



MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE
FLORESTA NACIONAL DO TAPIRAPÉ-AQUIRI

**Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica do Instituto Chico Mendes de
Conservação da Biodiversidade- PIBIC/ICMBio**

Relatório de Final
(2018-2019)

**Análise da qualidade fisiológica e microbiológica de sementes
de *Bertholletia excelsa* Bonpl. provenientes da Floresta Nacional do
Tapirapé-Aquiri.**

Nome do Estudante de IC: Tales Caldas Soares

Orientador(a): André Luís Macedo Vieira

**Marabá-Pa
Julho/2019**

Resumo

A *Bertholletia excelsa* é uma das espécies amazônicas, símbolo da região de Carajás. O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade fisiológica e microbiológica das sementes de 60 ouriços da espécie, provenientes da FLONA Tapirapé-Aquiri, de forma a proporcionar aumento de viabilidade e da taxa de germinação. Foram realizadas análises morfométricas dos frutos e sementes, de massa, grau de umidade, viabilidade pelo uso do sal de tetrazólio a 0,5%. Também foram isoladas a comunidade fúngica presente nos ouriços, nas amêndoas e nas sementes, bem como identificadas e incluídas na Coleção de Fungos do LABBIM – UEPA. Os valores de desvio padrão das características biométricas dos frutos e sementes foram relativamente altos, indicando grande variação entre as amostras. As amêndoas apresentaram um grau de umidade de 12,41%. Das 151 sementes analisadas, 86,09% foram classificadas como viáveis. Foram isolados e identificados 56 morfotipos fúngicos, com destaque para os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, que se apresentaram como os mais frequentes com associação aos frutos de castanha-do-Brasil e encontrados nas três regiões do fruto avaliadas.

Palavras-chave: Amazônia, Castanheira, Fungos.

Abstract

Bertholletia excelsa is one of the Amazonian species, symbol of the Carajas region. The objective of this work was to evaluate the physiological and microbiological quality of seeds of 60 species of Hedgehogs, coming from FLONA Tapirapé-Aquiri, in order to increase viability and germination rate. Morphometric analyzes of fruits and seeds, mass, moisture degree, viability using 0.5% tetrazolium salt were performed. Also isolated were the fungal community present in the hedgehogs, almonds and seeds, as well as identified and included in the LABBIM - UEPA Fungi Collection. The standard deviation values of biometric characteristics of fruits and seeds were relatively high, indicating great variation between samples. Almonds had a moisture content of 12.41%. Of the 151 seeds analyzed, 86.09% were classified as viable. Fifty-six fungal morphotypes were isolated and identified, highlighting the genera *Aspergillus* and *Penicillium*, which were the most frequent associated with Brazil nuts and found in the three evaluated fruit regions.

Keywords: Amazon, Chestnut, Fungi.

Lista de Figuras

- Figura 1.** Mapa de localização das castanheiras na FLONA Tapirapé-Aquiri, Pará, Brasil.....4
- Figura 2.** Peso da massa do ouriço (A), mensuração dos diâmetros externos do ouriço (B) e mensuração da semente com paquímetro digital (C).....5
- Figura 3.** Alicates e faca utilizados para descascar a semente (A), amêndoas em embebição (B), lâmina utilizada para seccionar a amêndoa (C), amêndoas seccionadas (D), amêndoas imersas em solução de tetrazólio (E), recipientes cobertos com papel alumínio (F) e material em estufa (G).....5
- Figura 4.** Interpretação do teste de tetrazólio segundo metodologia de Camargo et al., 1997.....6
- Figura 5.** Prensador de sementes (A), processador utilizado para triturar as sementes (B), sementes trituradas (C), pesagem da amostra (D) e amostras em estufa (E).....7
- Figura 6.** Ouriços de 1-10 (A), ouriço em saco plástico estéril (B), diluição seriada (C) e placas prontas em estufa (D).....9
- Figura 7.** Placa com cultivo de fungo sob a lamínula (A) e preparação do microcultivo (B).....9
- Figura 8.** Fotos macroscópicas: (A) - LABBIM F57 *Penicillium sp.*; (B) - LABBIM F45 não determinado; (C) - LABBIM F7 *Penicillium sp.*; (D) - LABBIM F54 *Aspergillus sp.*; (E) - LABBIM F13 não determinado; (F) - LABBIM F42 *Penicillium sp.*; (G) - LABBIM F14 não determinado; (H) - LABBIM F26 *Aspergillus sp.*; (I) - LABBIM F9 não determinado; (J) - LABBIM F16 *Aspergillus sp.*; (K) - LABBIM F46 não determinado; (L) - LABBIM F38 não determinado; (M) - LABBIM F40 *Colletotrichum sp.*; (N) - LABBIM F10 não determinado; (O) - LABBIM F37 *Aspergillus sp.*.....12
- Figura 9.** Código da lâmina: LABBIM F7 A- Corpo de frutificação; B- Hifas; C- Esporos. Descrição microscópica: Hifa septada longa com bifurcações, conidióforo característico de *Penicillium sp.* em 90° conídeos ovalados em correntes. Aumento de 400X.....13
- Figura 10.** Código da lâmina: LABBIM F48 A- Corpo de frutificação; B- Hifas; C- Esporos. Descrição microscópica: Hifa septada, hialina, delgada, corpo de frutificação blástico, longo sem septos, diâmetro vesícula menor, conídeos esféricos demáceos verrugosos em cadeias. Sugestivo de *Aspergillus sp.* Aumento de 400X.....13
- Figura 11.** Código da lâmina: LABBIM F2 A- Corpo de frutificação; B- Hifas; C- Esporos. Descrição microscópica: Hifa septada, hialina, delgada, corpo de frutificação tático, conídeo artroconídeo, forma retangular, liso em cadeias. Gênero não determinado. Aumento de 400X.....14
- Figura 12.** Código da lâmina: LABBIM F20 A- Corpo de frutificação; B- Hifas; C- Esporos. Descrição microscópica: Hifa septada, ramificação em 90° espaçada, conidiósporos em correntes, esférico. Gênero não determinado. Aumento de 400X.....14
- Figura 13.** Código da lâmina: LABBIM F26 A- Corpo de frutificação; B- Hifas; C- Esporos. Descrição microscópica: Hifa septada, ramificação em 90°, esporos esféricos equinulados em correntes, conidióforos com conídeos, características de *Aspergillus sp.* Aumento de 400X.....15
- Figura 14.** Código da lâmina: LABBIM F38 A- Corpo de frutificação; B- Hifas; C- Esporos.

Descrição microscópica: Hifa septada, hialina, delgada, corpo de frutificação blástico septado, sem célula pé, esporos ligeiramente ovalados, superfície lisa, formam correntes. Gênero não determinado.....	15
Figura 15. Código da lâmina: LABBIM F43 A- Corpo de frutificação; B- Hifas; C- Esporos. Descrição microscópica: Hifa septada, hialina, delgada, esporângio curto, ausência de célula pé. Gênero não determinado. Aumento de 400X.....	16
Figura 16. Código da lâmina: LABBIM F41 A- Corpo de frutificação; B- Hifas; C- Esporos. Descrição macroscópica: Hifa septada, hialina, delgada, esporângio com esporo alongado curvado, hialino, sem septos. Gênero não determinado. Aumento de 400X.....	16
Figura 17. Código da lâmina: LABBIM F27. A - Corpo de frutificação; B – Hifas; C - Esporos. Descrição microscópica: Hifa septada, hialina, delgada, corpo de frutificação blástico, longo sem septos, diâmetro vesícula menor, conídeos esféricos demáceos verrugosos em cadeias. Sugestivo de <i>Aspergillus</i> sp. Aumento de 400X.....	17

Lista de Quadros

Quadro 1. Critérios para descrição macro e microscópica dos fungos isolados se <i>Bertholletia excelsa</i> da FLONA Tapirapé-Aquiri, Pará, Brasil.....	10
---	----

Lista de Tabelas

Tabela 1. Tabela de classes para interpretação do teste do tetrazólio.....	6
Tabela 2. Morfometria dos frutos (ouriços) de <i>Bertholletia excelsa</i> da FLONA Tapirapé-Aquiri, Pará, Brasil.....	12
Tabela 3. Morfometria das sementes (castanhas) de <i>Bertholletia excelsa</i> da FLONA Tapirapé-Aquiri, Pará, Brasil.....	13
Tabela 4. Análise de viabilidade das sementes de <i>Bertholletia excelsa</i> da FLONA Tapirapé-Aquiri, Pará, Brasil através do uso do cloreto 2-3-5 trifeniltetrazólio.....	13
Tabela 5. Morfotipos isolados por região do fruto de castanha-do-Brasil da FLONA Tapirapé-Aquiri.....	15
Tabela 6. Fungos associados a frutos de castanha-do-Brasil da FLONA Tapirapé- Aquiri e a ocorrência por região do fruto avaliada.....	16
Tabela 7. Contagem de log de unidades formadoras de colônia por grama de amostra (ufc/g) por região do fruto (ouriço, semente e amêndoa).....	16

Lista de Abreviaturas e Siglas

AF - Aflatoxina

EMBRAPA- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FLONA – Floresta Nacional

ICMBio – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

ILPF - Integração-Lavoura-Pecuária-Floresta

LABBIM – Laboratório de Bioprodutos e Energia da Biomassa

PA - Pará

PFNM - Produtos Florestais Não Madeireiros

RAS - Regras para Análise de Sementes

SAFs - Sistemas Agroflorestais

Sumário

1. Introdução	1-3
2. Objetivos	3
3. Materiais e Métodos	4
3.1. Delineamneto do experimento	4
3.2 Ensaio laboratorial - análise da qualidade das sementes de <i>Bertholletia excelsa</i>	4-7
3.3 Isolamento e cultura de microrganismos	7-10
4. Resultados	11
4.1 Caracterização morfométricas de frutos e sementes	11
4.1.1 Morfologia de frutos e sementes	11-12
4.1.2 Morfometria dos frutos e das sementes	11
4.2 Viabilidade pelo teste do tetrazólio	13
4.3 Morfotipos de fungos isolados	14
5. Discução e Conclusões	25
6. Recomendações de Manejo	33
7. Agradecimentos.....	27
8. Citações e referências bibliográficas	28-34

1. Introdução

A *Bertholletia excelsa* Bonpl. é uma espécie arbórea nativa da Amazônia (SILVA, 2009) e, de acordo com Müller (1981), pode ser considerada uma árvore social, uma vez que se encontra em grupos, conhecidos como castanhais. Espécie comercialmente explorada desde o século XVII, foi descrita e denominada em 1.808 pelos pesquisadores Humboldt, Bonpland e Kunth. É conhecida popularmente como Castanha do Pará e, para efeito de comercialização exterior, a partir do ano de 1961, passou a ser denominada como Castanha do Brasil (SANTOS, 2012; SILVA, 2014).

Na década de 1920, com o declínio da borracha, a castanha do Pará passou a ocupar, por alguns anos, a posição de principal produto de exportação em vários estados da Amazônia, como foi o caso do Pará (ALMEIDA, 2016). Os anos de 1920 marcaram também a ascensão da área do vale do rio Tocantins, sobretudo o município de Marabá, no Sudeste do Pará, como grande centro produtor de castanha do Pará (ALMEIDA, 2014).

A espécie passou a constituir o principal produto extrativista para exportação na Região Norte do Brasil após a decadência da exploração e comércio da borracha extraída de seringueiras (LORENZI, 2002; VIEIRA et al., 2009).

A coleta extrativista da castanha é considerada, como um dos elementos fundamentais de preservação da floresta amazônica, pelo fato de suas sementes serem uma das principais fontes de renda para as famílias, que vivem nas florestas da região amazônica, e promovem a conservação de grandes extensões da floresta (ZUIDEMA; BOOT 2002; LOCATELLI et al., 2005; DOS SANTOS., et al 2010).

O extrativismo da castanha é considerado uma atividade estratégica, na conservação da Amazônia, por conciliar o uso econômico das florestas, e a manutenção da biodiversidade, na FLONA do Tapirapé-Aquiri, essa ação é desenvolvida por indígenas da etnia do *Xicrin do Cateté*, que se deslocam a unidade no período de safra da castanha.

Sua ocorrência em regiões meridionais da Amazônia, propensas nas últimas décadas ao desmatamento e à expansão da fronteira agrícola e pecuária, faz com que essa espécie apareça frequentemente como símbolo de resistência ambiental, e a possível desestruturação desta cadeia de produção pode potencializar o desmatamento na Amazônia (SANTOS., et al 2009; SCOLES, 2016).

A emergência de sementes de castanheira, por ser bastante lenta e desuniforme, constitui-se um dos grandes problemas no estabelecimento de cultivos racionais, como

também tem limitado os trabalhos de melhoramento genético com a cultura (CAMARGO, 1997; KAINNER et al., 1999).

Nesse contexto, se faz necessário investir em pesquisa sobre sua biologia reprodutiva e variação intra e interespecífica de produção, é importante para a definição, de práticas de manejo que, possibilitem a manutenção dos castanhais nativos (LIMA et al., 2009).

