

**EDLAYNE GONÇALEZ**

**DISTRIBUIÇÃO DE FUNGOS E DE MICOTOXINAS EM AMOSTRAS  
DE AMENDOIM DO PLANTIO À COLHEITA**

**Tese apresentada ao Instituto de Ciências  
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para  
obtenção do título de Doutor em Ciências.**

**São Paulo  
2008**

**DISTRIBUIÇÃO DE FUNGOS E DE MICOTOXINAS EM AMOSTRAS  
DE AMENDOIM DO PLANTIO À COLHEITA**

**EDLAYNE GONÇALEZ**

**Tese apresentada ao Instituto de Ciências  
Biomédicas da Universidade de São Paulo,  
para obtenção do título de Doutor em  
Ciências.**

**São Paulo  
2008**

**EDLAYNE GONÇALEZ**

**DISTRIBUIÇÃO DE FUNGOS E DE MICOTOXINAS EM AMOSTRAS  
DE AMENDOIM DO PLANTIO À COLHEITA**

**Tese apresentada ao Instituto de Ciências  
Biomédicas da Universidade de São Paulo,  
para obtenção do título de Doutor em  
Ciências.**

**Área de concentração: Microbiologia**

**Orientador: Prof. Dr. Benedito Corrêa**

**São Paulo  
2008**

**Dedico este trabalho ao  
Tomaz, Rafael, Santin,  
Angelina e Edvaldo.**

## **AGRADECIMENTOS**

**Este trabalho foi realizado graças à dedicação e auxílio de várias pessoas e Instituições, por isso meu agradecimento é para todos que de alguma forma participaram de mais uma realização em minha vida, em especial ao Prof. Benedito Corrêa pela orientação e amizade.**

**Obrigada a Todos!**

**"... Criatividade e senso de colaboração  
contribuem para solucionar os problemas que  
enfretamos..."**

**Alexandre Rangel**

## RESUMO

GONÇALEZ, E. **Distribuição de fungos e de micotoxinas em amostras de amendoim do plantio à colheita.** 2008. 94 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

A elucidação dos mecanismos de contaminação por fungos toxigênicos e por micotoxinas em amendoim em condições de campo é imprescindível, especialmente para que medidas preventivas possam ser tomadas. Este fato, associado ao consumo dos grãos *in natura* e de seus subprodutos pelo homem e animais, a elevada frequência de isolamento de fungos toxigênicos, particularmente de *Aspergillus flavus*, e *Fusarium verticillioides*, no ecossistema brasileiro e, por fim, à importância e atualidade dos estudos das aflatoxinas, do ácido ciclopiazônico e das fumonisinas em nível mundial, motivaram esta pesquisa que teve como objetivos: 1. determinar a micoflora do solo, ar, sementes plantadas, flores, ginóforo e grãos e cascas de amendoim em diferentes fases de maturação e após a secagem; 2. determinar a ocorrência de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>, ácido ciclopiazônico (ACP) e fumonisinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> nas sementes plantadas, grãos e cascas de amendoim coletadas em diferentes fases de maturação e após a secagem. O estudo da micoflora dos grãos e cascas de amendoim revelou *Fusarium* spp. e *Aspergillus flavus* como os fungos mais frequentes. *A. parasiticus* foi isolado somente após a secagem dos frutos. A espécie *A. flavus* também foi encontrada em amostras do solo e do ar. Das cepas de *A. flavus* isoladas, 85,72% foram produtoras de aflatoxinas e 38,09% produziram ácido ciclopiazônico e destas, 33,33% produziram ambas as toxinas e 4,76% produziu somente ACP. Todas as cepas de *A. parasiticus* isoladas foram produtoras de aflatoxinas. Aflatoxinas e ácido ciclopiazônico foram detectados em 32% das amostras de grãos de amendoim analisadas em concentrações que variaram de 4,20 µg/kg a 198,84 µg/kg e de 260 µg/kg a 600 µg/kg, respectivamente. Estas micotoxinas foram detectadas a partir do estágio de granação dos frutos. Nas cascas dos grãos analisados, somente aflatoxinas foram detectadas em 24% das amostras e

em concentrações que variaram de 5,76 µg/kg a 218,52 µg/kg. Este é o primeiro relato, no Brasil, da co-ocorrência de aflatoxinas e ácido ciclopiazônico em amostras de amendoim, assim como o isolamento de cepas de *A. flavus* produtoras de ambas as toxinas. Fumonisininas não foram detectadas nas amostras de grãos e cascas de amendoim analisadas, apesar das duas cepas de *Fusarium verticillioides* isoladas serem produtoras da toxina. Boas práticas agrícolas, levando em conta a qualidade das sementes plantadas e a rotação de culturas é indicada para região, uma vez que o solo e as futuras sementes se encontram contaminadas com *A. flavus* e *A. parasiticus*.

**Palavras-chave:** Aflatoxinas; Ácido ciclopiazônico; Fumonisinina; Fungos.



## ABSTRACT

GONÇALEZ, E. **Fungal and mycotoxins distribution in peanut samples from sowing to harvest. 2008.** 94 f. Ph. D. thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

The elucidation of the contamination way of the toxigenic fungi and mycotoxins in peanuts of field conditions is very important, so as to develop efficient control strategies. These facts in association with the peanuts “in natura” and their products are used in human and animal and the high frequency of toxigenic fungi like *A. flavus* and *F. verticillioides* in Brazil and the importance of the mycotoxins study, motivated this work. Under these considerations, the present study aimed to: 1. Identify the mycoflora of the soil, air, flower, pegs, peanut kernels and hulls in the different maturation stages and after drying; 2. Determine the occurrence of aflatoxins B1, B2, G1 and G2, cyclopiazonic acid (CPA) and fumonisins B1 and B2 in peanut kernels and hulls in different maturation stages and after drying. The mycoflora study of the peanut kernels and hulls showed that *Fusarium* spp. *Aspergillus flavus* were the most frequent fungi isolated. *A. flavus* also isolated in soil and air samples. *A. parasiticus* was isolated in the peanut kernels only after drying. The *A. flavus* strains analyzed, 85.72% can be able to produce aflatoxins, 38.09% produced CPA too, 33.33% produced both toxins and 4.76% produced only CPA. All *A. parasiticus* strains produced aflatoxins. Aflatoxins and CPA were detected in 32% of the peanut kernel samples in concentration from 4.20 µg/kg to 198.84 µg/kg and from 260 µg/kg to 600 µg/kg, respectively. These mycotoxins were detected from pod filling stage. In the peanut hulls only aflatoxins were detected in 24% of the samples in concentration from 5.76 µg/kg to 218.52 µg/kg. This present study showed for the first time the natural co-occurrence of the aflatoxins and cyclopiazonic acid in Brazilian peanuts samples as well as the isolation of toxigenic strains of the *A. flavus* producer for the both toxins. Fumonisins were not detected in peanut kernels and hulls samples, but two toxigenic *F. verticillioides* were isolated. Good agriculture practices are indicated to

region, because the soil and the future peanut kernels are with toxigenic fungi *A. flavus* and *A. parasiticus*.

**Key words:** Aflatoxin; Cyclopiazonic acid; Fumonisin; Fungi.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fazenda Majeca. Etapas das coletas.....	52
Figura 2: Representação gráfica do total de grãos de amendoim contaminados com fungos em meio de cultura AFPA.....	55
Figura 3: Representação gráfica do total de cascas de amendoim contaminados com fungos em meio de cultura AFPA.....	55
Figura 4: Representação gráfica do total de grãos de amendoim contaminados com fungos em meio de cultura DRBC.....	57
Figura 5: Representação gráfica do total de cascas de amendoim contaminados com fungos em meio de cultura DRBC.....	57
Figura 6: Representação gráfica do total de grãos de amendoim contaminados com <i>Aspergillus flavus</i> em diferentes fases de maturação do fruto.....	58
Figura 7: Representação gráfica do total de cascas de amendoim contaminados com <i>Aspergillus flavus</i> em diferentes fases de maturação do fruto.....	58
Figura 8: Representação gráfica do total de cascas de amendoim contaminados com <i>Aspergillus parasiticus</i> em diferentes fases de maturação do fruto.....	59
Figura 9: Freqüências absoluta e relativa (%) de isolamento de fungos em amostras de solo.....	61
Figura 10: Freqüência relativa (%) de isolamento de fungos em amostras de solo nos diferentes estágios de maturação dos frutos de amendoim.....	61
Figura 11: Freqüências absoluta e relativa (%) de isolamento de fungos em amostras de ar.....	65
Figura 12: Freqüência relativa (%) de isolamento de fungos em amostras de ar nos diferentes estágios de maturação dos frutos de amendoim.....	65
Figura 13: Concentrações ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 em grãos de amendoim em diferentes estágios de maturação.....	71
Figura 14: Concentrações ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 em cascas de amendoim em diferentes estágios de maturação.....	71
Figura 15: Concentrações ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de ácido ciclopiazônico em grãos de amendoim em diferentes estágios de maturação .....	73

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Porcentagem de contaminação fúngica em amostras de sementes plantadas, flores e ginóforos.....	53
Tabela 2: Porcentagem de contaminação fúngica em amostras de frutos de amendoim, grãos e cascas, em diferentes estágios de maturação, isoladas em meio de cultura AFPA.....	54
Tabela 3: Porcentagem de contaminação fúngica em amostras de frutos de amendoim, grãos e cascas, em diferentes estágios de maturação, isoladas em meio de cultura DRBC.....	56
Tabela 4: Freqüências absoluta e relativa (%) de isolamentos de fungos em amostras de solo.....	60
Tabela 5: Freqüências absoluta e relativa (%) de isolamentos de fungos em amostras de solo por coleta.....	60
Tabela 6: Unidades formadoras de colônias por grama de solo (UFC/g) dos fungos isolados em diferentes estágios de maturação dos frutos de amendoim.....	62
Tabela 7: Freqüências absoluta e relativa (%) de isolamentos de fungos em amostras de ar.....	63
Tabela 8: Freqüências absoluta e relativa (%) de isolamentos de fungos em amostras de ar por coleta.....	64
Tabela 9: Valores de temperatura, pH e umidade do solo nos diferentes estágios de maturação do amendoim.....	66
Tabela 10: Regime térmico local (°C) registrado no período de novembro/2004 a março/2005.....	67
Tabela 11: Regime pluviométrico local (mm) registrado no período de novembro de 2004 a março de 2005.....	68
Tabela 12: Incidência de aflatoxinas B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> e G <sub>2</sub> (µg/kg) em amostras de grãos de amendoim em diferentes estágios de maturação.....	69
Tabela 13: Incidência de aflatoxinas B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> e G <sub>2</sub> (µg/kg) em amostras de cascas de amendoim em diferentes estágios de maturação.....	70
Tabela 14: Incidência de ácido ciclopiazônico (µg/kg) em amostras de grãos de amendoim em diferentes estágios de maturação.....	72

Tabela 15: Concentração de aflatoxinas B1 e B2 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) e ácido ciclopiazônico ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de cepas de *A. flavus* isoladas de amostras de sementes plantadas, solo, ar, grãos e cascas de amendoim..... 74

Tabela 16: Concentração de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de cepas de *A. parasiticus* isoladas de amostras de sementes plantadas, solo, ar, grãos e cascas de amendoim..... 75

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>1.1 Aflatoxina</b> .....	20
<b>1.2 Ácido Ciclopiazônico</b> .....	22
<b>1.3 Fumonisinias</b> .....	24
<b>1.4 Amendoim</b> .....	26
<b>2 PROPOSIÇÃO E OBJETIVOS</b> .....	29
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	31
<b>3.1 Local do experimento e plantio</b> .....	31
<b>3.2 Amostragem do amendoim, flores e ginóforo</b> .....	32
<b>3.3 Amostragem do solo</b> .....	32
<b>3.4 Determinação da atividade de água</b> .....	32
<b>3.5 Determinação da temperatura, pH e umidade do solo</b> .....	32
<b>3.6 Avaliação climatológica da região</b> .....	33
<b>3.7 Análise da microbiota fúngica</b> .....	33
<b>3.7.1 Meios de cultura</b> .....	33
<b>3.7.2 Isolamento, contagem e identificação da microbiota fúngica da semente, flores, ginóforo e frutos de amendoim</b> .....	33
<b>3.7.3 Isolamento, contagem e identificação da microbiota fúngica das amostras de solo</b> .....	34
<b>3.7.4 Pesquisa de fungos do ar</b> .....	34
<b>3.8 Determinação de micotoxinas</b> .....	35
<b>3.8.1 Equipamento</b> .....	35
<b>3.8.2 Aflatoxinas</b> .....	35
<b>3.8.2.1 Grãos de amendoim</b> .....	35
<b>3.8.2.2 Cascas do amendoim</b> .....	36
<b>3.8.2.3 Quantificação de aflatoxinas por CLAE</b> .....	36
<b>3.8.2.4 Confirmação da presença de aflatoxinas</b> .....	37
<b>3.8.2.5 Teste de recuperação de aflatoxinas</b> .....	37
<b>3.8.3 Fumonisinias</b> .....	37
<b>3.8.3.1 Grãos de amendoim</b> .....	37
<b>3.8.3.2 Cascas do amendoim</b> .....	38

3.8.3.3	Quantificação de fumonisinas por CLAE .....	38
3.8.3.4	Teste de recuperação de fumonisinas .....	39
3.8.4	Ácido ciclopiazônico .....	39
3.8.4.1	Grãos de amendoim .....	39
3.8.4.2	Cascas do amendoim .....	40
3.8.4.3	Quantificação de ácido ciclopiazônico por CLAE .....	40
3.8.4.4	Teste de recuperação de ácido ciclopiazônico .....	41
3.9	Avaliação do potencial toxigênico para aflatoxinas .....	41
3.10	Avaliação do potencial toxigênico para ácido ciclopiazônico .....	42
3.11	Avaliação do potencial toxigênico para fumonisinas .....	42
3.12	Análise estatística .....	43
4	RESULTADOS .....	44
4.1	Determinação da microbiota fúngica do amendoim .....	44
4.2	Determinação da microbiota fúngica do solo .....	45
4.3	Determinação da microbiota fúngica do ar .....	45
4.4	Determinação da microbiota fúngica das flores e ginóforo .....	46
4.5	Determinação da temperatura, pH e umidade do solo .....	46
4.6	Avaliação do clima da região .....	46
4.7	Atividade de água .....	46
4.8	Análise micotoxicológica .....	47
4.8.1	Análise de aflatoxinas nas amostras de grãos e cascas de amendoim .....	47
4.8.2	Análise de fumonisinas nas amostras de grãos e cascas de amendoim .....	48
4.8.3	Análise de ácido ciclopiazônico nas amostras de grãos e cascas de amendoim .....	48
4.9	Avaliação do potencial toxigênico das cepas de <i>A. flavus</i> e <i>A. parasiticus</i> .....	49
4.10	Avaliação do potencial toxigênico das cepas de <i>F. verticillioides</i> ....	50
6	DISCUSSÃO .....	76
7	CONCLUSÕES .....	83
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	84

## 1 INTRODUÇÃO

Por centenas de anos têm-se observado as diferentes alterações que ocorrem no sabor e na qualidade dos alimentos devido ao crescimento de fungos (SCUSSEL, 1998).

