

Aurelia Lopes Castrillón (**)

Adhemar Purchio (***)

RESUMO

Cem amostras de castanhas do Pará, procedentes dos Estados do Amazonas e São Paulo, foram analisadas micológico e toxicologicamente para aflatoxinas B1 e G1. Isolou-se 312 colônias de fungos, sendo 91 do gênero *Aspergillus*, 83 do gênero *Penicillium* e as restantes incluídas em 23 gêneros diferentes. Entre as amostras de *Aspergillus*, 26 foram aflatoxigênicos, distribuídos em 3 espécies: *Aspergillus flavus* Link (18); *Aspergillus parasiticus* Speare (7) e *Aspergillus fresenii* Subram (1). Dos 100 extratos de castanhas analisados 3 foram positivos para aflatoxina.

INTRODUÇÃO

A castanha do Pará (castanha do Brasil) durante toda a sua trajetória comercial sofre ação depredatória. O atrito das sementes por ocasião do transporte, produz rachaduras na casca. O clima e o grau pluviométrico na época da safra, são fatores que favorecem a penetração de insetos, parasitas e microorganismos atuando junto à amêndoa deteriorando-a total ou parcialmente. Dentre os microorganismos responsáveis, os fungos filamentosos saprófitas, são os que mais participam do processo. Presentes no solo, água, vegetais e veiculados pelo ar, encontram-se em permanente contato com o produto, constituindo-se em principal ameaça à sua integridade.

Com referência a deterioração da castanha do Pará, Bitencourt (1949), examinando os danos nas amêndoas, isolou diversas espécies fúngicas inclusive *Aspergillus flavus*. Posteriormente, Almeida & Azevedo (1950) assinalam a sensibilidade do produto ao ataque dos *Aspergillus*, citando as espécies *A. flavus* e *A. orizae* como responsáveis.

Lin (1976), analisando castanhas, isolou culturas do grupo *A. flavus*, aflatoxigênicos encontrando maior prevalência em *A. parasiticus*.

(*) Parte da tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências, área de Microbiologia e Imunologia, no Instituto de Ciências Biomédicas da USP - SP:

(**) Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - CP 478, Manaus - AM.

(***) Instituto de Ciências Biomédicas - Dep. de Microbiologia - USP, SP.

A presença de fungos nos alimentos alertou os países importadores de grãos, no sentido de fiscalizar mais intensamente estes produtos adquiridos, estabelecendo ao mesmo tempo, padrões fixando a tolerância dos níveis de contaminação.

A castanha do Pará, que é mais consumida no estrangeiro, começou a sofrer medidas restritivas após o evento de 1960 na Inglaterra, em parte, por ser o alimento proveniente do Brasil (Lira, 1976).

Considerando-se a importância dos fungos nos processos de deterioração nos produtos alimentícios e de eventual produção de aflatoxinas nas amêndoas, alimento básico da região Amazônica e fonte de divisas do país, torna-se necessário a realização de pesquisas sobre as espécies fúngicas contaminantes e um estudo sobre a frequência de *Aspergillus* spp. produtores de aflatoxinas nesse substrato.

MATERIAL E MÉTODOS

O material para a realização da pesquisa foi proveniente de usinas de beneficiamento, de mercados, feiras-livres, propriedades particulares e de supermercados existentes na região da grande São Paulo.

As castanhas armazenadas procederam de regiões adjacentes dos chamados rios produtores da Amazônia onde estão localizados os castanhais: Purus, Solimões, Rio Negro e ainda dos pertencentes a algumas localidades da Bolívia.

As amostras originárias de Manaus, faziam parte das safras de 1979/1983. As procedentes dos supermercados de São Paulo não foi possível determinar.

Usinas de beneficiamento fornecedoras: CLEX (beneficiamento e depósito: Americana, Londrina e Canadense); COIMEX (beneficiamento - COIMEX); I.B. Sabbã; Rubem Melo Cia. Ltda. (beneficiamento - Rubem Melo); propriedades particulares; Colônia Santo Antônio (sítio Rosa de Maio/Manaus); Antonio Faustino; Mercado CEASA (Manaus) e Supermercados de São Paulo e Municípios vizinhos.