O plantio da castanha-do-brasil tem sido estimulado, principalmente como componente agroflorestal para programas de reflorestamento, a fim de reincorporar áreas degradadas ao processo produtivo, para a geração de renda, via produto florestal não madeireiro (PFNM), visando conciliar produtividade versus sustentabilidade ecológica da espécie, por meio do seu uso múltiplo (COSTA et al., 2009; SOUZA et al, 2015).

A castanha do Brasil é considerada um produto orgânico resultante do extrativismo da região Amazônica e não se faz uso de defensivos químicos para adubação e controle de pragas tornando a extração ambientalmente correta (ANDRADE, 2010). No entanto, se tem pouco controle dos padrões de qualidade devido a sua cadeia produtiva possuir baixo nível tecnológico, de manuseio e manejo da matéria-prima (LEITE, 2014).

As castanhas são bastante apreciadas nos mercados interno e externo, possuem elevado teor de lipídios e proteínas, que juntamente com as condições climáticas da região amazônica, na época de colheita (caracterizadas por temperatura média de 30°C e umidade relativa do ar em torno de 97%), aliadas às deficiências no processo de produção, são fatores que favorecerem o desenvolvimento de fungos produtores, de micotoxinas, que são metabólitos secundários produzidos por algumas linhagens de fungos que aceleram a deterioração da castanha, e podem impactar de forma negativa na saúde animal e humana (HUSSEIN; BRASEL 2001; BENNETT; KLICH 2003; COSTA et al., 2009; GIORDANO, 2009; MARTINS; MAZIERO; BERSOT 2010; MARTINS 2011).

As condições supracitadas propiciam o cultivo natural de fungos e bactérias dentre outros organismos. Presume-se que os ouriços ainda nas árvores são alvos de ataque (aves, roedores, prossímios e macacos) os quais podem deixar inóculos microbianos de fezes, regurgitações, saliva e mesmo do solo com suas patas, e também insetos, que contribuem para a riqueza da microbiota (ALMEIDA et al., 2009).

Um dos grandes problemas da exploração extrativista da castanha do Brasil está no sistema de coleta empregado, devido às questões de contaminação por bactérias e fungos (SOUZA et al., 2008; BORÉM et al.,2009). Após a coleta, os ouriços muitas vezes são armazenados de forma indevida, sendo depositados em locais descobertos e em contato direto com o solo, propiciando a entrada de água no fruto, dessa forma, o teor de umidade presente

no mesmo é elevado, favorecendo o desenvolvimento dos microrganismos e prejudicando a qualidade das sementes (SOUZA et al., 2004).

A Amazônia possui enorme biodiversidade, o que permite ao homem diversas possibilidades de se produzir de forma sustentável, a *Bertholletia excelsa* Bonpl. é uma das espécies florestais que permite esse aproveitamento, mas no entanto carece de tecnologias aplicadas, principalmente ao manejo de sementes, que são as unidades principais para a sua reprodução, sendo necessário compreender as especificidades fisiológicas e técnicas adequadas ao manejo (e particular) de cada espécie desde a coleta de sementes da matriz, até o plantio. Portanto, é importante o desenvolvimento de tecnologia de vise o aumento da viabilidade e minimize a contaminação e garanta o sucesso da produção de mudas.

Alteração do plano de trabalho:

As alterações realizadas, de título e da pesquisa, estão relacionadas à falta de lotes de sementes da espécie selecionadas no plano de trabalho submetido.

2. Objetivos

2.1. Geral

Avaliar a qualidade fisiológica e microbiológica das sementes de ouriços de *Bertholletia excelsa*, provenientes da FLONA Tapirapé-Aquiri.

2.2 Específicos

- Avaliar a viabilidade das sementes com o uso de tetrazólio;
- Realizar testes de morfometria nas sementes e nos frutos;
- Isolar a comunidade microbiana fúngica associada à espécie *B. excelsa*;
- Caracterizar a comunidade microbiana fúngica
- Todos os morfotipos isolados foram incluídos na Coleção de Referência de Fungos do Laboratório de Bioprodutos e Energia da Biomassa da UEPA.

3. Material e Métodos

3.1 Origem dos frutos e delineamento experimental

Os frutos de *Bertholletia excelsa* foram coletados de árvores localizadas na Trilha Ecológica Castanheira, localizada na Floresta Nacional do Tapirapé-Aquiri, a trilha está situada entre as coordenadas geográficas de 5° 35' e 6° 00' de latitude sul e 50° 24' e 51° 06' de longitude oeste (Figura 1), em parceria com o Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio).

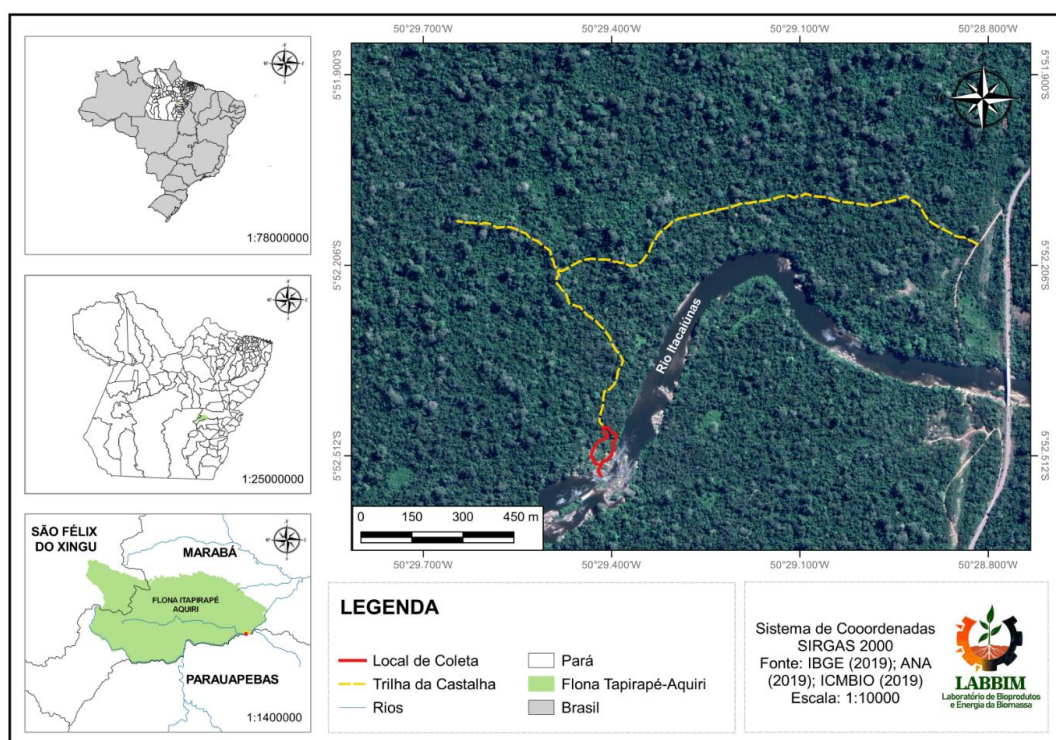


Figura 1. Mapa de localização das castanheiras na FLONA Tapirapé-Aquiri, Pará, Brasil. **Fonte:** Autoral (2019).

3.2 Ensaio laboratorial - análise da qualidade das sementes de *Bertholletia excelsa*

A condução experimental se deu no Laboratório de Bioprodutos e Energia da Biomassa da Universidade do Estado do Pará (UEPA), Marabá – PA. Para realização das análises, foram utilizados 60 frutos, subdivididos para os seus respectivos testes:

a) Caracterização morfométricas dos frutos e sementes

Para a caracterização Morfométrica foram utilizados 20 ouriços, sendo que de cada ouriço foi pesada sua massa em balança analítica (0,0001 g) (Figura 2-A) e medido as dimensões diâmetro tangencial interno e externo, diâmetro longitudinal interno e externo e

diâmetro do opérculo, os diâmetros externos exceto o diâmetro do opérculo com o auxílio de uma fita métrica (Figura 2-B) e os internos com o auxílio de um paquímetro digital (0,01 mm) (Figura 2-C). Cada ouriço foi aberto com o auxílio de um facão, após a abertura foi contado o nº de sementes por fruto e pesado sem as sementes. As sementes de cada fruto foram pesadas e mensuradas nas dimensões diâmetro longitudinal, tangencial e espessura da semente.



Figura 2. (A) Peso da massa do ouriço; (B) mensuração dos diâmetros externos do ouriço; e (C) mensuração da semente com paquímetro digital. **Fonte:** Autoral (2019).

b) Teste de viabilidade pelo método do tetrazólio

Para realização deste teste, foram utilizadas as sementes de 10 ouriços, sendo as mesmas descascadas com o auxílio de um alicate e uma faca estéril. As amêndoas foram lavadas com água destilada, e permaneceram em embebição em um recipiente plástico durante 24 horas. Logo, foram seccionadas ao meio com uma lâmina e transferidas para dois béqueres. Decorrida esta etapa as sementes foram imersas em solução a 0,1% de sal de tetrazólio (cloreto 2-3-5 trifeniltetrazólio), envolvidas e totalmente cobertas com papel alumínio e mantidas durante 06 horas no interior de uma estufa à 30°C (Figura 3 A-G).

Após o desenvolvimento da coloração, as sementes foram lavadas com água destilada, e agrupadas em três classes (Figura 4) para determinação da viabilidade (Tabela 1), segundo metodologia de Camargo et al. (1997). Também se verificou a presença de lesões decorrentes do processo de remoção da testa das amêndoas pela coloração vermelha.

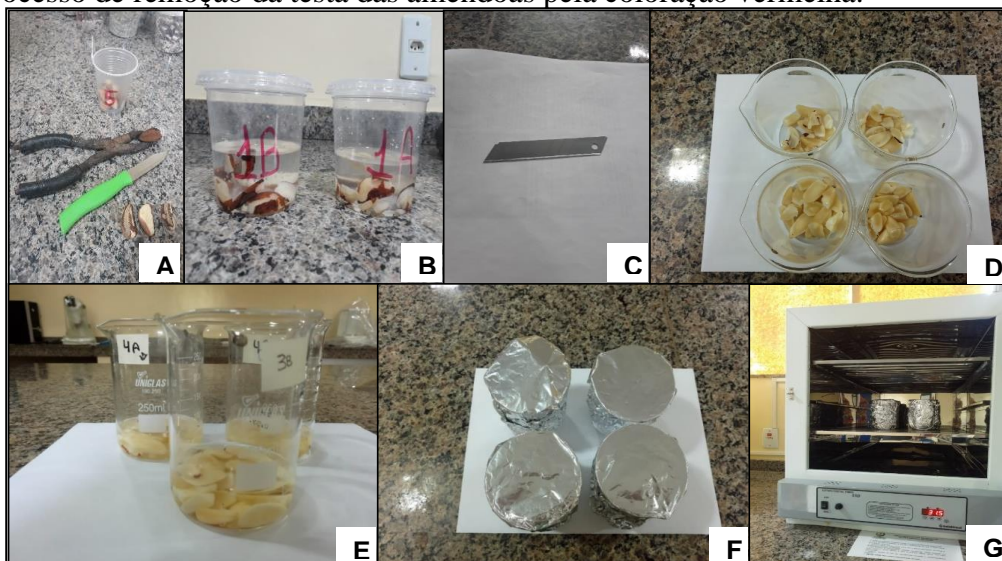


Figura 3. (A) Alicates e faca utilizados para descascar a semente; (B) amêndoas em embebição; (C) lâmina utilizada para seccionar a amêndoa; (D) amêndoas seccionadas; (E) amêndoas imersas em solução de tetrazólio; (F) recipientes cobertos com papel alumínio; e (G) material em estufa. **Fonte:** Autoral (2019).

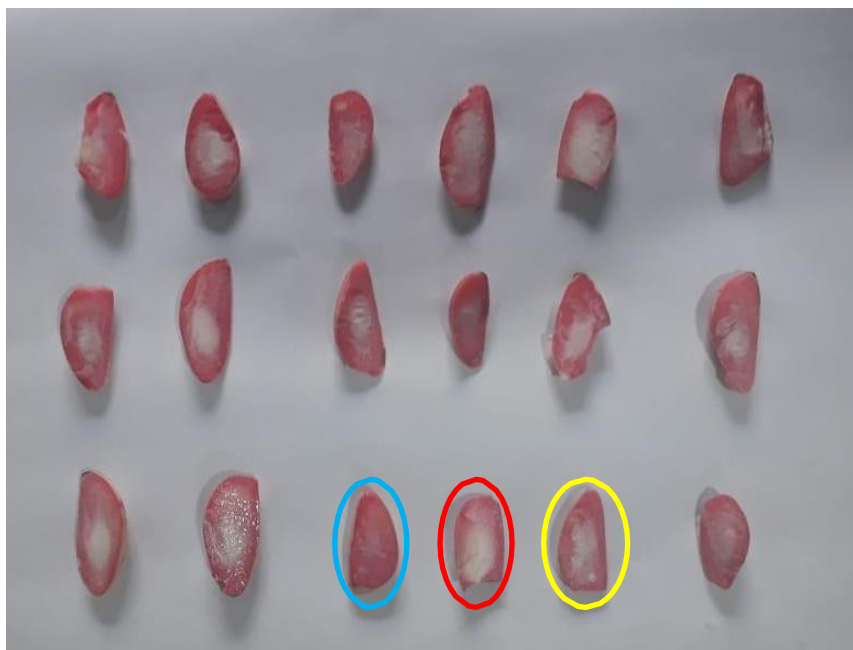


Figura 4. Interpretação do teste de tetrazólio segundo metodologia de Camargo et al., 1997 que se baseia no percentual de área branca pós teste: **Da esquerda para direita; em azul:** amêndoa 10% branca (altamente viável); em vermelho: semente 10 à 50% branca (inviável); em amarelo: amêndoa > 50% branca (moderada viabilidade). **Fonte:** Autoral, 2019.