Grãos de cereais são expostos, no campo, a uma ampla variedade de organismos, proveniente da poeira, água, plantas doentes, insetos, solo, fertilizante e material orgânico proveniente de animais de animais. Entretanto, o número e os tipos de microrganismos encontrados nos grãos vão depender da resistência dos mesmos, bem como do tipo de solo, insetos, roedores e especialmente das condições climáticas durante e imediatamente após a colheita (SILLKER e ELLIOT, 1980).

Os fungos podem causar uma série de danos aos grãos durante o plantio e a colheita, bem como durante o armazenamento (SILLKER e ELLIOT, 1980). Os impactos econômicos da invasão fúngica incluem a diminuição do poder de germinação, emboloramento visível, descoloração, odor desagradável, perda de matéria seca, aquecimento, cozimento, mudanças químicas e nutricionais com conseqüente perda da qualidade, produção de micotoxinas, tornando-os impróprios para o consumo (PASTER e BULLERMAN, 1988). *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* são os principais gêneros de fungos que produzem micotoxinas em alimentos (SIAME et al., 1998).

Micotoxinas são substâncias tóxicas produzidas pelo metabolismo secundário de várias espécies de fungos filamentosos que contaminam alimentos no campo, no armazenamento ou após a manufatura (MOSS, 1996). As micotoxinas são bastante diversas na origem, estrutura química, propriedades toxicológicas e no modo de ação (NORRED e RILEY, 2001), mas foi a partir de 1960, durante um surto de mortes de aves no Reino Unido, onde mais de 100.000 perus e milhares de patos morreram de forma inexplicável, após a ingestão de farelo de amendoim contaminado, que a atenção as micotoxinas ganhou importância definitiva. Este surto ficou conhecido como “Turkey X Disease” (De IONGH et al., 1962).



Atualmente, cerca de 500 micotoxinas foram isoladas, contudo, as toxinas mais estudadas, que comprovadamente têm propriedades tóxicas acentuadas e estão largamente distribuídas nos alimentos são: toxinas do ergot, aflatoxinas, estrigmatocistina, ocratoxinas, zearalenona, tricotecenos, fumonisinas, patulina, rubratoxinas, esporodesminas e ácido ciclopiazônico (SCUSSEL, 1998). Essas toxinas afetam a saúde pública e a agroeconomia, sendo responsáveis por perdas de milhões de dólares/ano no mundo todo em saúde humana, saúde animal e em produtos agrícolas condenados (HUSSEIN e BRASEL, 2001).

### **1.1 Aflatoxinas**

Muitas décadas depois da “doença do trevo doce” (sweet clover disease), outro caso descrito como “Turkey X Disease” foi descoberta em 1960 na Inglaterra como resultado da morte de milhares de perus em granjas avícolas. Após a ingestão de torta de amendoim brasileira pelos animais, um agente tóxico induziu a lesão no fígado levando à morte. Outra indicação de intoxicação foi a morte de patinhos alimentados com torta de amendoim vindas da Uganda e Tanzânia, que apresentavam lesões de fígado similares as produzidas pelo amendoim brasileiro (BABABUNMI, 1978).

Muitos produtos agrícolas são contaminados por aflatoxinas, entre eles temos os cereais, semente de algodão, amendoim, legumes, frutas, leites e seus derivados, entre outros (SHARMA e SALUNKHE, 1991).

Um dos principais gêneros de fungos implicados nos casos de intoxicação por micotoxinas (micotoxicoses) é o *Aspergillus* (OGA, 1996), à qual as espécies *A. flavus* e *A. parasiticus*, produtoras das aflatoxinas, são de grande importância na agricultura, sendo conhecidas por contaminar várias culturas, tanto na pré como pós-colheita (STEINHART, 1996).

Aflatoxinas são metabólitos extremamente tóxicos para humanos e animais. Sua estrutura policíclica deriva de um núcleo cumarínico (OGA, 1996), ligado a um sistema reativo bifurânico de um lado, e do outro a uma pentanona (característica

da série B) ou uma lactona de seis membros (característica da série G). Foram isolados 17 compostos denominados aflatoxinas, porém, apenas 4 são bem conhecidos e estudados do ponto de vista toxicológico (SHARMA ; SALUNKE, 1991). Esses 4 compostos são designados por B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>, conforme a fluorescência azul ou verde que emitem quando expostos à luz ultra violeta (HARTLEY et al., 1963; NESBITT, 1962).

A aflatoxina B<sub>1</sub> representa a mais tóxica das aflatoxinas e quase todas as informações sobre a bioatividade das aflatoxinas em animais focam esta toxina (COULOMBE, 1991).

As aflatoxinas individualmente ou em mistura induzem toxicidade aguda e crônica em animais, agindo também como carcinogênicas, mutogênicas, teratogênicas e supressoras do sistema imune (NEWBERNE e BUTLER, 1969; BILGRAMI e SINHA 1992; YOSHIZAWA, 1997). Estes efeitos dependem primariamente do sistema testado, dose e frequência de exposição. A sensibilidade às aflatoxinas variam com a espécie, idade e sexo do animal bem como com a composição da dieta e a rota da ingestão e o estado nutricional do animal (BILGRAMI e SINHA, 1992; BULLERMAN, 1979; YOSHIZAWA, 1997).

Todas as aflatoxinas possuem efeito carcinogênico (LEGATOR, 1966), sendo que a aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) é especialmente relacionada a hepatocarcinogênese (BENNET e FRENHOLZ, 1978). A AFB<sub>1</sub> é considerada uma das substâncias mais carcinogênicas conhecidas, sendo também a mais comumente encontrada nos alimentos contaminados por aflatoxinas (SHARMA e SALUNKE, 1991; ZEINGUE et al., 1993).

A ingestão de aflatoxinas pode levar a um quadro de intoxicação aguda ou crônica, dependendo da concentração ingerida. Seus efeitos toxicológicos somente ocorrem após a ativação metabólica de suas moléculas pelas enzimas hepáticas (HUSSEIN e BRASEL, 2001).

Os sinais clínicos da aflatoxicose em muitas espécies animais incluem falta de

apetite, perda de peso, anormalidades neurológicas, icterícia da membrana mucosa, diarreia sanguinolenta, convulsões e morte. Os danos no fígado são evidentes, apresentando palidez ou descoloração com necrose, aumento de tamanho e acúmulo de gordura. Há também acúmulo de fluídos na cavidade do corpo e hemorragia nos rins e trato intestinal. Exposição crônica sub-letal resulta em icterícia na carcaça e cirrose com proliferação do ducto biliar e fibroses. Exposições prolongadas de baixos níveis resultam em tumores no fígado em várias espécies, sendo a truta a mais sensível (BULLERMAN, 1979; SMITH e HENDERSON, 1991; BILGRAMI e SINHA, 1992).

A ação tóxica e carcinogênica da AFB<sub>1</sub> está relacionada com sua conversão em um ou mais metabólitos em vários tecidos do animal exposto. A maior parte da conversão metabólica da AFB<sub>1</sub> é catalizada pela citocromo P450 presente no fígado e em outros tecidos; esta conversão pode também ocorrer via reações de cooxidação pela prostaglandina H sintetase (COULOMBE, 1991). Ligações extra DNA são formadas quando a AFB<sub>1</sub> se liga a resíduos de guanina de seqüências alternadas G-C da DNA. Isto pode levar a mutações com alteração de estrutura causadas pela interação da AFB<sub>1</sub> ativada, podendo gerar transversões G:C para A:T (YU et al.,1990; COULOMBE, 1991; BILGRAMI e SINHA, 1992). A forma ativada da AFB<sub>1</sub> induz a expressão de vírus e a formação de tumor associado com oncogenes em rãs (BILGRAMI e SINHA, 1992).

Desde a descoberta das aflatoxina, muitos países estabeleceram regulamentos para proteger o consumo de alimentos pelo homem e animais (YAMAMOTO, 1997). No Brasil o limite máximo permitido de aflatoxinas em alimentos é 20 ppb (BRASIL, 1996).

## **1.2 Ácido Ciclopiazônico**

O ácido ciclopiazônico (ACP) é um ácido tetrâmico indólico, isolado pela primeira vez de culturas de *Penicillium cyclopium*, é um conhecido metabólito secundário produzido por várias espécies de *Penicillium* e *Aspergillus* (HAYASHI e

YOSHIZAWA, 2005), incluindo o *Aspergillus flavus*, sendo que algumas cepas são capazes de produzir tanto ACP como aflatoxinas (URANO et al., 1992).

Amendoim, milho, semente de algodão são freqüentemente invadidos antes da colheita por *A. flavus*, produtor de aflatoxinas e ACP (PILDAIN et al., 2004). Estas toxinas podem ocorrer naturalmente em outros produtos, tais como arroz, queijo, ovos, ração, etc. (NORRED, 1987; STEINHART et al., 1996; HAYASHI e YOSHIZAWA, 2005), sendo, muitas vezes, co-contaminantes (LISKER et al., 1993). No Brasil há relatos de ACP em produtos derivados de tomates e em leite comercial, coletados no Estado de São Paulo (MOTTA e SOARES, 2000 e 2001; OLIVEIRA et al., 2006).

Dois fungos produtores de ACP, *Penicillium camemberti* e *Aspergillus oryzae*, são de grande importância para produção industrial de produtos fermentados (GOTO et al., 1987). Os achados de ACP em amendoim e milho indicam que a extensão do potencial de exposição do homem e animais a esta toxina é maior do que se acreditava (NORRED, 1987), sendo que o ACP pode ter contribuído com as aflatoxinas, para a “Turkey X Disease” (VAAMONDE et al., 2003).

Ácido ciclopiazônico é um metabólito tóxico para várias espécies, como aves, suínos, cachorros, ratos (HAYASHI e YOSHIZAWA, 2005), sendo que os sinais clínicos da intoxicação incluem: inatividade, diarreia, anorexia, tremor, incoordenação muscular, alteração na função cardíaca, podendo levar a morte (DALVI, 1991; NORRED e RILEY, 2000). O ACP produz mudanças degenerativas e necrose no fígado, baço, rins, pâncreas, glândulas salivares e músculos. Seus efeitos no retículo endoplasmático de células hepáticas e em células HeLa, sugerem uma inibição na síntese protéica e inibição da absorção de cálcio e cálcio-dependente da atividade de ATPase do retículo endoplasmático (DALVI, 1991). Sua atividade mutagênica foi verificada em *Salmonella typhimurium* TA 98 pelo teste de AMES (URANO et al., 1992). Na Argentina, algumas doenças de etiologia desconhecida foram observadas em galinhas e poderiam estar relacionadas com a presença de ACP em amendoim utilizado na ração destas aves, pois cepas de *A. flavus* produtoras de ACP são freqüentemente isoladas em

amostras de amendoim (VAAMONDE et al., 2006). Ainda em galinhas, o ACP possui um efeito imunossupressor (KMALAVENKATESH et al., 2005).

No homem, a “Doença de Kodua”, foi associada com o consumo de milho (*Paspalum scrobiculatum*) contaminado com ACP em certas regiões da Índia (RAO e HUSAIN, 1985).

Diferentes métodos analíticos são utilizados para detecção e quantificação de ACP em alimentos, tais como, imunoensaios, eletroforese capilar e cromatografia (LANDSEN, 1984; HAYASHI e YOSHIZAWA, 2005), sendo que a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é considerada a mais sensível (HAYASHI e YOSHIZAWA, 2005).

No Brasil, não há legislação sobre o limite máximo permitido para ácido ciclopiazônico em alimentos.

### **1.3 Fumonisinas**

As fumonisinas são micotoxinas solúveis em água, produzidas por várias espécies de *Fusarium*, mas principalmente pelo *Fusarium verticillioides* Sheldon e *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg (NORRED e RILEY, 2001).

