitoring the different forms of guarana, because *Aspergillus* and *Penicillium* are widely distributed in the Brazilian ecosystem and are well known producers of mycotoxins. The levels of OTA were below the LOD in all of the samples (see Table 1). Bugno et al. (2006) identified fungi contaminating medicinal plants, including guarana. They were also found in coffee and cocoa with similar production process (Batista and Chalfoun, 2007).

Caffeine and tannins against OTA: the results for each alkaloid are presented in Table 1 as mean values and range. The mean of caffeine in the samples was 2.6 (from 1.85 to 2.9) g%. Despite this, the OTA levels in the evaluated samples were below the LOQ. The caffeine level of powdered guarana reported in the literature can reach 3.98 mg%, according to Souza et al. (2010). However, other authors have reported higher values of 4.28 mg% (Bauman, 1995) and 1.56-5.58 mg% (Meurer-Grimes et al., 1998). These results demonstrate that the caffeine levels in guarana are above those of other products reported contaminated with OTA, such as cocoa and coffee. The maximum content of caffeine in different varieties of Brazilian coffee reported by

Farah and Donangelo (2006) was 1.23 mg%, far below the levels found in our study. Therefore, the OTA levels, in the current study could be below the LOD because of some alkaloids (in higher amount in guarana) ability to suppress the biosynthesis of OTA by *Aspergillus* (Lee et al., 2007). Caffeine, for example, appears to inhibit mycotoxin synthesis by restricting the uptake of carbohydrates and fungi appear to synthesize the toxin. Lenovich (1981) reported that the caffeine level might influence OTA production because it exhibited activity against aflatoxin in cocoa seeds, with caffeine contents ranging from 0.3 to 3.6 mg%. However, Santini et al. (2011) found no correlation between the OTA and caffeine contents of different coffee preparations, with caffeine levels ranging from 0.06 to 0.16 mg/cup. Thus, the method of drying guarana seeds prior to grinding seems to decrease the levels of tannins and caffeine (Ushirobira et al., 2004). Considering that the standard of the Amazonian preparation is 10g/cup of powder guarana, it is possible to consume less than the average amount of caffeine. Another aspect considered is the absence of the skin (husk) of the guarana seeds used in the powder guarana production. According to Batista et al. (2009), the skin of coffee beans is a significant source of OTA and the cleaning steps and standardization methods effectively reduce the OTA level. During the industrial process of converting coffee beans into roasted coffee and soluble coffee, the OTA levels reduction can reach up to 90%. In guarana processing, removing the husk and roasting the seeds could positively affect the biosafety of the seeds. Some studies have been performed to understand the effect of UV light on food, as UV exposure is an alternative method to prevent the production of secondary metabolites such as OTA (Schmidt-Heydt et al., 2011). Powdered guarana production occurs under environmental conditions, with drying in sun light, which has a high incidence of UV light. Thus, this method may be a prevention factor. Consequently, it is possible to observe 100% of the guarana samples below the maximum limit allowed of 5µg/kg. The average for tannins was 14.75 g% (min. 10.09; max. 23.16). The tannin levels were higher than the 4.05 g% value reported by SOUZA et al. (2010) for powder guarana. Friedhelm et al. (1990) reported a level of 12.1 g%. No correlation was observed between the concentrations of caffeine and tannins in the current samples studied ($p=0.0621$). Those levels were higher than that reported by Savolainen (1992) for tannins in coffee samples, at 17-18 g%. Therefore, the tannins levels of the samples confirm the antitoxigenic properties of tannins observed in coffee and tea (Hasan, 1999). Although these studies did not examine other phenolic compounds, such

as the catechins, it has been reported the antioxidant effect and the ability to enhance the antimicrobial effect of guarana. (Basile et al. 2005).

Mc and aw levels: The average mc level of 6.25 % (min. 5.0; max. 8.78 %) in the samples was below the Brazilian regulation limit of 12 %. Those levels were consistent with the levels of 5.0-10.6% reported by Araujo et al. (2006). It is important to emphasize the influence of environmental conditions, such as relative humidity (RH %) and temperature, on the fungal metabolism, as those parameters provide an adequate caffeine level during the production process. The average of *aw* was 0.49 (min. 0.42; max. 0.53), similar to the values of 0.51 (min. 0.43; max. 0.58) which was reported by Copetti et al. (2011) in powder chocolate. Such levels are definitively associated to the production of mycotoxins.

In conclusion, the effects of alkaloids from guarana on OTA levels and fungal strains was studied and despite observed the presence of toxigenic strains in guarana, the OTA levels were below the LOQ (2.0 µg/kg), probably due to the high caffeine content fungi inhibition properties.

Acknowledgements

We are grateful to the Research Foundation of the State of Amazonas (FAPEAM) for financial support and the research fellowship.

References

- Araujo AAS, Mercuri LP, Seixas SRS, Storpirtis S, Matos JR (2006). Determination of humidity and ash content of guarana commercial samples using conventional method and thermal analysis. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 42: 269-277.
- Basile A, Ferrara L, Pezzo MD, Mele G, Sorbo S, Bassi P, Montesano D (2005). Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. Journal of Ethnopharmacology, 102:32-36.
- Batista LR, Chalfoun SM, Silva CF, Cirillo M, Varga EA, Schwan RF (2009). Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea Arabica* L.) processed by dry and wet methods. Food control, 20: 784-790.
- Batista LR, Chalfoun SM (2007). Incidence of ochratoxin A in fraction different coffee beans (*Coffea Arabica* L.): “boia”, mixes and varriacao. Ciencia e Agrotecnologia, Lavras, 31: 804-813.
- Belliardo F, Martelli A, Valle MG (1985). HPLC determination of caffeine and theophylline in *Paullinia cupana* Kunth (guarana) and *Cola*

- spp samples. Zeitschrift für Lebensmittel - Untersuchung und Forschung, 5: 398-401.
- Bugno A, Almodovar AAB, Pereira TC, Pinto TJA, Sabino M (2006). Occurrence of Toxigenic Fungi in Herbal Drugs. Brazilian Journal of Microbiology, 37: 47-51.
- Copetti MV, Iamanaka BT, Frisvad JC, Pereira JL, Taniwaki MH (2011). Mycobiota of cocoa: from farm to chocolate. Food microbiology, 28: 1499-1504.
- Fukumasu H, Silva TC, Avanzo JL, Lima CE, Mackowiak II, Atroch A, Spinosa HS, Moreno FS, Dagli MLZ (2006). Chemopreventive effects of *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, the guarana on mouse hepatocarcinogenesis. Cancer Letters, 233: 158-164.
- Farah A, Donangelo CM (2006). Phenolic compounds in coffee. Brazilian Journal of Plant Physiology, 18 (1): 23-36.
- Espinola EB, Dias RF, Mattei R, Carlini EA (1997). Pharmacological activity of Guarana (*Paullinia cupana* Mart) in laboratory animals, Journal Ethnopharmacology, 55: 223-229.
- Friedhelm M (1990). Analysis of guarana seeds II. Studies on the composition of the tannin fraction. Zeitschrift für Lebensmittel - Untersuchung und -Forschung. 190 (5): 429.
- Heard CM, Johnson S, Moss G, Thomas CP (2006). In vitro transdermal delivery of caffeine, theobromine, theophylline and catechin from extract of Guarana, *Paullinia Cupana*. International Journal of Pharmaceutics, 317: 26-31.
- Hasan HAH (1999). Role of caffeine and tannin in anti-toxigenic properties of coffee and tea. Cryptogamie Mycologie, 20 (1): 17-21.
- Kukoski EM, Fett R, Garcia AA, Troncoso GAM (2005). Propriedades químicas y farmacológicas del fruto guaraná (*Paullinia cupana*). VITAE, Revistade La Facultad de Química Farmacéutica, 2 (12): 45-52.
- Lee SE, Park BS, Bayman P, Baker JL, Choi WS, Campbell BC (2007). Suppression of ochratoxin biosynthesis by naturally occurring alkaloids. Food additives and contaminants, 24 (4): 391-397.
- Lenovich LM (1981). Effect of caffeine on aflatoxin production on cocoa beans. Journal of Food Science, 46 (2): 655.
- Majhenic L, Škerget A, Knez Z (2007). Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. Food Chemistry, 104: 1258-1268.
- Martins M, Kluczkowski AM, Souza TP, Pacheco C, Savi GD, Scussel VM (2014). Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* by guaraná (*Paullinia cupana Kunth*) and jucá (*Libidibia ferrea Mart*) extracts. African Journal of Biotechnology. 13 (1), 131-137.

- Meurer-Grimes B, Berkov A, Beck H (1998). Theobromine, theophylline, and caffeine in 42 samples and products of Guaraná (*Paullinia cupana*, Sapindaceae). *Economic Botany*, 3 (42): 293-301.
- Okuda T (2005). Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry*, 66: 2012–2031.
- Otobone FJ, Sanches AC, Nagae R, Martins JV, Sela VR, De Mello JC, Audi EA (2007). Effect of lyophilized extracts from guarana seeds [*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke] on behavioral profiles in rats. *Phytother Research Journal*, 21 (6): 531-535.
- Pitt JI., Hocking AD (1997). *Fungi and Food Spoilage*. Blackie Academic and Professional, London.
- Santini A, Ferracane R, Mikušová P, Eged S, Šrobárová A, Meca G, Mañes J, Ritieni A (2011). Influence of different coffee drink preparations on ochratoxin A content and evaluation of the antioxidant activity and caffeine variations. *Food Control*, 22:1240-1245.
- Samson RA, Hong SB, Frisvad JC (2006). Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Med. Mycol.* 44:133-148.
- Sanchez-Hervaz M, Gil JV, Bisbal F, Ramón D, Martínez-Culebras PV (2008). Mycobiota and mycotoxin producing fungi from cocoa beans. *International Journal of Food Microbiology*, 125: 336-340.
- Savolainen H (1992). Tannin content of tea and coffee. *Journal Applied Toxicology*, 12 (3): 191-192.
- Schmidt-Heydt M, Rüfer C, Raupp F, Bruchmann A, Perrone G, Geisen R (2011). Influence of light on food relevant fungi with emphasis on ochratoxin producing species. *International Journal of Microbiology*, 145: 229-237.
- Souza SA, Alves SF, De Paula JAM, Fiuza TS, Paula JR, Bara MTF (2010). Determination of tannins and methylxanthines in powdered guarana (*Paullinia cupana* Kunth, *Sapindaceae*) by high performance liquid chromatography". *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 20 (6): 866-870.
- Tfouni SAV, Camargo MCR, Vitorino SHP, Menegário TF, Toledo MCF (2007). Contribution of guaraná powder (*Paullinia cupana*) as a source of caffeine in the diet. *Journal of Nutrition*, 20 (1): 63-68.
- Ushirobira TMA, Yamaguti E, Uemura LM, Audi EA, De Melo JCP (2004). Physical chemical evaluation of guarana seeds dried by different methods. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 14 (1): 15-20.
- Weber RWS, Pitt D (2000). Teaching techniques for mycology: 11. Riddell's slide cultures. *Mycologist*. 14: 118-120.

Weckerle CS, Stutz MA, Baumann TW (2003). Purine alkaloids in *Paullinia*. *Phytochemistry*, 64: 735-742.



Figure 1. Illustrations of different forms of guarana (*Paullinia cupana* Kunth). (a) fruit. (b) seeds, (c) powder and (d) shells.

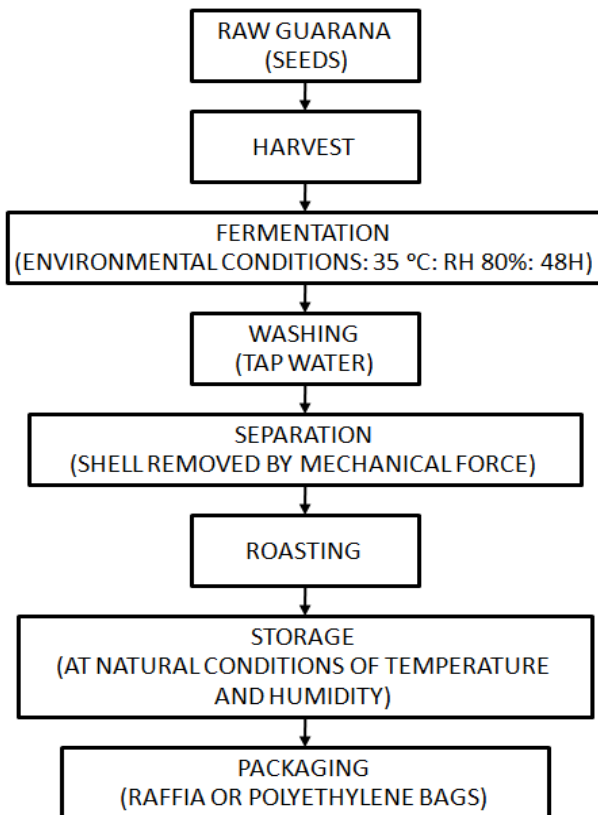


Figure 2. Flowchart of powder Guarana (*Paullinia cupana* Kunth) processing.

Table 1. Natural elements of powdered guarana (*Paullinia cupana* Kunth) and OTA distribution.

Variables	Levels (SD ^a)	Range
Caffeine (mg%)	2.60 ± 0.27	1.85 - 2.92
Tannin (mg%)	14.75 ± 4.92	10.09 - 23.17
Moisture content(g%)	6.25 ± 1.35	5.00 - 8.78
Water activity	0.49 ± 0.06	0.42 - 0.59
OTA ^b (µg/kg)	n.d. ^c	n.d. ^c

^aMean ± standard deviation calculated from the total samples ($N=30$)

^bOchratoxin A

^c Not detected in the samples evaluated by HPLC method with LOQ for Σ AFL = 2.0 µg/kg.

CAPÍTULO 3

INHIBITION OF GROWTH AND AFLATOXIN PRODUCTION OF *ASPERGILLUS PARASITICUS* BY GUARANÁ (*PAULLINIA CUPANA KUNTH*) AND JUCÁ (*LIBIDIBIA FERREA MART*) EXTRACTS

Trabalho publicado:
African Journal of Biotechnology (ISSN 1684-5315)
v. 13, n.1, p. 131-137, 2014.

**INHIBITION OF GROWTH AND AFLATOXIN PRODUCTION
OF *ASPERGILLUS PARASITICUS* BY GUARANÁ (*PAULLINIA
CUPANA KUNTH*) AND JUCÁ (*LIBIDIBIA FERREA MART*)
EXTRACTS.**

**INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE *ASPERGILLUS
PARASITICUS* E PRODUÇÃO DE AFLATOXINAS POR
EXTRATOS DE GUARANÁ (*PAULLINIA CUPANA KUNTH*) E
JUCÁ (*LIBIDIBIA FERREA MART*)**

**MARISTELA MARTINS¹ ARIANE MENDONCA
KLUSZCZOVSKI² TATIANE PEREIRA DE SOUZA²
CAROLINA PACHECO² GEOVANA DAGOSTIM SAVI¹ VILDES
MARIA SCUSSEL¹**

¹Laboratory of Mycotoxicology and Food Contaminants –
LABMICO, Food Science and Technology Department, Center of
Agricultural Sciences, Federal University of Santa Catarina,
Florianopolis, SC, Brazil

²Faculty of Pharmaceutical Sciences, Federal University of
Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil.