Tabela 1. Tabela de classes para interpretação do teste do tetrazólio para determinação da viabilidade.

Classes	Cor		Viabilidade
	Branco	Rosa	
1	<10%	> 90%	Alta
2	10 a 50%	50 a 90%	Moderada
3	> 50%	< 50%	Não viável

Fonte: Autoral (2019).

c) Grau de umidade pelo método da estufa em alta temperatura

A determinação do grau de umidade foi realizada através método da estufa, utilizando-se sementes de 20 ouriços, segundo a metodologia descrita no Manual de Procedimentos para Análise de Sementes Florestais (DA LIMA JÚNIOR, 2010). As sementes foram prensadas com um prensador específico para quebrar castanha do Pará e trituradas com o auxílio de um processador. Para cada ouriço retirou-se 3 amostras de 20g e as mesmas foram inseridas em placas de Petri. As amostras permaneceram em uma estufa de circulação forçada Solab SL102 a 105 ± 3 °C durante 24 horas resfriaram em um dessecador durante 15 minutos e foram pesadas (Figura 3 A-E). Os resultados se deram em percentagem média para cada lote conforme evidenciado pela Equação 1.

$$U = 100x \frac{P - p}{P - t}$$

Onde:

U = % de umidade

P = peso inicial, peso do recipiente e sua tampa mais o peso da semente úmida;

p= peso inicial, peso do recipiente e sua tampa mais o peso da semente seca;

t= tara, peso do recipiente com sua tampa.

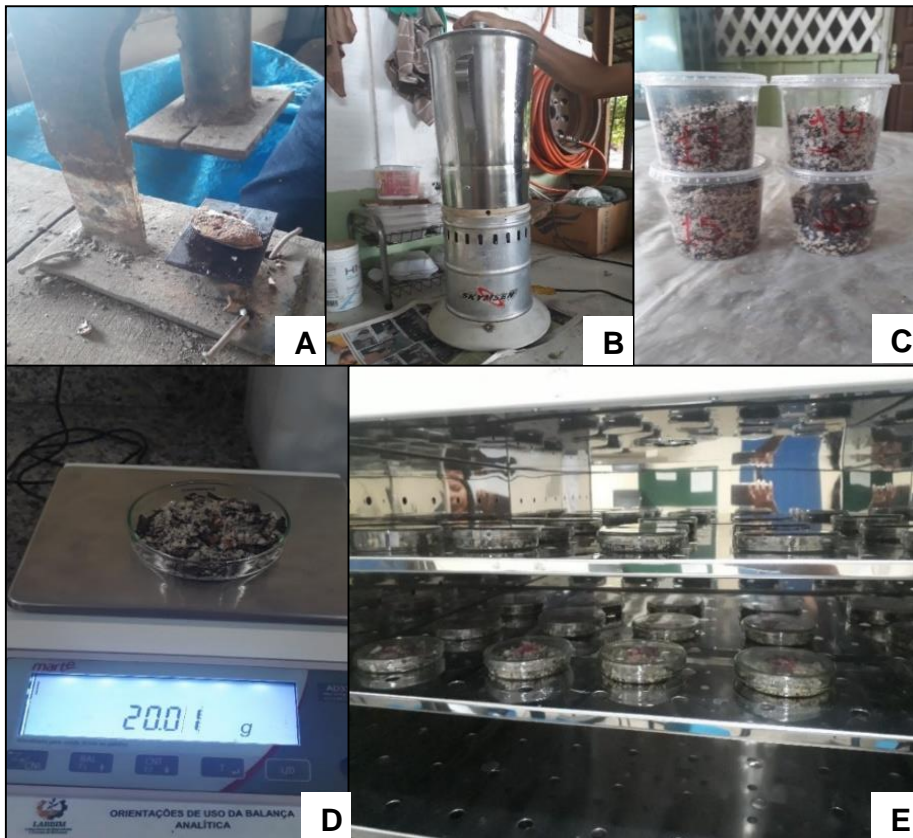


Figura 5. (A) Prensador de sementes; (B) processador utilizado para triturar as sementes; (C) sementes trituradas; (D) pesagem da amostra; e (E) amostras em estufa.

Fonte: Autoral (2019).

3.3 Isolamento e cultura de microrganismos

O isolamento da comunidade fúngica foi realizado a partir de 10 ouriços aleatoriamente classificados de A a J, sendo 3 regiões do fruto (superfície externa do ouriço, superfície externa da castanha e amêndoas), considerando o fator de diluição. Todos os procedimentos realizados em triplicata.

A técnica principal envolveu a diluição seriada e plaqueamento em superfície de meio de cultivo sólido.

a) Isolamento da comunidade fúngica da superfície externa do fruto

O isolamento da comunidade microbiana fúngica da superfície externa dos ouriços foi realizado com 10 ouriços selecionados aleatoriamente e classificados de A à J. Inicialmente os ouriços foram lavados em água corrente em abundância, imersos em solução de hipoclorito 2% por 1 minuto e enxaguado em água corrente para a eliminação da comunidade epifítica contaminante. Em seguida cada ouriço foi depositado em um saco plástico esterilizado, contendo 100ml de solução salina estéril (cloreto de sódio – NaCl a 0,85%) e agitados manualmente por 5 minutos. Em condições assépticas, foi realizada e diluição seriada até a 10^{-10} . Foram semeados 100 μ L das diluições 10^{-10} , 10^{-8} e 10^{-5} em meio BDA (15g/L ágar, 200g/L batata 1,5g/L dextrose, pH 5,8 \pm 0,2 contendo 500 mg/L do antibiótico ciprofloxacino) em triplicata e incubados a 28°C por 6 dias.

b) Isolamento comunidade fúngica da superfície externa da semente

Para o isolamento dos fungos associados à superfície externa das sementes, todas as castanhas dos ouriços (A à J) foram lavadas em água corrente, em seguida repetiu-se o procedimento de isolamento como descrito acima. As diluições utilizadas foram 10^{-6} , 10^{-4} e 10^{-2} nas mesmas condições de cultivo.

c) Isolamento da comunidade microbiana associada às amêndoas

A última etapa de isolamento foi realizada com as amêndoas. Inicialmente foi definida a média do peso total de sementes por ouriço e definida a amostragem de amêndoas por ouriço, sendo este número 8 sementes por ouriço. Em seguida realizou-se a desinfecção superficial das sementes através da lavagem com água e detergente neutro, seguida de enxágue em água corrente.

Na sequência, as sementes foram imersas em hipoclorito 2% por 5 minutos e enxaguadas com água destilada estéril. Para a abertura das sementes e obtenção das amêndoas utilizou-se de um alicate e uma faca (ambos devidamente esterilizados). As amêndoas foram novamente pesadas em condições estéreis e em seguida suspendidas em 100mL de solução salina estéril (NaCl 0,85%) e agitadas manualmente por 5 minutos. Em condições assépticas, foi realizada e diluição seriada até a 10^{-5} . Foram semeados 100 μ L das diluições 10^{-5} e 10^{-3} em meio BDA (ágar batata dextrose, pH 5,8 \pm 0,2 contendo 500 mg/L do antibiótico ciprofloxacino) em triplicata e incubados a 28°C por 6 dias.

Após o período de incubação, todas as placas foram avaliadas quanto ao número de ufc por diluição e os dados foram convertidos para ufc/g de amostra. Além disso, foram purificados os diferentes morfotipos por região do fruto analisada, com base nas características macroscópicas do crescimento da colônia fúngica (formato, tamanho e pigmentação).

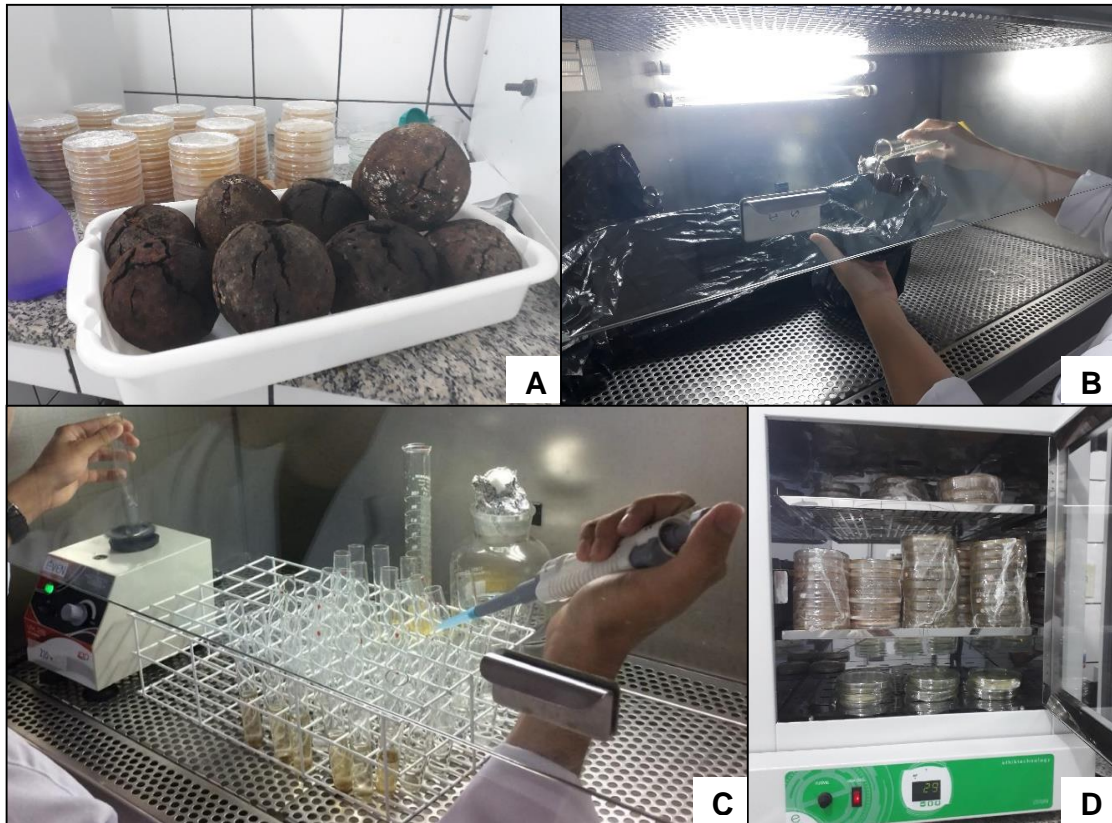


Figura 6. (A) Ouriços de 1-10, (B) ouriço em saco plástico estéril, (C) diluição seriada e (D) placas prontas em estufa. **Fonte:** Autorial (2019).

d) Confirmação de morfotipos fúngicos

Utilizando a técnica do microcultivo (Figura 6 -A e B), foi realizada a microscopia dos diferentes morfotipos purificados com o objetivo de investigar a presença do mesmo morfotipo nas diferentes regiões do fruto (ouriço, semente e amêndoa) A técnica do microcultivo consiste em cultivar o fungo diretamente sob a lamínula, e assim obter melhor resultados na visualização do arranjo do micélio, das estruturas reprodutivos e esporos. A visualização se deu por microscopia ótica no aumento de 40x.

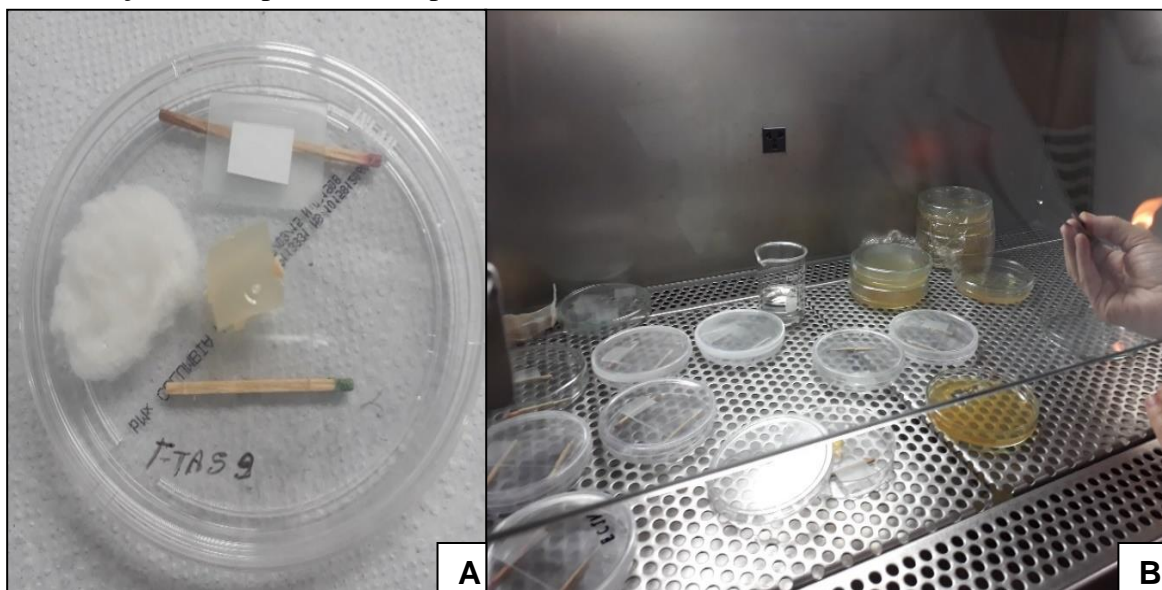


Figura 7. (A) Placa com cultivo de fungo sob a lamínula e (B) preparação do microcultivo. **Fonte:** Autoral (2019).