*F. verticillioides* está distribuído pelo mundo em uma variedade de hospedeiros, mas é encontrado principalmente contaminando o milho, aparentemente por uma relação entre o milho e o fungo (NORRED e RILEY, 2001). As principais fumonisinas detectadas em culturas do fungo e em milho são as Fumonisinas B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>), B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>) e B<sub>3</sub> (FB<sub>3</sub>) (ORSI et al., 2000). A FB<sub>1</sub> é sempre a mais abundante, representando cerca de 70% da concentração total das fumonisinas em alimentos ou em produtos alimentícios naturalmente contaminados, seguidos pela FB<sub>2</sub> e FB<sub>3</sub> (MAGNOLI, 1999).

As fumonisinas são os agentes causadores da leucoencefalomalácia em eqüinos (ROSS et al., 1991), do edema pulmonar em suínos (DIAZ e BOERMANS, 1994), câncer hepático em roedores (GELDERBLOM et al., 1992), alterações em

macrófagos de galinhas (CHATTERJEE e MUKHERJEE, 1995), hepatotoxicidade em cavalos, porcos, ratos, macacos, citotoxicidade em culturas de células de mamíferos, além de fitotoxicidade em várias plantas (MARASAS, 1995). O consumo humano de milho contaminado com fumonisinas tem sido correlacionado com a incidência de câncer de esôfago em algumas regiões da África e China (DIAZ e BOERMANS, 1994). A FB<sub>1</sub> tem sido considerada a principal causadora dos efeitos tóxicos, foi classificada pela International Agency for Research on Câncer (IARC) como carcinógena B2 (IARC, 1993), sendo a propriedade carcinogênica também atribuída a FB<sub>2</sub> e a FB<sub>3</sub> (GELDERBLOM et al., 1992).

O primeiro efeito bioquímico da exposição à FB<sub>1</sub>, é a inibição da ceramida sintase, o que leva a interrupção do metabolismo dos esfingolípídios, com isso o aumento de esfingosina e esfinganina (JOHNSON e SHARMA, 2001). Tão logo a cultura de células ou animais sejam expostos a fumonisina ocorre inibição da biossíntese de novo esfinganina; aumento drástico de base esfingóide e esfinganina livre nos tecidos, plasma e/ou urina. A concentração de esfingosina livres também aumenta e a concentração de esfingolípídios complexados diminui, e os produtos de degradação da base esfingóide e outros produtos lipídicos também aumentam (WANG, 1991; RILEY, 1994, 1996). A determinação da relação esfingosina/esfinganina no plasma e tecidos é um indicativo da exposição as fumonisinas (REDDY et al., 1996).

Em neurônios da região do hipocampo, a inibição da biossíntese dos esfingolípídios foi relacionada com a diminuição do crescimento do axônio, tal efeito se mostrou reversível com adição de ceramida (RILEY et al., 1996).

Os esfingolípídios são importantes mensageiros moleculares no sistema imune (JOHNSON e SHARMA, 2001) e fundamentais para integridade da membrana celular e para comunicação intracelular (DIAZ e BOERMANS, 1994; HENRY e WYATT, 2001), pois estes são formadores da bicamada de lipídios os quais, se prejudicadas poderiam resultar no aumento da permeabilidade e ruptura celular (HENRY e WYATT, 2001). Estão também envolvidos na regulação de receptores na superfície celular, na bomba de íons e outros sistemas vitais para função e

sobrevivência celular (WEIBKING et al., 1993). A interferência das fumonisinas pode ter impacto nestes processos e os efeitos variam dependendo do tipo de célula atingida. (RILEY, 1996; TOLLESON et al., 1999).

No Brasil, não legislação sobre o limite máximo permitido para fumonisinas em alimentos.

#### **1.4 AMENDOIM**

O amendoim é uma planta originária da América do Sul, provavelmente da região do Gran Chaco, incluindo os vales do Rio Paraná e Paraguai. ([www.agrobyte.com.br/amendoim.htm](http://www.agrobyte.com.br/amendoim.htm)). Considerado como apreciável fonte de matéria graxa, o amendoim é tido como uma das principais oleaginosas em larga escala mundial, onde a variabilidade espacial e temporal da precipitação pluvial é muito alta, principalmente na África, EUA, Indonésia, Brasil, entre outros (ARAÚJO et al., 1997; SANTOS et al., 1997). No Brasil, 88,6% da produção de amendoim realiza-se na região sudeste, sendo que destes, 83,2% no Estado de São Paulo, 8,3% é produzido na região sul e 2,9% na região nordeste (FAGUNDES, 2002). A safra 2005/06 ultrapassou 400 mil toneladas (MARTINS, 2006a) e o saldo da balança comercial paulista para grãos e produtos de amendoim foi de US\$ 54,4 milhões em 2005 (MARTINS, 2006b). Já a safra 2006/2007, quando comparada a de 2005/2006, houve uma redução de 23% na produção e de 12% na área plantada (MARTINS, 2007).

Sua diversidade na forma de consumo faz com que esta cultura tenha grande expressividade econômica. Os grãos são consumidos “in natura” ou processados industrialmente, dando origem a alguns derivados, como óleo e farelo, ou ainda na fabricação de produtos alimentícios, no ramo das conservas, confeitarias e enlatados (SANTOS et al., 1997). Já suas cascas são utilizadas, tanto no Brasil como em outros países como cama de frango, cama para gado leiteiro confinado, como fonte de fibras para ruminantes e sua farinha é utilizada como fonte de fibras de baixa caloria em vários produtos alimentícios para o homem (COLLINS e POST, 1981; LIEN et al., 1998; HILL, 2002).

Muitos produtos agrícolas são invadidos por fungos antes, durante e após a colheita, na secagem, transporte e/ou estocagem. Em geral, amendoim, milho, sementes de algodão estão entre os grãos com maior risco de contaminação (ISMAIL, 2000).

No Brasil a contaminação de amendoins por aflatoxinas é um grande problema, isto devido a fatores ambientais que favorecem o crescimento de fungos e a produção da toxina (CALORI-DOMINGUES e FONSECA, 1995).

Vários estudos foram conduzidos para identificação da microbiota fúngica e micotoxinas no amendoim durante a estocagem e em condições de campo experimentais, sendo que os principais gêneros encontrados foram: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* e entre as micotoxinas as aflatoxinas e ácido ciclopiazônico (HILL et al., 1983; SANDERS et al., 1984; COLE et al., 1986; EL-MAGHRAGY e EL-MARAGHRY, 1987, 1988; LISKER et al., 1993; HORN et al., 1994, 1995; ANDERSON et al., 1996; SIAME et al., 1998; HORN et al., 2000; ISMAIL, 2000; BHATTACHARYA e RAHA, 2002; VAAMONDE et al., 2003; MPHANE et al., 2004; PILDAIN et al., 2004; OFFIAH e ADESIYUN, 2007; NAKAI, et al., 2008).

A ocorrência das aflatoxinas é maior no amendoim porque é o produto preferido pelo fungo e, também, porque muitas vezes há demora e chuvas no período de secagem após o arranquio (FONSECA, 2004a).

Na hora do arranquio o amendoim contém cerca de 40% de umidade ou mais. A partir deste momento ele começa a perder umidade numa velocidade que depende do clima (sol, chuvas, dias nublados etc.) e da maneira com a planta for disposta no chão para secar: se deitada ou embandeirada (com as vagens para cima). Enquanto a umidade estiver acima de 20-22% a atividade metabólica da vagem oferece resistência à penetração do fungo e o risco de contaminação é muito pequeno. Abaixo de 11% (no amendoim em casca) não há umidade suficiente para os fungos crescerem e também não há perigo de contaminação. Nem sempre a secagem rápida do amendoim pode ser conseguida porque, na hora da colheita da safra de maior volume, que é a chamada "das águas", e que



ocorre nos meses de janeiro/fevereiro, às vezes chove muitos dias em seguida ou faz dias nublados, impedindo uma secagem rápida (FONSECA, 2004b).

O amendoim é freqüentemente invadido antes da colheita pelo *A. flavus* e *A. parasiticus* (HORN et al., 2000). O solo é um reservatório primário destes fungos e, sendo o amendoim um fruto subterrâneo, suas vagens estão diretamente expostas a contaminação (HORN et al., 1994; HORN et al., 2000). Entretanto, o amendoim pode, também, ser contaminado por *A. flavus* e *A. parasiticus* durante a floração. Isto foi demonstrado em laboratório, através da inoculação de *A. flavus* nas flores do amendoim, sendo que suas hifas alcançaram o topo do ovário. Esta pode ser uma importante via de contaminação natural (COLE et al., 1986).

A determinação das vias de contaminação, por fungos toxigênicos e por micotoxinas, da cultura do amendoim em condições de campo é de grande importância devido ao consumo deste e de seus subprodutos pelo homem e animais.

## 2 PROPOSIÇÃO E OBJETIVOS

Os avanços na área da tecnologia agrícola permitiram um aumento da produção mundial de alimentos. Entretanto, determinados fatores climáticos e biológicos têm limitado as capacidades agrícolas de alguns países, afetando direta ou indiretamente os produtos durante o plantio, a colheita e o armazenamento. Em termos de produção, a qualidade do amendoim depende muito de sua variedade e práticas culturais. Sabemos que todos os grãos são expostos, tanto no campo quanto no armazenamento, à ação de fatores físicos, químicos e biológicos, que interagem entre si favorecendo os processos de deterioração, que podem acarretar perdas substanciais na economia e alto risco à saúde humana e animal. A manutenção adequada das culturas durante o plantio, bem como dos grãos durante o período de entressafra, permite a conservação das características organolépticas e nutricionais, preservando assim a qualidade do produto. Sendo o amendoim uma cultura de grande significado econômico, é imprescindível a elucidação dos mecanismos de contaminação por fungos toxigênicos e por micotoxinas em condições de campo, especialmente antes da colheita, para que medidas preventivas possam ser tomadas, amenizando-se, com isso, as perdas econômicas. Estes fatos, associados à importância do amendoim na alimentação humana e animal, a elevada frequência de isolamento de fungos toxigênicos, particularmente de *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides*, no ecossistema brasileiro e à importância e atualidade do estudo das aflatoxinas, do ácido ciclopiazônico e das fumonisinas em nível mundial, motivaram esta pesquisa que tem como objetivos:

1. Identificar o perfil da microbiota fúngica das flores, do ginóforo, das cascas e dos grãos do amendoim, do solo e do ar atmosférico, da semeadura até a colheita;
2. Monitorar, nas várias etapas, a contaminação do amendoim por micotoxinas (aflatoxinas, ácido ciclopiazônico e fumonisinas), identificando o momento da cultura em que ela ocorre.

3. Verificar a potencialidade toxigênica das cepas de *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *Fusarium verticillioides* quanto à produção de micotoxinas (aflatoxinas, ácido ciclopiazônico e fumonisinas);
4. Determinar a atividade de água da casca e dos grãos do amendoim, das flores, do ginóforo, do fruto em diferentes fases de maturação do amendoim;
5. Analisar a atividade de água, a temperatura, umidade e o pH do solo, em diferentes fases do cultivo no campo, correlacionando estes dados com a presença de micotoxinas e com a microbiota fúngica;
6. Correlacionar os resultados dos elementos de clima atuantes na região de estudo, no período da cultura do amendoim.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Local do experimento e plantio**

O estudo foi realizado na Fazenda Majeca, Município de Junqueirópolis, interior do Estado de São Paulo, situada a 640 km da capital (latitude Sul 21,57 graus e longitude 51,47 graus). O amendoim, variedade Runner IAC 886, foi plantado no mês de dezembro de 2004, em solo classificado como arenoso. O sistema de plantio foi o convencional e a adubação empregada foi 4-30-10, a base de 330 kg por hectare. As amostras das sementes, flores, ginóforo, frutos, solo e ar foram coletadas e encaminhadas para análises da microbiota no Laboratório de Micotoxinas, do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP e para avaliação das micotoxinas no Laboratório de Produtos Naturais do Instituto Biológico.

As coletas foram realizadas nos seguintes períodos (Figura 1):

**1<sup>a</sup> Coleta (30/11/04):** Plantio: onde foram coletadas amostras de solo, ar e sementes plantadas;

**2<sup>a</sup> Coleta (20/01/05):** Floração: onde foram coletadas amostras de solo, ar e flores;

**3<sup>a</sup> Coleta (14/02/05):** Formação das Vagens: onde foram coletadas amostras de solo, ar, ginóforo, frutos recém-formados (fase de água) e frutos em início de granação;

**4<sup>a</sup> Coleta (14/03/05):** Granação dos frutos: onde foram coletados amostras de solo, ar e frutos em granação;

**5<sup>a</sup> Coleta (24/03/05):** Colheita: onde foram coletados amostras de solo, ar e frutos maduros recém-colhidos;

**6<sup>a</sup> Coleta (30/03/05):** Secagem dos Frutos: onde foram coletadas amostras de frutos secos.

Nas coletas de 1 a 5 foram medidas temperatura, umidade e pH do solo.

### **3.2 Amostragem do amendoim, flores e ginóforo**

Para amostragem foi utilizada a metodologia proposta por DELP et al. (1986). A região do plantio foi dividida em 10 parcelas uniformes de 80 m<sup>2</sup>, com 11 plantas por metro linear e espaçamento de 90 cm. Para cada coleta foram escolhidas, ao acaso, 5 parcelas e de cada uma delas foram colhidas sementes plantadas, flores, ginóforo e amendoim (fruto). Os sítios de amostragem foram casualizados e a amostragem feita em 6 coletas. Para cada um dos períodos de coleta foram colhidas 5 amostras. Cada amostra foi constituída de 500 flores (2<sup>a</sup> coleta), 500 ginóforos (3<sup>a</sup> coleta), 5 Kg de fruto (3<sup>a</sup> a 6<sup>a</sup> coletas).