As usinas de beneficiamento são instaladas em grandes armazéns de alvenaria com pé direito alto, aeração natural, temperatura ambiente variando entre 26 a 38°C. Para evitar maior concentração de umidade, as sementes são reviradas freqüentemente, sistema que diminui a contaminação por fungos e outros microorganismos.

Todas as amostras foram identificadas segundo os locais de procedência, tipo, qualidade e safra.

Grupo I: Castanhas de usinas de beneficiamento - desidratadas em casca e sem casca (50 amostras). De depósitos - naturais em casca (10 amostras), qualidade boa e mistas;

Grupo II: Castanhas de feiras-livres recém colhidas, em casca (15 amostras), qualidade mista;

Grupo III: Castanhas do CEASA - em ouriço (5 amostras); castanhas de propriedades particulares - em ouriço (10 amostras), qualidade mista.

Grupo IV: Castanhas de Supermercados naturais em casca (10 amostras), qualidade mista.

Meios utilizados para o isolamento dos fungos

Ágar-Sabouraud-glicose (Difco), acrescido de cloranfenicol (100mg/1.000ml) p.H 5.6; ágar-Cazpeck (Difco), p.H 7.3; ágar-batata (Difco), p.H 5.6; meio de ADM (*Aspergillus* diferencial medium), para a detecção de fungos produtores de aflatoxinas empregou-se o meio Yes (2% de extrato de levedura; 20% de sacarose) segundo Davis *et al.* (1966).

Culturas padrão

Aspergillus flavus - nº 3517 e *Aspergillus parasiticus* - nº 135 utilizadas na pesquisa como modelo, cedidas pela micoteca do Setor de Micologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

As amostras do padrão qualitativo de aflatoxinas B1 e G1 foram cedidas pelo laboratório de Micotoxinas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Os fungos foram estudados em cultivo e características micromorfológicas, fisiológicas e identificação final, segundo Raper *et al.* (1949), Riddel (1950), Gilman (1957), Raper & Fennell (1965), Barnett & Hunter (1972); Ainsworth *et al.* (1973), Bothast & Fennell (1974), von Arx (1974), Pitt (1979), Cole *et al.* (1981), Lacaz *et al.* (1984) e Lodder (1970).

A extração das toxinas foi segundo o método observado no Programa Nacional de Monitoração e Controle de Micotoxinas (PMC - Micotoxinas), São Paulo, com base no método de Lee (1965) e quantificadas de acordo com o método de Coomes & Feuill (1965).

As amostras de castanha em granel eram compostas de 1,0 kg e 5 ouriços de cada origem. Depois de trituradas sem processo de desengorduramento, de cada uma delas foi tomado uma alíquota de 1,0 g, e transferiu-se asépticamente, para um tubo de ensaio contendo 20 ml de água destilada e agitação por 10 minutos. Após 30 minutos de repouso, 0,1ml do sobrenadante era colocado em placas com ágar-Sabouraud-glicose, acrescido de cloranfenicol (100 mg/1.000 ml). A partir de 24 horas até 10 dias de incubação a 28°C, as placas eram examinadas. Das colônias isoladas, retirou-se fragmentos, para o exame microscópico entre lâmina e lamínula, com o corante lactofenol azul de algodão e foram feitos repiques em tubos com ágar-Sabouraud-glicose (inclinado) para estudo morfológico posterior.

Para a produção de aflatoxinas por *Aspergillus* sp. semeou-se fragmentos do fungo no meio Yes. Incubação de 10 a 20 dias a 28°C, prazo suficiente para o crescimento da colônia. A seguir, filtrou-se o meio de cultivo em algodão hidrófilo livre de impurezas utilizando-se um frasco de Erlenmeyer de 250 ml.