Abstract

In the present study, fruits extracts (*Paullinia cupana* M. & *Libidibia ferrea* M. - guaraná & jucá, respectively) of the Amazon Region were tested for antifungal and antimycotoxigenic activities against *Aspergillus parasiticus* using the agar dilution method. The treatments utilized were at three different concentrations (1.08, 1.62 and 3.24%). The effects both extracts on growth diameter of fungal colony was time and concentration dependent. No treatment completely inhibited fungi growth, however *A. parasiticus* was significantly reduced by the treatments when compared to the Control Group. The production of AFB1, AFB2, AFG1 and AFG2 by *A. parasiticus* grown on guaraná and jucá extracts treatment was significantly smaller when compared to controls. *A. parasiticus* strain produced aflatoxins in all concentrations when grown on guaraná extracts medium treated and different of that observed when on jucá's treated extracts.

Keywords: aflatoxin, *Aspergillus parasiticus*, *Paullinia cupana*, *Libidibia ferrea*.

Introduction

Aflatoxins, the secondary metabolites produced by strains of *Aspergillus flavus* (*A. flavus*) and *Aspergillus parasiticus* (*A. parasiticus*) are known to be potent carcinogens and hepatotoxic agents and pose a severe hazard to animal and human health (Stoloff, 1977). Aflatoxin B₁ (AFB₁) is the most potent of the four naturally occurring aflatoxins namely aflatoxins (AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂) (Figure 1). Thus foods contaminated with these toxigenic fungi and presence of aflatoxin is a major concern, which has received world wide attention due to their deleterious effects on human and animal health as well as their importance in international food trade (Mishra and Das, 2003).

A major challenge for several foods production is the control of contamination by aflatoxigenic fungi and aflatoxins production. Although there are many synthetic fungicides in use, their safety in foods are yet to be fully established and also the chances of obtaining newer fungicides that meet stringent environmental and food safety requirements through empirical synthesis do not appear to be high (Gopalkrishnan et al., 1997). The use of numerous plant extracts and their constituents may provide an alternative way to prevent fungal growth and aflatoxin formation (Fan and Chen, 1999; Mahmoud, 1999).

Medicinal plants constitute the basis of health care systems in many Amazonian communities in Brazil. Ethnopharmacological studies in this region indicate jucá (*Libidibia ferrea* Mart) as an antifungal, antimicrobial and anti-inflammatory healing plant of the Amazonian forest. Locals use it in the form of tea (leaves, fruits or peel), syrup (peel) and as oral mouth wash steeping the fruits in alcohol for days (Vieira, 1992; Di Stasi and Hiruma-Lima, 2002; Borrás, 2003; Sampaio et al., 2009).

In spite of its antimicrobial properties, most of the studies with the crude extract of jucá had focused on its high content of polyphenols and the analgesic, anti-inflammatory, antiulcer and cancer chemopreventive properties (Port's et al., 2013, Bacchi et al., 1995; Queiroz et al., 2001; Nakamura et al., 2002). The crude extract of jucá contains anthraquinones, alkaloids, depsides, depsidones, flavonoids, lactones, saponins, sugars, tannins, sesquiterpenes and triterpenes. Tannins are regarded as the major component (Souza et al., 2006).

The therapeutic properties of jucá fruits have been described and studied over the years and they include the treatment of wounds and

bruises and chronic cough and asthma relief (Hashimoto, 1996). Jucá fruits feature antiulcerogenic (Bacchi and Sertie, 1994; Bacchi et al., 1995), anti-inflammatory and analgesic properties (Carvalho et al., 1996). Souza et al. (2006) in their study to assess genetic toxicity, from three different concentrations of the crude extract obtained from the fruits of jucá investigated their potential cytotoxic and clastogenic and described that extract in rats showed no toxic effect.

Guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) is one of the best-known native examples of Brazilian Amazonian biodiversity, in addition to having great economic value (Kuskoski et al., 2005). Guaraná, a low-growing bush-type plant, is the richest vegetable source of caffeine (Mehr et al., 1996; Weckerle et al., 2003). The seeds of this plant also contain theophylline, theobromine, xanthine derivatives and tannins and also (catechin, epicatechin, proanthocyanidins) (Majhenic et al., 2007).

Because of its high caffeine content, its seed has been suggested to have natural protection against mycotoxins from toxigenic fungi. The activity of guaraná extracts against bacteria and fungi was tested demonstrating significant inhibition for several species (Basile et al., 2005; Majhenic et al., 2007).

Several substrates with antifungal activity of plant origin have been studied as a way to prevent the effects of toxigenic fungi, for example *Satureja hortensis* L. essential oil (Razzaghi-Abyaneh et al., 2008); traditional medicinal plants from Tamil Nadu, India (Duraipandiyam and Ignacimuthu, 2011); citrus species (Salas et al., 2011); combined plant extracts (Sindhu et al., 2011); eugenol (Komala et al., 2012); *Caesulia axillaris* Roxb. essential oil (Mishra et al., 2012); *Callistemon lanceolatus* (Sm.) Sweet essential oil (Shukla et al., 2012); essential oil from *Cicuta virosa* (Tian et al., 2012). To the best of our knowledge, there has not been a relevant study on the effectiveness of any species of *Paullinia cupana* K. and *Libidibia ferrea* M. against aflatoxin production by *A. parasiticus*. The objectives of the present investigation were to evaluate the efficiency of guaraná and jucá extracts against the growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*.

Material and methods

Plant material

Obtaining the vegetable raw material: The samples of guaraná (only the seeds) were acquired in a market in the city of Manaus. The jucá fruit (except its seeds) were collected in the city of Manaus-AM, Brazil, in September 2011. The identification was carried out in the Herbarium National Institute for Amazonian Research (INPA), which

was incorporated under the voucher specimen number 228022. The seeds and fruits of both Amazonian vegetables respectively were ground in a blender and grinder. Conventional sieves with a mesh of approximately 1 mm^2 were used to obtain homogeneous flour which was wrapped in plastic pots for later use in the tests.

Extract preparation

The guaraná and jucá extracts were obtained according to the method described by Majhenic et al., (2007), with some modifications. Samples were weighed into 6, 9 and 18 g quantities and added to 100 mL of ethanol (Synth, Diadema, Sao Paulo) /water (60:40 v/v). The extraction was carried out with magnetic stirring for 2 hours (room temperature), followed by Buchner funnel filtration through filter paper (Nalgon, porosity 3 and diameter 12.5 microns) with the aid of a vacuum pump. The final volume was adjusted to 100 mL with the solvent (ethanol/water 60:40 v/v).

Antifungal activity test

Fungal strains and Inocula

Strains of *A. parasiticus* were obtained from the culture collection of the Laboratory of Mycotoxicology and Contaminants in Foods - LABMICO - Federal University of Santa Catarina - UFSC. *The identification of fungi genera and species:* for the (a) *morphological characterization* of the isolated strains was carried out for the *Aspergillus* genera on MEA, GN25 and CYA media. On the other hand, the (b) *species identification* was performed through microcutive Czapek-dox for *Aspergillus* as described by Weber and Pitt (2000) and followed the Samson et al. (2006) keys. For the (c) *species micromorphological* observation, the isolates were examined under the light microscope (100x and 400x magnification) with species identification carried out according to the taxonomic keys and guides available as follows: Pitt and Hocking, 1997; Raper and Fennel, 1965.

The culture was maintained at 25 °C on slants of Potato Dextrose Agar (PDA). These fungus were previously cultivated in strains containing Malt Extract Agar (MEA) over the course of 7 days to assure fungus purity. Then, 10 ml of Tween 80 (Biokar) (0.02%, dissolved in distilled water) was added and the tubes were shaken for 1 min in a vortex to separate the conidia from the rest of the medium. The

conidia concentration in suspension was determined, using a Neubauer counting chamber. The value obtained was as follow: *A. parasiticus*, 1.0×10^7 conidia /ml.

Agar dilution method

Fungi were tested using the agar dilution method according to APHA, 1992, described by SALAS et al., (2011). In brief, the extracts (in the following concentrations: 1.08%, 1.62% and 3.24%) were added to culture medium at a ratio of 18/2 v / v (18 ml of medium and 2 ml of extract). The extracts were added to the medium and then 20 ml of the mixture was poured into a disposable petri dish (90x15mm). The medium in question was MEA, which contained 20 g of malt extract, 20 g of agar, 1 g of glucose, and 20 g of peptone per litre of distilled water. After the addition of medium, the plates were allowed to dry for two days. MEA plates without guaraná and jucá extracts (control), and MEA plates with the guaraná and jucá extracts were inoculated with the same inoculum in triplicate for each mould. For each treatment, a volume of 10 μ L of the conidia concentration in suspension was inoculated ($10 \pm 0.2 \mu$ L). The plates were incubated at $28 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ in the darkness for 8-12 days (for toxin production). In order to evaluate the fungi growth, two colony diameter measurements were taken to assess the treatment efficacy twice daily for 86 hours. The colony radius was plotted against time, and linear regression was used to obtain the growth rate constant (k).

Antimycotoxin activity test

To evaluate the mycotoxin production, *A. parasiticus* was grown on MEA medium containing the different concentration extracts and the Control (MEA without extracts-treatment), at temperature of 30°C and moisture content of 90% for 12 days. The fungi grown on each MEA medium was transferred into separating funnel and stirred with chloroform for aflatoxins extraction, followed by filtration through anhydrous sodium sulphate (Na_2SO_4), which was performed three times. The aflatoxin extract was evaporated with nitrogen stream at 60°C and quantified by thin layer chromatography (TLC) in plates of silica gel 60 G. The detection of AFB_1 , AFB_2 , AFG_1 and AFG_2 (produced by the *A. parasiticus* strains) was performed according to the methods of Moss and Badii (1982). The extracts were resuspended and the chromatogram developed in the following solvent system chloroform/ acetone (90:10).

Standard solutions and the fungi toxin extracts (10 μ L) were applied onto silica plates and the chromatographic run performed within 90 min. Finally, the plates were placed into a 356 nm UV light cabinet to detect the toxins fluorescence, limit of detection (LOD): 2 μ g/kg. AFB1 and AFB2 exhibited a bluish and AFG1 and AFG2 a yellow fluorescence, verified at the following Rfs: 0.55, 0.50, 0.45 and 0.40, respectively.

Statistical analysis

Colony fungal growth and antimycotoxin activity data were evaluated by analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni post-test. All analyses were expressed as the mean \pm S.D. and p values < 0.001 were considered statistically significant. The growth rate constant (k) of the two fungal species was estimated by linear regression. The analysis was conducted using the software Programme R (statistical software).

Results and discussion

Extract antifungal activity

Guaraná and jucá extracts showed inhibitory effects on growth and different degrees of antifungal activity was observed in the concentrations applied. Figure 2 and Table 1 shows the colonies growth and the growth constant (k) for different extracts types and concentrations, respectively.

Our results showed that the effect of guaraná and jucá extracts on growth diameter of fungi colony was time and concentration dependent (Figure 2). For the tests we used three different concentrations of extracts, 1.08% (treatment I), 1.62% (treatment II) and 3.24% (treatment III) and not treated control group. No treatment completely inhibited fungi growth. *A. parasiticus* was significantly reduced by all treatments when compared to the control. All treatments following 86 hours of incubation showed better inhibition compared to the control (mainly the treatment 1). The k was calculated for all fungi tested. Table 1 shows the values obtained for k as calculated by linear regression.

Amongst the previously toxigenic strains of *Aspergillus* evaluated, *A. parasiticus* was found to be highly toxigenic, producing AFB1, AFB2, AFG1 and AFG2, and selected for to verify the ability to produce aflatoxins in medium containing different extracts of plants of Amazon region in the present investigation. Although, there are earlier reports on variation of antifungal activity of plant products against

different species of a particular genus of a fungus (Prakash et al., 2010; Shukla et al., 2009) literature is mostly silent on variation of their efficacy at strain level of a particular fungal species.

The efficacy of guaraná and jucá extracts has so far been not well-explored against storage fungi and mycotoxin contamination. However, there are earlier reports on antimicrobial activity of guaraná extracts against three species of fungi: *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride* and *Penicillium cyclopium*, and two species of Gram negative bacteria: *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens* and one species of Gram positive bacteria: *Bacillus cereus* (Majenic et al., 2007), and antimicrobial activity of jucá extracts against of the following oral pathogens: *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus oralis* and *Lactobacillus* (Sampaio et al., 2009). To the best of our knowledge, there has not been a relevant study on the effectiveness of any species of *Paullinia cupana* K. and *Libidibia ferrea* M. against aflatoxin production by *A. parasiticus*.

Recent studies have demonstrated the antifungal activity of natural compounds extracted from different sources, for example, traditional medicinal plants from Tamil Nadu, India (Duraipandiyan and Ignacimuthu, 2011); citrus species (Salas et al., 2011); *Caesulia axillaris* Roxb. essential oil (Mishra et al., 2012); Sweet essential oil (Shukla et al., 2012); essential oil from *Cicuta virosa* (Tian et al., 2012). In spite of its antimicrobial properties, most of the previous studies with crude jucá extract were focused on its high polyphenols content and its analgesic, anti-inflammatory, antiulcer and cancer chemopreventive properties (Bacchi et al., 1995; Queiroz et al., 2001; Nakamura et al., 2002).

Antimycotoxin activity test

When different concentrations of extracts were added to the fungal cultures in liquid media, a remarkable reduction in aflatoxin synthesis was observed. The reduction in growth and toxin production was dependent on the concentration of extract. The production of AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂ by *A. parasiticus* grown on guaraná and jucá extracts treatment was significantly lower when compared to controls. *A. parasiticus* strain produced AFLs in all treatments when grown on guaraná extracts medium treated, different of what observed when that fungus grew on extracts jucá (Figure 3).

Recent studies have investigated the effects of different compounds (*Satureja hortensis* L. essential oil by Razzaghi-abyaneh et al., 2008; combined plant extracts by Sindhu et al., 2011 and eugenol by

Komala et al., 2012) on natural strains of *A. flavus* and *A. parasiticus* and their inhibition of aflatoxin production.

Ghorbanian et al., (2008) investigated effect of neem leaf extract on growth of *A. parasiticus* and production of aflatoxin and reported that the inhibition of aflatoxin synthesis by neem leaf extract was found to be time and dose dependent. Bhatnagar and McCormick (1988) also reported that neem leaf extracts added to fungal growth media did not affect fungal growth, but that they essentially blocked aflatoxin biosynthesis at concentrations greater than 10% due to the presence of volatile compounds such as 3-methyl-2-buten-1-ol. Turmeric inhibited spore count and aflatoxin production at the concentration of 0.1–1.0% with the highest percent reduction in toxin synthesis (85%) at 1.0% (Gowda et al., 2004). Soni et al., (1992) reported a 90% reduction in aflatoxin production at a 5–10 mg/mL concentration of turmeric, an effect attributed to the anti-oxidant curcumin in turmeric. It has been suggested that the regulation of aflatoxin synthesis and conidiogenesis may be interlinked, since the loss of aflatoxigenic capabilities in the non-aflatoxigenic variant strains of *A. parasiticus* was correlated with alterations in the conidial morphology (Kale et al., 1996). Ammonia vapors are used to inactivate mycotoxins and one of the characteristics of aflatoxin deactivation processes is that it should destroy the mycelia and spores of the toxic fungi, which may proliferate under favorable conditions (Namazi et al., 2002). Bullerman (1974) studied the effects of cinnamon on growth and aflatoxin production by known toxigenic strains of *A. parasiticus*. It was observed that the cinnamon is an effective inhibitor of aflatoxin production even though mycelium growth may be permitted. The results of the present study are in agreement with these findings.