### **3.3 Amostragem do solo**

Para amostragem do solo foi utilizado o procedimento mencionado anteriormente no item 2.2. Amostras de solo, obtidas na parte superficial (0-5 cm de profundidade) ao redor de cada planta, foram homogeneizadas e uma sub amostra retirada e analisada quanto à microbiota fúngica e atividade de água. A umidade, pH e temperatura foi medida no momento coleta, em profundidade em torno de 5 cm, onde se encontravam os frutos. No total foram analisadas, quanto a microbiota fúngica, 25 amostras de solo.

### **3.4 Determinação da atividade de água**

A atividade de água das amostras de sementes plantadas, fruto (casca e grão), flores, ginóforo e de solo foram determinadas por meio do aparelho AQUALAB CX-2 (Decagon Devices Inc., Pullman, WA).

### **3.5 Determinação da temperatura, pH e umidade do solo**

A temperatura do solo foi avaliada utilizando-se um termômetro, enterrado a 5 cm da superfície. O pH e a umidade foram medidos pelo aparelho soil test (Demetra E.M., Tokyo, Japão). Todas as medidas foram feitas em triplicata e em cinco parcelas da área.

### **3.6 Avaliação climatológica da região do plantio**

Foram avaliadas, diariamente, a temperatura máxima e mínima da região utilizando-se termômetros de máxima e mínima e também a quantidade de chuva através de pluviômetro.

### **3.7 Análise da Microbiota Fúngica**

#### **3.7.1 Meios de cultura**

Para o isolamento e contagem da microbiota fúngica, foram utilizados os meios de cultura Ágar Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol (DRBC – OXOID) e Ágar *Aspergillus flavus* - *A. parasiticus* (AFPA – OXOID), que são seletivos para *Fusarium verticillioides* e *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, respectivamente. O meio Martin (MARTIN, 1950) foi utilizado para o isolamento da microbiota fúngica do solo. Para a manutenção e identificação dos fungos isolados, foi utilizado o meio Ágar Sabouraud Dextrose (ASD – OXOID), este meio também foi utilizado para isolamento da microbiota fúngica presente no ar. Os meios de cultura ágar coco (LIN e DIANESE, 1976), Czapeck - Dox (Difco) e meio de arroz (ROSS et al., 1990), foram utilizados para os testes de produção das aflatoxinas, ácido ciclopiazônico e fumonisinas, respectivamente, das cepas de *A. flavus*, *A. parasiticus* e *F. verticillioides*.

#### **3.7.2 Isolamento, contagem e identificação da microbiota fúngica da semente, flores, ginóforo e frutos de amendoim (BERJAK, 1984)**

De cada uma das 25 amostras de amendoim foi retirado, aproximadamente, 30g para desinfecção em solução de hipoclorito de sódio 2% por 3 minutos, para eliminação dos contaminantes externos. Após a desinfecção, foi separada a casca dos grãos do amendoim e lavados com água estéril. Alguns grãos e cascas foram selecionados ao acaso e semeados diretamente em placa de Petri contendo ágar DRBC e AFPA (PITT et al., 1979). Foram utilizadas, para cada amostra, 3 placas contendo 11 grãos cada e 3 placas contendo cascas. Todas as placas foram incubadas a 25 °C por 5 dias e os resultados expressos em percentagem do total

de grãos inoculados contaminados por fungos. Em seguida, colônias de diferentes tipos morfológicos foram isoladas em ágar Sabouraud dextrose e submetidas à identificação, por meio da técnica de microcultivo (RIDDELL, 1950). Os fungos foram classificados em nível de gênero. Entretanto *Fusarium verticillioides* e fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* foram classificados até espécie de acordo com os seguintes compêndios: ARX, 1974; BARNETT e HUNTER, 1965; BARRON, 1972; ELLIS, 1993; NELSON et al., 1983; RAPER e FENNEL, 1965. Para amostras de sementes, flores e ginóforo, foi seguido o mesmo procedimento.

### **3.7.3 Isolamento, contagem e identificação da microbiota fúngica das amostras de solo (SWANSON et al., 1992)**

De cada amostra de solo, de um total de 25 amostras, foram retiradas 10 g de cada e diluídos em 90 mL de salina 0,85% esterilizada, obtendo-se diluição de  $10^{-1}$ . A partir desta, foram preparadas diluições decimais e sucessivas até  $10^{-6}$ . Foram depositados 1 mL de cada diluição em placas de Petri contendo 10 a 15 mL de meio de Martin (1950) e incubadas a 25 °C por 7 dias. Todas as amostras foram processadas em duplicatas. Após a incubação, foi feita a contagem das colônias multiplicando-se o número obtido pelo fator de diluição, a fim de se obter o número de unidades formadoras de colônia por grama de substrato. Colônias de diferentes tipos morfológicos foram isoladas em ágar Sabouraud Dextrose e submetidas à identificação por meio da técnica de microcultivo (RIDDELL, 1950).

Os fungos foram classificados em nível de gênero. Entretanto *Fusarium verticillioides* e fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* foram classificados até espécie de acordo com os seguintes compêndios: Arx, 1974; Barnett e Heunter, 1965; Barron, 1972; Ellis, 1993; Nelson Et Al., 1983; Raper e Fennel, 1965.

### **3.7.4. Pesquisa de fungos do ar (GAMBALE, 1980)**

Um total de 50 placas de Petri (10 por cada período de coleta) contendo ágar Sabouraud dextrose foram abertas, durante 15 minutos, em diferentes pontos da plantação. Este método baseia-se na sedimentação dos esporos de fungos

anemófilos sobre a placa em questão, quando colocada em posição horizontal. Após a exposição, as placas foram fechadas e incubadas a 25 °C por 7 dias.

Colônias de diferentes tipos morfológicos foram isoladas em ágar Sabouraud Dextrose e submetidas à identificação por meio da técnica de microcultivo (RIDDELL, 1950). Os fungos foram classificados em nível de gênero. Entretanto *Fusarium verticillioides* e fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* foram classificados até espécie de acordo com os seguintes compêndios: Arx, 1974; Barnett e Hunter, 1965; Barron, 1972; Ellis, 1993; Nelson Et Al., 1983; Raper e Fennel, 1965.

### **3.8 Determinação de Micotoxinas**

As micotoxinas (aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>, ácido ciclopiazônico e fumonisinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>) foram detectadas e quantificadas nas cascas e grãos de amendoim separadamente.

#### **3.8.1 Equipamento**

O cromatógrafo líquido de alta eficiência utilizado neste estudo foi da marca Shimadzu, modelo LC 6AD, acoplado com detector de ultravioleta SPD 6A e detector de fluorescência RF 551, ambos da Shimadzu e loop de 20 µL. Para as análises o programa utilizado foi o class VP 5.02, Shimadzu.

#### **3.8.2 Aflatoxinas**

##### **3.8.2.1 Grãos de amendoim (AOAC, 2000)**

Vinte e cinco (25) gramas de cada amostra, previamente trituradas com 5 g de NaCl, foram transferidas para um frasco de boca larga e adicionados 125 mL de metanol: água (70:30 v/v). Após agitação por 30 minutos em agitador mecânico horizontal, o conteúdo do frasco foi filtrado em papel de filtro e, 15 mL do extrato foi diluído em 30 mL de água destilada. Em seguida, 15 mL do extrato filtrado (15 mL = 1,0 g da amostra) foi transferido para uma coluna de imunoafinidade a um



fluxo de cerca de 1-2 gotas/segundo até que o ar passasse pela coluna. Completada a operação, a coluna foi lavada com 10 mL de água destilada a um fluxo de cerca de 2 gotas/segundo e eluída com 1,0 mL de metanol grau HPLC a um fluxo de cerca de 1-2 gotas/segundo. Após a eluição, o extrato foi recolhido e armazenado em temperatura de congelamento até o momento da quantificação.

### **3.8.2.2 Cascas do amendoim (AOAC, 2000 modificado)**

Vinte e cinco (25) gramas de cada amostra, previamente trituradas com 10 g de NaCl, foram transferidas para um frasco de boca larga e adicionados 250 mL de metanol: água (60:40 v/v). Após agitação por 30 minutos em agitador mecânico horizontal, o conteúdo do frasco foi filtrado em papel de filtro e 20 mL do extrato foram diluídos com 20 mL de água destilada. Após nova filtração, 4,0 mL do extrato (4,0 mL = 0,2 g da amostra) foram transferidos para uma coluna de imunoafinidade a um fluxo de cerca de 1-2 gotas/segundo até que o ar passasse pela coluna. Completada a operação, a coluna foi lavada com 5,0 mL de água destilada a um fluxo de cerca de 2 gotas/segundo e eluída com 1,0 mL de metanol grau HPLC a um fluxo de cerca de 1-2 gotas/segundo. Após a eluição, o extrato foi recolhido e armazenado em temperatura de congelamento até o momento da quantificação.

### **3.8.2.3 Quantificação de aflatoxinas por CLAE**

As aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> presentes no extrato metanólico foram quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), tendo como fase móvel metanol:acetonitrila:ácido fosfórico 0,1% (24:24:52 v/v/v), fluxo de 1,0 mL/min, detector de fluorescência (364nm de excitação e 440nm de emissão), coluna ODS C<sub>18</sub> 4,6X250 mm de 5 micron (Shimadzu) e temperatura do forno de 30 °C (CHAN et al., 2004). O método de quantificação das amostras foi padrão externo, utilizando curva de calibração com 5 pontos para cada aflatoxina. Os pontos utilizados foram: 8,09; 11,325; 16,18; 22,65 e 32,36 ng/mL para AFB<sub>1</sub>; 1,0; 1,4; 2,0; 2,8 e 4,0 ng/mL para AFB<sub>2</sub>; 2,54; 3,55; 5,08; 7,11 e 10,16 ng/mL para AFG<sub>1</sub> e 1,92; 2,67; 3,84; 7,11; 7,68 ng/mL para AFG<sub>2</sub>. Os limites de quantificação e

detecção foram: 3,5 e 2,0 ng/mL para AFB<sub>1</sub>; 0,1 e 0,05 ng/mL para AFB<sub>2</sub>; 2,0 e 1,0 ng/mL para AFG<sub>1</sub> e 0,15 e 0,05 ng/mL para AFG<sub>2</sub>, respectivamente. O limite de quantificação foi considerado como a menor concentração da toxina possível de ser confirmada. O limite de detecção para cada aflatoxina foi determinado como sendo a concentração onde a área do pico se encontrava três vezes acima da linha de base padrão.

#### **3.8.2.4 Confirmação da presença de aflatoxinas**

As amostras que apresentaram aflatoxinas detectáveis foram confirmadas segundo TARIN et al. (2004), onde 500 µL da amostra foi seca sob nitrogênio e diluída em 50µL de ácido trifluoroacético (TFA) e 200 µL de hexano à 40 °C. A solução foi agitada por 15 minutos, seca sob nitrogênio e redissolvida com 200 µL de acetonitrila:água (3:7 v/v) e analisada por CLAE como descrito no item 2.8.2.3.

#### **3.8.2.5 Teste de recuperação de aflatoxinas**

Os métodos descritos nos itens anteriores foram verificados quanto a recuperação das aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> tanto para os grãos como para as cascas. Para isso, foram adicionados, tanto nos grãos como nas vagens de amendoim 4,85 ng/g de AFB<sub>1</sub>, 0,6 ng/g de AFB<sub>2</sub>, 1,52 ng/g de AFG<sub>1</sub> e 1,15 ng/g de AFG<sub>2</sub>, em triplicata. A extração, quantificação e confirmação da presença das aflatoxinas foram realizadas como descrito nos itens anteriores.

### **3.8.3 Fumonisinias**

#### **3.8.3.1 Grãos de amendoim (VISCONTI et al., 2001)**

Vinte e cinco (25) gramas de cada amostra, previamente triturada, foram transferidos para um frasco de boca larga e acrescidos 50 mL de acetonitrila:metanol:água (25:50:50 v/v/v). Após agitação por 20 minutos, em agitador mecânico horizontal, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante filtrado em papel de filtro. As operações foram repetidas novamente para o precipitado, e os filtrados recolhidos. 10 mL do filtrado

foram diluídos com 40 mL de tampão fosfato (PBS) pH 7,0, agitado e filtrado em papel de filtro de microfibras e, em seguida, coletados 10 mL para purificação em coluna de imunoafinidade com fluxo de 2,0-3,0 mL por minuto. As fumonisinas foram eluídas com 1,5 mL de metanol grau HPLC e evaporado até a secura e mantido em congelador até o momento da quantificação.

### **3.8.3.2 Cascas do amendoim (VISCONTI et al., 2001 - modificado)**

Dez (10) gramas de cada amostra, previamente triturada, foram transferidos para um frasco de boca larga e acrescidos 100 mL de acetonitrila:metanol:água (25:50:50 v/v/v). Após agitação por 20 minutos, em agitador mecânico horizontal, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante filtrado em papel de filtro. As operações foram repetidas novamente para o precipitado, e os filtrados recolhidos. 20 mL do filtrado foram diluídos com 20 mL de tampão fosfato (PBS) pH 7,0, agitado e filtrado em papel de filtro de microfibras e, em seguida, coletados 10 mL para purificação em coluna de imunoafinidade com fluxo de 2,0-3,0 mL por minuto. As fumonisinas foram eluídas com 1,5 mL de metanol grau HPLC e evaporado até a secura e mantido em congelador até o momento da quantificação.