Depois de filtrado, procedeu-se a extração com três porções de clorofórmio (25 ml cada), em funil de separação de 250 ml, segundo o PMC-micotoxinas e Coomes & Feuill (1965).

Conforme a necessidade da exclusão de interferentes nos extratos, utilizou-se, isoladamente ou em combinação os métodos: precipitação com acetato de chumbo neutro a 20%, coluna da sílica-gel (Pons **et al.**, 1966), purificação direta na placa cromatográfica, realizando um primeiro desenvolvimento com éter etílico (Nabney & Nesbitt, 1965).

Para confirmar a análise, efetuou-se a cromatografia de camada delgada bidimensional (Schuller **et al.**, 1973) e pela aspersão de solução de ácido Sulfúrico a 50% sobre as manchas fluorescentes da amostra e do padrão. Os sistemas de solventes: Clorofórmio-acetona (90:10) e benzeno-acetato de etila-etanol (60:39:1).

RESULTADOS

Os resultados demonstram que das 100 amostras analisadas 3 foram positivas para aflatoxinas B1 e G1. Na tabela 1 observa-se que procediam: da Usina Londrina (UL-3), castanhas desidratadas sem casca, qualidade boa; Usina I.B. Sabbã (UIBS-3), castanha natural em casca, qualidade mista, pertencentes ao Grupo I e amostra de Supermercados (SEL) de São Paulo, natural em casca, qualidade mista, integrada no Grupo IV.

A análise dos extratos revela que os níveis variam de 0,1 a 2,25 ppm de aflatoxina B1 e de 0,075 a 1,5 ppm de aflatoxina G1. O nível em termos de aflatoxinas, foi considerado elevado, muito elevado a baixo ou negativo, Tabela 1.

Das 100 amostras foram isoladas 312 colônias de fungos, sendo de 23 gêneros diferentes, Tabela 2.

Na Tabela 3, estão demonstrados os percentuais dos gêneros de fungos isolados de 85 amostras referentes às usinas (60), feiras-livre (10), CEASA (5) e Supermercados (10). Observa-se que houve predominância dos gêneros **Aspergillus** sp. e **Penicillium** sp.

A Tabela 4, refere-se as amostras em ouriços (15) sob as designações Camo (5), CSA (5) e a AF (5), das quais foram isoladas, predominantemente, **Aspergillus** sp., **Penicillium** sp. e **Cephalosporium** sp.

O gênero **Aspergillus** spp. foi prevalente com 91 culturas pertencentes a sete grupos (**flavus**, **niger**, **nidulans**, **fumigatus**, **ochraceus** e **wentii**). O gênero **Penicillium** apresentou frequência significativa com 83 culturas e a seguir, **Absidia** sp. (27), **Paecilomyces** sp. (18) e **Cephalosporium** sp. (13), Tabela 2. Observou-se que, o número de legumes, foi baixo, se comparado com o dos fungos filamentosos (Tabelas 2, 3 e 4).

Analisando-se as 91 culturas de **Aspergillus** sp. verificou-se que 26 (28,57%) eram espécies aflatoxigênicas, entretanto, apenas 24 (26,37%) foram positivas.

Por outro lado, nota-se que das 24 amostras aflatoxigênicas, todas produziram aflatoxina B1 (100%) e somente 15 (62,50%) foram aflatoxinas G1 positivas, Tabela 5.

Observou-se que as amostras variaram em níveis, entre os limites de 0,0025 e 3,33 ppm para aflatoxina B1 e de 0,0075 e 2,25 ppm para aflatoxina G1, Tabela 5. Dentre os fungos toxigênicos, 16 amostras da espécie **Aspergillus flavus**, 7 de **Aspergillus parasiticus** ambos do grupo **flavus** e 1 **Aspergillus fresenii** do grupo **Ochraceus**. Este último, produziu apenas aflatoxina B1 em nível baixo e inconstante na elaboração deste metabólico.