Para a descrição macroscópica dos fungos foram utilizados os seguintes critérios: forma da colônia (puntiforme, circular, filamentosa e irregular), superfície da colônia (cotonosa, granulada e lisa), margem da colônia (ondulada, lobada e filamentosa), coloração (verso e reverso) e aspecto (seco e úmido) (Quadro 1).

Na descrição microscópica dos fungos os critérios utilizados para descrição foram: Hifa (septada, cenocítica), pigmentação (hialina e demácea), espessura da hifa (espessa e delgada), corpo de frutificação (blástico, esporângio e tálico), esporo (conídeo e artroconídeo), formato do esporo (estérico, ovalado e alongado e arranjo dos esporos (isolados e em cadeias)).

Quadro 1. Critérios para descrição macro e microscópica dos fungos isolados se *Bertholletia excelsa* da FLONA Tapirapé-Aquiri, Pará, Brasil.

Descrição Macroscópica		Descrição Microscópica	
Critérios	Variações	Critérios	Variações
Forma da colônia	Puntiforme	Hifa	Septada
	Circular		Cenocítica
	Filamentosa	Pigmentação da hifa	Hialina
	Irregular		Demácea
Superfície da colônia	Cotonosa	Espessura da hifa	Espessa
	Granulada		Delgada
	Lisa	Corpo de frutificação	Blástico
Margem da colônia	Lisa		Esporângio
	Ondulada	Tálico	
	Lobada	Esporo	Conídeo
	Filamentosa		Artroconídeo
Coloração	Verso	Formato do esporo	Esférico
	Reverso		Ovalado
Aspecto	Seco		Arranjo dos esporos
	Úmido	Isolados	
			Cadeias

Fonte: Autoral (2019).

4. Resultados

4.1 Caracterização morfométricas de frutos e sementes

4.1.1 Morfologia de frutos e sementes

a) Frutos: Cápsula poricida simples, indeiscente, orbicular, em corte transversal apresenta-se arredondada, não estipitada. Pedúnculo em tons castanhos, homócromo, opaco, glabro, com retículos transversais. Fruto estenocárpico, subgloboso. Exocarpo castanho escuro, opaco, reticulado, glabro, fibroso; mesocarpo castanho claro, homócromo, mais espesso que o exocarpo, glabro, fibroso; endocarpo castanho escuro, semelhante ao exocarpo, opaco, rugoso, glabro, cartáceo, levemente fibroso e septado.

b) Sementes: (a) Descrição externa: estenospérmica; triangular angulosa; trisseriada; base, margem e ápice angulosos. Constituída por duas camadas de tegumento: a testa, mais externa, em tons castanhos, opaca, rugosa, glabra e lígnea; e a camada mais interna, o tégmen, é membranoso e castanho mais escuro que a testa. Hilo em depressão, subapical, grande, oblongo, rafe rígida e saliente, em tons castanhos escuros e homocroma. (b) Descrição interna: embrião atípico, triangular, conferruminado, não havendo distinção de cotilédones, eixo hipocótilo-radícula e plúmula.

Todas as descrições morfológicas dos frutos e sementes foram realizadas com base no trabalho de Santos et al. (2006).

Cavalcante (1996) refere-se ao fruto de *Bertholletia excelsa* como uma cápsula do tipo pixídio incompleto. Já Müller (1995) classifica-o como cápsula indeiscente. Oliveira e Daly (2001) classificam o fruto da castanha-do-pará como secundariamente indeiscente, devido ao diâmetro da abertura do fruto ser menor que o diâmetro da semente. O fruto de *Bertholletia* é uma cápsula poricida simples, indeiscente (por não liberar as sementes espontaneamente), de acordo com a classificação de Barroso et al. (1999), devido às características morfológicas do fruto dessa espécie.

4.1.2 Morfometria dos frutos e das sementes

Os 20 ouriços da FLONA Tapirapé-Aquiri apresentaram uma média de 15 ± 2 sementes conforme evidenciado na tabela 2. Estes valores estão de acordo com os encontrados por Camargo et al. (2010), Borges et al. (2016) e Da Rocha et al. (2016).

Já a massa média por ouriço, foi de $222,31 \pm 160,38$ g. Os frutos apresentaram um comprimento externo médio de $106,22 \pm 4,30$ mm e uma largura externa de $110,17 \pm 8,83$ mm com a abertura do opérculo de $19,82 \pm 11,70$ mm.

Tabela 2. Morfometria dos frutos (ouriços) e grau de umidade sementes de *Bertholletia excelsa* da FLONA Tapirapé-Aquiri, Pará, Brasil.

O	N	Massa		GU	Comprimento		Largura		OP
		O	O+ S		Interno	Externo	Interno	Externo	
		----- g -----		- % -	----- mm -----				
1	18	211,29	317,60	8,35	79,56	97,10	76,81	114,34	5,54
2	13	207,97	338,17	10,6	80,45	101,20	71,42	108,35	8,38
3	12	207,24	400,78	9,05	84,02	103,80	79,32	114,25	4,99
4	16	259,93	435,46	9,90	69,91	108,90	81,70	120,32	7,23
5	14	286,06	511,04	9,17	75,10	115,90	65,38	125,24	7,00
6	15	229,35	446,70	9,22	66,48	106,30	81,86	117,96	7,32
7	14	188,61	464,19	12,17	65,26	106,60	74,51	115,71	10,29
8	10	303,44	567,71	9,70	66,84	117,50	89,91	137,68	6,78
9	15	271,80	441,24	10,55	61,86	108,20	87,00	118,83	9,56
10	14	160,78	447,66	9,13	89,23	105,00	45,60	82,52	6,38
11	18	174,31	338,38	12,38	77,50	96,77	82,30	101,54	9,00
12	16	217,72	346,42	15,35	84,00	101,86	99,80	95,49	10,41
13	11	246,82	393,44	16,38	80,20	105,68	80,50	96,45	8,46
14	16	231,49	497,14	11,43	109,8	101,86	115,90	103,45	8,11
15	18	211,37	461,08	15,78	70,3	109,18	116,70	109,82	11,46
16	23	256,70	538,40	13,98	75,8	113,00	99,10	115,55	9,96
17	15	199,99	413,58	14,08	75,8	102,50	93,60	109,50	10,53
18	13	172,66	459,56	14,80	84,2	108,54	102,20	106,95	8,55
19	16	224,24	387,69	20,37	91,00	103,45	113,20	99,31	11,78
20	17	184,47	495,83	15,81	83,00	111,09	88,70	110,13	9,18
Média	15,2	222,31	435,1	12,41	78,52	106,22	87,28	110,17	19,82
Mínimo	10	160,78	317,6	8,35	61,86	96,77	45,6	82,52	8,11
Máximo	23	303,44	567,71	20,37	109,8	117,46	116,7	137,68	40,83
DP	2,12	30,9	54,48	2,73	8,03	4,3	13,36	8,83	11,7

Legenda: O – Ouriço (fruto da castanha), N – Número de Sementes, MO – Massa do Ouriço (em gramas), MO+MS – Massa do Ouriço + Massa das Sementes (em gramas), DL – Diâmetro Longitudinal, DP – Diâmetro Perpendicular, DO – Diâmetro do Opérculo.

De forma a compreender melhor as peculiaridades morfológicas das sementes de castanha, foram mensuradas todas as sementes encontradas em cada um dos 20 ouriços. Em todos os ouriços, os padrões morfológicos avaliados não apresentaram diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Conforme pode ver visualizado na tabela 3, a massa média das sementes presentes nos ouriços, o comprimento, a largura e a espessura em mm não apresentaram diferenças estatísticas. Tratando-se de sementes por ouriço, a massa média variou de $6,60 \pm 1,53$ g (ouriço 6) a $8,49 \pm 1,05$ g (ouriço 7); o comprimento variou de $40,88 \pm 2,34$ mm (ouriço 16) a $60,64 \pm 4,93$ mm (ouriço 4); a largura variou de $16,41 \pm 2,06$ mm (ouriço 4) a $26,57 \pm 1,81$ mm (ouriço 13); e a espessura de $17,31 \pm 1,78$ mm (ouriço 18) a $32,63 \pm 2,84$ mm (ouriço 3). Nenhum ouriço apresentou castanhas com medidas de largura e/ou espessura maiores que as de comprimento.

Tabela 3. Morfometria das sementes (castanhas) de *Bertholletia excelsa* da FLONA Tapirapé-Aquiri, Pará, Brasil.

O	Massa (S) ----- g -----	Comprimento ----- mm -----	Largura ----- mm -----	Espessura ----- mm -----
1	7,09 ± 1,49 ^{AB}	44,51 ± 4,43 ^{FGH}	21,21 ± 3,57 ^{BC}	28,30 ± 2,45 ^{BC}
2	6,70 ± 1,59 ^{ABC}	50,57 ± 4,91 ^{DEF}	26,04 ± 1,42 ^A	32,39 ± 2,65 ^A
3	7,54 ± 1,32 ^{AB}	57,55 ± 5,00 ^{BCD}	20,88 ± 5,01 ^{BCD}	32,63 ± 2,84 ^A
4	7,33 ± 1,20 ^{AB}	60,64 ± 4,93 ^{ABC}	16,41 ± 2,06 ^{EF}	29,94 ± 3,27 ^{AB}
5	5,33 ± 1,57 ^C	65,71 ± 3,05 ^A	14,85 ± 1,41 ^F	25,05 ± 3,71 ^{CD}
6	6,60 ± 1,53 ^{BC}	63,37 ± 7,88 ^{AB}	14,97 ± 1,59 ^F	26,19 ± 3,68 ^{CD}
7	8,49 ± 1,05 ^A	55,01 ± 10,09 ^{CDE}	16,92 ± 2,56 ^{EF}	28,39 ± 3,44 ^{BC}
8	7,09 ± 1,60 ^{ABC}	44,40 ± 5,33 ^{FGH}	17,07 ± 1,14 ^{DEF}	23,71 ± 2,12 ^{DE}
9	7,52 ± 0,93 ^{AB}	42,73 ± 3,56 ^{GH}	19,83 ± 2,16 ^{CDE}	25,55 ± 2,15 ^{CD}
10	6,61 ± 1,43 ^{BC}	42,79 ± 4,53 ^{GH}	16,87 ± 1,84 ^{EF}	22,98 ± 3,06 ^{DE}
11	7,09 ± 0,79 ^{AB}	42,40 ± 4,40 ^{GH}	24,43 ± 3,00 ^{AB}	19,50 ± 1,80 ^F
12	6,81 ± 1,70 ^{ABC}	44,90 ± 4,77 ^{FGH}	24,95 ± 3,52 ^A	18,22 ± 2,56 ^F
13	8,21 ± 2,12 ^{AB}	48,38 ± 6,67 ^{EFG}	26,57 ± 1,81 ^A	19,33 ± 1,68 ^F
14	6,92 ± 0,99 ^{ABC}	43,90 ± 5,26 ^{FGH}	25,59 ± 3,16 ^A	20,38 ± 3,21 ^{EF}
15	8,12 ± 1,36 ^{AB}	48,45 ± 4,64 ^{EFG}	26,10 ± 3,41 ^A	18,47 ± 2,87 ^F
16	6,57 ± 1,04 ^{BC}	40,88 ± 2,34 ^H	23,55 ± 2,32 ^{AB}	17,92 ± 1,78 ^F
17	8,41 ± 0,84 ^A	42,57 ± 3,50 ^{GH}	26,35 ± 2,02 ^A	20,05 ± 1,12 ^{EF}
18	7,66 ± 0,90 ^{AB}	46,05 ± 4,39 ^{FGH}	24,07 ± 3,16 ^{AB}	17,31 ± 1,78 ^F
19	7,60 ± 1,46 ^{AB}	44,03 ± 4,22 ^{FGH}	23,88 ± 2,66 ^{AB}	17,56 ± 2,10 ^F
20	8,22 ± 1,18 ^{AB}	47,26 ± 4,17 ^{FGH}	26,09 ± 3,44 ^A	18,41 ± 2,41 ^F

Legenda: S – Sementes. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. **Fonte:** Autorial (2019).

O conhecimento da variação morfométrica de características de frutos e sementes é útil para formação de bancos de germoplasma e para o melhoramento, pois essas informações podem ser exploradas em programas de melhoramento direcionados para geração de cultivares que produzam frutos com características que melhorem a sua comercialização (SANTOS et al., 2009; GONÇALVES et al., 2013).