### **3.8.3.3 Quantificação de fumonisinas por CLAE**

Amostras contendo 200 µL cada, foram diluídos em 50 µL de reagente OPA (40 mg de orto-ftaldeído em 1,0 mL de metanol, diluídos em 5,0 mL de solução 0,1 M de tetraborato de sódio, acrescidos de 50 µL de mercaptoetanol) em temperatura ambiente por 2 minutos. O extrato foi injetado no CLAE e as fumonisinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> foram identificadas e quantificadas. O cromatógrafo utilizado foi o LC6AD - Shimadzu, acoplado com detector de fluorescência RF551 (Shimadzu). As condições cromatográficas foram: fase móvel acetonitrila:água:ácido acético (520:480:5 v/v/v), com fluxo de 1,02 mL/min, forno 30 °C, λ emissão 440 nm e λ excitação 335 nm, coluna C<sub>18</sub> 4,6X150 mm, 5 micron (J.T. Baker). O método de quantificação das amostras foi padrão externo, utilizando curva de calibração com 4 pontos para cada fumonisina (2,0; 1,0; 0,5; e 0,25 µg/mL para FB<sub>1</sub> e 1,0; 0,5;

0,25 e 0,125 µg/mL para FB<sub>2</sub>). Os limites de quantificação e detecção foram: 0,25 e 0,025 µg/mL para FB<sub>1</sub> e 0,125 e 0,0125 µg/mL para FB<sub>2</sub>, respectivamente. O limite de quantificação foi considerado como a menor concentração da toxina possível de ser confirmada. O limite de detecção para cada fumonisina foi determinado como sendo a concentração onde a área do pico se encontrava três vezes acima da linha de base padrão.

#### **3.8.3.4 Teste de recuperação de fumonisinas**

Os métodos descritos nos itens anteriores foram verificados quanto a recuperação das fumonisinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, tanto para os grãos como para as cascas. Para isso, foram adicionados, tanto nos grãos como nas cascas de amendoim 0,8 µg/g de FB<sub>1</sub> e 0,4 µg/g de FB<sub>2</sub>, em triplicata. A extração, identificação e quantificação da presença das fumonisinas foram realizadas como descrito nos itens anteriores.

#### **3.8.4 Ácido Ciclopiazônico**

##### **3.8.4.1 Grãos de amendoim (URANO et al., 1992)**

Vinte e cinco (25) gramas de cada amostra, previamente triturada, foram transferidos para um frasco de boca larga e acrescidos de 100 mL de metanol:bicarbonato de sódio 2% em água (7:3 v/v). Após agitação por 30 minutos em agitador mecânico horizontal, o conteúdo do frasco foi filtrado em papel de filtro. Uma alíquota de 50 mL do extrato foi transferido para um funil de separação e adicionados 100 mL de hexano. Após uma agitação gentil, a fração hexânica foi descartada e, em seguida, adicionados 50 mL de uma solução aquosa de KCl 10%. Esta solução foi acidificada com 2,0 mL de HCl 6 N. O ACP foi eluído com 50 mL de clorofórmio por duas vezes. Após adicionar sulfato de sódio anidro, a fração clorofôrmica foi filtrada e evaporada até a secura em evaporador rotativo. O resíduo foi resuspenso em 10 mL de clorofórmio e transferido para uma coluna de extração de fase sólida Micotox® MS2300 (Micotox Ltda, Bogotá D.C., Colombia) a um fluxo de cerca de 1-2 gotas/segundo até que o ar passasse pela coluna. Completada a operação, a coluna foi lavada com 10 mL de éter etílico, 10

mL de clorofórmio/acetona (1:1 v/v) e 10 mL de clorofórmio/metanol (95:5 v/v). O ACP foi eluído com 10 mL de clorofórmio/metanol (75:25 v/v) a um fluxo de 2,0 mL/min. O extrato foi evaporado sob nitrogênio até a secura e diluído em 1,0 mL de metanol grau HPLC. O extrato foi armazenado em temperatura de congelamento até o momento da quantificação.

#### **3.8.4.2 Casca de amendoim (URANO et al., 1992 - modificado)**

Vinte e cinco (25) gramas de cada amostra, previamente triturada, foram transferidos para um frasco de boca larga e acrescidos de 200 mL de metanol:bicarbonato de sódio 2% em água (7:3 v/v). Após agitação por 30 minutos em agitador mecânico horizontal, o conteúdo do frasco foi filtrado em papel de filtro. Uma alíquota de 100 mL do extrato foi transferido para um funil de separação e adicionados 100 mL de hexano. Após uma agitação gentil, a fração hexânica foi descartada e, em seguida, adicionados 50 mL de uma solução aquosa de KCl 10%. Esta solução foi acidificada com 2,0 mL de HCl 6 N. O ACP foi eluído com 50 mL de clorofórmio por duas vezes. Após adicionar sulfato de sódio anidro, a fração clorofórmica foi filtrada e evaporada até a secura em evaporador rotativo. O resíduo foi resuspendido em 10 mL de clorofórmio e transferido para uma coluna de extração de fase sólida Micotox® MS2300 (Micotox Ltda, Bogotá D.C., Colombia) a um fluxo de 2,0 mL/min, até que o ar passasse pela coluna. Completada a operação, a coluna foi lavada com 10 mL de éter etílico, 10 mL de clorofórmio/acetona (1:1 v/v) e 10 mL de clorofórmio/metanol (95:5 v/v). O ACP foi eluído com 10 mL de clorofórmio/metanol (75:25 v/v) a um fluxo de 2,0 mL/min. O extrato foi evaporado sob nitrogênio até a secura e diluído em 1,0 mL de metanol grau HPLC. O extrato foi armazenado em temperatura de congelamento até o momento da quantificação.

#### **3.8.4.3 Quantificação de ácido ciclopiazônico por CLAE**

O ácido ciclopiazônico foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), tendo como fase móvel acetonitrila:tampão acetato de amônio (0,05 M, pH5) (8:2 v/v), fluxo de 0,6 mL/min, detector de UV em 284 nm (LOSITO et al,

2002), coluna ODS C<sub>8</sub> 4,6X250 mm de 5 micron (Shimadzu). O método de quantificação das amostras foi padrão externo, utilizando curva de calibração com 5 pontos (0,611; 1,223; 2,446; 4,892 e 9,798 µg/mL). Os limites de quantificação e detecção foram: 0,03 µg/mL e 0,005 µg/mL, respectivamente. O limite de quantificação foi considerado como a menor concentração da toxina possível de ser confirmada. O limite de detecção foi determinado como sendo a concentração onde a área do pico se encontrava três vezes acima da linha de base padrão.

#### **3.8.4.4 Teste de recuperação de ácido ciclopiazônico**

Os métodos descritos nos itens anteriores foram verificados quanto a recuperação do ácido ciclopiazônico, tanto para os grãos como para as cascas. Para isso, foram adicionados, tanto nos grãos como nas cascas de amendoim, 180 µg/kg de ácido ciclopiazônico, em triplicata.

#### **3.9 Avaliação do potencial toxigênico para aflatoxinas das cepas de *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* (LIN e DIANESE, 1976)**

A partir do resultado da microbiota fúngica, foi realizado o potencial toxigênico das 21 cepas de *Aspergillus flavus* e das 04 cepas de *Aspergillus parasiticus* isoladas. Cada cepa foi mantida em tubo contendo ágar batata dextrose a 25 °C por 10 dias. Um fragmento das colônias de *A. flavus* e de *A. parasiticus* foi inoculado em uma placa de petri contendo ágar coco. A placa foi incubada por 10 dias a 25 °C. Após o crescimento, a colônia com o ágar foi pesada e transferida para um frasco e adicionado clorofórmio na proporção de 10 g do cultivo para 30 mL de clorofórmio. Após 30 minutos de agitação, o solvente foi filtrado em papel de filtro contendo sulfato de sódio e terra de diatomácea. O filtrado foi evaporado até a secura e transferido para um volume conhecido e aplicado em placa de sílica gel G 60 (Merck), acompanhado de um padrão quantitativo de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>. A placa foi eluída unidimensionalmente com a mistura de solventes clorofórmio:acetona (9:1 v/v) (AOAC, 1980). Após a secagem do solvente, foi realizada a leitura das amostras e do padrão em fotodensitômetro (CS 9000,

Shimadzu). A quantificação foi feita por comparação das áreas das amostras com as dos padrões de aflatoxinas.

### **3.10 Avaliação do potencial toxigênico para ácido ciclopiazônico das cepas de *Aspergillus flavus*** (SANCHES et al., 2004 modificado)

A partir do resultado da microbiota fúngica, foi realizado o potencial toxigênico das 21 cepas de *Aspergillus flavus* isoladas. Cada cepa foi mantida em tubo contendo ágar batata dextrose a 25 °C por 07 dias. Foram inoculados 1,0 mL de suspensão de esporos, de cada cepa, em frascos contendo 25 mL de caldo de Czapeck-Dox (DIFCO) e incubados a 25 °C por 12 dias. As culturas foram filtradas e os caldos foram extraídos duas vezes com 25 mL de clorofórmio. Os extratos foram filtrados, evaporados até a secura e rediluídos com 1,0 mL de metanol grau HPLC. O ACP presente nos extratos foi quantificado por CLAE como descrito no item 2.8.4.3.

### **3.11 Avaliação do potencial toxigênico de cepas de *Fusarium verticillioides*** (SYDENHAM et al., 1996)

Foi inoculado 1,0 mL da suspensão de esporos das 02 cepas de *F. verticillioides*, isoladas no estudo da microbiota fúngica, em 50g de arroz estéril e incubado por 15 dias a 27 °C, seguidos de 15 dias a 15 °C. As fumonisinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> foram extraídas das 50 g de arroz, adicionando-se 100 mL de acetonitrila:água (1:1 v/v). Após agitação de 45 minutos, o conteúdo do frasco foi filtrado e uma alíquota de 10 mL foi retirada e transferido para uma coluna de extração de fase sólida de troca iônica de 500 mg (SAX, Variam), previamente condicionada com 5,0 mL de metanol seguidos por 5,0 mL de água destilada. Após a passagem do extrato, a coluna foi lavada com 5,0 mL de metanol:água (1:1 v/v) e as fumonisinas foram eluídas com 15 mL de metanol:ácido acético (99:1 v/v). Os extratos evaporados até a secura e rediluídos em 1,0 mL de metanol grau HPLC. Os extratos foram quantificados por cromatografia líquida de alta resolução (CLAE), como descrito no item 2.8.3.3.

### **3.12 Análise estatística**

Estimaram-se modelos de regressão linear, a fim de permitir que diversas variáveis explicativas respondessem pelas variáveis independentes (*A. flavus* e *A. parasiticus* nas cascas e grãos de amendoim, sementes, flores, ginóforo, solo e ar; atividade de água; temperatura, pH e umidade do solo; temperatura ambiente e índice pluviométrico). As variáveis dependentes foram as aflatoxinas e o ácido ciclopiazônico presentes nos grãos e nas cascas. Para estimar os modelos, usou-se o procedimento REG do SAS<sup>®</sup> (Statistical Analysis Software).



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Determinação da microbiota fúngica do amendoim

As sementes de amendoim plantadas, mesmo após o tratamento com fungicida, apresentaram os seguintes fungos em ordem decrescente de porcentagem de contaminação: F.N.E. (36%), *Penicillium spp.* (15%), *Rhizopus spp.* (11%), *Fusarium spp.* (8%), *Phoma spp.* (7%), *Trichoderma spp.* (7%) *Cladosporium spp.* (4%), *A. flavus* (3%), *A. niger* (3%), *A. terreus* (2%) e *Fusarium verticillioides* (1%) (Tabela 1).

A análise da microbiota dos grãos e casca de amendoim, em diferentes estágios de maturação, revelou uma maior incidência de *Fusarium spp.*, seguido de *Aspergillus spp.* em meio de cultura AFPA (Tabela 2 e Figura 2). No meio de cultura DRBC, a maior incidência também foi de *Fusarium spp.*, seguido de *Aspergillus spp.*, *Rhizopus spp.* e *Penicillium spp.* (Tabela 3 e Figura 3).

Das 25 amostras de grãos de amendoim coletadas, foram isolados, em meio AFPA, os seguintes fungos, em ordem decrescente de porcentagem de contaminação: *Fusarium spp.* (30%), *Aspergillus flavus* (14%), *A. terreus* (12%), *Penicillium spp.* (1%), *Curvularia spp.* (0,8%) e *Beltrania spp.* (0,6%) (Tabela 2 e Figura 2). As cascas dos grãos acima foram avaliadas e os seguintes fungos isolados: *Fusarium spp.* (94%), *A. flavus* (13,5%), *Rhizopus spp.* (2,6%) e *Scopulariopsis spp.* (0,3%) (Tabela 2 e Figura 3).

O estudo da microbiota fúngica das 25 amostras de grãos e suas cascas, utilizando o meio de cultura DRBC, apresentou os seguintes resultados em ordem decrescente de contaminação: Grãos: *Fusarium spp.* (22%), *A. flavus* (20%), *Penicillium spp.* (8,5%), *Rhizopus spp.* (8%), *A. terreus* (7%), *A. parasiticus* (4,5%), *Curvularia spp.* (1%), *Fusarium verticillioides* (1%), *Mucor spp.* (0,5%) e *A. niger* (0,1%) (Tabela 3 e Figura 4); Casca: *Fusarium spp.* (63,5%), *Rhizopus spp.* (25,6%), *Absidia spp.* (16%), *A. flavus* (10%), *A. niger* (5%), *Trichoderma spp.* (1,6%), *Penicillium spp.* (1,4%) e *A. candidus* (0,27%) (Tabela 3 e Figura 5).