Selvi et al., (2003) in their work on inhibitory effect of *Garcinia indica* extract on growth and aflatoxin production in *A. flavus* found that at lower concentration of 500 and 1000 ppm the inhibition of aflatoxin production is relatively greater than inhibition of fungus growth. Moreover, the essential oil had a reducing effect on ratio of total aflatoxins per mycelial dry weight, indicating what-ever the concentration of the essential oil increases not only the mycelia growth is prevented but also the ability of aflatoxin production by remaining mycelia is reduced.

Similarly, the concentrations of guaraná and jucá extracts that were investigated in this study decreased the fungal growth. This study was conducted for both extracts, providing a confirmation of previous studies that have suggested that these compounds could be natural

fungicides. No general rule can be proposed to explain the antifungal activity, and further studies on their activity and mechanisms of action must be carried out. However, the possible use of these compounds as natural antifungal agents reveals an interesting option for the decontamination of natural fungi and toxins in foods.

At the concentrations, applied no extract completely inhibited the growth of the strains under consideration; studies with higher concentrations, or mixtures of different extracts could be tested in order to completely inhibit the growth of fungi. In addition, the extracts should be investigated using an *in vivo* food matrix test.

This study also evaluates the potential efficacy of natural Amazonian extracts as compounds that effectively control the aflatoxin production. No significant differences were found between the concentrations of guaraná studied on the inhibition of aflatoxin concentrations and other studies could be performed to reduce the production of these substances in the strains under study. As shown, it would be possible to work with higher concentrations and mixtures of guaraná extracts to assess total aflatoxin inhibition. Regarding the jucá extracts, was not observed aflatoxins production above the method LOD (2 µg/kg) in two concentrations tested, therefore, further experiments should continue to assess the conditions tested here and should be adapted to an array of foods.

Conclusions

This work was an approach to study the individual potential efficacy of these extracts as natural compounds that effectively control the growth and aflatoxin production by *A. parasiticus*.

Based on the results of this study concluded that jucá extracts were more effective than the guaraná in controlling the growth and production of aflatoxins by *A. parasiticus* therefore, further experiments should continue to assess the conditions tested here and should be adapted to an array of foods.

The important reduction of aflatoxins production by jucá extracts suggests that phytochemical compounds could be used alone or in conjunction with other substances or processes to control the toxic metabolites production. These extracts must be subjected to further study to characterize the active compound define toxicity and evaluate economic feasibility.

References

- APHA. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3. ed. Washington, American Public Health Association, 1992. 1219 p.
- Bacchi E, Sertié JA (1994). Antiulcer action of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea* in rats. *Plant. Med.* 60 (2): 118-120.
- Bacchi EM, Sertie JAA, Villa N, Katz H (1995). Antiulcer action and toxicity of *styrax-camporum* and *Caesalpinia ferrea*. *Plant. Med.* 61 (3): 204-207.
- Basile A, Ferrara L, Del Pezzo M, Mele G, Sorbo S, Bassi P (2005). Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana Mart.* *J. Ethnopharmacol.* 102: 32-36.
- Bhatnagar D, McCormick S P (1988). The inhibitory effect of neem (*Azadirachta indica*) leaf extracts on aflatoxin synthesis in *Aspergillus parasiticus*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 65: 1166-1168.
- Borrás MRL (2003). *Plantas da Amazônia: Medicinais ou mágica?—Plantas comercializadas no mercado Adolpho Lisboa.* Editora Valer/Governo do Estado do Amazonas, Manaus.
- Bullerman LB (1974). Inhibition of aflatoxin production by cinnamon. *J. Food Sci.* 39: 1163-1165.
- Carvalho JCT, Teixeira JRM, Souza PJC (1996). Preliminary studies of analgesic and Anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. *J. Ethnopharmacol.* 53: 175 – 178.
- Di Stasi L C, Hiruma-Lima CA (2002). *Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica.* Unesp, São Paulo.
- Duraipandiyan V, Ignacimuthu S (2011). Antifungal activity of traditional medicinal plants from Tamil Nadu, India. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 204-215.
- Fan JJ, Chen JH (1999). Inhibition of aflatoxin-producing fungi by welsh onion extracts. *J. Food Protect.* 62: 414 – 417.
- Gopalkrishnan G, Banumathi B, Suresh G (1997). Evaluation of the antifungal activity of natural xanthenes from *Garcinia mangostana* and their synthetic derivative. *J. Nat. Prod.* 60: 519 – 524.
- Gowda NKS, Malathi V, Suganthi RU (2004). Effect of some herbal and chemical compounds on the growth of *Aspergillus parasiticus* and aflatoxin production. *Anim. Feed Sci. Technol.* 116: 281–291.
- Hashimoto G (1996). (ed.): *Illustrated Cyclopedia of Brazilian Medicinal Plants.* Aboc Sha, Kamakura, p. 646.

- Kale S, Cary JW, Bhatnagar D, Bennett JW. (1996). Characterization of experimentally induced, nonaflatoxigenic variant strain of *Aspergillus parasiticus*. Appl. Environ. Microbiol. 62: 3399–3404.
- Komala VV, Ratnavathi CV, Vijay Kumar BS, Das IK (2012). Inhibition of aflatoxin B1 production by an antifungal component, eugenol in stored sorghum grains. Food Control 26: 139-146.
- Kukoski EM, Fett R, Garcia AA, Troncoso GAM (2005). Propriedades químicas y farmacológicas Del fruto guaraná (Paullinia cupana). Rev. Facultad de Quím. Farmacêutica 12 (2): 45-52.
- Majhenic L, Skerget M, Knez Z (2007). Antioxidant and antimicrobial activity of guaraná seed extracts. Food Chem. 104: 1258-1268.
- Mahmoud, ALE (1999). Inhibition of growth and aflatoxin biosynthesis of *Aspergillus flavus* by extracts of some Egyptian plants. Lett. Appl. Microbiol. 29: 334 – 336.
- Mehr CB, Biswal RN, Collins JL, Cochran HD (1996). Supercritical carbon dioxide extraction of caffeine from Guarana. J. Supercrit. Fluids. 9: 185–191.
- Mishra HN, Das C (2003). A review on biological control and metabolism of aflatoxin. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 43: 245 – 264.
- Mishra PK, Shukla R, Singh P, Prakash B, Kedia A, Dubey NK (2012). Antifungal, anti-aflatoxigenic, and antioxidant efficacy of Jamrosa essential oil for preservation of herbal raw materials. Int. Biodeterior. Biodegrad.74: 11-16.
- Moss MO, Badii F (1982). Increased production of Aflatoxins by *Aspergillus parasiticus* spore in the presence of Rubratoxin B. Appl. Environ. Microbiol. 43: 895–898.
- Nakamura ES, Kurosaki F, Arisawa M, Mukainaka T, Okuda M, Tokuda H, Nishino H, Pastore F (2002). Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. Cancer Lett. 177: 119–124.
- Namazi M, Allameh A, Aminshahidi M, Nohee A, Malekzadeh F (2002). Inhibitory effect of ammonia solution on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* NRRL-2999. Acta Pol. Toxicol. 10: 65–72.
- Pitt JI, Hocking AD (1997). Fungi and Food Spoilage. Blackie Academic and Professional, London.
- Port's PS, Chisté RC, Godoy HT, Prado MA (2013). The phenolic compounds and the antioxidant potential of infusion of herbs from the Brazilian Amazonian region. Food Res. Int. 53 (2): 875–881

- Prakash B, Shukla R, Singh P, Kumar A, Mishra PK, Dubey NK. (2010). Efficacy of chemically characterized Piper betle L. essential oil against fungal and aflatoxin contamination of some edible commodities and its antioxidant activity. *Int. J. Food Microbiol.* 142: 114 – 119.
- Queiroz ML, Justo GZ, Valadares MC, Pereira-da-silva FR (2001). Evaluation of *Caesalpinia ferrea* extract on bone marrow hematopoiesis in the murine models of listeriosis and Ehrlich ascites tumor. *Immunopharm. and Immunot.* 23: 367–382.
- Raper KB, Fennel DI (1965). The genus *Aspergillus*. Baltimore: The Williams & Wilkins Company 686 p.
- Razzaghi-Abyaneh M, Shams-Ghahfarokhi M, Yoshinari T, Rezaee M, Jaimand K, Nagasawa H, Sakuda S (2008). Inhibitory effects of *Satureja hortensis* L. essential oil on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Int. J. Food Microbiol.* 123: 228–233.
- Salas MP, Céliz G, Geronazzo H, Daz M, Resnik SL (2011). Antifungal activity of natural and enzymatically-modified flavonoids isolated from citrus species. *Food Chem.* 124: 1411–1415.
- Sampaio FC, Pereira MSV, Dias CS, Costa VCO, Conde NCO, Buzalaf MAR (2009). *In vitro* antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. *J. Ethnopharm.* 124: 289–294.
- Samson RA, Hong SB, Frisvad JC (2006). Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Med. Mycol.* 44: 133 – 148.
- Selvi AT, Joseph GS, Jayaprakasha GK (2003). Inhibition of growth and aflatoxin production in *Aspergillus flavus* by *Garcinia indica* extract and its antioxidant activity. *Food Microbiol.* 20: 455–460.
- Shukla R, Kumar A, Singh P, Dubey NK (2009). Efficacy of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown essential oil and its monoterpene aldehyde constituents against fungi isolated from some edible legume seeds and aflatoxin B1 production. *Int. J. Food Microbiol.* 135: 165 – 170.
- Shukla R, Singh P, Prakash B, Dubey NK (2012). Antifungal, aflatoxin inhibition and antioxidant activity of *Callistemon lanceolatus* (Sm.) Sweet essential oil and its major component 1,8-cineole against fungal isolates from chickpea seeds. *Food Control* 25: 27-33.
- Sindhu S, Chempakam B, Leela NK, Suseela Bhai R (2011). Chemoprevention by essential oil of turmeric leaves (*Curcuma longa* L.) on the growth of *Aspergillus flavus* and aflatoxin production. *Food and Chem. Toxicol.* 49: 1188–1192.
- Soni KB, Rajan A, Kuttan R (1992). Reversal of aflatoxin induced liver damage by turmeric and curcumin. *Cancer Lett.* 66: 115–121.

- Souza AB, Souza LMS, Carvalho JCT, Maistro EL (2006). No clastogenic activity of *Caesalpinia ferrea* Mart. (Leguminosae) extract on bone marrow cells of Wistar rats. *Genet. Mol. Biol.* 29: 380–383.
- Stoloff L (1977). Aflatoxin – An Overview: Mycotoxin in Human and Animal Health. Pathotox Publisher, Park Forest South III. pp. 7–28.
- Tian J, Huang B, Luo X, Zeng H, Ban X, He J, Wang Y (2012). The control of *Aspergillus flavus* with *Cinnamomum jensenianum* Hand.-Mazz essential oil and its potential use as a food preservative. *Food Chem.* 130: 520–527.
- Vieira LS (1992). Fitoterapia da Amazônia: Manual das Plantas Mediciniais. Agronomica Ceres, São Paulo.
- Weber RWS, Pitt D (2000). Teaching techniques for mycology: 11. Riddell's slide cultures. *Mycologist* 14 (3), 118 – 120.
- Weckerle CS, Stutz MA, Baumann TW (2003). Purine alkaloids in *Paullinia*. *Phytochem.* 64, 735–742.

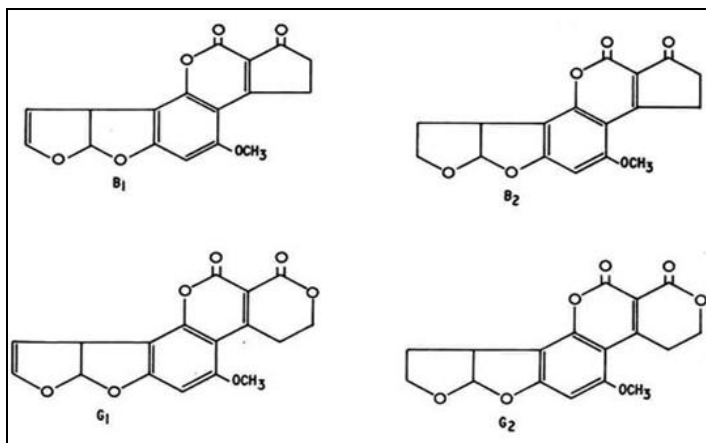


Figure 1. Chemical structure of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂.

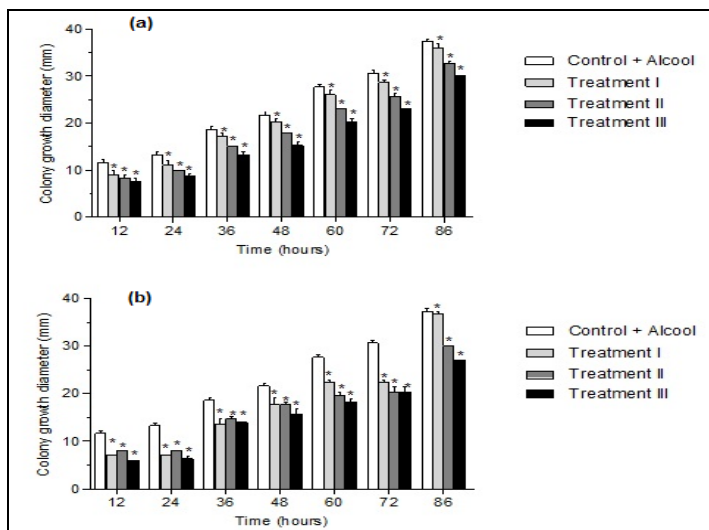


Figure 2. Antifungal activity of guaraná (a) and jucá (b) extracts on *A. parasiticus* on MEA at different concentrations (data are given as mean values and standard deviations of the diameter of fungal colonies - each point represents the mean of measurements in triplicate). Symbols indicate statistically significant compared with the control group * $p < 0.001$.

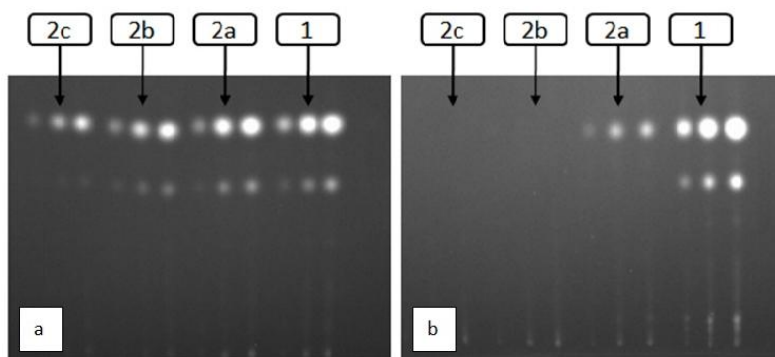


Figure 3. a) Effect of *guaraná* extracts treatment on aflatoxin production by *A. parasiticus* [(1) Control: no treatment; (2) *Guaraná* extracts treated: (2a) 1.08% (2b) 1.62% and (2c) 3.24%]. b) Effect of *jucá* extracts treatment on aflatoxin production by *A. parasiticus* [(1) Control: no treatment; (2) *Jucá* extracts treated: (2a) 1.08% (2b) 1.62% and (2c) 3.24%] by thin layer chromatography (TLC).