DISCUSSÃO

Para a identificação dos *Aspergillus*, além dos meios convencionais, empregou-se o meio ADM (*Aspergillus* diferencial medium) utilizado na determinação da espécie *A. flavus*. Entretanto, o resultado demonstrou que o ADM não mostrou-se eficiente; tanto o *A. flavus*, *A. parasiticus* (grupo *flavus*) como o *A. fresenii* (grupo *ochraceus*), produziram pigmento, variando apenas na intensidade da cor. Assim, essa peculiaridade não é exclusiva na denominação de espécie, como já foi demonstrado que outras espécies do grupo *flavus* e espécies de outros grupos podem apresentar esse pigmento (Bothast & Fennell, 1974).

Além das análises da presença de fungos e amostras tóxicas, verificou-se tipos de deterioração na castanha e alterações nas propriedades organolóticas: observou-se que os Zigomycetes, consomem a amêndoa totalmente, deixando a casca revestida internamente, por uma camada micelial branca e às vezes cinza, segundo o gênero presente. Outras espécies em conjunto, inclusive *Dematiáceos*, produzem deterioração negra, crostosa e inodora. A associação de bactérias e fungos, em geral, altera a cor da castanha (cinza escura) e consistência (gelatinosa). Os gêneros *Fusarium* sp. e *Cephalosporium* sp. danificam a amêndoa, modificando a sua consistência (mucóide), o cheiro (odor pútrico) e a deterioração parda que só foi detectada depois de cortar a castanha, produz odor rançoso, e na maioria destas amostras, isolou-se *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp.

Detectou-se nos ouriços, a presença de larvas de inseto pertencente à família *Curculionidae* que, além de estragar a entrecasca (tornando-a quebradiça e pulverulenta) promove sulcos rasos no mesocarpo.

Os resultados relativos aos extratos das amostras, demonstraram que a de Supermercado apresentou nível de toxidez "muito elevado" para aflatoxinas B1 e G1, diferindo das amostras oriundas de usinas que em termos de aflatoxina foi para B1, baixo a médio e para G1 baixo ou negativo. Assim, na ocorrência das três amostras positivas considerou-se: tempo de estocagem, tipo de tratamento do produto e sanidade das amêndoas. Nas de supermercado, período de estocagem desconhecido, naturais (sem beneficiamento) número elevado de contaminação; as de usinas, com tempo de estocagem conhecido, contaminação moderada, e tratamento adequado.

A contaminação maciça verificada em algumas amostras, por fungos do gênero *Aspergillus*, produtores de aflatoxinas B1 e G1, apresentaram-se isentas destas micotoxinas.

Conclui-se neste trabalho que a castanha do Pará, diante de todas as agressões a que é submetida e considerando-se as suas propriedades nutritivas, não corresponde às expectativas de ser um substrato favorável à produção de aflatoxinas. Pesquisas devem ser efetuadas para verificar, os fatores intrínsecos do produto na interferência de produção de aflatoxina.

SUMMARY

One hundred samples of Brazil nuts from the States of Amazonas and São Paulo, were analysed mycologically and toxicologically for aflatoxins B1 and G1. Three hundred and

twelve fungi were isolated of which 91 were of the genus *Aspergillus*, 83 of the genus *Penicillium* and the remainder included 23 different genera. Amongst the *Aspergillus* samples, 26 were producers of aflatoxin, distributed into three species: *Aspergillus flavus* Link (18); *Aspergillus parasiticus* Speare (7) and *Aspergillus fresenii* Subram (1). Of the 100 extracts of analysed nuts, three were aflatoxin-positive.

Tabela 1. Análise quantitativa de aflatoxinas B1 e G1 em farelo de amostras de castanhas do Pará.

Amostras	Concentração de aflatoxinas (mg/kg)	
	B1	G1
UL - 3	0,1	0,075
UIBS - 3	0,25	0,875
SEL - 7	2,25	1,5

UL - 3: Usina Londrina.