A maior incidência da espécie *A. flavus* isolada nas amostras de amendoim, ocorreu no estágio de granação dos frutos, sendo de 44% nos grãos e 49% nas cascas, seguido pelo fruto já maduro, durante a colheita, (34% nos grãos e 8,8% nas cascas) e após a secagem dos frutos (8% nos grãos) (Figuras 6 e 7). A espécie também foi isolada em 1,2% das cascas de frutos recém-formados (Figura 7). *A. parasiticus* foi isolado somente em grãos maduros (2%) e secos (21%), em meio de cultura DRBC (Figura 8).

#### 4.2 Determinação da microbiota fúngica do solo

Foram analisadas 25 amostras de solo onde isolamos os seguintes fungos, em ordem decrescente de frequência: *Penicillium* spp. (100%), *Fusarium* spp. (84%), *A. terreus* (76%), *Mucor* spp. (28%), F.N.E.(20%), *Cladosporium* spp. (16%), *A. flavus* (8%), *A. niger* (8%) e *Trichoderma* spp (8%) (Tabela 4 e Figura 9).

Os fungos de maior incidência foram *A. terreus*, *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp., que apresentaram uma distribuição uniforme durante todas as coletas, ou seja, desde o plantio até a colheita (Tabela 5 e Figura 10). Já a espécie *A. flavus* foi isolada do solo somente na 1ª coleta ( $2,0 \times 10^3$  UFC/g) e na 4ª coleta ( $5,0 \times 10^3$  UFC/g) (Tabela 6 e Figura 10).

#### 4.3 Determinação da microbiota fúngica do ar

Foram realizadas 50 exposições de placas no ar, 10 em cada coleta (da 1ª a 5ª) e os seguintes gêneros de fungos foram isolados: *Cladosporium* spp. (58%), *Mucor* spp. (22%), *Aspergillus* spp. (18%), *Neurospora* spp. (16%), *Rhizopus* spp. (14%), *Helminthosporium* spp. (8%), *Penicillium* spp. (8%), F.N.E. (8%), *Sepedonium* spp. (6%), *Alternaria* spp. (2%), *Epicocum* spp. (2%) e *Trichoderma* spp. (2%) (Tabela 7 e Figura 11).

O fungo de maior frequência durante as coleta foi o *Cladosporium* spp., seguido do *Neurospora* spp.. *A. flavus* foi isolado na 4ª coleta, durante o estágio de granação do fruto e *A. parasiticus* foi isolado nas 1ª e 4ª coletas, durante a plantação do amendoim e no estágio de granação do fruto (Tabela 8 e Figura 12).

#### **4.4 Determinação da microbiota fúngica das flores e ginóforo**

As flores e ginóforos analisados apresentaram 100% de freqüência de *Fusarium* spp., único gênero fúngico encontrado tanto no meio de cultura AFPA como no meio DRBC (Tabela 1).

#### **4.5 Determinação da temperatura, pH e umidade do solo**

Os resultados de temperatura, pH e umidade do solo são apresentados na tabela 9. A temperatura média do solo foi de 26,6 °C, não ocorrendo variações durante as coletas 1, 2, 4 e 5, somente na coleta 3 a média ficou em 24 °C (Tabela 9). Nenhuma variação foi encontrada no pH do solo, que se manteve neutro (7,0) (tabela). Quanto a umidade, foi observado grande variação entre as coletas, sendo que na 3<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> coletas os menores valores foram encontrados (Tabela 9).

#### **4.6 Avaliação do clima da região**

A temperatura máxima e mínima e o índice pluviométrico registrado durante as coletas podem ser observados nas tabelas. A temperatura média máxima foi de 32,3 °C e a mínima de 19,9 °C (Tabela 10) e o índice pluviométrico médio foram de 4,75 mm (Tabela 11), durante o período de novembro de 2004 a março de 2005 (Tabela). O índice pluviométrico médio calculado entre as coletas foram de 8,53 mm formação das vagens e no início da granação, de 0,43 mm na granação, de 5,5 mm no fruto maduro e de 0,0 mm no fruto seco.

#### **4.7 Atividade de água**

As amostras de grãos e cascas de amendoim apresentaram valores de atividade de água em torno de 0,98 desde a formação da vagem até a maturação dos grãos. Após a secagem dos frutos, a atividade de água foi de 0,69 a 0,74 para os grãos e de 0,53 a 0,74 para as cascas (Tabelas 2 e 3). As flores e os ginóforos apresentaram atividade de água em torno de 0,98 e as sementes plantadas 0,49 (Tabela 1).

No solo os valores encontrados não sofreram variação durante os diferentes estágios de maturação dos grãos, se mantendo acima de 0,90 (Tabela 6).

## **4.8 Análise Micotoxicológica**

### **4.8.1 Análise de aflatoxinas nas amostras de grãos e cascas de amendoim**

Os métodos para análises de aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>), e G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>) foram avaliados em grãos e cascas de amendoim onde obtivemos os seguintes percentuais de recuperação: Grãos de amendoim: 87%, 80%, 89% e 64% para AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> respectivamente; Casca de amendoim: 83%, 82%, 90% e 61% para AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> respectivamente. Os percentuais de recuperação tanto para os grãos como para as cascas estão de acordo com os encontrados no método empregado (AOAC, 2000). Os limites de quantificação foram estabelecidos para AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> em 3,5 ng/mL, 0,1 ng/mL, 2,0 ng/mL e 0,15 ng/mL, respectivamente. Os limites de detecção foram de 2,0 ng/mL, 0,05 ng/mL, 1,0 ng/mL e 0,05 ng/mL para AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>, respectivamente. As curvas de calibração utilizadas para quantificação das amostras apresentaram r<sup>2</sup> de 0,999 para AFB<sub>2</sub> e AFG<sub>2</sub>, r<sup>2</sup> de 0,997 para AFB<sub>1</sub> e r<sup>2</sup> de 0,996 para AFG<sub>1</sub>.

Das 25 amostras de grãos analisadas, 08 (32%) apresentaram contaminação por aflatoxinas. As aflatoxinas foram detectadas em 4% das amostras do estágio de granação, 16% no grão após a maturação e em 12% dos grãos após a secagem, em concentrações que variaram de 4,20 µg/kg a 198,84 µg/kg (Tabela 12 e Figura 13). As aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> foram detectadas em 100% das amostras contaminadas e as aflatoxinas G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> detectadas em 37,5% e 62,5%, respectivamente (Tabela 12). Das amostras de cascas, 6 (24%) apresentaram contaminação por aflatoxinas. As aflatoxinas foram detectadas em 4% das amostras do estágio de granação, 16% no grão após a maturação e em 4% dos grãos após a secagem, em concentrações que variaram de 5,76 µg/kg a 218,52 µg/kg (Tabela 13 e Figura 14). A aflatoxina B<sub>1</sub> foi detectada em 100% das

amostras contaminadas e as aflatoxinas B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> foram detectadas em 83,3%, 50% e 50%, respectivamente (Tabela 13).

Os frutos recém formados e no início da granação não apresentaram contaminação por aflatoxinas, tanto nas cascas como nos grãos. As figuras 13 e 14 mostram a concentração de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> nas diferentes fases de maturação e após a secagem dos grãos e cascas de amendoim.

Nas sementes plantadas, AFB<sub>1</sub> foi detectada, não sendo possível sua quantificação.

Todos os resultados encontrados foram confirmados com TFA.

#### **4.8.2 Análise de fumonisinas nas amostras de grãos e cascas de amendoim**

Os métodos para análise de fumonisinas B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) e B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>) foram avaliados em grãos e cascas de amendoim onde obtivemos os seguintes percentuais de recuperação: Grãos de amendoim: 77,5% para FB<sub>1</sub> e 92% para FB<sub>2</sub>; Casca de amendoim: 84% para FB<sub>1</sub> e 71,35% para FB<sub>2</sub>. Os limites de quantificação foram estabelecidos para FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> em 0,25 µg/mL e 0,125 µg/mL, respectivamente. Os limites de detecção foram de 0,025 µg/mL para FB<sub>1</sub> e 0,0125 µg/mL para FB<sub>2</sub>. As curvas de calibração utilizadas para quantificação das amostras apresentaram r<sup>2</sup> de 0,996 para FB<sub>1</sub> e r<sup>2</sup> de 0,997 para FB<sub>2</sub>.

Os resultados das análises das 25 amostras de grãos e das 25 de cascas de amendoim, não revelaram a presença de fumonisinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> em níveis detectáveis.

#### **4.8.3 Análise de ácido ciclopiazônico nas amostras de grãos e cascas de amendoim**

Os métodos para análise de ácido ciclopiazônico registraram percentuais de recuperação de 70%, para os grãos de amendoim, e de 62%, para as cascas de amendoim. Os limites de quantificação e detecção foram de 0,03 µg/mL e 0,005

µg/mL, respectivamente. A curva de calibração utilizada para quantificação das amostras apresentou  $r^2$  de 0,999.

Das 25 amostras de grãos analisadas, 08 (32%) apresentaram contaminação por ácido ciclopiazônico. A toxina foi detectada em 8% das amostras do estágio de granação, 16% no grão após a maturação e em 8% dos grãos após a secagem, em concentrações que variaram de 260 µg/kg a 600 µg/kg (Tabela 14 e Figura 15). Os frutos recém formados e no início da granação não apresentaram contaminação por ácido ciclopiazônico (Tabela 14 e Figura 15).

Os resultados das análises das 25 amostras de cascas de amendoim, não revelaram a presença de ácido ciclopiazônico em níveis detectáveis.

#### **4.9 Avaliação do potencial toxigênico de cepas de *A. flavus* e *A. parasiticus***

Neste estudo foram isoladas 21 cepas de *A. flavus*, sendo 01 das sementes plantadas; 01 do ar, durante a 4ª Coleta; 02 do solo nas 1ª e 4ª coletas; 02 nas cascas dos frutos recém formados; 03 nos grãos e 02 nas cascas no estágio de granação; 05 nos grãos e 01 nas cascas dos frutos maduros e 03 nos grãos e 01 nas cacas dos frutos após a secagem (Tabelas 1, 2, 3, 5 e 8; Figuras 6, 7, 10 e 12). Destas cepas foram avaliados os potenciais para produção de aflatoxinas e ACP, onde 85,72% foram produtoras de aflatoxinas e 38,09% produziram ácido ciclopiazônico, sendo que 33,33% produziram ambas as toxinas e 4,76% produziu somente ACP. As concentrações de aflatoxina B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> variam de 18.560 µg/kg a 8,0 µg/kg e de 260 µg/kg a 1,0 µg/kg, respectivamente. As concentrações de ACP variam de 17,45 µg/mL a 2,36 µg/mL (Tabela 15).

Das 04 cepas de *A. parasiticus* isoladas, 02 estavam no ar nas 1ª e 4ª coletas; 01 nos grãos maduros e 01 nos grãos de frutos após a secagem (Tabelas 3 e 8; Figuras 8 e 12). As concentrações das aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> foram de 34.300 µg/kg a 1.300 µg/kg, de 250 µg/kg a 30 µg/kg, de 1.210 µg/kg a 100 µg/kg e de 900 µg/kg a 30 µg/kg, respectivamente (Tabela 16).

#### **4.10 Avaliação do potencial toxigênico de cepas de *Fusarium verticillioides***

Foram isoladas duas cepas de *F. verticillioides*, sendo uma em grãos de frutos após a secagem e a outra das sementes utilizadas no plantio (Tabelas 1 e 3). As concentrações de fumonisinas B<sub>1</sub> foram 55.699,51 µg/kg e 320,41 µg/kg, respectivamente. A fumonisina B<sub>2</sub> foi detectada apenas na amostra de grão após a secagem na concentração de 5.023 µg/kg.

## **TABELAS E GRÁFICOS**

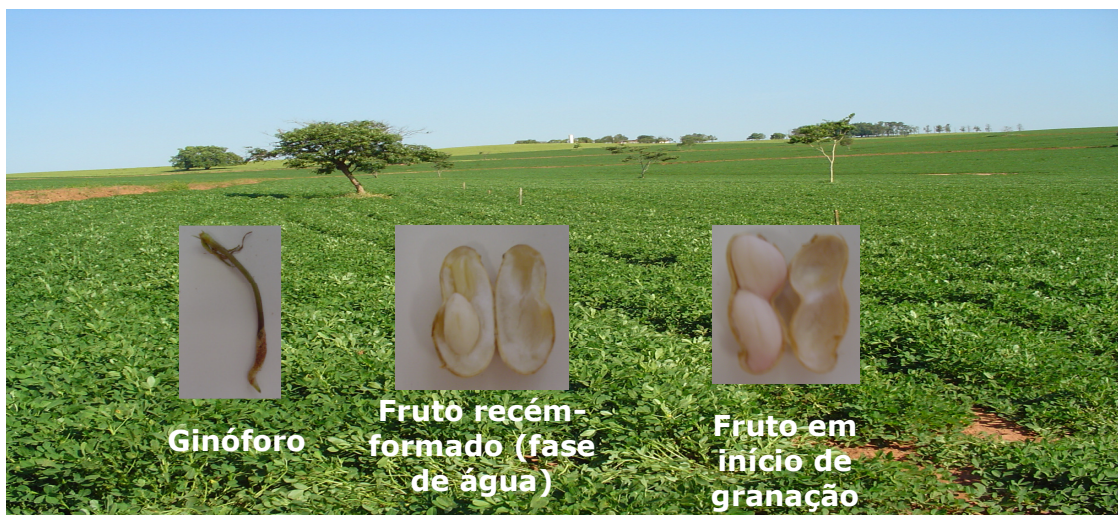




1ª coleta



2ª coleta



3ª coleta



4ª coleta



5ª e 6ª coletas

Figura 1: Fazenda Majeca. Etapas das coletas.