4.2 Viabilidade pelo teste do tetrazólio

Os padrões de coloração observados na secção interna das amêndoas variaram de róseo, nas sementes viáveis até branco nas sementes mortas (Fig. 4). Na maioria dos casos, a coloração branca foi observada inicialmente na parte central da amêndoa, estendendo-se para a periferia. A análise de viabilidade por meio do uso do tetrazólio a 0,5% revelou que, do total de 151 sementes analisadas, 130 se mostraram viáveis, com 30,46% interpretadas como sendo altamente viáveis (classe 1) e 55,63% moderadamente viáveis (Tabela 4).

Tabela 4. Análise de viabilidade das sementes de *Bertholletia excelsa* da FLONA Tapirapé-Aquiri, Pará, Brasil através do uso do cloreto 2-3-5 trifeniltetrazólio.

Interpretação	----- O -----										Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Classe 1	2	5	2	5	7	13	2	2	4	4	46 (30,46%)
Classe 2	10	8	7	7	7	5	15	8	10	7	84 (55,63%)
Classe 3	4	2	2	4	2	2	0	3	2	2	21 (13,91%)

Legenda: O – ouriços (fruto) da *Bertholletia excelsa* da FLONA Tapirapé-Aquiri, Pará, Brasil.

Fonte: Autoral (2019).

Além do aspecto cor, também foi observada a consistência dos tecidos, constatando-se que áreas de coloração branca se apresentavam mais flácidas. Moore (1972) comenta sobre a importância de considerar associados à coloração, aspectos de turgidez e consistência dos tecidos, para determinar com precisão o estado de deterioração da semente.

As amêndoas apresentavam coloração rósea homogênea e tecidos mais túrgidos, porém não se observou coloração vermelha intensa no interior que, de acordo com Reis et al. (1979), seria um indicativo da localização do embrião. Este resultado está de acordo com o encontrado por Camargo et al. (1997) que relacionou os padrões de coloração pelo teste do tetrazólio com diferentes graus de umidade e períodos de armazenamento.

4.3 Morfotipos de fungos isolados

O isolamento e contagem dos morfotipos fúngicos dos ouriços nativos da FLONA Tapirapé-Aquiri evidenciou a presença de 21 nos ouriços, 21 nas sementes e 14 nas amêndoas, totalizando 56 morfotipos (Tabela 5 e 7). Os gêneros fúngicos *Aspergillus sp* e *Penicillium sp* foram os mais frequentes com associação aos frutos de castanha-do-Brasil e encontrados nas três regiões do fruto avaliadas. O gênero *Fusarium sp* ocorreu em menor diversidade manifestando-se apenas 1 vez na região da semente.

Pacheco et al. (2010), analisando a microbiota em amêndoas de castanha do Brasil oriunda do município de Manaus (AM) também obtiveram a predominância de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, considerando-os gêneros nativos da microflora de castanheira. Em estudos com amêndoas de catanha-do-brasil, os gêneros mais frequentemente isolados foram *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*; além de *Acremonium*, *Poecilomyces*, *Absidia*, *Thichoderma*, entre outros (CASTRILLÓN; PURCHIO, 1988; BAYMAN et al., 2002, COSTA et al., 2009; PACHECO et al., 2010).

Tabela 5. Fungos associados a frutos de castanha-do-Brasil da FLONA Tapirapé-Aquiri e a ocorrência por região do fruto avaliada.

Gênero Sugerido	Número de isolados	Região do Fruto
<i>Aspergillus sp.</i>	10	O/S/A
<i>Penicillium sp.</i>	8	O/S/A
<i>Acremonium sp.</i>	3	O/S/A
<i>Geotrichum sp.</i>	2	O/S
<i>Botrytis sp.</i>	1	O
<i>Cladosporium sp.</i>	1	O
<i>Paecilomyces sp.</i>	1	S
<i>Colletotrichum sp.</i>	2	S
<i>Fusarium sp.</i>	1	S
<i>Verticillium sp.</i>	1	S
<i>Mucor sp.</i>	1	S
Não determinado	9	O
Não determinado	5	S
Não determinado	11	A
Total isolado	56	----

Legenda: O – Ouriço, S – Semente, A – Amêndoa.

Fonte: Autoral (2019).

O solo é o principal reservatório primário de diversidade fúngica, inclusive os do gênero *Aspergillus* (SMITH, ROSS 1991). Observando a microbiota de amostras de solo provenientes de Junqueirópolis – SP, Freitas et al. (2008) constataram predominância dos gêneros *Penicillium* e *Fusarium*. Também encontraram a espécie *Aspergillus flavus* em 8% das amostras estudadas. O desenvolvimento fúngico sucede desde as fases no campo, no processo de constituição das sementes, na colheita, fases de secagem, beneficiamento, até o armazenamento até então o manuseio e transporte até o consumidor (ROSSETTO et al., 2005; SANTOS et al., 2001).

Vários estudos realizados sobre a micobiota da castanha-do-brasil evidenciaram que as espécies comumente isoladas foram *Aspergillus flavus* Link; *Aspergillus nomius* Kurtzman; *Aspergillus parasiticus* Speare; *Aspergillus niger* Tiegh; *Aspergillus tamaritii* Kita; *Aspergillus pulverulentus* (McAlpine) Thom; *Aspergillus flavo-furcatus* Bat. e H. Maia, *Penicillium glabrum* (Wehmer) Westling; *Penicillium citrinum* Thom; *Rhizopus spp.* e *Fusarium oxysporum* Schltld. (FREIRE et al., 2000; BAYMAN et al., 2000; OLSEN et al., 2008; GONÇALVES et al., 2012).

A contagem de log de unidades de colônia por grama de amostra não diferiu estatisticamente nas regiões da semente e amêndoa ($5,65 \pm 0,54$ e $5,61 \pm 1,44$), porém diferiu no ouriço ($6,45 \pm 0,42$) (Tabela 6).

Tabela 6. Contagem de log de unidades formadoras de colônia por grama de amostra (ufc/g) por região do fruto (ouriço, semente e amêndoa).

Região do fruto	Log de ufc.g ⁻¹	Desvio Padrão
Ouriço	6,448 a	0,422
Semente	5,652 b	0,545
Amêndoa	5,612 b	1,447

Legenda: As letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p < 0,05)

Fonte: Autorial (2019).

Os morfotipos fúngicos isolados por região foram registrados na Coleção de Referência de Fundos do Laboratório de Bioprodutos e Energia da Biomassa da UEPA sob os códigos LABBIM F01 a LABBIM F62 (Tabela 7) e foram descritos macroscopicamente (imagens representadas pela Figura 8 -A a O) e microscopicamente (Figuras 9 a 17).

Tabela 7. Morfotipos isolados por região do fruto de castanha-do-Brasil da FLONA Tapirapé-Aquiri.

Código do Isolado	Região do fruto	Total de morfotipos isolado
LABBIM F01; LABBIM F02; LABBIM F03; LABBIM F04; LABBIM F05; LABBIM F06; LABBIM F07; LABBIM F08; LABBIM F09; LABBIM F10; LABBIM F11; LABBIM F12; LABBIM F13; LABBIM F14; LABBIM F15; LABBIM F16; LABBIM F17; LABBIM F18; LABBIM F19; LABBIM F20; LABBIM F21	Ouriço	21
LABBIM F01; LABBIM F03; LABBIM F04; LABBIM F07; LABBIM F14; LABBIM F28; LABBIM F29; LABBIM F30; LABBIM F31; LABBIM F33; LABBIM F34; LABBIM F35; LABBIM F36; LABBIM F37; LABBIM F39; LABBIM F40; LABBIM F42; LABBIM F43; LABBIM F44; LABBIM F45; LABBIM F47	Semente	21
LABBIM F01; LABBIM F03; LABBIM F04; LABBIM F50; LABBIM F51; LABBIM F52; LABBIM F53; LABBIM F55; LABBIM F56; LABBIM F58; LABBIM F59; LABBIM F60; LABBIM F61; LABBIM F62	Amêndoa	14
Total isolado		56

Fonte: Autorial (2019).

4.4 Imagens macro e microscópica dos morfotipos fúngicos encontrados

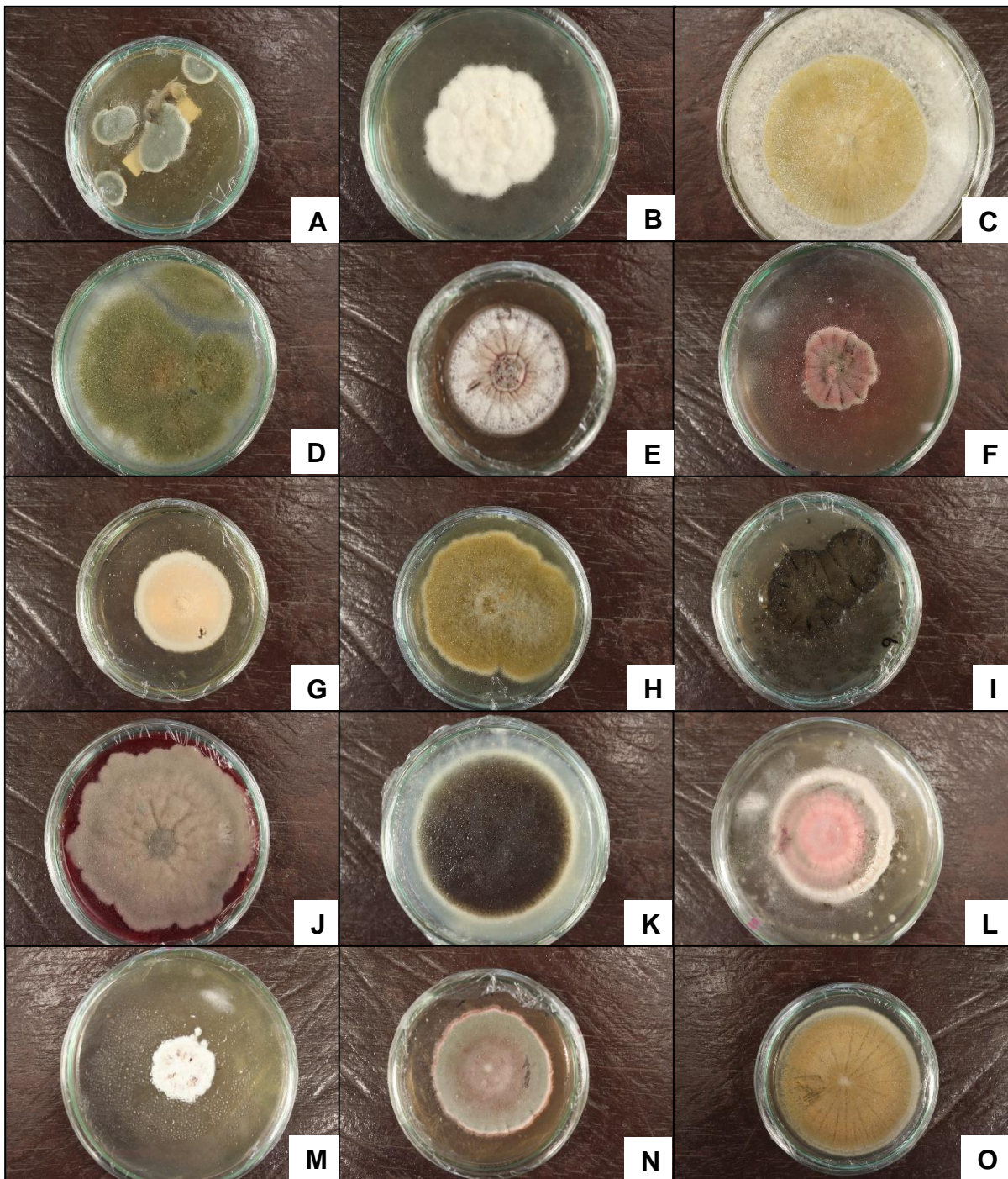


Figura 8. Fotos macroscópicas dos morfotipos fúngicos: (A) LABBIM F57 *Penicillium sp.*; (B) LABBIM F45 não determinado; (C) LABBIM F7 *Penicillium sp.*; (D) LABBIM F54 *Aspergillus sp.*; (E) LABBIM F13 não determinado; (F) LABBIM F42 *Penicillium sp.*; (G) LABBIM F14 não determinado; (H) LABBIM F26 *Aspergillus sp.*; (I) LABBIM F9 não determinado; (J) LABBIM F16 *Aspergillus sp.*; (K) LABBIM F46 não determinado; (L) LABBIM F38 não determinado; (M) LABBIM F40 *Colletotrichum sp.*; (N) LABBIM F10 não determinado; (O) LABBIM F37 *Aspergillus sp.*

Fonte: Autoral (2019).