UIBS - 3: Usina I.B. Sabbã.

SEL - 7: Supermercado Eldorado.

Tabela 2. Frequência dos fungos encontrados nas amostras de castanha do Pará segundo o total de culturas isoladas.

Gêneros	Nº Colônias de fungos isolados	Frequência
<i>Absidia</i> sp.	27	8,65 %
<i>Aspergillus</i> sp.	91	29,16 %
<i>Candida</i> sp.	3	0,97 %
<i>Cephalosporium</i> sp.	13	4,16 %
<i>Circinella</i> sp.	1	0,32 %
<i>Cladosporium</i> sp.	3	0,97 %
<i>Cunninghamella</i> sp.	4	1,29 %
<i>Fusarium</i> sp.	8	2,56 %
<i>Geotrichum</i> sp.	2	0,64 %
<i>Humicola</i> sp.	4	1,29 %
<i>Monascus</i> sp.	2	0,64 %
<i>Mucor</i> sp.	6	1,92 %
<i>Neurospora</i> sp.	1	0,32 %
<i>Paecilomyces</i> sp.	18	5,76 %
<i>Penicillium</i> sp.	83	26,60 %
<i>Phialophora</i> sp.	3	0,97 %

continuação (Tabela 2.).

Gêneros	Nº Colônias de fungos isolados	Frequência
<i>Rhodotorula</i> sp.	3	0,97 %
<i>Rhizopus</i> sp.	5	1,60 %
<i>Saccharomyces</i> sp.	5	1,60 %
<i>Syncephalastrum</i> sp.	8	2,56 %
<i>Torulopsis</i> sp.	3	0,97 %
<i>Trichoderma</i> sp.	8	2,56 %
<i>Verticillium</i> sp.	5	1,60 %
FNI	6	1,92 %
Total	312	100 %

FNI = Fungos não identificados.

Tabela 3. Frequência de fungos isolados em castanha do Pará, procedentes de usinas de beneficiamento, feiras-livres, CEASA (MAO-AM) e Supermercados (Grande São Paulo).

Gêneros	Usina	Feira-livre	Ceasa	Supermercados	Total	%
<i>Absidia</i> sp.	16	6	1	4	27	31,76
<i>Aspergillus</i> sp.	63	4	4	12	83	97,64
<i>Candida</i>	1		1		2	2,35
<i>Cephalosporium</i> sp.	7	2			9	10,58
<i>Circinella</i> sp.	1				1	1,17
<i>Cladosporium</i> sp.	2				2	2,35
<i>Cunninghamella</i> sp.	3			1	4	4,70
<i>Fusarium</i> sp.	5	1		1	7	8,23
<i>Geotrichum</i> sp.			1		1	1,17
<i>Humicola</i> sp.	4				4	4,70
<i>Monascus</i> sp.	2				2	2,35
<i>Mucor</i> sp.	4		1	1	6	7,05
<i>Neurospora</i> sp.	1				1	1,17
<i>Paecilomyces</i> sp.	11	4		3	18	21,17
<i>Penicillium</i> sp.	55	5	6	8	74	87,60
<i>Phialophora</i> sp.	2				2	2,35
<i>Rhodotorula</i> sp.	2			1	3	3,29
<i>Rhizopus</i> sp.	3	1		1	5	5,88
<i>Saccharomyces</i> sp.	5				5	8,33

continuação (Tabela 3.).

Gêneros	Usina	Feira-livre	Ceasa	Supermercados	Total	%
<i>Syncephalastrum</i> sp.	6	1		1	8	9,41
<i>Torulopsis</i> sp.	1		1		2	2,35
<i>Trichoderma</i> sp.	1	2		4	7	8,35
<i>Verticillium</i> sp.	1			2	3	3,52
FNI	2	1	1	1	5	5,88
Total	165	27	14	33	239	

FNI = Fungos não identificados.