Table 1 - Growth constant (k) of colonies of *A. parasiticus* subjected to different types and concentrations of extract.

Specie	Group	Concentration (%)		
		1.08	1.62	3.24
<i>A. parasiticus</i>	Guaraná	0.3660 ± 0.0112	0.3291 ± 0.0094	0.3010 ± 0.0119
	Jucá	0.3774 ± 0.0263	0.2809 ± 0.0183	0.2793 ± 0.0143
	Control	0.3933 ± 0.0102		

CAPÍTULO 4

IN VITRO ACTIVITY OF THE BRAZIL NUT (BERTHOLLETIA EXCELSA H.B.K.) OIL IN AFLATOXIGENIC STRAINS OF *ASPERGILLUS PARASITICUS*

Trabalho submetido:

European Food Research and Technology (ISSN 1438-2377)

In vitro activity of the Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) oil in aflatoxigenic strains of *Aspergillus parasiticus*

**MARISTELA MARTINS¹ ARIANE MENDONCA
KLUSZCZOVSKI² VILDES MARIA SCUSSEL¹**

**¹Laboratory of Mycotoxicology and Food Contaminants –
LABMICO, Food Science and Technology Department, Center of
Agricultural Sciences, Federal University of Santa Catarina,
Florianopolis, SC, Brazil**

**²Faculty of Pharmaceutical Sciences, Federal University of
Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil.**

Abstract

The growing demand for safe foods without preservatives has fostered research to investigate the effects of natural compounds on microorganisms. Accordingly, an in vitro study was carried out to determine physico-chemical characterization and investigate the antimicrobial effects of Brazil nut oil on toxigenic strains of *Aspergillus*. The antifungal activity testing was carried out isolating *A. parasiticus* by transferring the strains to the center of the plates containing treatments with different concentrations of Brazil nut oil. The plates were incubated for eight days at 28°C with subsequent extraction of toxins. The aflatoxins AFB₁, AFB₂, AFG₁, and AFG₂ were determined by thin-layer chromatography. The values found for acidity, refractive index, and density ranged from 0.3512 to 0.7092, 1.4670 to 1.470, and 9.2×10^2 to 16.7×10^2 , respectively. The results obtained showed that the effect of Brazil nut oil on the growth diameter of the fungal colony was time and concentration dependent. After eight days of incubation, all treatments showed better fungal growth inhibition compared with that of the control. Total inhibition of aflatoxin production by the strain (LOQ of the method: 2 g/kg) was also observed in the medium containing the oil, while in the control treatment, AFB₁, AFB₂, and AFG₁ were produced by the inoculated strain *Aspergillus parasiticus*.

Keywords: antifungal, antiaflatoxigenic, aflatoxins.

Introduction

Fungal contamination of food and raw materials is a common public health problem in many countries, and it can also cause losses in the food production chain due to spoilage and mycotoxin production.

Aflatoxins belong to a group of fungal toxins known as mycotoxins and have been shown to be carcinogenic and hepatotoxic.¹ These substances are produced by strains, such as *Aspergillus sp.*, which have toxigenic potential. Synthetic chemicals such as fungicides and preservatives have long been used to reduce losses caused by contamination. However, the use of these products can cause environmental problems due to their residual toxicity, carcinogenicity, hormonal imbalance, and spermatotoxicity.²

Despite its role as a tool for increasing crop productivity, fungicides can contaminate water and soil of crop fields and neighboring areas affecting their fauna and flora.^{3,4} Fungicide resistance is one of the most important issues in modern agriculture. It may be the result of mutations of genes encoding fungicide targets (qualitative fungicide resistance) or resistance to different mechanisms that are induced by sub-lethal fungicide stress. These mechanisms result in different and varying levels of resistance (quantitative fungicide resistance).⁵ The growing demand for safe foods without preservatives has fostered research on alternative technologies to prevent contamination in a more natural way. Among some examples are plant extracts and essential oils.^{6,7}

The antibacterial and antifungal activity of essential oils and extracts of some plants has been reported in several studies.⁸⁻¹¹ Similarly, effective components, such as 6,7-dimethoxycoumarin from *Citrus sinensis*¹² and naphthoquinones from walnuts¹³, have been isolated in some cases. However, since nuts are commonly associated to toxigenic fungal contamination, some essential oils have also been tested to prevent contamination, for example in peanuts¹⁴ and Pistachios¹⁵. Nevertheless, natural extracts to prevent contamination of fungi have not yet been tested in Brazil nuts, which have high nutrition value and economic importance for the northern region of Brazil. Brazil nut oil, for example, can be extracted using different methods and conditions, and it is known as an excellent source of unsaturated fatty acids.^{16,17} Therefore, an *in vitro* study was carried out to determine physico-chemical characterization and investigate the antimicrobial effects of Brazil nut oil on toxigenic strains of *Aspergillus parasiticus*.

Material and methods

Sample collection and preparation: samples of unshelled Brazil nuts (dehydrated) were obtained from a processing plant located in Manaus, Amazonas. The oil was extracted by the cold press method using a hydraulic press (MARCONI, model ME 098) at room temperature (25°C) and initial and end pressure of 3 and 12 tons, respectively. The

oil obtained was stored in amber glass jars on a stainless steel shelf at room temperature ($25 \pm 5^\circ\text{C}$) and relative humidity of $80 \pm 15\%$.

Acidity index: the acidity of the oils obtained was determined according to the AOAC official method.¹⁸

Density index: The density of the oils was determined using a digital densitometer (TRADEMARK) at 25°C . Density index was read directly from the densitometer.

Refractive index: The refractive index was determined using a refractometer (ABBE-2WAJ, ATTO®).

Fatty acids profile: The characterization of the profile of the fatty acids extracted from fatty acid methyl esters was made as follows: the oil samples of 1.0 g were weighed in tubes by adding 10.0 mL of n-heptanol and stirred. Next, 0.50 mL of NaOH and 2.0 mol/L methanol, and they were stirred again for 20s. After the phases were separated, the supernatant was collected for gas chromatography analysis.¹⁶ The analyses were carried out in a gas chromatography using a SHIMADZU CG 14A chromatograph coupled with a computer using SHIMADZU CR4A CHROMATOPACH. The chromatographic conditions were: a fused-silica capillary column (Carbowax 50m) and 0.22 m inner diameter. The flow of the carrier (H_2) gas was $0.5 \text{ kg} / \text{cm}^2$. The injector temperature was 220°C , the detector 230°C and the column isometric 190°C for 60 seconds, followed by an increase in the ratio of $2^\circ\text{C} / \text{minute}$ up to a maximum temperature of 220°C , staying for 35 minutes.

Toxigenic strains: The *A. parasiticus* strains used in this study were isolated from commercial Brazil nuts obtained from a processing facility located in northern Brazil and were identified at the laboratory of Mycotoxicology and Food Contaminants – LABMICO, Federal University of Santa Catarina - UFSC. Identification of genera and species of the fungi: morphological characterization was carried out for the *Aspergillus* genera in MEA, CYA, and G25 media. On the other hand, identification was performed by growing *Aspergillus* species on Czapek-Dox agar, as described by Weber and Pitt¹⁹ and followed by Samson *et al.*²⁰ For micro-morphological observations, the isolated strains were examined under light microscopy at 100x and 400x magnification, and species identification was performed according to the taxonomic keys and guides of Pitt and Hocking²¹, Raper and Funcho²²; the culture was maintained at 25°C on Potato Dextrose Agar (PDA) slants. This culture was previously grown in test tubes containing PDA for 7 days to confirm the purity of the fungus. Subsequently, 10 ml of 0:02 % Tween 80 (Biokar) dissolved in distilled water was added, and

the tubes were vortexed for 1 min to break up the conidial chains. The concentration of conidia suspended was determined using a Neubauer counting chamber: *A. parasiticus*, 1.2×10^3 conidia/ml.

Effect of the Brazil nut oil extracted on the mycelial growth of A. parasiticus: the mycelial growth of *A. parasiticus* were evaluated using the agar dilution method according to APHA²³, as described by Salas et al.²⁴: Brazil nut oil was added to the culture medium at the following concentrations: 500 (T1), 1000 (T2), and 1500 μ L (T3) in 18 mL; and control treatment (CT), *i.e.*, without the addition of oil, was also used in the treatments. The oils were added to the PDA medium, and the mixture was then poured into disposable Petri dishes (90x15mm). The plates were dried for two days before inoculation. Colony diameter was measured every 24 hours for eight days to evaluate treatment efficacy. Antifungal activity was determined in terms of percentage of mycelial growth inhibition and calculated using the following formula: percentage of inhibition (%) = $(1 - T/C) \times 100$, where T is the diameter of the fungal colony in the treated sample and C is the diameter of the fungal colony in the control plate.

Extraction and quantification of aflatoxins: the aflatoxins B₁, B₂, G₁, and G₂ were evaluated by thin layer chromatography (TLC) according to the AOAC official method.¹⁸ After observation of mycelial growth, the contents of the Petri dishes were completely transferred to a separatory funnel and shaken thoroughly with 15 ml of chloroform for 10 minutes, and the chloroform extract was collected with three repetitions to ensure complete toxin removal. The pooled washings were filtered through Whatman filter paper and evaporated on a water bath under nitrogen atmosphere. The residues were dissolved in 1 mL of benzene:acetonitrile (98:2 v/v) and separated by thin layer chromatography. The plates were developed with chloroform: acetone (9:1 v/v). Standard solutions and the fungi toxin extracts (10 ml) were applied on silica plates, and the chromatographic run was performed within 90 min. Aflatoxins were detected by visual examination of the TLC plates under UV lamp at 365 nm and compared with fluorescent bands of the standard toxin; the limit of detection (LOD) was 2 μ g/kg. The AFB₁ and AFB₂ exhibited blue fluorescence, and AFG₁ and AFG₂ toxins exhibited green fluorescence at the following R_fs: 0.55, 0.50, 0.45, and 0.40, respectively.

Statistical analysis: The results were subjected to analysis of variance, and the means were compared by Tukey test at 5 % probability.

Results and discussion

Table 01 shows the values of acidity, refractive index, and density obtained in the present study. The Acidity index values found ranged from 0.3512 to 0.7092 (% FFA). The values found are in compliance with the maximum limit established by the Brazilian laws for refined cold pressed oils (4.0 mg KOH/g of oil).²⁵ The values are in agreement with those found by Santos *et al.*¹⁶ and above the mean value of 0.20, found by Ferreira *et al.*²⁶

Table 01 - Physico-chemical characterization of Brazil nut oil.

Analysis	Results	Maximum Values ^a
Acidity index (mgKOH/g)	0.3512 - 0.7092	4,0 mgKOH/g
Refraction index (20 °C)	1.4670 - 1.470.	ND ^b
Density (g/mL)	9.2 x10 ² - 16.7 x10 ²	ND ^b

^a National Sanitary Surveillance Agency (ANVISA)(BRASIL, 2005)

^b Not specified.

The refractive index values of the Brazil nut oil found ranged from 1.4670 to 1.470. These results are similar to those found by Neto *et al.*²⁷ and Ferreira *et al.*²⁸, who studied the characterization of crude Brazil nut oil and found mean values of refractive index of 1.466 at 20°C and 1.4451 at 25°C, respectively. The refractive index values found in the present study are consistent with those found by Santos *et al.*¹⁶ The density values ranged from 9.2 x10² to 16.7 x10² g/mL. The mean density value found by Santos *et al.*¹⁶ and Ferreira *et al.*²⁶, 9.6 x10² (kg/m³) and 0.910 g/ml, respectively, were similar to the values obtained in the present study. Therefore, it can be said that the Brazil nut oil obtained comply with the reference values in terms of quality parameters.

The Table 2 shows the results of composition of the major fatty acids of the crude oil Brazil nut analyzed by gas-liquid chromatography. The results of the present study confirm previous studies where the composition of the crude oil shows high content of unsaturated fatty acids, 36.21 to 51% of monounsaturated oleic fatty acid, and 34 to 38.28% of oleic fatty acid.^{29,26,30} According to Silva *et al.*²⁹, the oleic fatty acid is the main component of almond oil, but Brazil nut is also a source of

polyunsaturated fatty acids.^{29,26,30} Saraiva *et al.*³¹ found linoleic acid levels between 30 - 47%.

Table 02. Characterization fatty acids of Brazil nut oil.

Fatty acids profile	Structure	Experiment
Palmitic (%)	(C16)	13.5±0.01 ^{ab}
Stearic (%)	(C18)	11.3±0.03 ^a
Oleic (%)	(C18:1, W-9)	38.1±0.03 ^a
Linoleic (%)	(C18:2, W-6)	35.6±0.03 ^a
Linolenic (%)	(C18:3, W-9)	0.3±0.00 ^a

Data represent the mean ± standard deviation of triplicate determinations.

Different letters in the same row indicate statistical significant difference (p<0.05).

Effect of Brazil nut oil on the growth of Aspergillus parasiticus: The results showed that the effect of Brazil nut oil on the growth diameter of the fungal colony was time and concentration dependent (Figure 1). Since in addition to the control treatment (CT), three different concentrations of oil were used in the treatments, 500 (T1), 1000 (T2), and 1500 µL (T3), it was possible to observe inhibition of fungal growth in all concentrations tested. The mycellial growth of *Aspergillus parasiticus* was significantly reduced in all treatments compared to that of the control. After eight days of incubation, all treatments showed better fungal growth inhibition compared to that of the control (especially T1). There was no significant difference between the treatments.

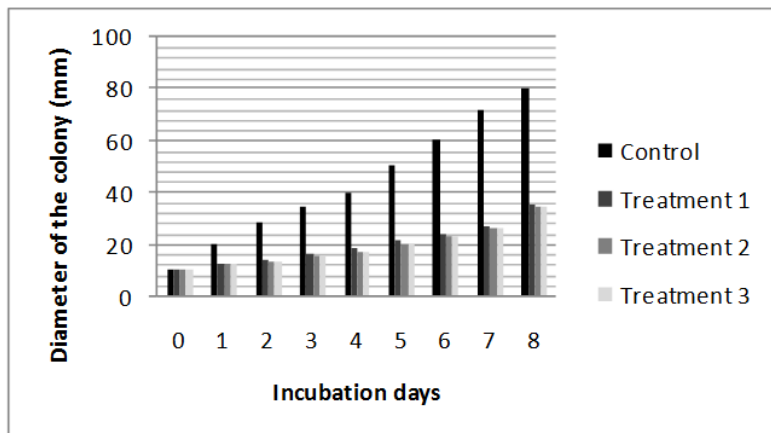


Figure 01. Growth of *A. parasiticus* on effect of Brazil nut oil in different concentrations: 500 (T1); 1000 (T2) e 1500 μL (T3), for 8 dias / 28 ° C.

Essential oils are known as rich sources of antimicrobial compounds. They may be consisted of a large number of structurally different chemical components and may have more than 50 individual components in individual oil.³² The antifungal effect of an essential oil depends on its chemical composition and application method.^{33,34} Previous studies have shown that some natural preparations, *i.e.*, aqueous extracts of neem (*Azadirachta indica* A. Juss)³⁵ and essential oils of Thymus, Thymus x- Prolock, and Thymus eriocalyx³⁶ inhibited the growth of *A. parasiticus* and aflatoxin production in a dose-dependent manner. In a study of Razzaghi-Abyaneh *et al.*⁷, the essential oils tested had a significant inhibitory effect on lag phase, growth rate, and AFB₁ accumulation by *Aspergillus* section Flavi. This study showed that the effectiveness of these essential oils was influenced by changes in their concentrations and substrate water availability. Matan and Matan³⁷ reported the inhibitory effects of anise, lemon, and mandarin oils on certain fungi by the broth dilution method.