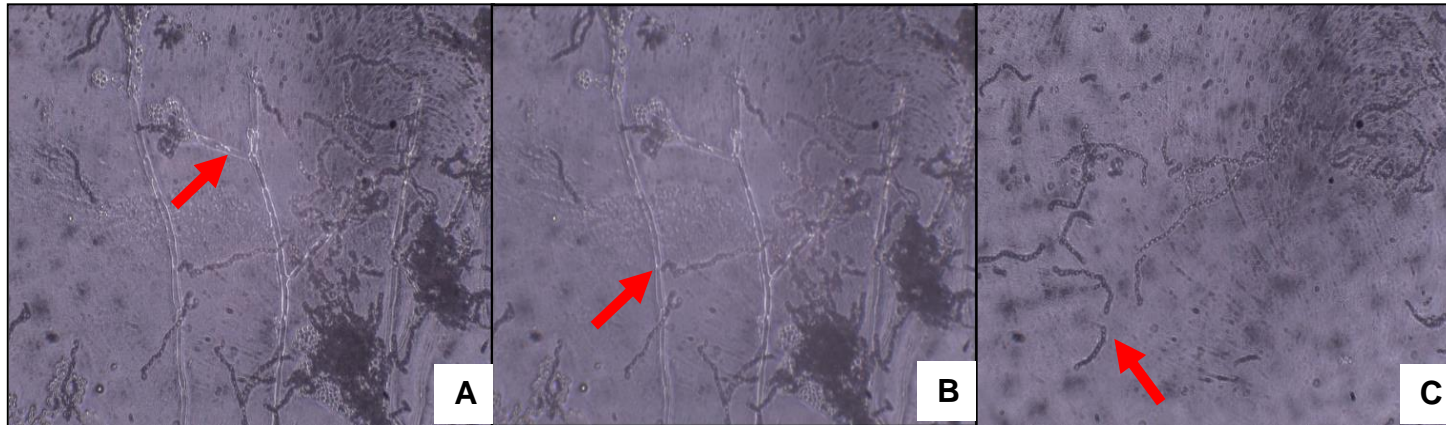


Figura 9. Código da lâmina: LABBIM F7 A- Corpo de frutificação; B- Hifas; C- Esporos. Descrição microscópica: Hifa septada longa com bifurcações, conidióforo característico de *Penicillium* sp. em 90° conídeos ovalados em correntes. Aumento de 400X.
Fonte: Autoral (2019).

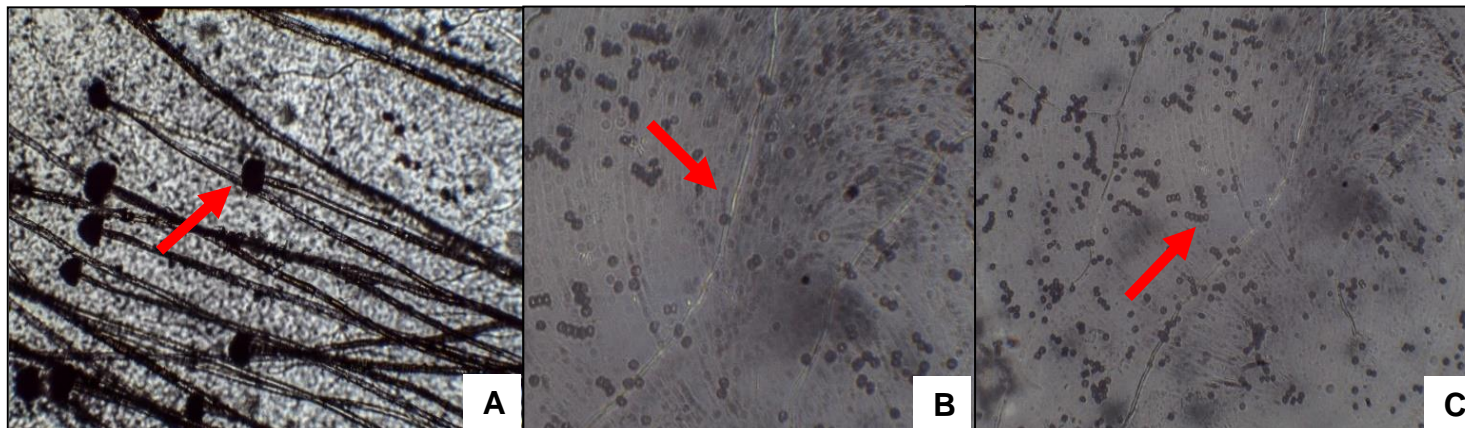


Figura 10. Código da lâmina: LABBIM F48 A- Corpo de frutificação; B- Hifas; C- Esporos. Descrição microscópica: Hifa septada, hialina, delgada, corpo de frutificação blástico, longo sem septos, diâmetro vesícula menor, conídeos esféricos demáceos verrugosos em cadeias. Sugestivo de *Aspergillus* sp. Aumento de 400X.
Fonte: Autoral (2019).

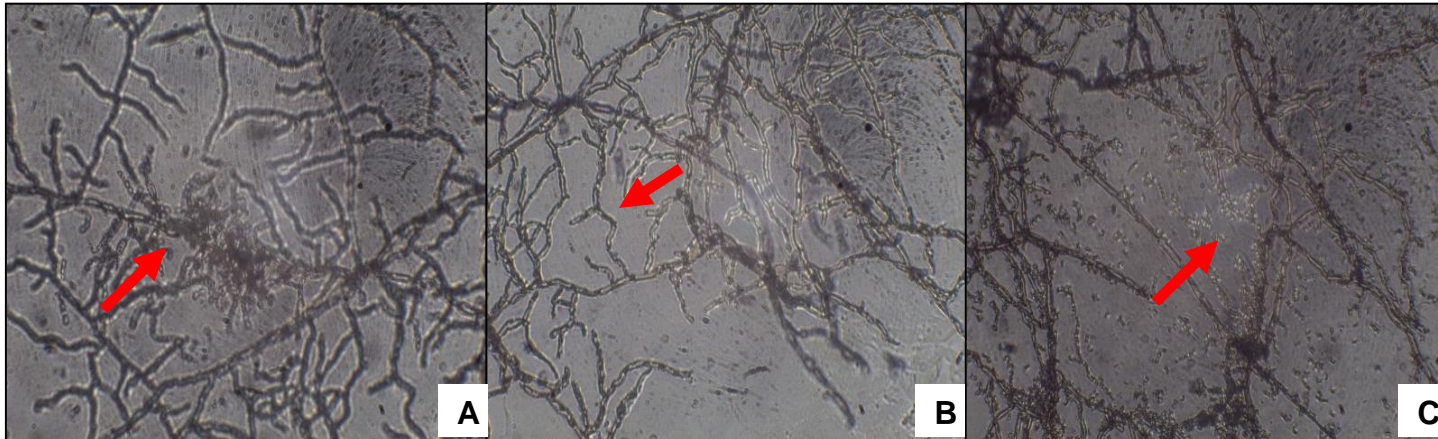


Figura 11. Código da lâmina: LABBIM F2 A- Corpo de frutificação; B- Hifas; C- Esporos. Descrição microscópica: Hifa septada, hialina, delgada, corpo de frutificação tálico, conídeo artroconídeo, forma retangular, liso em cadeias. Gênero não determinado. Aumento de 400X.

Fonte: Autoral (2019).

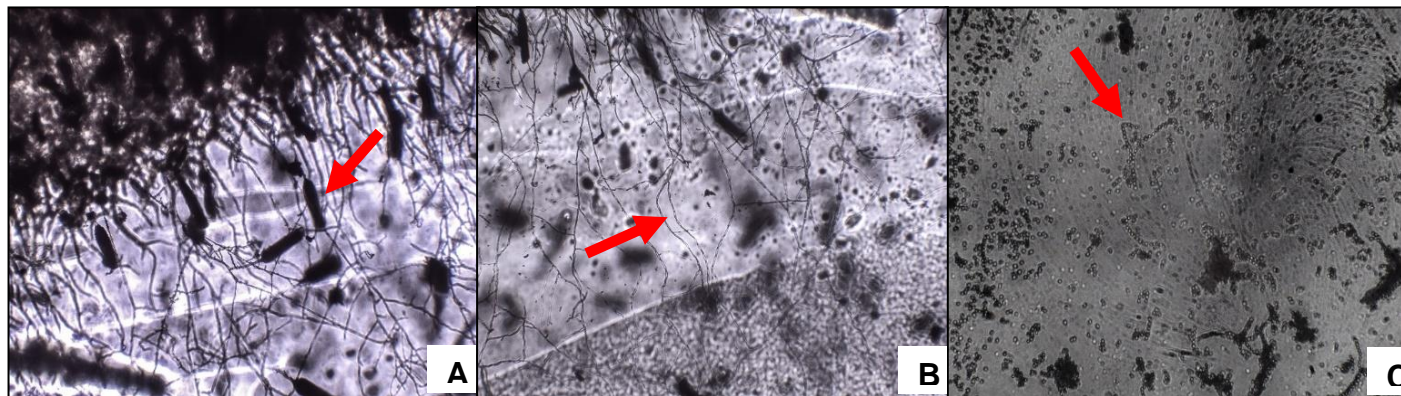


Figura 12. Código da lâmina: LABBIM F20 A- Corpo de frutificação; B- Hifas; C- Esporos. Descrição microscópica: Hifa septada, ramificação em 90° espaçada, conidiósporos em correntes, esférico. Gênero não determinado. Aumento de 400X.

Fonte: Autoral (2019).



Figura 13. Código da lâmina: LABBIM F26 A- Corpo de frutificação; B- Hifas; C- Esporos. Descrição microscópica: Hifa septada, ramificação em 90°, esporos esféricos equinulados em correntes, conidióforos com conídeos, características de *Aspergillus sp.* Aumento de 400X.

Fonte: Autoral (2019).



Figura 14. Código da lâmina: LABBIM F38 A- Corpo de frutificação; B- Hifas; C- Esporos. Descrição microscópica: Hifa septada, hialina, delgada, corpo de frutificação blástico septado, sem célula pé, esporos ligeiramente ovalados, superfície lisa, formam correntes. Gênero não determinado. Aumento de 400X.

Fonte: Autoral (2019).



Figura 15. Código da lâmina: LABBIM F43 A- Corpo de frutificação; B- Hifas; C- Esporos. Descrição microscópica: Hifa septada, hialina, delgada, esporângio curto, ausência de célula pé. Gênero não determinado. Aumento de 400X.

Fonte: Autoral (2019).



Figura 16. Código da lâmina: LABBIM F41 A- Corpo de frutificação; B- Hifas; C- Esporos. Descrição macroscópica: Hifa septada, hialina, delgada, esporângio com esporo alongado curvado, hialino, sem septos. Gênero não determinado. Aumento de 400X.

Fonte: Autoral (2019).

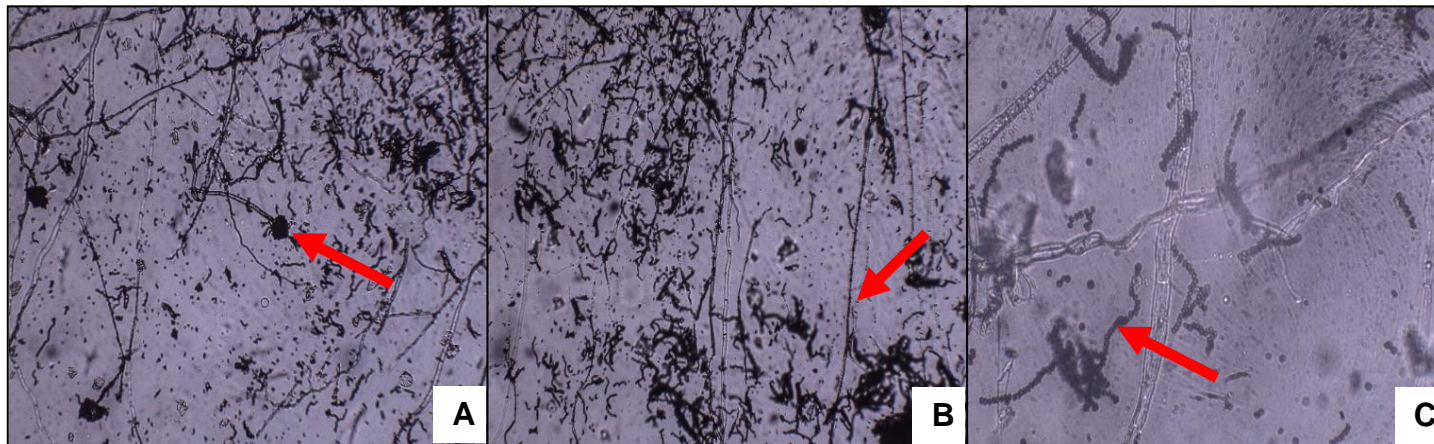


Figura 17. Código da lâmina: LABBIM F27. A - Corpo de frutificação; B – Hifas; C - Esporos. Descrição microscópica: Hifa septada, hialina, delgada, corpo de frutificação blástico, longo sem septos, diâmetro vesícula menor, conídeos esféricos demáceos verrugosos em cadeias. Sugestivo de *Aspergillus* sp. Aumento de 400X.
Fonte: Autoral (2019).

5. Discussão e Conclusões

A biometria de frutos é uma importante ferramenta utilizada para avaliar a variabilidade genética dentro de populações de uma mesma espécie, e as relações desta variabilidade com fatores ambientais, fornecendo maior conhecimento sobre aspectos ecológicos (MACEDO et al., 2009). Alguns estudos têm mostrado que espécies arbóreas tropicais possuem alta variabilidade quanto ao tamanho do fruto, número de sementes e massa dos frutos (BRAGA et al., 2007; MATOS et al., 2014; ZUFFO et al., 2014; DA ROCHA et al., 2016).