Tabela 4. Freqüência de gêneros de fungos isolados de castanhas do Pará em ouriço, provenientes de diversas localidades de Manaus (AM).

Gênero	Localidades			Total	%
	CAMO	CSA	AF		
<i>Aspergillus</i> sp.	3	1	4	8	53,33
<i>Candida</i> sp.		1		1	6,66
<i>Cephalosporium</i> sp.	3	1		4	26,66
<i>Cladosporium</i> sp.	1			1	6,66
<i>Fusarium</i> sp.	1			1	6,66
<i>Geotrichum</i> sp.		1		1	6,66
<i>Penicillium</i> sp.	1	6	2	9	60,0
<i>Phialophora</i> sp.	1			1	6,66
<i>Torulopsis</i> sp.		1		1	6,66
<i>Trichoderma</i> sp.		1		1	6,66
<i>Verticillium</i> sp.		2		2	13,33
FNI		1		1	6,66
Total	10	15	5	31	

CAMO = CEASA MANAUS - OURIÇO.

CSA = COLÔNIA SANTO ANTONIO.

AF = ANTONIO FAUSTINO.

Tabela 5. Produção de aflatoxina B1 e G1 por fungos isolados de castanha do Pará (10 a 20 dias de cultivo em meio de YES, a 28°C).

Amostras	Fungos	Aflatoxina B1	(mg/200 ml) G1	Total
UA - 2	<i>Aspergillus flavus</i>	1,0	0,75	1,75
UA - 7	<i>Aspergillus flavus</i>	0,0025	0,0018	0,0043
UL - 3	<i>Aspergillus parasiticus</i>	2,0	1,5	3,5
UL - 7	<i>Aspergillus flavus</i>	0,01		0,01
UL - 9	<i>Aspergillus flavus</i>	2,5	1,87	4,37
UL - 10	<i>Aspergillus parasiticus</i>	2,5	1,87	4,37
DC - 3	<i>Aspergillus parasiticus</i>	2,5	1,87	4,37
DC - 9	<i>Aspergillus flavus</i>	0,66		0,66
UIBS - 3	<i>Aspergillus parasiticus</i>	0,01	0,0075	0,175
UIBS - 4	<i>Aspergillus parasiticus</i>	0,002		0,002
UCX - 3	<i>Aspergillus flavus</i>			
UCX - 7	<i>Aspergillus flavus</i>	0,001		0,001
UCX - 8	<i>Aspergillus flavus</i>	1,0	0,75	1,75
UCX - 10	<i>Aspergillus flavus</i>	3,33	1,87	5,2
URM - 1	<i>Aspergillus parasiticus</i>	0,25		0,25
URM - 3	<i>Aspergillus flavus</i>			
URM - 7	<i>Aspergillus flavus</i>	1,0		1,0
CMA - 4	<i>Aspergillus flavus</i>	0,05		0,05
CMO - 5	<i>Aspergillus flavus</i>	0,20	0,75	0,95
AF - 1	<i>Aspergillus fresenii</i>	0,20		0,20
AF - 1	<i>Aspergillus flavus</i>	0,33	0,25	0,58
AF - 2	<i>Aspergillus parasiticus</i>	1,0	0,75	1,75
JEO - 1	<i>Aspergillus flavus</i>	0,020	0,075	0,095
SEL - 7	<i>Aspergillus flavus</i>	1,0	2,25	3,25
SFM - 9	<i>Aspergillus flavus</i>	0,05		0,05
SFM - 10	<i>Aspergillus flavus</i>	0,05	1,5	2,0
Total		24	15	24