The essential oil of anise proved highly inhibitory of fungal growth, with minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) values of 40 $\mu\text{L}/\text{ml}^{-1}$ against *Aspergillus niger* and 60 $\mu\text{L}/\text{ml}^{-1}$ against *P. chrysogenum*, respectively. Similarly, thyme essential oil and thymol, its main component, showed remarkable efficacy in inhibiting AFB₁ production by toxigenic strain of *A. flavus*.^{38,39} The mycelial growth and production of AFB₁ in SMKY broth were reduced. With the increase in the concentrations of the thyme

essential oil to up $0.7 \mu\text{l/ml}^{-1}$, mycelial growth was completely inhibited, while the production of AFB₁ was observed even at $0.6 \mu\text{l/ml}^{-1}$.³⁸

Effect of Brazil nut oil on aflatoxin production: This study evaluated the effectiveness of Brazil nut oil against aflatoxin production by *A. parasiticus*. When different concentrations of the oil were added to fungi in liquid culture medium, total inhibition of aflatoxin production (LOQ of the method: 2 g/kg) by the strain was observed in the medium containing the oil. In the control treatment, on the other hand, it was found that AFB₁, AFB₂, and AFG1 were produced by the inoculated strain of *Aspergillus* (Figure 2).

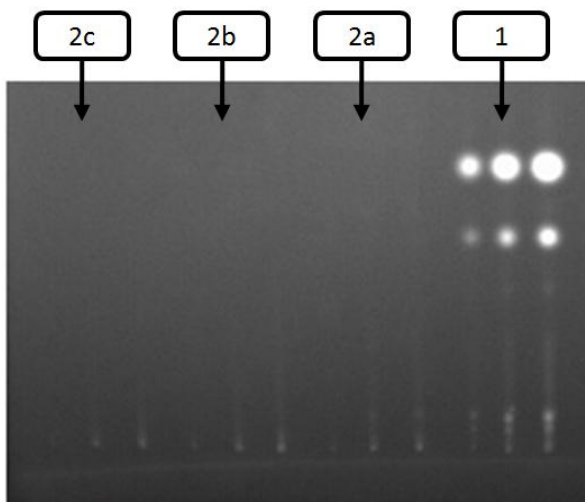


Figure 02. Effect of the Brazil nut oil on aflatoxins production by *Aspergillus parasiticus* [(1) Control (TC); (2) Brazil nut oil treatments: (2a) 500 μL (T1), (2b) 1000 μL (T2), e 1500 μL (T3) by thin-layer chromatography.

According to Basappa⁴⁰, 65-70% of aflatoxin contamination in crude peanut oil was observed in the sediment, while about 30-35% was observed in the supernatant, indicating that the toxin is sparingly soluble in this oil. Idris *et al.*⁴¹ found that unrefined oils are more susceptible to aflatoxin contamination. Another factor that may affect aflatoxin accumulation in oils is the presence of selenium since it is believed that its reduction occurs by covalent attachment to proteins forming selenoproteins, such as glutathione peroxidase and thioredoxin reductase, which have similar antioxidant properties.⁴² Selenium can be

found in Brazil nuts in varying concentrations.⁴³⁻⁴⁷ Such variation can be explained by the fact that selenium is found in different concentrations in different types of soils.⁴⁸ According to Pacheco and Scussel,⁴⁸ aflatoxin contamination in Brazil nuts seems to increase with the increase in the concentration of selenium; however this mineral has an affinity for the protein molecule and not for the lipid fraction. On the other hand, Brazil nut has high levels of polyunsaturated fatty acids,¹⁶ which can affect fungal metabolism. According to Fraga *et al.*⁴⁹, some fungi have fatty acids in their mycelia composition. Among them are the palmitic acid (C16:0), stearic acid (C18: 0), oleic acid (C18: 1), and linoleic acid (C18: 2), which account for 95 % of the fatty acids of *Aspergillus*. Therefore, the activity of fatty acids against the metabolism of fungi⁵⁰ could have affected colony growth and inhibited aflatoxin production, which is a possible explanation for the results found.

On the other hand, Khan and Ahmad⁵¹ conducted an ultra structure analysis and highlighted multiple sites of action of eight essential oils on fungal cells, including damages to the cell walls and membranes and to cytoplasmic *A. fumigatus* and *Trichophyton rubrum* contents. In addition, these authors have also shown that the oils studied inhibited elastase and keratinase enzymes. It is believed that the lipophilic properties of oils can assist in the penetration of cell membranes and accumulation of polysaccharides under hydric stress conditions. This can lead to plasmalemma rupture in yeast cells.⁵² Nevertheless, those authors observed that high concentration of essential oils (2500 μL^{-1} of boldo and 1500 μL^{-1} of clover) completely inhibited the growth and accumulation of AFB₁ by *Aspergillus sp.* under water activity of 0.98. According to Soliman and Badeaa⁵³, the extent of inhibition of fungal growth and mycotoxin production are dependent on the concentration of the essential oils used; a positive correlation was observed between fungal growth and aflatoxin production.⁵⁴ The antimicrobial activity of essential oils is mainly due to the presence of phenols and other compounds.⁵⁵⁻⁵⁶

Treatment with essential oils regulates conidiogenesis, and aflatoxin synthesis may be interrelated with the loss of the aflatoxigenic capabilities of *A. parasiticus* that are correlated with alterations in the conidial morphology.⁵⁷ Moreover, the lysis of hyphae and spores of the toxigenic fungi are characteristic of the aflatoxin deactivation process.^{58,59} Essential oils could act on the hyphae of the mycelium leading to various components exiting the cytoplasm, potentially causing loss of the integrity and rigidity of the hyphal cell wall.^{60,61} Furthermore, antimicrobial activity might cause terpenes, which are

present in essential oils, to cross cell membranes thus penetrating the interior of the cell and interacting with critical intracellular sites.⁶²

Low concentrations of essential oils can lead to changes in the cell structure by inhibiting cellular respiration and altering the permeability of microbial cell membrane, whereas high concentrations may damage the cell membrane leading to homeostasis destabilization, which can affect the enzymatic systems. Some studies have shown a strong influence on the reproduction and mycelial growth of the fungus by the presence of aflatoxin. According to Brodhagen and Keller⁶³, a decrease in *A. flavus* sporulation prevents the production of secondary metabolites (aflatoxins B₁ and B₂). This is due to the existence of a metabolic pathway that is controlled by the G protein. Factors such as stress, virulence, and external factors are responsible for sporulation reduction. Kumar et al.³⁹ evaluated the effect of *Thymus vulgaris* essential oil on the mycelial growth and production of aflatoxin B1 produced by *A. flavus*. The results showed a complete inhibition of mycelial growth in culture medium at 700 ppm concentration. This essential oil also showed activity on the production of aflatoxin B1 with a decrease in production with increased microorganism concentration until complete inhibition at 600 ppm concentration. Therefore, the production of aflatoxin could have been suppressed with an increased oil concentration.

Conclusions

Different strategies related especially to interactions between plants and fungi, in which the biosynthesis of aflatoxin is a complex characteristic, have been used for preventing the contamination of susceptible crops and agricultural commodities with carcinogenic aflatoxins. Natural inhibitors of either fungal growth or aflatoxin production from plants and microorganisms are possible candidates for reducing aflatoxin contamination without incurring the damage that arise from the use of synthetic chemicals. The results of this study show the possibility of using natural compounds as alternatives to pesticides to control the growth of fungi and aflatoxins. The central finding of our study is that Brazil nut oil effectively inhibited the growth and aflatoxin production by *A. Parasiticus*.

Acknowledgements

We are grateful to the Research Foundation of the State of Amazonas (FAPEAM) for financial support and the research fellowship.

References

1. IARC, International Agency of Research on Cancer. (1997). Evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances: aromatic amines and mycotoxins. In: IARC Monographs. Lyon, 56, p. 245-395.
2. Grisolia CK, Ethylene-bisdithiocarbamate fungicides: aspects of genotoxicity, carcinogenicity and teratogenicity. *Pesticidas*, **5**: 19-32 (1995).
3. Battaglin AW, Sandstrom MW, Kuivila KM, Kolpin DN and Meyer MT, Occurrence of azoxystrobin, propiconazole and selected other fungicides in US streams, 2005-2006. *Water, Air, Soil Pollut.*, **218**: 307-322 (2011).
4. Silva DRO, Avila LA, Agostinetto D and Dal Magro T, Pesticides monitoring in surface water of rice production areas in southern Brazil. *Rural Science*, **39**: 2383-2389 (2009).
5. Deising HB, Reimann S and Pascholati SF, Mechanisms and significance of fungicide resistance. *Brazilian Journal of Microbiology* **39**(2): 286-295 (2008).
6. Manso S, Cacho-Nerin F, Becerril R and Nerín C, Combined analytical and microbiological tools to study the effect on *Aspergillus flavus* of cinnamon essential oil contained in food packaging. *Food Control*, **30**: 370-378 (2013).
7. Razzaghi-Abyaneh M, Shams-Ghahfarokhi M, Rezaee M, Jaimand K, Alinezhad S, Saberi R and Yoshinari T, Chemical composition and antiaflatoxigenic activity of *Carum carvi* L., *Thymus vulgaris* and *Citrus aurantifolia* essential oils. *Food Control*, **20**: 1018-1024 (2009).
8. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D and Idaomar M, Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, **46**: 446-475 (2008).
9. Burt S, Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – A review. *International Journal of Food Microbiology*, **94**: 223-253 (2004).
10. Shams-Ghahfarokhi M, Shokoohamiri MR, Amirrajab N, Moghadasi B, Ghajari A and Zeini F, In vitro antifungal activities of *Allium cepa*, *Allium sativum* and ketoconazole against some pathogenic yeasts and dermatophytes. *Fitoterapia*, **77**: 321-323 (2006).
11. Webster D, Taschereau P, Belland RJ, Sand C and Rennie RP, Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. *Journal of Ethnopharmacology*, **115**: 140-146 (2008).

12. Mohanlall V and Odhav B, Biocontrol of aflatoxins B1, B2, G1, G2, and fumonisin B1 with 6,7-dimethoxycoumarin, a phytoalexin from *Citrus sinensis*. *Journal of Food Protection*, **69**: 2224–2229 (2006).
13. Mahoney N, Molyneux RJ and Campbell BC, Regulation of aflatoxin production by naphthoquinones of walnut (*Juglans regia*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**: 4418–4421 (2000).
14. Passone MA, Girardi NS, Ferrand CA and Etcheverry M, In vitro evaluation of five essential oils as botanical fungitoxicants for the protection of stored peanuts from *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* contamination. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **70**: 82–88 (2012).
15. Al-Gahtani MF, Al-Othman MR, Mahmoud MA and Abd El-Aziz ARM, Anti-aflatoxigenic effect of essential oils on *Aspergillus* Spp. isolated from pistachio in Saudi Arabia. *African Journal of Microbiology Research*, **7**(25): 3151–3159 (2013).
16. Santos OV, Corrêa NCF, Soares FASM, Gioielli LA, Costa CEF and Lannes, SCS, Chemical evaluation and thermal behavior of Brazil nut oil obtained by different extraction processes. *Food Research International*, **47**, 253–258 (2012).
17. Freitas SP, Freitas-Silva O, Miranda IC and Coelho MAS, Extraction and simultaneous separation of the Brazil nuts oil with ethanol. *Food Science and Technology*, **27**: 14–17 (2007).
18. Association of Official Analytical Chemists (AOAC), Official methods of analysis of the 18th international AOAC, Horwitz, W., Latimer, G. W., Jr., Eds.; AOAC: Gaithersburg, MD (2005).
19. Weber RWS and Pitt D, Teaching techniques for mycology: 11. Riddell's slide cultures. *Mycologist*, **14** (3): 118–120 (2000).
20. Samson RA, Hong SB, Frisvad JC, Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Medical Mycology* **44**: 133–148 (2006).
21. Pitt JI and Hocking AD, *Fungi and Food Spoilage*. Blackie Academic and Professional, London (1997).
22. Raper KB and Fennel DI, *The genus Aspergillus*. Baltimore: The Williams & Wilkins Company 686 p. (1965).
23. APHA-American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and was and wastewater. 16 ed. Washington: American Public Health Association. (1999).
24. Salas MP, Céliz G, Geronazzo H, Daz M and Resnik SL, Antifungal activity of natural and enzymatically-modified flavonoids isolated from citrus species. *Food Chemistry* **124**: 1411–1415 (2011).

25. BRASIL. Resolução RDC/ANVISA/MS n° 270 (2005, de 22 setembro de). Regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 23 set. 2005. Seção 1. [Retrieved in Aug 11th., 2010, from]. http://www.suvisa.rn.gov.br/contentproducao/aplicacao/sesap_suvisa/arquivos/gerados/resol_270_set_2005.pdf.
26. Ferreira ES, Silveira CS, Lucien VG, Amaral AS, Caracterização físico-química da amêndoa, torta e composição dos ácidos graxos majoritários do óleo bruto da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). *Alimentos e Nutrição*, **17**(2): 203-208 (2006).
27. Neto VQ, Bakke OA, Ramos CMP, Bora PS, Letelier JC and Conceição MM, Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K) seed kernel oil: characterization and thermal stability. *Revista de Biologia e Farmácia*, **3** (1): 33-42 (2009).
28. Ferreira ES, Silveira CS, Lucien VG, Amaral AS and Silveira CS, Caracterização físico-química do fruto e do óleo extraído de Tucumã (*astrocaryum vulgare* mart). *Alimentos e Nutrição*, **19**: 427–433 (2008).
29. Silva RF, Ascheri JLA and Souza JML, Influence of Brazil nut processing on the quality of nuts. *Science and agro-technology*, **34** (2): 445-450 (2010).
30. Gonçalves JF, Fernandes AV, Oliveira AFM, Rodrigues LF and Marenco RA, Primary metabolism components of seeds from brazilian amazon tree species. *Brazilian Journal Plant Physiology*, **14**(2): 139-142 (2002).
31. Saraiva SA, Cabral EC, Eberlin MN and Catharino RR, Amazonian Vegetable Oils and Fats: Fast Typification and Quality Control via Triacylglycerol (TAG) Profiles from Dry Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry Fingerprinting. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, **57**: 4030-4034 (2009).
32. Wang Q, Yang Y, Zhao X, Zhu B, Nan P and Zhao J, Chemical variations in the essential oil of *Ephedra sinica* from Northeastern China. *Food Chemistry*, **98**: 52-58 (2006).
33. Chu CL, Liu WT and Zhou T, Fumigation of sweet cherries with thymol and acetic acid to reduce postharvest brown rot and blue mold rot. *Fruits*, **52**:123-129 (2001).
34. Suhr KI and Nielsen PV, Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye spoilage fungi. *Journal of Applied Microbiology*, **94**: 665-674 (2003).