Da Rocha et al (2016), evidenciou valores médios semelhantes ao estudar a massa O + S de castanha-do-brasil da Amazônia Mato-Grossense, encontrando um valor de comprimento variando de 80 a 132 mm (média de 166,20 mm), largura de 85 a 135 mm (média de 112,60 mm). O mesmo autor, também observou grande variação na massa de fruto, sendo encontrado valores inferiores, com mínimo de 154,32 g e um valor máximo de 748,97 g (média de 425,27 g).

As amêndoas apresentaram um grau de umidade (GU) de $12,41 \pm 2,17\%$. O GU encontrado foi superior aos 6% verificado por Figueiredo e Carvalho (1994) ao avaliarem o grau de umidade de sementes de castanheira armazenadas em sacos de aniagem em Belém. Figueiredo et al. (1990) relata que há redução da capacidade germinativa das sementes de castanheira, com o decréscimo do grau de umidade.

Na periferia das amêndoas, observou-se nítida distinção de tecidos hipodérmicos com coloração rósea mais intensa, indicando maior atividade respiratória. É possível que esses tecidos sejam a causa da diferenciação das estruturas germinativas; são descritos por Vaughan (1970) como sendo um anel de tecido procambial circundado por células de parênquima e endosperma.

Estes resultados indicam que há grande potencial para o uso do teste de tetrazólio na avaliação da qualidade de sementes de castanheira; porém, novos estudos devem ser efetuados, de forma a correlacionar os padrões de coloração com a germinação e para acompanhar as modificações morfológicas, que, segundo Reis et al. (1979), resultam na diferenciação do embrião.

O teste de tetrazólio permitiu também detectar danos mecânicos externos nas amêndoas, originados no processo de retirada da testa o que reforça os relatos de Moore (1966) sobre a necessidade de aprender a reconhecer ferimentos causados pela preparação. O teste de tetrazólio é um excelente indicador de viabilidade de sementes, e

também possibilita se inferir se o dano mecânico está relacionado à perda do potencial de germinação da semente, possibilitando o planejamento de ações que diminuam perdas.

A castanha-do-brasil é um produto comercializado que apresenta baixo controle dos padrões de qualidade, os quais reduzem o valor comercial final do produto, podendo até mesmo impedir a exportação por meio de barreiras sanitárias. Na Europa, onde a amêndoa é consumida in natura, a contaminação na origem pode ser levada até o consumidor final (WADT et al., 2005).

A contaminação da castanha-do-brasil, de acordo com Eaton e Groopman (1994) é gerada por aflatoxinas, que são um grupo de metabólitos secundários produzidos por fungos das espécies *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, no qual em condições favoráveis de umidade relativa do ar e altas temperaturas, associados a sistemas de armazenagem precários costumam encontrar um ambiente favorável para se desenvolverem em maior quantidade, tornando a castanha imprópria para o consumo (MASSI et al., 2014).

Tais toxinas constituem um risco a saúde humana, devido aos seus efeitos tóxicos imediatos, imunossupressores, mutagênicos, teratogênicos e carcinogênicos (MASSI et al., 2014; HONTANAYA et al., 2015). Dentre as diversas amêndoas comercializadas no país, a castanha-do-brasil é a que apresenta a maior incidência de aflatoxinas (COSTA et al, 2009a). Pacheco e Scussel (2006) e Mello e Scussel (2010) sugerem que a contaminação possa acontecer em campo, ainda na floresta, ou durante o armazenamento dos frutos até seu processamento.

Para se produzir mudas de espécies florestais de qualidade é importante compreender as especificidades fisiológicas e técnicas adequadas ao manejo (e particular) de cada espécie desde a coleta de sementes da matriz, até o plantio. É importante o desenvolvimento de tecnologia de vise o aumento da viabilidade e minimize a contaminação e garanta o sucesso da produção de mudas.

Portanto, Nesse contexto é fundamental a realização de estudos que avaliem e identifique os fatores que afetam a qualidade fisiológica e microbiológica das sementes desta espécie, a fim de se propor soluções, que possibilitem maximizar a viabilidade e permita a produção de mudas livres de patógenos, visando contribuir com a perpetuação da espécie pelo método de reprodução via sementes, cooperando com a manutenção dos recursos naturais, e a conservação do patrimônio genético Brasileiro.

Conclusões

(a) A biometria dos frutos e sementes é importante, para fornece informações, para a conservação e exploração da espécie, permitindo-se tomar decisões para valoração e uso eficaz e sustentável desses (PFNMs).

(b) A massa e os padrões morfométricos mensurados (fruto e sementes) apresentaram valores semelhantes aos da bibliografia. Nenhuma semente apresentou o comprimento menor que a largura e espessura.

(c) Os valores de desvio padrão das características biométricas dos frutos e sementes foram relativamente altos, indicando grande variação entre as amostras, o que pode estar relacionado à variabilidade genética e/ou fatores ambientais não controlados.

(d) As amêndoas apresentaram um grau de umidade de 12,41%. A alta umidade em comparação com a bibliografia pesquisada, explica o fato das sementes serem consideradas de alta e moderada viabilidade pelo teste do tetrazólio.

(e) O teste do tetrazólio a 5 % se mostrou eficiente para análise da viabilidade das sementes. Das 151 sementes analisadas, 86,09% foram classificadas como viáveis. Também foi possível evidenciar os danos acometidos durante o processo de retirada da testa através da coloração vermelha, visando aprimoramento dessa técnica de beneficiamento.

(f) Foram isolados e identificados 56 morfotipos fúngicos, com destaque para os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, que se apresentaram como os mais frequentes com associação aos frutos de castanha-do-Brasil e encontrados nas três regiões do fruto avaliadas.

(g) Todos os morfotipos isolados foram incluídos na Coleção de Referência de Fungos do Laboratório de Bioprodutos e Energia da Biomassa da UEPA.

6. Recomendações para o manejo

A Amazônia possui enorme biodiversidade, o que permite ao homem diversas possibilidades de se produzir de forma sustentável. A *Bertholletia excelsa* Bonpl. é uma das espécies florestais que permite esse aproveitamento, mas no entanto carece de tecnologias aplicadas ao manejo de sementes.

A biometria dos frutos e sementes fornece informações, para a conservação e exploração da espécie, permitindo-se tomar decisões para valoração, conservação e uso eficaz e sustentável desses PFNMs, pois informações dimensionais são importantes para seleção de matrizes com potencial de árvores porta sementes, visando à utilização em programas de melhoramento e bancos de germoplasma.

A determinação do teor de água das sementes é de fundamental importância seja na colheita, secagem, armazenamento ou comercialização, pois influencia diretamente em vários aspectos de sua qualidade fisiológica, o que implica diretamente na produção de mudas.

A utilização de testes de viabilidade é imprescindível para avaliar a qualidade das sementes, principalmente, para a tomada de decisões quanto ao manejo de lotes durante as etapas de pós-colheita das sementes.

O desenvolvimento de métodos para a avaliação rápida da qualidade fisiológica das sementes pode auxiliar na tomada de decisão quanto ao uso ou descarte de lotes destinados à conservação e/ou produção de mudas, principalmente para espécies cujo período para germinação é demasiadamente longo, reduzindo custos e otimizando a etapa de plantio e aprimorando técnicas de beneficiamento.

A utilização de métodos para detecção de fungos em sementes de florestais, visando o controle da qualidade de sementes e mudas produzidas, é estratégica para dificultar a introdução e disseminação de patógenos, e auxiliar no desenvolvimento de formas de combate de patógenos, que acometem as sementes. Carneiro (1986), afirma que os maiores problemas ligados às doenças ocorrem durante a germinação e formação de mudas em viveiro e, geralmente, são causados por fungos.

A qualidade fisiológica e sanitária é um dos mais importantes aspectos na produção de mudas, pois os microrganismos podem causar anormalidades e lesões nas plântulas, bem como deterioração de sementes, e identificar a causa do patógeno é o primeiro passo, para desenvolvimento de protocolos de desinfestação de agentes patogênicos.

7. Agradecimentos

Ao meu orientador André Luís Macedo Vieira, pelas contribuições necessárias ao enriquecimento do projeto, como também pela dedicação e atenção no decorrer do trabalho, minha sincera gratidão.

A toda equipe da base avançada da FLONA do Tapirapé-Aquiri de Marabá e Parauapebas em especial: Glenda Rafaela de Sousa Quirino, Paloma Cristina Bezerra Campos, Vitória dos Santos Banina, Fernanda Barros Mendes.

A toda equipe do LABBIM em especial Alisson Rangel Albuquerque, Milena Pupo Raimam, Débora Pereira dos Santos.

Aos meus amigos e Bolsistas PIBIC/ICMBio Gleysla Gonçalves, Luana de Carmim e Gabriele Melo pelo apoio prestado no desenvolvimento do projeto.

A empresa Salobo Metais S.A, subsidiária da Vale S.A, pois a origem dos recursos financeiros para elaboração do projeto é proveniente de compensação ambiental, coordenada pelo ICMBio junto a FUNTEC.

Ao ICMBio e CNPq por todo o suporte estrutural e técnico para execução deste trabalho.

Ao laboratório de Bioprodutos e Energia da Biomassa da Universidade do Estado do Pará pelo suporte durante as análises morfométricas e de teor de umidade.

8. Citações e referências bibliográficas

ALMEIDA, J.J. **Os Primórdios da Exploração da Castanha-do-Pará na Amazônia (Séculos XVIII-XX)**. In: 6ª Conferência Internacional de História Econômica e VIII Encontro de Pós-Graduação em História Econômica. São Paulo: Universidade de São Paulo. 2016. p. 1-32.

ALMEIDA, S. S.; SOUSA, D. G.; DO VALE, N. C. **História natural, ecologia e técnicas de manejo em castanhais nativos do sul do Amapá**. In: KANZAKI, Luis Isamu Barros (Org.). Desenvolvimento sustentável em áreas de extrativismo da castanha-do-brasil no sul do Amapá. Belém: Banco da Amazônia, 2009. p. 11-48.

ANDRADE, R. G. D. **Classificação das castanhas do Brasil por origem e seleção de suas amêndoas utilizando visão computacional**. 88 f. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 88 p.

BARROS, A. C.; VERÍSSIMO, A. **A Expansão madeireira na Amazônia: impactos e perspectivas para o desenvolvimento sustentável no Pará**. Belém: Imazon, 2002. 166p.

BAYMAN, P.; BAKER, J. L.; MAHONEY, N. E. *Aspergillus* on tree nuts: incidence and associations. **Mycopathologia**, v. 155, n. 3, p. 161-169, 2002.

BAYMAN, P.; BAKER, J.; MAHONEY, N. *Aspergillus* on tree nuts. **Mycopathologia**, v.155, p.161-169, 2000.

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

BORGES, P. **Do valor alimentar da castanha-do-pará**. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura. Serviço de Informação Agrícola (Estudos Técnicos 39), 1967. 38 p.

BORGES, F. A.; TONINI, H.; BALDONI, A. B.; BOTELHO, S. C. C. Tamanho da amostra para estimar produção de sementes de castanheiras nativas. **Nativa**, v.4, n.3, p.166-169, 2016.

BRAGA, L. F.; SOUSA, M. P.; GILBERTI, S.; CARVALHO, M. A. C.; Caracterização morfométrica de sementes de castanha de sapucaia (*Lecythis pisonis* Cambess - Lecythydaceae). **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, v.5, n.1, p.111-116, 2007.

CAMARGO, F. F.; COSTA, R. B.; RESENDE, M. D. V.; ROA, R. A. R.; RODRIGUES, N.B.; SANTOS, L.V.; FREITAS, A.C.A. Variabilidade genética para caracteres morfométricos de matrizes de castanha-do-brasil da Amazônia Mato-Grossense. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 40, n. 4, p. 705-710, 2010.

CAMARGO, I. P.; DE CARVALHO, M. L. M.; VIEIRA, M. G. G. C. Avaliação da deterioração em sementes de castanha-do-brasil pelo teste do tetrazólio. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 32, n. 8, p. 835-839, ago. 1997

CASTRILLON, A L.; PURCHIO, A. Fungos contaminantes e produtores de aflotoxinas em Castanha-do-Pará (*Bertholletia excelsa*, Humb. e Bonpl 1808). **Acta Amazônica**, v. 18, n. 3-4, p. 173-183, 1988.

CAVALCANTE, M. C.; OLIVEIRA, F.; MAUÉS, M. M.; FREITAS, B. M. **Pollination requirements and the foraging behavior of potential pollinators of cultivated Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Bonpl.)**. Trees in Central Amazon Rainforest. *Psyche: A Journal of Entomology*, Article ID 978019, 2012.

CAVALCANTE, P. B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. 6. ed. Belém: CNPq, Museu Paraense Emílio Goeldi. 1996. 279 p. (Coleção Adolpho Ducke).