Tabela 1: Porcentagem de contaminação fúngica em amostras de sementes plantadas, flores e ginóforos.

Coleta	Amostra	Atividade de água	% Contaminação Fúngica										
			<i>A. flavus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. terreus</i>	<i>Penicillium spp</i>	<i>Fusarium spp</i>	<i>F. verticillioides</i>	<i>Cladosporium spp</i>	<i>Trichoderma spp</i>	<i>Phoma spp</i>	<i>Rhizopus spp</i>	F.N.E.
<b>1<sup>a</sup> coleta (semente)</b>	1	0,49	3	3	2	15	8	1	4	7	7	11	36
<b>2<sup>a</sup> coleta (flor)</b>	1	0,99	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-
	2	0,98	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-
	3	0,98	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-
	4	0,99	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-
	5	0,98	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-
<b>3<sup>a</sup> coleta (ginóforo)</b>	1	0,98	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-
	2	0,97	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-
	3	0,97	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-
	4	0,98	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-
	5	0,97	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-

F.N.E.: fungo não esporulado

Tabela 2: Porcentagem de contaminação fúngica em amostras de frutos de amendoim, grãos e cascas, em diferentes estágios de maturação, isoladas em meio de cultura AFPA.

Coleta	Amostra	Atividade de água		% Contaminação Fúngica															
				<i>A. flavus</i>		<i>A. terreus</i>		<i>Penicillium</i> spp		<i>Fusarium</i> spp		<i>Scopulariopsis</i> spp		<i>Rhizopus</i> spp		<i>Curvularia</i> spp		<i>Beltrania</i> spp	
		grão	casca	grão	casca	grão	casca	grão	casca	grão	casca	grão	casca	grão	casca	grão	casca	grão	casca
3 <sup>o</sup> coleta (fruto recém formado)	1	0,98	0,98	-	-	-	-	-	-	-	94,5	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	0,99	0,99	-	-	-	-	-	-	-	94	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	0,99	0,99	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	0,99	0,99	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	0,98	0,99	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-
3 <sup>o</sup> coleta (início da granação)	1	0,98	0,98	-	-	-	-	3	-	9	100	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	0,98	0,98	-	-	-	-	-	-	-	93,5	-	7	-	-	-	-	-	-
	3	0,98	0,97	-	-	-	-	-	-	6	100	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	0,97	0,95	-	-	-	-	3	-	6	100	-	-	-	-	21	-	-	-
	5	0,98	0,97	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-
4 <sup>o</sup> coleta (granação)	1	0,98	0,97	97	100	9	-	-	-	12	100	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	0,96	0,97	21	66,5	36,5	-	-	-	9	20	-	-	-	66,5	-	-	-	-
	3	0,96	0,96	-	35,5	24	-	-	-	42,5	100	-	-	-	-	-	-	12	-
	4	0,97	0,96	-	13,5	36,5	-	-	-	60,5	100	-	-	-	-	-	-	3	-
	5	0,97	0,97	6	35,5	21	-	21	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-
5 <sup>o</sup> coleta (fruto maduro)	1	0,97	0,97	-	20	91	-	-	-	6	73,5	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	0,97	0,96	82	7	-	-	-	-	33	93	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	0,96	0,96	36,5	20	33	-	-	-	24	73,5	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	0,97	0,86	12	46,5	18	-	-	-	24	100	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	0,95	0,77	27,5	21,5	27,5	-	-	-	54,5	100	-	-	-	-	-	-	-	-
6 <sup>o</sup> coleta (fruto seco)	1	0,69	0,67	3	-	-	-	-	-	100	100	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	0,72	0,54	6	-	-	-	-	-	100	100	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	0,74	0,74	54,5	-	-	-	-	-	63,5	100	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	0,71	0,58	6	-	-	-	-	-	100	100	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	0,69	0,53	6	-	-	-	-	-	94	100	-	-	-	-	-	-	-	-

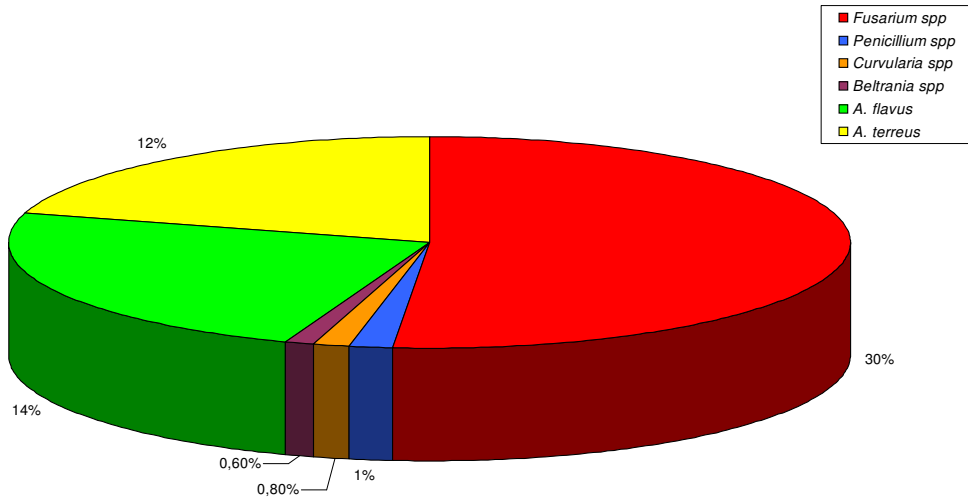


Figura 2: Representação gráfica do total de grãos de amendoim contaminados com fungos em meio de cultura AFPA.

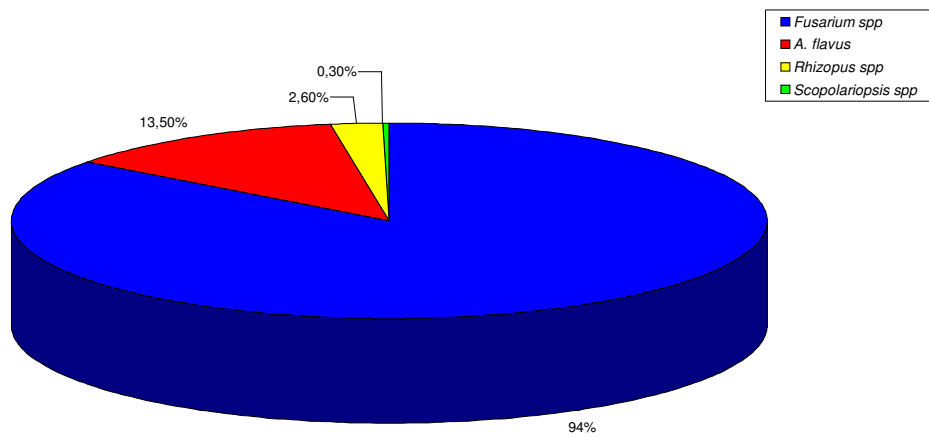


Figura 3: Representação gráfica do total de cascas de amendoim contaminados com fungos em meio de cultura AFPA.

Tabela 3: Porcentagem de contaminação fúngica em amostras de frutos de amendoim, grãos e cascas, em diferentes estágios de maturação, isoladas em meio de cultura DRBC.

Coleta	Amostra	Atividade de água		% Contaminação Fúngica																											
				<i>A. flavus</i>		<i>A. parasiticus</i>		<i>A. candidus</i>		<i>A. niger</i>		<i>A. terreus</i>		<i>Fusarium spp</i>		<i>F. verticillioide s</i>		<i>Penicillium spp</i>		<i>Trichoderma spp</i>		<i>Absidia spp</i>		<i>Curvularia spp</i>		<i>Rhizopus spp</i>		<i>Mucor spp</i>			
				grão	casca	grão	casca	grão	Casca	grão	casca	grão	casca	Grã o	casca	grão	casca	grão	casca	grão	casca	grão	casca	grão	casca	grão	casca	grão	casca	grão	casca
3 <sup>o</sup> coleta (fruto recém formado)	1	0,98	0,98	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	2	0,99	0,99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	27	100	-	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
	3	0,99	0,99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-			
	4	0,99	0,99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
	5	0,98	0,99	-	13,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	17,5	-	-	-	-	-	-			
3 <sup>o</sup> coleta (início da granação)	1	0,98	0,98	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	93	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	35,5			
	2	0,98	0,98	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	-	33	6,5			
	3	0,98	0,97	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-			
	4	0,97	0,95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	31,5	-	-	-	-	-	6	-	-	-			
	5	0,98	0,97	-	-	-	-	-	-	-	6,5	-	-	9	53,5	-	-	-	-	-	20	-	-	-	-	-	-	-			
4 <sup>o</sup> coleta (granação)	1	0,98	0,97	100	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	62,5	-	-	-	-	-			
	2	0,96	0,97	51,5	-	-	-	-	6,5	-	-	-	-	6	-	-	-	21	-	-	-	20	-	-	-	100	-	-			
	3	0,96	0,96	72,7	68,5	-	-	-	-	-	-	-	-	6	-	-	-	51,5	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-			
	4	0,97	0,96	45,5	33,5	-	-	-	-	-	-	-	-	30	-	-	-	-	12	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-		
	5	0,97	0,97	45,5	33,5	-	-	-	-	-	-	-	-	67	-	-	-	3	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-		
5 <sup>o</sup> coleta (fruto maduro)	1	0,97	0,97	2	-	-	-	-	-	-	13,5	97	-	-	13,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-		
	2	0,97	0,96	27,5	-	6	-	-	-	-	60	-	-	27,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	33	80	-	-			
	3	0,96	0,96	33,5	-	-	-	-	-	-	40	42,5	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21	60	-	-			
	4	0,97	0,86	100	-	-	-	-	-	-	7	15	-	-	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	57	-	-			
	5	0,95	0,77	15	-	-	-	-	-	-	-	12	-	12	-	-	-	6	-	-	-	-	-	-	33	100	-	-			
6 <sup>o</sup> coleta (fruto seco)	1	0,69	0,672	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	57,5	100	-	-	9	-	-	-	-	-	-	30,5	-	6	-			
	2	0,72	0,54	-	-	6	-	-	-	-	-	-	-	63,5	100	3	-	3	-	-	-	-	-	33	-	3	-				
	3	0,74	0,74	-	-	76	-	-	-	-	-	-	-	33	100	-	-	-	-	-	-	-	-	21	-	-	-				
	4	0,71	0,58	-	-	6	-	-	-	-	-	6	-	89	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
	5	0,69	0,53	-	-	15	-	-	-	-	-	-	-	94	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-			

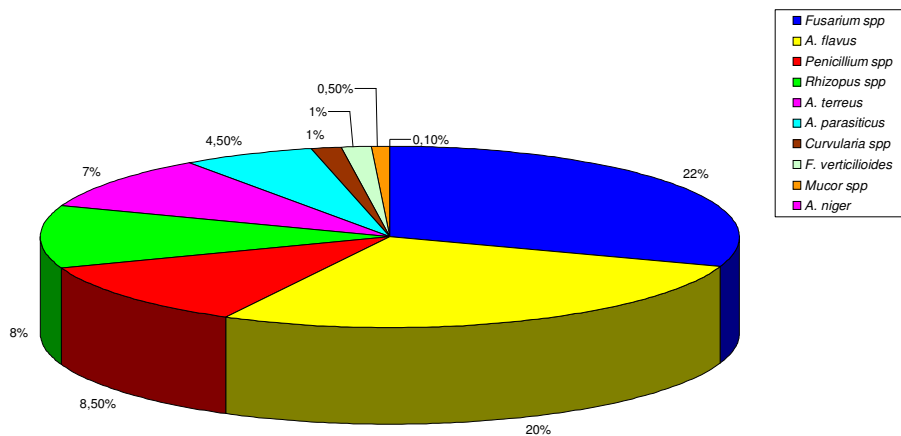


Figura 4: Representação gráfica do total de grãos de amendoim contaminados com fungos em meio de cultura DRBC.

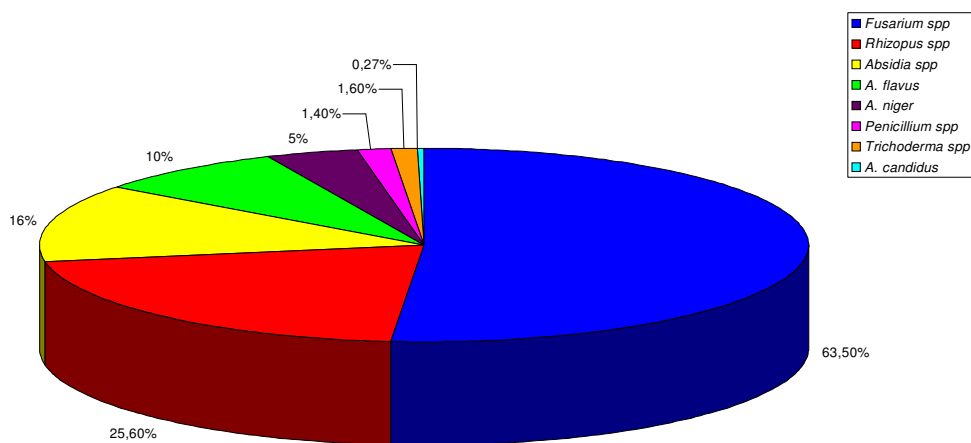


Figura 5: Representação gráfica do total de cascas de amendoim contaminados com fungos em meio de cultura DRBC.