35. Razzaghi-Abyaneh M, Allameh A, Tiraihi T, Shams-Ghahfarokhi M and Ghorbanian M, Morphological alterations in toxigenic *Aspergillus parasiticus* exposed to neem (*Azadirachta indica*) leaf and seed aqueous extracts. *Mycopathologia*, **159**: 565-570 (2005).
36. Rasooli I and Razzaghi-Abyaneh M, Inhibitory effects of Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Food Control*, **15**: 479-483 (2004).
37. Matan N and Matan N, Antifungal activities of anise oil, lime oil and tangerine oil against molds on rubberwood (*Hevea brasiliensis*). *International Biodeterioration & Biodegradation*, **62**: 75-78 (2008).
38. López-Malo A, Alzamora SM and Palou E, *Aspergillus flavus* growth in the presence of chemical preservatives and naturally occurring antimicrobial compounds. *International Journal of Food Microbiology*, **99**: 119-128 (2005).
39. Kumar A, Shukla R, Singh P, Prasad CS and Dubey NK, Assessment of *Thymus vulgaris* L. essential oil as a safe botanical preservative against post harvest fungal infestation of food commodities. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **9**: 575-580 (2008).
40. Basappa SC and Sreenivasamurthy V, State of aflatoxin in groundnut oil. *Journal of Food Science and Technology*, **14**: 57-60 (1977).
41. Idris YMA, Mariod AA, Elnour IA and Mohamed AA, Determination of aflatoxin levels in Sudanese edible oils. *Food and Chemical Toxicology*, **48**: 2539-2541 (2010).
42. Pontual ML, Tuji FM, Barros SP, Bóscolo FN, Novaes PD and de Almeida SM, Ultra structural evaluation of the radioprotective effect of sodium selenite on submandibular glands en rats. *Journal Applied Oral Science*, **15** (3): 162-168 (2007).
43. Reilly C, Metal contamination of food. 2nded. London: Elsevier, 1991. 284p. (1991).
44. Chunhieng T, Pétritis K, Elfakir C, Brochier J, Goli T and Montet D, Study of selenium distribution in the protein fractions of the Brazil nut, *Bertholletia excelsa*. *Journal Agricultural and Food Chemistry* **52**: 4318-4322 (2004).
45. Souza ML and Menezes HC, Processamentos de amêndoa e torta de castanha-do-Brasil e farinha de mandioca: parâmetros de qualidade. *Ciênc. Tecnol. Alim.*, **24** (1): 120-128 (2004).

46. Dumont E, Vanhaecke F and Cornelis R, Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **385**: 1304-1343 (2006).
47. Thomson CD, Chisholm A, McLachlan SK and Campbell JM, Brazil nuts: an effective way to improve selenium status. *American Journal of Clinical and Nutrition*, **87**: 379–384 (2008).
48. Pacheco AM and Scussel VM, Selenium and aflatoxin levels in raw Brazil nuts from the Eastern and Western Amazon basin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55** (26): 11087-11092 (2007).
49. Fraga EM, Santana DMN, Gatti MJ, Direito GM, Cavaglieri LR and Rosa CAR, Characterization of *Aspergillus* species based on fatty acid profiles. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **103** (6): 540-544 (2008).
50. Calvo AM, Hinze LL, Gardner HW and Keller NP, Sporogenic Effect of Polyunsaturated Fatty Acids on Development of *Aspergillus* spp. *Applied Environmental Microbiology*, **65**(8): 3668–3673 (1999).
51. Khan MSA and Ahmad I, In vitro antifungal, anti-elastase and anti-keratinase activity of essential oils of *Cinnamomum*-, *Syzygium*- and *Cymbopogon* species against *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*. *Phytomedicine*, **19** (1): 48-55 (2011).
52. Ultee A, Bennink MHJ and Moezelaar R, The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the foodborne pathogens *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**: 1561-1568 (2002).
53. Soliman KM and Badeaa RI Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food Chemistry and Toxicology*, **40**: 1669–1675 (2002).
54. El-Habib R, Antifungal activity of some essential oils on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production. *Journal Food Agricultural and Environmental*, **10** (2): 274-279 (2012).
55. Toda M, Okubo S, Hiyoshi R and Shimamura T, The bacterial activity of tea and coffee. *Letters Applied Microbiology*, **8**: 123–125 (1989).
56. Ebana RUB, Madunagu BE, Ekpe ED and Otung NI, Microbiological exploitation of cardiac glycosides and alkaloids from *Garcinia kola*, *Borreria ocymoides*, *Kola nitida* and *Citrus aurantifolia*. *Journal Applied Bacteriology*, **71**: 398–401 (1991).
57. Kale S, Cary JW, Bhatnagar D and Bennett JW, Characterization of experimentally induced, nonaflatoxigenic variant strain of *Aspergillus parasiticus*. *Applied Environmental Microbiology*, **62**: 3399–3404 (1996).

58. Knobloch K, Pauli A, Iberl B, Wigand H and Weis N, Antibacterial activity and antifungal properties of essential oil components. *Journal Essential Oil Research*, **1**: 119–128 (1988).
59. Namazi M, Allameh A, Aminshahidi M, Nohee A and Malekzadeh F, Inhibitory effect of ammonia solution on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* NRRL-2999. *Acta Pol. Toxicology*, **10**: 65–72 (2002).
60. Nicola SI, Cantore PL, Capasso F and Senatore F, Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. essential oils. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, **53** (1): 57-61 (2005).
61. Sharma N and Tripathi A, Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* Van Tieghem. *Microbiology Research*, **163**(3): 337-344 (2008).
62. Cristani M, d'Arrigo M, Mandalari G, Castelli F, Sarpietro MG, Micieli D, Venuti V, Bisignano G, Saija A and Trombetta D, Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, **55**(15): 6300-6308 (2007).
63. Brodhagen M and Keller NP, Signalling pathways connecting mycotoxin production and sporulation. *Molecular Plant Pathology*, **7**: 285-301 (2006).

CAPÍTULO 5

INHIBITION OF AFLATOXINS PRODUCTION ON BRAZIL NUT (*BERTHOLLETIA EXCELSA* HBK) TREATED BY JUCA (*LIBIDIBIA FERREA* MART.) AMAZONIAN EXTRACT

Trabalho submetido:

Food Control (ISSN 0956-7135)

**INHIBITION OF AFLATOXINS PRODUCTION ON BRAZIL
NUT (*BERTHOLLETHIA EXCELSA* HBK) TREATED BY JUCA
(*LIBIDIBIA FERREA* MART.) AMAZONIAN EXTRACT**

**MARISTELA MARTINS¹ ARIANE MENDONCA
KLUSCZCOVSKI² GEOVANA DAGOSTIM SAVI¹ TATIANE
PEREIRA DE SOUZA² CAROLINA PACHECO² VILDES
MARIA SCUSSEL¹**

**¹Laboratory of Mycotoxicology and Food Contaminants –
LABMICO, Food Science and Technology Department, Center of
Agricultural Sciences, Federal University of Santa Catarina,
Florianopolis, SC, Brazil**

**²Faculty of Pharmaceutical Sciences, Federal University of
Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil.**

Abstract

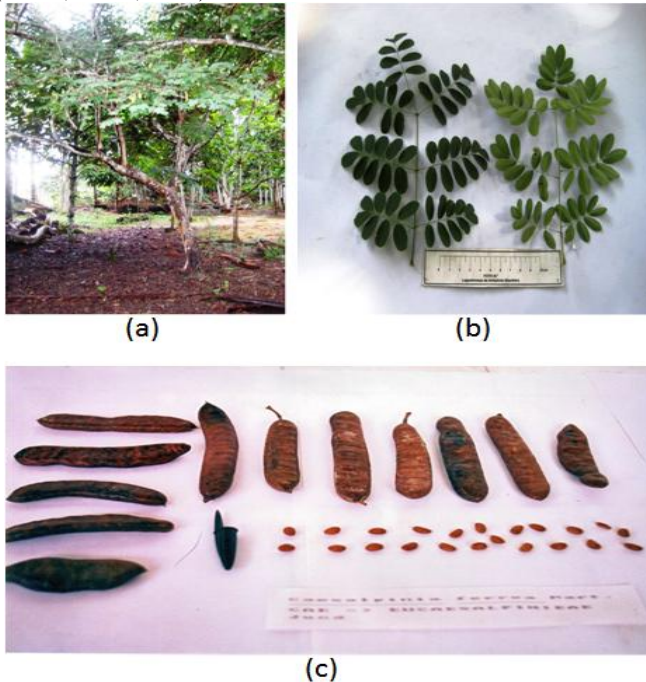
Natural plant extracts may provide an alternative method to protect food and feed from fungi contamination. The crude extract of juca (*Libidibia ferrea* M.) contains anthraquinones, alkaloids, depsides, depsidones, flavonoids, lac-tones, saponins, sugars, tannins, sesquiterpenes and triterpenes. Brazil nut (*Bertholletia excelsa* HBK) is the main economic wise commodity from the Amazon rainforest. Contamination by aflatoxins (AFLs) is a major problem for tree nuts, especially because the causal fungi (*Aspergillus flavus* group), occur as a natural contamination. Since contamination is usually associated to in-shell nuts, this work evaluated the efficiency of juca extracts against the growth & AFL production by *A. parasiticus* on in-shell Brazil nuts. The samples were inoculated with highly toxigenic strain of *A. parasiticus* with three different juca treatments (Groups I, II, III at 500, 1000 and 1500 µL) and a Group C (as control: not treated) incubated for 12 days in order to evaluate AFLs (AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂) production. The AFLs method applied had immunoaffinity columns for cleanup and HPLC-FLD for determining. The method quantification limit were 3.1, 0.02, 1.41 and 0.03 µg/kg, for AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, respectively. A significant difference between Treatments and Control Groups was observed leading to total inhibition of AFG₂, AFB₁ and AFB₂ when applied 1000 µL juca extract and inhibition of AFB₁ and AFB₂ when treated at lower concentration (500 µL extract).

Keywords: *Aspergillus*, *Bertholletia excelsa*, *Libidibia ferrea*, antimicotoxigenic.

1. Introduction

Chemical and physical antifungi procedures have been studied for the preservation of stored grains and nuts (Zovico et al., 1999; Freitas-Silva and Venancio, 2010; Zhang et al., 2011; Giordano et al., 2012). Due to health and economic considerations, natural plant extracts may provide an alternative green method to protect food and feed from fungi contamination. *Libidibia ferrea* Mart is a tree that belongs to the family of Leguminosae-Caesalpinioideae (Caesalpinaceae) and grow throughout Brazil, being widely distributed in the North and Northeast. It is commonly known as iron wood or juca (Peters et al., 2008) (Figure 1).

Figure 1. *Libidibia ferrea*: **juca** (a) tree, (b) leaves and (c) fruits & seeds
Fonte: (Souza, INPA, 2014).



Juca fruits extracts (except seeds) have been reported to present relevant healing, antifungal, antimicrobial, anti-inflammatory, analgesic, antiulcer and cancer chemopreventive properties (Nakamura et al., 2002; Ambrósio et al., 2010; Lima et al., 2012; Dias et al., 2013). These pharmacological properties may be related to the presence of flavonoids, saponins, tannins, coumarins, steroids and phenolic compounds.

Brazil nuts are the main commodities from the Amazon rainforest and their production is destined to international trade and/or national consumption. Gatherers that pick and store the fruits are responsible for the initial handling and processing, which is still done in the forest (CAC, 2010; Pacheco and Scussel; 2006; 2007). The main stages in Brazil nut production are: collection in the forest (cleaning paths between trees, gathering the fruit, opening the fruit and transporting them to the camp), processing (soaking, cleaning, first drying, peeling the nuts and second drying of the peeled nuts) and commercialization after packaging (FAO, 2006). Contamination by aflatoxins (AFLs) is a major problem for tree nuts, as well as for other stored nuts, grains, milk and dry fruits, especially because the causal fungi, *Aspergillus flavus* group, occurs as a natural contaminant (Molyneux et al., 2007). Industries and producers have endeavored considerable efforts over the last 15 years to minimize fungal growth and AFLs production in tree nuts, particularly in the case of Brazil nuts, that occur due to the hot and humid climatic conditions found in the Amazon environment, with an average temperature of 26 °C and relative humidity of 80-95%, which favors these toxins production. In addition, the extractivism characteristics (temperature and relative humidity during in the forest gathering and handling) are hard to be controlled, having a direct or indirect effect on toxigenic fungi and AFLs production. Since contamination is usually associated to in-shell nuts, proven processing/treatments that reduce AFLs levels in Brazil nuts include shelling or sorting by size, specific gravity, color or damage and ozone (De Mello and Scussel, 2009; Pacheco et al., 2010; Giordano et al., 2012). Recent studies have demonstrated the antifungal and antimycotoxigenic activity of natural compounds extracted from different sources (Duraipandiyan and Ignacimuthu, 2011; Salas et al., 2011; Mishra et al., 2012; Shukla et al., 2012; Tian et al., 2012). Worldwide, several attempts were made to evaluate different methods of detoxification or inhibition of AFLs production by fungi (Soher, 1999; Soliman; Badeaa, 2002; Maraqa et al., 2007). Some studies were conducted to investigate the effect of natural compounds on fungal growth and mycotoxin production in an array of food (Atanda et al.,

2007; Komala et al., 2012; Espitia et al., 2012). The main Amazonian plant of juca natives use indication is as anti-inflammatory. Despite this, the literature reports few studies with fruits ethanol extracts, and there are no comprehensive studies on its possible effects on the AFLs production. Therefore, this study aimed to evaluate the efficiency of juca extracts against the growth and AFL production by *A.parasiticus* in in-shell Brazil nuts.

2. Material and Methods

2.1 Plant material: dry juca fruits (10 kg), except its seeds, from the Herbarium of the National Institute for Amazonian Research (INPA) located at Manaus city -AM, Brazil (identified under the voucher specimen number 228022).

2.2 Chemicals: AFL standards: AFB₁, AFB₂, FG₁ and AFG₂, from Sigma, Germany. Acetonitrile and methanol Panreac (No. 361881 and 361091, Barcelona, Spain, respectively) and hexane Veteco (Rio de Janeiro, Brazil) were HPLC grade. Sodium hydroxide, monobasic sodium phosphate and sodium chloride, all from Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brazil), dibasic sodium phosphate and potassium chloride Biotec (Sao Paulo, Brazil), trifluoroacetic acid (TFA) Merck-Schuchardt (Darmstadt, Germany) were analytical grade. Water was purified in a Milli-Q system on 18.2 MU/cm. Five hundred mL of PBS buffer was prepared using 0.13 g monobasic sodium phosphate, 0.57 g sodium phosphate dibasic, 3.51 g sodium chloride and 0.1005 g of potassium chloride (pH: 7.4), galic acid (Sigma), casein; solution of sodium carbonate 20%.

2.3 Apparatus and equipments: The HPLC equipment was from Gilson (No 712, Villiers-le-Bel, France) consisting of an isocratic pump (No 305), a manifold module (No 805), manual injector (20 µl loop), fluorescence detector (FLD, model 121) with emission (range between 430 and 470 nm) and excitation (range of 305 and 395 nm) filters. The chromatographic column used was a C18 150, with 4,5 and 5 mm for internal diameter and particle size, respectively, ACE (Edinburgh, Scotland). Spectrophotometer UV-Vis, Shimadzu, model UV-1700 pharma spec, colloid mill Tecnal.

2.4 Juca preparation: The fruits were ground in a grinder. Conventional sieves with a mesh of approximately 1 mm^2 were used to obtain homogeneous flour which was wrapped in plastic pots for later use in the tests.