COSTA, A. K. F, FREIRE, F. D. C. O., VIEIRA, I. G. P., ANDRADE, J. A., MENDES, F.N.P. Fungos associados à castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bompl) e ao amendoim (*Arachishypogaea* L.) comercializados em Fortaleza (Ceará). **Ciênc. Agron.**, v. 40, n. 3, p. 455-60. 2009.

DA LIMA J. R.; M. D. J. **Manual de procedimentos para análise de sementes florestais**. 2010.

DA ROCHA, V. D.; ROSSI, A. A.; COCHEV, J. S. Caracterização biométrica de frutos e sementes de castanha-do-brasil na Amazonia Marogrossense. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 13, n. 24, p. 186-196, 2016.

DE CAMARGO, I. P.; DE CARVALHO, M. L. M.; VIEIRA, M. D. G. G. C. Avaliação da deterioração em sementes de castanheira-do-brasil pelo teste de tetrazólio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 32, n. 8, p. 835-839, 1997.

DOS SANTOS, J. C.; SENA, A.L.D. S.; DA ROCHA, C. I. L. **Competitividade brasileira no comércio internacional de castanha-do-brasil**. In: Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: CONGRESSO SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 48., 2010, Campo Grande, MS. Tecnologias, desenvolvimento e integração social. Campo Grande, MS: Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, 2010. SOBER., 2010.

DUMONT, E.; DE PAUW, L.; VANHAECKE, F.; CORNELIS, R. Speciation of Se in *Bertholletia excelsa* (Brazilnut): A hard nutto crack? **Food Chemistry**, v. 95, n. 4, p. 684–692, 2006.

EMBRAPA. **Manual de segurança e qualidade para altura de castanha-do-Brasil**. Informação tecnológica, campo PAS, 61 p, (qualidade e segurança dos alimentos), 2004.

EVANGELISTA, J. S.; NEVES, E. D. S.; AZEVEDO, V. R.; WADT, L. D. O. **Germinação de sementes de castanheira para produção de mudas**. In *Embrapa Acre-Artigo em anais de congresso (ALICE)*. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO

CIENTÍFICA DA EMBRAPA ACRE, 1., 2013, Rio Branco. Anais... Rio Branco: Embrapa Acre, 2013.

FIGUEIREDO, F. J. C.; CARVALHO, J. E. U. **Avaliação de características recalcitrantes de sementes de castanha-do-brasil.** Belém: Embrapa-CPATU, 1994. 17p. (Embrapa-CPATU. Boletim de Pesquisa, 154).

FIGUEIREDO, F. J. C.; CARVALHO, J. E. U.; FRAZÃO, D.A.C. **Nível crítico de umidade e seus efeitos sobre a emergência de plântulas de castanha-do-brasil.** Belém: Embrapa-CPATU, 1990 p. (Embrapa-CPATU. Boletim de Pesquisa, 113).

FREIRE, F. D. C. O.; KOZAKIEWICZ, Z.; Paternson, R. M. Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. **Mycopathologia**, Netherlands, v. 149, p.13-19, 2000.

FREITAS, S. C.; Gonçalves, E. B.; ANTONIASSI, R.; FELBERG, I. Meta-análise do teor de selênio em castanha-do-Brasil. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 11, n. 1, p. 54–62, mar. 2008.

GIORDANO, B. N. E. **Efeito do ozônio sobre a microflora e aflatoxinas durante a armazenagem de castanha-do-Brasil com casca (*Bertholletia excelsa* H.B.K).** 2009. 193 f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos), Centro de Ciências Agrária da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2009. 193 p.

GONÇALVES, J. S.; FERRACIN, L. M.; CARNEIRO VIEIRA, M. L.; IAMANAKA, B. T.; TANIWAKI, M. H.; PELEGRINELLI FUNGARO, M. H. 2012. Molecular analysis of *Aspergillus* section Flavi isolated from Brazil nuts. **World journal of microbiology & biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1817–25. 2012b.

HONTANAYA, C.; MECA, G.; LUCIANO, F. B.; MAÑES, J.; FONT, G. Inhibition of aflatoxin B1, B2, G1 and G2 production by *Aspergillus parasiticus* in nuts using yellow and oriental mustard flours. **Food Control**, v. 47, p. 154-160, 2015.

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v.167, n. 2, p:101-34, 2001.

KAINER, K.A.; MALAVASI, M.D.; DURYEA, M.L.; SILVA, E. Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) seed characteristics, preimbibition and germination. **Seed Science and Technology**, v.27, p.731-745, 1999.

LEITE, G.A. **Modelagem conceitual em biossensor para detecção de aflatoxina em castanha-do-Brasil.** 101 f. Dissertação (Mestrado em Sistemas Mecatrônicos), Faculdade de Tecnologia da Universidade de Brasília, Brasília. 2014. 101 p.

LIMA, L.M.D.S.; WADT, L.D.O.; DA SILVA, L.M.; RIGAMONTE A. V.; & MAUÉS, M. **Biologia reprodutiva de castanheira (*Bertholletia Excelsa* Bonpl) em um plantio**

no Acre. Anais do III Congresso Latino Americano de Ecologia, 10 a 13 de setembro de 2009, São Lourenço – MG.

LOCATELLI, M.; VIEIRA, A. H.; BENTES - GAMA, M. M.; FERREIRA, M. G. R.; MARTINS, E. P.; SILVA-FILHO, E. P.; SOUZA, V. F.; MACEDO, R. S. **Cultivo da castanha - do - Brasil em Rondônia**. Sistemas de Produção 7. Embrapa Rondônia, Porto Velho, 2005.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 4 ed. Nova Odessa, SP, Instituto Plantarum, v. 1. 2002. 384 p.

MASSI, F. P.; VIEIRA, M. L. C.; SARTORI, D.; PENHA, R. E. S.; MUNHOZ, C.D. F.; FERREIRA, J. M.; IAMANAKA, B. T.; TANIWAKI, M. H.; FRISVAD, J.C.; FUNGARO, M. H. P. Brazil nuts are subject to infection with B and G aflatoxin-producing fungus, *Aspergillus pseudonomius*. **International journal of food microbiology**, v.186, p.14- 21, 2014.

MAUÉS, M. M. **Reproductive phenology and pollination of the Brazil nut tree (*Bertholletia excels* Humb. &Bonpl. Lecythidaceae) in Eastern Amazonia**. IN: Kevan P & Imperatriz Fonseca VL (Eds.) – Pollinating Bees – The Conservation Link Between Agriculture and Nature – Ministry of Environmente, Brasília. p. 245-254. 2002.

MAUÉS, M. M.; KRUG, C.; WADT, L.; DRUMOND, P.; CAVALCANTE, M.; DOS SANTOS, A. C. S. **A castanheira-do-brasil: avanços no conhecimento das práticas amigáveis à polinização**. Fumbio Rio de Janeiro. 2015.

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

MELLO, F. R.; SCUSSEL, V. M. Characteristics of in shell brazil nuts and their relationship to aflatoxin contamination: criteria for sorting. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, p. 9305-9310, 2007.

MOORE, R. P. Interpretation of color differences in tetrazolium testing. **Seed Technologist News**, Louisville, v.44, n.3, p.22-24, 1972.

MOORE, R.P. Tetrazolium test for diagnosing causes for seed weariness and for predicting and understanding performance. **Proceedings of the Association of Official Seed Analysts**, Lincoln, v.56, p.70-73, 1966.

MORI, S. A. **The Brazil nut industry-past, present and future**. Sustainable harvest and marketing of rain forest products, p. 241-251, 1992.

MÜLLER, C. H., RODRIGUES, G. T.; BOLTEN, A. B. **Castanha-do-brasil:**

resultados de pesquisa. Embrapa Amazônia Oriental-Séries anteriores (INFOTECA-E), 1980.

MÜLLER, C. H. **Castanha-do-brasil: estudos agronômicos.** Embrapa Amazônia Oriental-Documentos (INFOTECA-E), 1981.

MÜLLER, C. H. **Quebra da dormência da semente e enxertia em castanha-do-brasil.** Embrapa Amazônia Oriental-Documentos (INFOTECA-E), 1982.

OLIVEIRA, A. A.; DALY, D. C. 2001. **Florestas do Rio Negro.** São Paulo: Editora Científica, Companhia das Letras.

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

PACHECO, A. M.; LUCAS, A.; PARENTE, R.; PACHECO, N. Association between aflatoxin and aflatoxigenic fungi in Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). **Ciência Tecnologia de Alimentos Campinas**, v. 30, n. 2, 330–334, 2010.

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

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

PERES, C. A.; BAIDER, C. Seed dispersal, spatial distribution and population structure of Brazil nut trees (*Bertholletia excelsa*) in southeastern Amazonia. **Journal of Tropical Ecology**, v. 13, n. 1, p: 595-616, 1997.

REIS, G.G. dos; CARVALHO, LEU.; MÜLLER, C.H. **Calibração do teste de tetrazólio para sementes de castanha-do-brasil.** Belém: Embrapa-CPATU, 1979. 9p. (Embrapa-CPATU. Comunicado Técnico, 17).

RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M. D.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCOPIO, L. C. **Flora da Reserva Ducke: Guia de Identificação das Plantas Vasculares de uma Floresta de Terra Firme na Amazônia Central.** Manaus: INPA. DFID, 1999. 816 p.

ROSSETTO, C. A. V.; SILVA, O. F.; ARAÚJO, A. E. D. S. Influência da calagem, da época de colheita e da secagem na incidência de fungos e aflatoxinas em grãos de amendoim armazenados. **Ciência Rural**, v. 35, n. 2, p. 309-315, 2005.

SANTOS C. C. M.; LOPES, M. R. V.; KASSEKI, S, Y. Ocorrência de aflatoxinas em amendoim e produtos de amendoim comercializadas na região de São José de Rio Preto/SP. **Rev. Inst. Adolfo Lutz.**, v. 60, n. 2, p. 153-157, 2001.

SANTOS, J. U. M.; BASTOS, M. N. C.; CARVALHO, A. C. M. *Bertholletia excelsa* Humboldt & Bonpland (Lecythidaceae): aspectos morfológicos do fruto, da semente e da plântula. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais**, Belém, v. 1, n. 2, p. 103-112, mai-ago. 2006.

SANTOS, F.S.; PAULA, R.C.; SABONARO, D.Z.; VALADARES, J. Biometria e qualidade fisiológica de sementes de diferentes matrizes de *Tabebuia chrysotricha* (Mart. Ex A. DC.) Standl. **Scientia Forestalis**, v. 37, n. 82, p.163-173, 2009.

SANTOS, O. V. **Estudo das potencialidades da castanha-do-Brasil: produtos e subprodutos**. 2012 f. Tese (Doutorado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutico). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 214 p.

SCOLES, Ricardo. Do Rio Madeira ao Rio Trombetas, novas evidências ecológicas e históricas da origem antrópica dos castanhais amazônicos. **Novos cadernos NAEA**, v. 14, n. 2, 2016.

SERRANO, R. O.P. **Regeneração e estrutura populacional de *Bertholletia excelsa* H.B.K. em áreas com diferentes históricos de ocupação no vale do Rio Acre (Brasil)**. 59 f. 2005. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Manejo de Recursos Florestais). Universidade Federal do Acre. Rio Branco, 2005. 59p.

SOUZA, C. R. D. **Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Humn. & Bonpl.)**. Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos (INFOTECA-E), 2008.

SOUZA, E. C. D.; AZEVEDO, V. R.; WADT, L. D. O.; CAMPOS, T. D. **Análise do sistema reprodutivo de *Bertholletia excelsa***. In: Embrapa Acre-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: CONGRESSO NORTE NORDESTE DE PESQUISA E INOVAÇÃO, 10. 2015, Rio Branco. Anais... Rio Branco: Rio Branco: Ifac; Conif, 2015.

TONINI H.; KASMINSK, P. E.; DA COSTA, P. Relação da produção de sementes de castanha-do-Brasil com características morfométricas da copa e índices de competição. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.43, n.11, p.1509-1516, nov. 2008.

VAUGUAN, J.C. **The structure and utilization of oil seeds**. London: Chapman & Hall Ltd., 1970. 279p.

VIEIRA, A. H.; BENTES-GAMA, M.M.; ROCHA, R.B.; LOCATELLI, M.; & OLIVEIRA, A. **Fenologia reprodutiva de castanha-do-Brasil, (*Bertholletia excelsa* Humb. Bompl.)**, em Porto Velho/RO. Embrapa Rondônia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 2009.

WADT, L. H. O.; KAINER, K. A.; GOMES-SILVA, D. A. P. Population structure and nut yield of a *Bertholletia excelsa* stand in Southwestern Amazonia. **Forest Ecology and Management**, v.211, n. 1, p: 371-384, 2005.

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

ZUFFO, A.M.; ANDRADE, F.R.; ZUFFO JÚNIOR, J.M.; Caracterização biométrica de frutos e sementes de baru (*Dipteryx alata* Vog.) na região leste de Mato Grosso, Brasil. **Revista de Ciências Agrárias**, v.37, n.4, p.463-471, 2014.

ZUIDEMA, P.A.; BOOT, R.G.A. Demography of the Brazil nut tree (*Bertholletia excelsa*) in the Bolivian Amazon: impact of seed extraction on recruitment and population dynamics. **Journal of Tropical Ecology**, v.18, p.1-31, 2002.