Referências bibliográficas

- Almeida, F. & Azevedo, P. C. - 1950. O gênero *Aspergillus* e a podridão da Castanha do Pará. Belém - PA. **Pará Médico**, 50: jan/mar., 1949.
- Arx, J. A. von - 1974. The genera of fungi sporulating in pure culture. Vadez. J. **Cramer**. 315 p.
- Barnett, H. L. & Hunter, B. B. - 1972. **Illustrated genera of imperfect fungi**, 3. ed. Minneapolis, Burgess. 241 p.
- Barron, G. L. - 1972. The genera of *Hyphomycetes* from soil. New York, Robert E. Krieger. 366 p.
- Biology of conidial fungi - 1981. G. T. Cole, B. Kendrick (ed.). New York Academic Press. v. 1. 485 p.
- Bitencourt, A. A. - 1941. Podridões da castanha do Pará. **Biológico**, S.P., 7:303-312.
- Bothast, R. J. & Fennell, D. I. - 1974. A medium for rapid identification enumeration of *Aspergillus flavus* and related organisms. **Mycologia**, 66:365-369.
- Coomes, T. J. & Feuell, A. J. - 1965. Recommended procedures for the detection and estimation of aflatoxin B₁ in groundnuts and groundnut materials. **Trop. Prod. Inst. Rep.**, n. 13 G.
- Davis, N. D.; Diener, U. L.; Eldridge, D. W. - 1966. Production of aflatoxins B₁ and G₁ by "*Aspergillus flavus*" in a semisynthetic medium. **Appl. Microbiol.**, 14:378-80.
- Difco Laboratories - 1974. **Manual of dehydrated culture media and reagents for microbiological and clinical laboratory procedures**, 9. ed. Detroit.
- The Fungi - 1973. **An advanced treatise**. Ainsworth, G. C., Sparrow, F. K. & A. S. Sussman (eds.). New York, Academic Press, v. 4A. 621 p.
- Gilman, J. C. - 1957. **A manual of soil fungi**. 2. and ed. Ames, Iowa State College Press. 450 p.
- Lacaz, C. S. - 1977. **Micologia médica, fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. Servier, 6. ed., São Paulo. 502 p.
- Lee, W. V. - 1965. Quantitative determination of aflatoxin in groundnut products. **Analyst**. (London), 90(1070):305-307.
- Lin, M. T. - 1976. High incidence of aflatoxigenic fungi in Brazil nut. **Fitopatologia (Lima)**, 11:21. [resumo].
- Lira, M. B. - 1976. A castanha da *Bertholletia excelsa* e a aflatoxicose. In: **Anais Congresso de Toxicologia Tropical**, 1. Manaus. p. 153-155.
- Lodder, J. - 1970. **The yeasts: a taxonomic study**. 2. ed. Amsterdam, Elsevier. p. 803-1308.
- McLean, J. T. - 1926. Some general problems of the transport by sea and conservation in store of ripe fruit. **J. R. Soc. Arts.**, 74:328-341. [apud Bitencourt, A. A. - 1941].
- Nabney, J. & Nesbitt, B. F. - 1965. A espectrofotométric method for determining the aflatoxins. **Analyst**, 90:155-160.
- Pitt, J. I. - 1979. **The Genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talamomyces***. London, Academic Press. 634 p.

- Pons, W. A. Jr.; Cuculu, A. F.; Lee, L. S.; Robertson, J. A.; Franz, A. O.; Goldblatt, L. A. - 1966. Determination of aflatoxins in agricultural products: use of aqueous acetone for extraction. **J. Assoc. Offic. Anal. Chem.**, 49:554-562.
- Raper, K. B. & Fennell, D. I. - 1965. **The genus Aspergillus**. Baltimore, Williams & Wilkins (eds.) 686 p.
- Ridell, R. W. - 1950. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. **Mycologia**, 42:265-270.
- Schuller, P. L.; Verhulstsonk, C. A. H.; Paulsch, W. E. - 1973. Analysis of aflatoxin M₁ in liquid and powdered milk. **Pure Appl. Chem.**, 35:291-296.
- Tropical Products Institute - 1962. **Aflatoxin in groundnuts and groundnuts products: interpretation of physico-chemical and biological test results**. London, T. P. I. Ministry of Overseas Development, Londres. pg. 1.

(Aceito para publicação em 14.10.1988)