2.5 Juca extraction: The juca extracts were obtained according to the method described by Sampaio et al., (2009), with some modifications. The fruits (10g) were dried in kiln (40°C) and grounded prior preparation of the extract. The extraction was carried out by using ethanol (60%, v/v) for a period of 2 h without any heating procedure. The extraction was carried out with magnetic stirring, followed by Buchner funnel filtration through filter paper (Nalgon, porosity 3 and diameter 12.5 microns) with the aid of a vacuum pump. The final volume was adjusted to 100 mL with the solvent (ethanol/water 60:40 v/v).

2.6 Determination of total phenolic compounds (TPC) and total tannins content (TTC)

(a) Total phenolic compounds: The spectrophotometric assay was made by direct measurement using, after the initial scan, the wavelength of 265 nm. The methodology has been validated as recommended by the ICH (1996). The quantification was performed with an UV-visible spectrophotometer (Modelo—UV-1700, Shimadzu). Results were expressed as grams of gallic acid per 100 g of extract solution. All analyses were carried out in triplicate and the data were presented as means \pm standard deviations. Linearity was performed by constructing calibration curve of gallic acid standard using five concentrations of standard: 4, 8, 12, 16 e 20 $\mu\text{g/mL}$. To study the repeatability analysis of nine determinations tested at 100% concentration was used or 12 $\mu\text{g/mL}$ for the standard and 36 $\mu\text{g/mL}$ solution for extraction. The accuracy was determined by the concentration of the standard on three different levels (4, 8 e 12 $\mu\text{g/mL}$) and the theoretical concentration of extractive solution (18 $\mu\text{g/mL}$). The equation of the straight line obtained was $y = 0.046x - 0.0245$ with R^2 de 0.9996. The repeatability shown accuracy of method, with coefficient of variation (CV) below of 0.7% (0.69 to 0.5% for gallic acid and extraction solution, respectively). The intermediate precision was also within the permissible values (CV $<5\%$). The detection limit was 0.123 mg/mL and the quantification limit was 0.409 $\mu\text{g/mL}$. All concentrations showed a recovery above 90% in the three levels proposed concentration: low ($101.97 \pm 1.99\%$), average ($102.62 \pm 0.67\%$) and high concentration ($102.29 \pm 1.28\%$).

(b) *Total tannin content analysis:* The non-tannin fraction (NTF) was determined after magnetically stirring 10 mL from the extract solution with 150.0 mg of casein for 30 min. The juca extract solutions were filtered and 7.0, 4.0 and 2.0 mL of these solutions were diluted with distilled water to 50 mL. The absorbance was determined at 265 nm using distilled water as a compensatory solution. The total tannin content (TTC) was expressed as grams of gallic acid per 100 g of extract solution according to the equations below (1 to 3). The results represent the mean of three determinations (Solon et al., 2007).

$$TP = \frac{A_1 \cdot DF}{m \cdot A_{1cm}^{1\%}} \quad (1)$$

$$NTF = \frac{A_2 \cdot DF}{m \cdot A_{1cm}^{1\%}} \quad (2)$$

$$TTC = TP - NTF \quad (3)$$

Where: TP = total polyphenols (g %); NTF = non-tannin fraction (g%), TTC = total tannin content (g%), A = absorbance (A.U.), DF = dilution factor, m = extractive weight and $A_{1cm}^{1\%}$ = specific absorption of gallic acid (521.1).

2.7 Inhibition of AFLs production in Brazil nuts by juca extracts

(a) *Samples:* Raw, medium size, in-shell Brazil nuts, year 2013 harvest, from the Brazilian Amazon basin. The average (range)% of mc levels in the samples were 10.60 (8.0-12.7)% and the average (range)% of Aw levels were 0.69 (0.60-0.74).

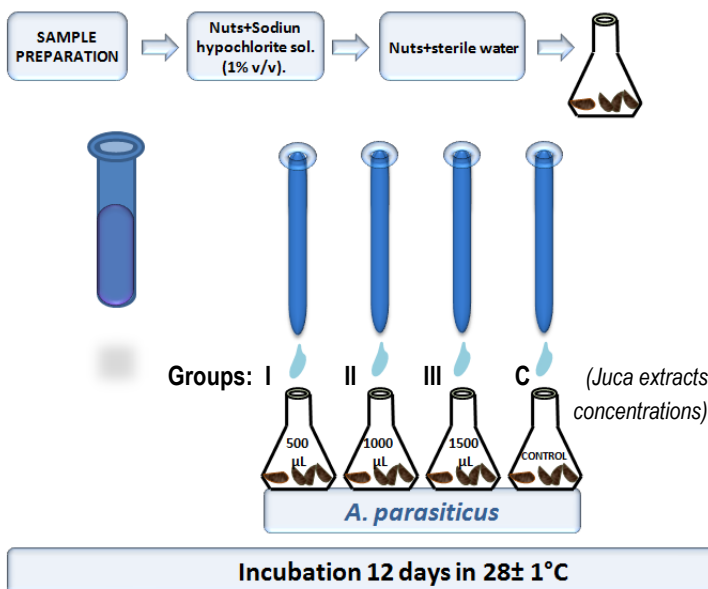
(b) *Brazil nuts sampling:* Samples were collected (February to May) from two Brazil nut facilities from the Para estate in Brazil. The sampling method used was that required by the EU (1998). The samples were collected from silos (capacity of 400- 800 kg) of each city, weekly, homogenized in bags and final portions of 30 kg taken, packed and immediately sent to the laboratory. They were kept in their original packages, properly identified, and stored under refrigeration ($\pm 4^\circ\text{C}$) until the day of the analysis at the Laboratory of Mycotoxicology and Food Contaminants and Mycotoxins (LABMICO) of the Federal University of Santa Catarina (UFSC), Southern Brazil.

(c) *Brazil nuts sample preparation:* the nuts are pre-soaked in sterile distilled water in a quartz clean Erlenmeyer flask (250 ml) for 1 hour. Then be washed three times with sterile water and surface sterilized with sodium hypochlorite solution (1%v /v).The nuts were washed three times with sterile water to remove any residual sodium hypochlorite

present in them. Then were transferred to a 250 ml Erlenmeyer flask pre-autoclaved laboratory under pressure (121° C) for 15 min. The transfer was carried out aseptically inside a laminar flow hood. All glass ware used was pre-sterilized by autoclaving. Two highly toxigenic strains were used as inoculum. A volume of 3 ml inoculums containing spores prepared at 0.02% (v/v) Tween-20 was added to the sample with four different chestnut extract concentration and control (no extract). The spore count is determined by a Neubauer counting chamber. These samples were maintained at $28 \pm 1^\circ\text{C}$ in a BOD incubator for a period of 12 days, the samples will be removed and processed for analysis of AFLs.

(d) *Fungal strains and inocula*: strains of *A. parasiticus* were obtained from the culture collection of the LABMICO/UFSC. *The identification of fungi genera and species*: for the (a) *morphological characterization*: was carried out for the *Aspergillus* genera on MEA, GN25 and CYA media. On the other hand, the (b) *species identification*: performed through microcultural Czapek-dox for *Aspergillus* as described by Weber and Pitt (2000) and followed the Samson et al. (2006) keys. For the (c) *species micromorphological observation*: the isolates were examined under the light microscope (100x and 400x magnification) with species identification carried out according to the taxonomic keys and guides available as follows: Pitt and Hocking (1997). The culture was maintained at 25 °C on slants of PDA. These fungi were previously cultivated in strains containing MEA over the course of 7 days to assure purity. Then, 10 ml of Tween 80 (Biokar) (0.02%) was added and the tubes were shaken for 1 min in a vortex to separate the conidia from the rest of the medium. The conidia concentration in suspension was determined, using the Neubauer counting chamber. The value obtained was as follow: *A. parasiticus*, 1.0×10^7 conidia /ml (SD = 0.3×10^7 conidia /ml). Samples of Brazil nuts were inoculated with highly toxigenic strain of *A. parasiticus* with three different juca treatments (Groups: I, II and III for 500, 1000 and 1500 µL, respectively) with Group C (Control: not treated) and incubated for 12 days in order to evaluate the production of AFLs (Figure 2).

Figure 2. Flowchart of sample preparation (Brazil nuts), inoculation (*A. parasiticus*) and juca (*Libidibia ferrea* M.) extract application.



2.7.5 Aflatoxins analysis: All samples of Brazil nuts (Treatments and Controls) were analyzed for the presence of AFLs using immunoaffinity columns for clean-up and HPLC/ FLD for determination based on the method of AflatestWB M1TM, according to NeoColumn Aflatoxin DR (Direct Read) according to Neogen protocol, approvals by USDA/GIPSA N° 2007-105 (NEOGEN, 2013). Briefly, the samples were continuously mixed in a shaker for 2 min (5 g salt (NaCl) and 125 mL 70% MeOH). The remainder was filtrated through cellulose filters Itamaraty (Art.102, Brazil).The extract was diluted 1:2 using 15 mL of filtered extract with 30 mL 10mM PBS total of 45 mL. The remainder was filtrated through cellulose filters Itamaraty (Art.102, Brazil). A filtered aliquot of 15 mL was passed through an immunoaffinity column at a drop per second. Flow rate avoiding column drying. The column was washed twice with distilled water to remove extraneous non-specific material and then dried. The AFLs bound to the antibody was released by the elution with 1 mL of 100% HPLC Methanol with a flow rate of a drop per second and collected in a test tube. Finally, 1 mL of

HPLC Grade H₂O was passed through the immunoaffinity column to give a 2.00 mL total volume. The eluate was evaporated to dryness using a heating block at 40°C with gentle nitrogen stream. The residue was resuspended in 100 µL of mobile phase water:acetonitrile:methanol (6:2:2, v/v/v) with potassium bromide (0.119 g) & nitric acid (47.6 µL) of mobile phase (1000 mL) and the flow rate of 1 mL/min.), at wave lengths (360 and 440 nm, emission and excitation, respectively). Under these conditions, the retention time for the AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂ was approximately 18.9, 15.9, 13.9 and 10.9 min, respectively. The calibration curve was prepared using twenty standard solutions of AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂ ranging from 0.035 to 4.00; 0.00065 to 2.00; 0.035 to 4.00 and 0.00091 to 2.00 µg/mL, respectively. Recovery tests were conducted to determine the efficacy of the analytical method adding a known amount of standard (2.5 µg/mL) in a AFLs Brazil nut sample in quintuplicate. The detection and quantification limits (LOD and LOQ) were: 0.26, 0.002, 0.28 and 0.005 µg/kg and 3.1, 0.02, 1.41 and 0.03 µg/kg, for each AFL, respectively, considering signal to noise ratio 10:1.

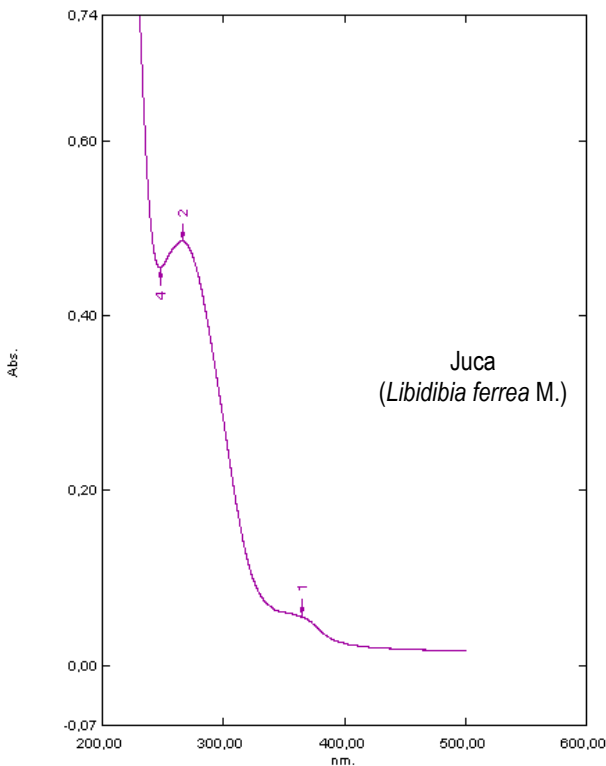
2.8 Statistical analysis: Data were analyzed by using ANOVA, followed by Newman-Keuls Multiple Comparison test. The data were expressed as mean ± standard deviation and the values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results and discussion

3.1 Determination of total phenolic compounds and tannins content

Data obtained showed variation on *Aspergillus parasiticus* growth and toxin production on the in-shell Brazil nuts after 12 days of incubation. Figure 3 and Table 1 show the characteristic spectrum of *Libidibia ferrea* Mart fruits extract at 265 nm and AFLs variation according to the 3 treated Groups (I, II and III), respectively).

Figure 3. Spectrum of the extract of *Libidibia ferrea* Mart fruits at 265 nm.



For TPC and TTC extract concentration, the values observed in the present study are relatively high when compared with other plant species. The amount of TPC extracted with ethanol 60% (v/v) was averaged $21.71 \pm 0,093$ g%. On the other hand, the TTC reached $19.18 \pm 0,045$ g%. Comparison with the literature data is difficult, since just a few studies were previously carried out with the same species, and even when the species were the same, they originated from other regions. Another problem is the use of different reference standards and different extraction solvents. Polyphenols are the primary plant compounds with antioxidant activity, although they are not the only ones. However, the juca PT, values were higher than the values reported in the literature (7.3 and 6.813 g% by Sampaio et al. (2009) in the crude hydromethanolic extract and Port's et al. (2013) in infusion,

respectively. In the determination of tannins by determining TPC, high levels of TTC were obtained as compared with the literature where concentrations up to 9.2% (Bacchi and Sertié, 1994) are cited. The tannins present in other species of *Libidibia ferrea* Mart. has also been reported in the literature (Nakamura et al. 2002).

Table 1. Aflatoxin production by *A.parasiticus* on in-shell Brazil nut in different treatments with juca extract.

Group	Juca extract	Aflatoxins average (\pm SD ^a) (μ g/kg)			
		AFG ₁	AFG ₂	AFB ₂	AFB ₁
Control	NA*	11172.33(\pm 2510.70)	170.04(\pm 10.07)	ND ^b	146.70(\pm 8.05)
Treatment I	500 μ L	187.89(\pm 11.73)	65.59(\pm 6.76)	ND ^b	ND ^b
Treatment II	1000 μ L	88.04(\pm 6.34)	ND ^b	ND ^b	ND ^b
Treatment III	1500 μ L	ND ^b	ND ^b	ND ^b	ND ^b

^a standard deviation *not applicable

^b - not detected

3.2 Aflatoxins analysis: The calibration curve, obtained by least squares regression linear analysis showed a correlation coefficient of 0.990, 0.993, 0.991 and 0.993 for AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂, respectively. The average recovery for each toxin were: 87.0; 85.0; 90.0 and 98.0 %, respectively (Table 1). The HPLC LOD and LOQ for the AFLs were: 0.26, 0.002, 0.28 and 0.005 μ g/kg and 3.1, 0.02, 1.41 and 0.03 μ g/kg, for each AFL, respectively.

Our results showed that the extract of *Libidibia ferrea* Mart has a good inhibitory effect upon AFLs production by *A. parasiticus*. As expected, *A. parasiticus* produced AFG₁ (11,172.33 μ g/kg), AFG₂ (170.04 μ g/kg) and AFB₁ (146.70 μ g/kg) in the Control test - no juca added. Although the Treatment I allowed to produce some toxin AFG₁ (187.89 μ g/kg) and AFG₂ (65.59 μ g/kg). The extract juca Treatment II to produced toxin AFG₁ (88.04 μ g/kg) and Treatment III completely inhibited AFL production during the stored Brazil nut study. The reduction in growth and toxin production was dependent on the concentration of extract. A study conducted by Ghorbanian et al. (2008) investigated effect of neem leaf extract on growth of *A. parasiticus* and production of AFL and

reported that the inhibition of AFL synthesis by neem leaf extract was found to be time and dose dependent. The efficacy of juca extracts has been explored against storage fungi and AFL contamination, however, these studies have not evaluated the effectiveness of the extract juca in an array of food (Martins et al., 2014). There are earlier reports on juca extracts antimicrobial activity against of the following oral pathogens: *Candida albicans*, *Streptococcusmutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus oralis* and *Lactobacillus* (Sampaio et al., 2009).

Detoxification of AFL by plant parts, plant products, or their extracts are safer than detoxification by physical, chemical (ammoniation, formaldehyde, calcium hydroxide) and microbiological means. The potential of some herbal plants to degrade aflatoxins has been reported (Sandoskumar et al., 2007).

In a study by Komala et al. (2012), eugenol treatment was used to inhibit AFB₁ contamination in stored sorghum grains were The antifungal activity of eugenol showed the complete inhibition of AFB₁ production on sorghum grains at a concentration of 8.025 mg/g (150 ml/20 g) where as in yeast extract sucrose medium the fungal growth was inhibited at all the three concentrations because of equal dissemination and the seed germination was also inhibited in all the three concentrations. Atanda et al., (2007), found that AFLs can be completely inhibited in culture medium with sweet basil leaves and there is the possibility of its being used to protect sorghum against *Aspergillus* contamination. It also shows that AFLs can be controlled by co-storing whole dry sweet basil leaves with AFL infected foods. Soliman and Badaea (2002) reported complete inhibition of *A. flavus*, *A. parasiticus*, and *A. ochraceus* by the oils of thyme and cinnamon (<500 ppm), marigold (<2000 ppm), spearmint, basil, (3000 ppm). However, they did not specify chemical composition of their thyme oil. The efficiency shown by extract juca applied in Brazil nuts on the inhibition AFL production can be explained by the fact that the compounds responsible for this property (phenolic compounds, mainly tannins) are present in high concentration in juca extracts.

4. Conclusions

The results of this study showed that the application of jucá extracts presents significant effect on the inhibition aflatoxins production in Brazil nuts stored. Considering that juca extracts a natural product (considered naturally as safe), being already applied as a bactericide agent against humans oral pathogens, there is a need to explore its potential use as an effective inhibitor to fungi growth and AFLs

production, through the anti-fungi components isolation/identification and the economic viability. More studies need to be carried out to isolate and identify the main components.

Acknowledgements

We are grateful to the Research Foundation of the State of Amazonas (FAPEAM) for financial support and the research fellowship.

References

- Ambrósio, G., F., Júnior, R.C., & de Sousa, H.C. (2010). Anti-inflammatory activity of Jucá (*Caesalpinia ferrea*) extracts obtained by SFE and by ESE, in: Proceedings of the II Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids, Prosciba 2010, Brasil, 2010, p. 89.
- Atanda, O.O., Akpan, I. & Oluwafemi, F. (2007). The potential of some spice essential oils in the control of *A. parasiticus* CFR 223 and aflatoxin production. *Food Control*, 18, 601–607.
- Bacchie, E.M.; Sertie, J.A.A. (1994). Anti ulcer action of *Stryrax camporum* and *Caesalpinia ferrea* Mart. in rats. *Planta Medica*, 60 (2) 118-120.
- Bacchie, E.M., Sertie, J.A.A., Villa, N.; Katz, H. (1995). Anti ulcer action and toxicity of *Stryrax camporum* and *Caesalpinia ferrea* Mart. *Planta Medica*, 61, 204-207.
- Cavalheiro, M.G., Farias, D.F., Fernandes, G.S., Nunes, E.P., Cavalcanti, F.S. Vasconcelos, I.M., Melo, V.M.M. & Carvalho, A.F.U. (2009). Biological and enzymatic activities of the aqueous seed extract of *Caesalpinia ferrea* Mart., Leguminosae. *Brasilian Journal of Pharmacognosy*, 19, 586- 591.
- Carvalho, J.C.T., Teixeira, J.R.M., Souza, P.J.C., Bastos, J.K., Santos Filho, D. & Sarti, S.J. (1996). Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 53,175-178.
- CAC - Codex Alimentarius Commission. (2010). Proposed draft maximum levels for total aflatoxins in Brazil nuts (N11-2008). Izmir: FAO/WHO. Document Number (N11-2008).
- De Mello-Robert, F. & Scussel, V. M. (2009). Development of physical and optical methods for in-shell Brazil nuts sorting and aflatoxin reduction. *Journal of Agricultural Science*, 1, 3–14.
- Dias, A.M.A., Rey-Rico, A., Oliveira, R.A., Marceneiro, S., Alvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A., Junior, R.N.C., Braga, M.E.M. & de Sousa, H.C. (2013). Wound dressings loaded with an anti-inflammatory jucá

- (*Libidibia ferrea*) extract using supercritical carbon dioxide technology. *Journal of Supercritical Fluids*, 74: 34–45.
- Duraipandiyan, V. & Ignacimuthu, S. (2011). Antifungal activity of traditional medicinal plants from Tamil Nadu, India. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 204-215.
- European Union (EU) (1998). Commission Directive 98/53/EC of July 16, 1998, laying down the sampling methods and the methods of analysis for the official control of the levels for certain contaminants in foodstuff. Off. J. Eur. Comm. 1998, 17.7.98, L 201/93.
- Espitia, P. J. P., Soares, N. F. F., Botti, L. C. M., Melo, N. R., Pereira, O. L. & Silva, W. A. (2012). Assessment of the efficiency of essential oils in the preservation of postharvest papaya in an antimicrobial packaging system. *Brazilian Journal of Food Technology*, 15 (4), 307-316.
- FAO (2006). Microfinance and forest-based small-scale enterprises. FAO Forestry Paper, 146, 110p. Roma.
- Freitas-Silva, O. & Venâncio, A. (2011). Brazil nuts: Benefits and risks associated with contamination by fungi and mycotoxins. *Food Research International*, 44, 1434–1440.
- Giordano, B.N.E., Nones, J. & Scussel, V.M. (2012). Susceptibility of the In-shell Brazil Nut Mycoflora and Aflatoxin Contamination to Ozone Gas Treatment during Storage. *Journal of Agricultural Science*, 4 (8).
- Ghorbanian, M., Razzaghi-Abyaneh, M., Allameh, A., Shams-Ghahfarokhi, M. & Qorbani, M. (2008). Study on the effect of neem (*Azadirachta indica* A. juss) leaf extract on the growth of *Aspergillus parasiticus* and production of aflatoxin by it at different incubation times. *Mycoses*, 51, 35–39.
- Komala, V.V., Ratnavathi, C.V., Vijay Kumar, B.S. & Das, I.K. (2012). Inhibition of aflatoxin B1 production by an antifungal component, eugenol in stored sorghum grains. *Food Control*, 26, 139-146.
- Lima, S.M.A., Araujo, L.C.C. & Sitonio, M.M. (2012). Anti-inflammatory and analgesic potential of *Caesalpinia ferrea*, Brazilian Journal of Pharmacognosy, 22: 169–175.
- Majhenic, L., Skerget, M. & Knez, Z. (2007). Antioxidant and antimicrobial activity of guaraná seed extracts. *Food Chemistry*, 104:1258-1268.
- Maraqqa, A., Alsharoha, N. F., Farah, H., Albjeirami, W. M., Shakya, A. K., & Sallal, A. J. (2007). Effect of *Nigella sativa* extract and oil on aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. *Turkish Journal of Biology*, 31, 155-159.

- Martins, M., Kluczkovski, M.A., Souza, T.P., Pacheco, C., Savi, G.D. & Scussel, V.M. (2014). Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* by guaraná (*Paullinia cupana Kunth*) and jucá (*Libidibia ferrea Mart*) extracts. *African Journal of Biotechnology*, 13(1): 131-137.
- Mishra, P.K., Shukla, R., Singh, P., Prakash, B., Kedia, A. & Dubey, N.K. (2012). Antifungal, anti-aflatoxigenic, and antioxidant efficacy of Jamrosa essential oil for preservation of herbal raw materials. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 74, 11-16.
- Montes-Belmont, R. & Carvajal, M. (1998). Control of *Aspergillus flavus* in maize with plant essential oils and their components. *Journal of Food Protection*, 61(5), 616-619.
- Molyneux, R. J., Mahoney, N., Kim, J. H. & Campbell, B.C. (2007). Mycotoxins in edible tree nuts. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 72–78.
- Nakamura, E.S., Kurosaki, F., Arisawa, M., Mukainaka, T., Okuda, M., Tokuda, H., Nishino, H. & Pastore, F. (2002). Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds, *Cancer Letters*, 177:119–124.
- Pacheco, A. M., Lucas, A., Parente, R. & Pacheco, N. (2010). Association between aflatoxin and aflatoxigenic fungi in Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). *Food Science and Technology*, 30, 330–334.
- Peters, V.M., Souza, S.O., Carvalho, J.C.T, Borges, L.V. & Guerra, M.O. (2008). Evaluation of reproductive toxicity of aqueous extract of the fruits from *Caesalpinia ferrea* Mart. in rats. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 7 (5): 268 – 272.
- Pitt, J.I. & Hocking, A.D. (1997). *Fungi and Food Spoilage*. Blackie Academic and Professional, London.
- Port's, P.S., Chisté, R.C., Godoy, H.T. & Prado, M.A. (2013). The phenolic compounds and the antioxidant potential of infusion of herbs from the Brazilian Amazonian region. *Food Research International*, 53 (2), 875-881.
- Salas, M.P., Céliz, G., Geronazzo, H., Daz, M. & Resnik, S.L. (2011). Antifungal activity of natural and enzymatically-modified flavonoids isolated from citrus species. *Food Chemistry*, 124, 1411–1415.
- Sampaio, F.C., Pereira, M.S.V., Dias, C.S., Costa, V.C.O., Conde, N.C.O. & Buzalaf, M.A.R. (2009). *In vitro* antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. *Journal of Ethnopharmacology*, 124, 289–294.

- Samson, R.A., Hong, S.B. & Frisvad, J.C. (2006). Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Medical Mycology*, 44, 133 – 148.
- Sandosskumar, R., Karthikeya, M., Mathiyazhaga, S., Mohankumar, M., Chandrasekar, G., & Velazhahan, R. (2007). Inhibition of *Aspergillus flavus* growth and detoxification of aflatoxin B by medicinal plant zimnu (*Allium sativum* L. *Alliumcepa* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23,1007-1014.
- Shukla, R., Singh, P., Prakash, B. & Dubey, N. K. (2012). Antifungal, aflatoxin inhibition and antioxidant activity of *Callistemon lanceolatus* (Sm.) Sweet essential oil and its major component 1,8-cineole against fungal isolates from chickpea seeds. *Food Control*, 25, 27-33.
- Soher, E. A. (1999). Prevention of the growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by some spice essential oils. *Minufiya Journal of Agricultural Research*, 24(2), 563-576.
- Soliman, K.M. & Badeaa, R.I. (2002). Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food and Chemical Toxicology* 40, 1669–1675.
- Solon, L.G., Costa, L.J.L., Wanderley, A.G., Soares, L.A.L. & De Souza, T.P. (2007). Evaluation of complexing agents in the quantification of total tannins in the extractive solution of *Schinus terebinthifolius* RADDI and *Psidium guajava* L. *Biofarma*, 2(4), 275-281.
- Tian, J., Huang, B., Luo, X., Zeng, H., Ban, X., He, J. & Wang, Y. The control of *Aspergillus flavus* with *Cinnamomum jensenianum* Hand.-Mazz essential oil and its potential use as a food preservative. *Food Chemistry*, 130, 520–527, 2012.
- Yin, M.C.; Cheng, W.S. Inhibition of *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* by some herbs and spices. *Journal of Food Protection*, 61, 123-125, 1998.
- Zhang, C.; MA, Y.; Zhao, X.; Zeng, Y.; Wang, F. Kinetic modelling of aflatoxins B₁ conversion and validation in corn, rice, and peanut during thermal treatments. *Food Chemistry*, vol 129, ed. 3, pag. 1114-1119, 2011.
- Zovico, C., Fonseca, H., Calori-Domingues, M.A., Glória, E.M., Borguini, R.G., Silveira, V.P., Piedade, S.S.; Barbin, D. (1999). Electronic color sorting in the decontamination of peanuts contaminated with aflatoxins. *Scientia Agricola*, v. 56, p. 371-376, 1999.
- Weber, R.W.S; Pitt, D. Teaching techniques for mycology: 11. Riddell's slide cultures. *Mycologist*, 14 (3):118-120, 2000.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O efeito dos alcalóides presentes no guaraná sobre os níveis de OTA e o crescimento de cepas fúngicas foi estudado e apesar das cepas toxigênicas observadas, os níveis de OTA estavam abaixo do LOQ (2,0 mg /kg), provavelmente devido às altas concentrações da cafeína no guaraná, confirmando as propriedades antifúngicas desses alcalóides.

Os extratos de jucá apresentaram-se mais eficientes no controle do crescimento do *A. parasiticus*, bem como na inibição da produção de AFLs quando comparados com os extratos de guaraná, sugerindo que os compostos fitoquímicos do jucá poderiam ser usados sozinhos ou em conjunto com outras substâncias ou processos no controle da produção de metabólitos tóxicos.

O óleo extraído da castanha-do-brasil mostrou resultados significativos contra a produção de AFLs por *A. parasiticus*.

Os extratos de jucá apresentaram efeito significativo sobre a inibição da produção de AFLs em castanha-do-Brasil. Considerando que o extrato de jucá é um produto naturalmente seguro, há uma necessidade de explorar o seu uso potencial como um inibidor eficaz para o crescimento de fungos e a produção AFLs, por isso mais estudos devem ser realizadas para isolar e identificar os principais componentes.

Substâncias naturais capazes de inibir o crescimento de fungos ou a produção de AFLs são possíveis alternativas para o controle seguro micotoxinas em produtos alimentícios, sem incorrer os danos que surjem do uso de produtos químicos sintéticos. Os resultados deste estudo mostram a possibilidade de utilização de compostos naturais como alternativas aos pesticidas para controlar o crescimento de fungos e AFLs na castanha-do-Brasil.

Desta forma, sugere-se que os extratos de jucá poderiam ser aplicados nas castanhas antes da primeira secagem ainda na floresta e o óleo de castanha-do-Brasil poderia ser adicionado a cera de carnaúba, que já é utilizada na etapa de polimento das castanhas com casca. No entanto, mais estudos sobre as características sensoriais das castanhas após aplicação dos extratos/óleo devem ser realizados, assim como, futuros testes poderão ser realizados para avaliar a qualidade de óleos provenientes tanto de castanhas boas quanto de castanhas já deterioradas. Outra sugestão deste trabalho é a realização de um planejamento detalhado para o estudo da viabilidade econômica da aplicação destes extratos nas castanhas ainda nas etapas iniciais da cadeia produtiva.