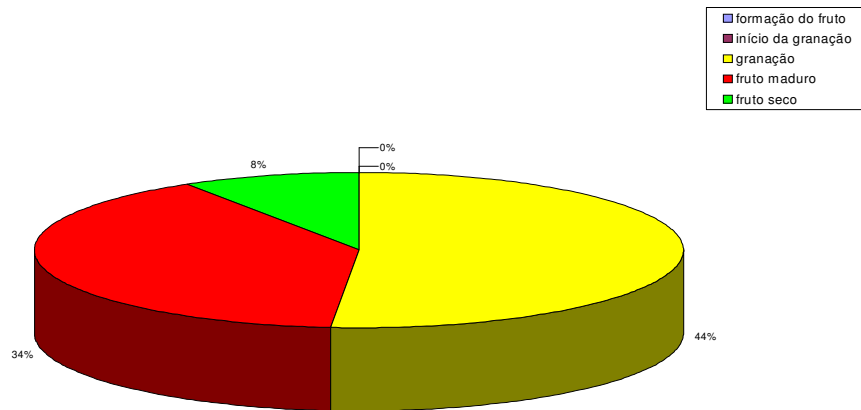


Figura 6: Representação gráfica do total de grãos de amendoim contaminados com *Aspergillus flavus* em diferentes fases de maturação do fruto.

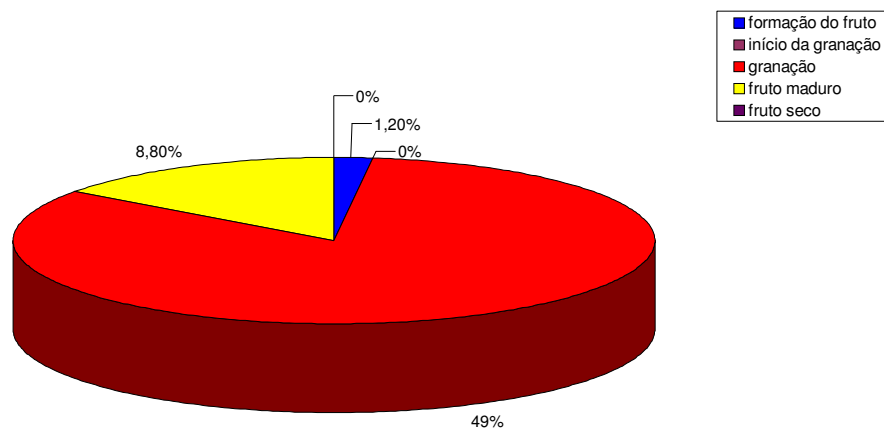


Figura 7: Representação gráfica do total de cascas de amendoim contaminados com *Aspergillus flavus* em diferentes fases de maturação do fruto.

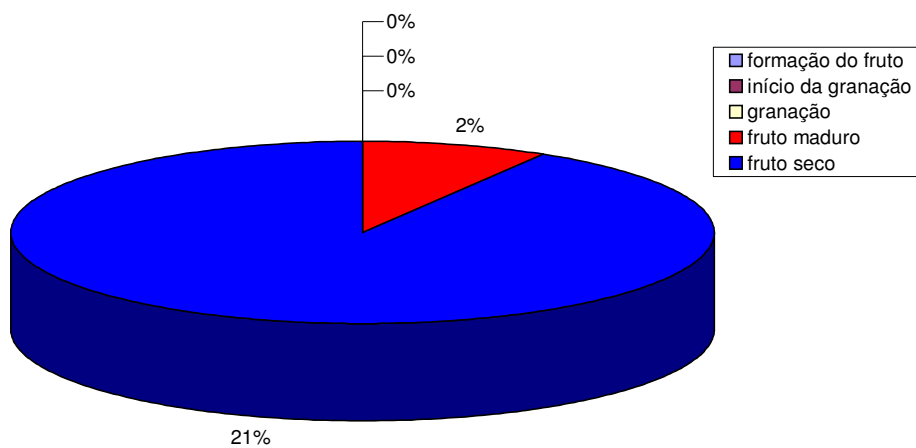


Figura 8: Representação gráfica do total de cascas de amendoim contaminados com *Aspergillus parasiticus* em diferentes fases de maturação do fruto.



Tabela 4: Freqüências absoluta e relativa (%) de isolamentos de fungos em amostras de solo.

<b>Gêneros</b>	<b>Freqüência Absoluta</b>	<b>Freqüência Relativa (%)</b>
<i>Penicillium</i> spp	25	100
<i>Fusarium</i> spp	21	84
<i>A. terreus</i>	19	76
<i>Mucor</i> spp	07	28
F.N.E.	05	20
<i>Cladosporium</i> spp	04	16
<i>A. flavus</i>	02	8
<i>A. niger</i>	02	8
<i>Trichoderma</i> spp	02	8

Tabela 5: Freqüências absoluta e relativa (%) de isolamentos de fungos em amostras de solo por coleta.

<b>FREQUÊNCIA ABSOLUTA (FREQUÊNCIA REALATIVA%)</b>					
<b>Fungos Isolados</b>	<b>1ª coleta</b>	<b>2ª coleta</b>	<b>3ª coleta</b>	<b>4ª coleta</b>	<b>5ª coleta</b>
<i>Penicillium</i> spp	05 (100)	05 (100)	05 (100)	05 (100)	05 (100)
<i>Fusarium</i> spp	05 (100)	03 (60)	04 (80)	05 (100)	04 (80)
<i>A. terreus</i>	05 (100)	04 (80)	03 (60)	04 (80)	03 (60)
<i>Mucor</i> spp	-	01 (20)	04 (80)	01 (20)	01 (20)
F.N.E.	-	05 (100)	-	-	-
<i>Cladosporium</i> spp	01 (20)	02 (40)	-	01 (20)	-
<i>A. flavus</i>	01 (20)	-	-	01 (20)	-
<i>A. niger</i>	-	-	02 (40)	-	-
<i>Trichoderma</i> spp	-	01 (20)	-	01 (20)	-

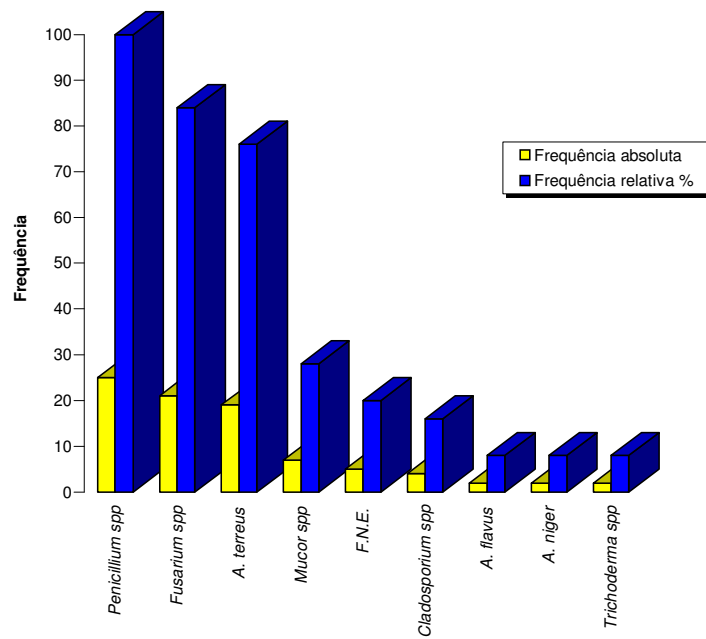


Figura 9: Frequências absoluta e relativa (%) de isolamento de fungos em amostras de solo.

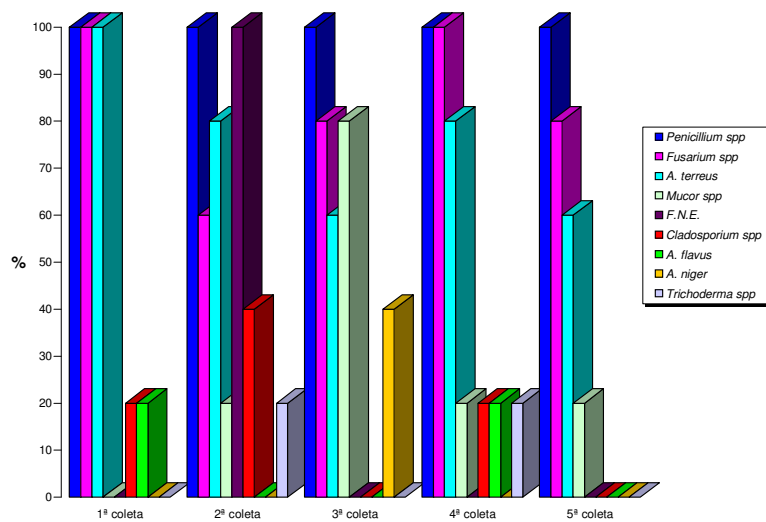


Figura 10: Frequência relativa (%) de isolamento de fungos em amostras de solo nos diferentes estágios de maturação dos frutos de amendoim.

Tabela 6: Unidades formadoras de colônias por grama de solo (UFC/g) dos fungos isolados em diferentes estágios de maturação dos frutos de amendoim.

Coleta	Amostra	Atividade de água	Contaminação Fúngica (UFC/g)								F.N.E.
			<i>A. flavus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. terreus</i>	<i>Penicillium spp</i>	<i>Fusarium spp</i>	<i>Mucor spp</i>	<i>Cladosporium spp</i>	<i>Trichoderma spp</i>	
<b>1<sup>a</sup></b> <b>coleta</b>	1	0,99	-	-	2,5x10 <sup>3</sup>	18,5x10 <sup>3</sup>	1,0x10 <sup>3</sup>	-	-	-	-
	2	1,00	2,0x10 <sup>3</sup>	-	5,0x10 <sup>3</sup>	25,0x10 <sup>3</sup>	5,0x10 <sup>3</sup>	-	1,0x10 <sup>3</sup>	-	-
	3	0,99	-	-	3,0x10 <sup>3</sup>	17,5x10 <sup>3</sup>	1,5x10 <sup>3</sup>	-	-	-	-
	4	0,99	-	-	7,5x10 <sup>3</sup>	22,0x10 <sup>3</sup>	2,5x10 <sup>3</sup>	-	-	-	-
	5	0,99	-	-	9,0x10 <sup>3</sup>	54,0x10 <sup>3</sup>	2,5x10 <sup>3</sup>	-	-	-	-
<b>2<sup>a</sup></b> <b>coleta</b>	1	1,00	-	-	3,5x10 <sup>3</sup>	31,0x10 <sup>3</sup>	1,0x10 <sup>3</sup>	-	0,5x10 <sup>3</sup>	-	4,5x10 <sup>3</sup>
	2	1,00	-	-	-	12,0x10 <sup>3</sup>	5,0x10 <sup>3</sup>	1,0x10 <sup>3</sup>	-	-	3,0x10 <sup>3</sup>
	3	1,00	-	-	3,5x10 <sup>3</sup>	24,5x10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	6,0x10 <sup>3</sup>
	4	1,00	-	-	0,5x10 <sup>3</sup>	21,5x10 <sup>3</sup>	4,0x10 <sup>3</sup>	-	-	-	1,5x10 <sup>3</sup>
	5	1,00	-	-	4,0x10 <sup>3</sup>	34,0x10 <sup>3</sup>	-	-	1,0x10 <sup>3</sup>	0,5x10 <sup>3</sup>	6,5x10 <sup>3</sup>
<b>3<sup>a</sup></b> <b>coleta</b>	1	0,99	-	-	-	10,5x10 <sup>3</sup>	3,5x10 <sup>3</sup>	2,0x10 <sup>3</sup>	-	-	-
	2	0,96	-	-	-	23,0x10 <sup>3</sup>	3,0x10 <sup>3</sup>	3,0x10 <sup>3</sup>	-	-	-
	3	0,87	-	0,5x10 <sup>3</sup>	2,0x10 <sup>3</sup>	63,0x10 <sup>3</sup>	0,5x10 <sup>3</sup>	1,0x10 <sup>3</sup>	-	-	-
	4	0,86	-	-	5,0x10 <sup>3</sup>	22,5x10 <sup>3</sup>	2,0x10 <sup>3</sup>	-	-	-	-
	5	0,98	-	0,5x10 <sup>3</sup>	4,0x10 <sup>3</sup>	40,5x10 <sup>3</sup>	-	1,5x10 <sup>3</sup>	-	-	-
<b>4<sup>a</sup></b> <b>coleta</b>	1	0,99	5,0x10 <sup>3</sup>	-	10x10 <sup>3</sup>	110x10 <sup>3</sup>	20x10 <sup>3</sup>	-	10x10 <sup>4</sup>	-	-
	2	0,99	-	-	-	100x10 <sup>3</sup>	5,0x10 <sup>3</sup>	-	-	-	-
	3	0,99	-	-	15x10 <sup>3</sup>	105x10 <sup>3</sup>	15x10 <sup>3</sup>	-	-	-	-
	4	0,99	-	-	60x10 <sup>3</sup>	130x10 <sup>3</sup>	70x10 <sup>3</sup>	10x10 <sup>3</sup>	-	5,0x10 <sup>3</sup>	-
	5	0,99	-	-	25x10 <sup>3</sup>	105x10 <sup>3</sup>	5,0x10 <sup>3</sup>	-	-	-	-
<b>5<sup>a</sup></b> <b>coleta</b>	1	0,99	-	-	-	11,0x10 <sup>3</sup>	1,0x10 <sup>3</sup>	-	-	-	-
	2	0,99	-	-	-	12,0x10 <sup>3</sup>	2,5x10 <sup>3</sup>	-	-	-	-
	3	0,98	-	-	1,5x10 <sup>3</sup>	25,0x10 <sup>3</sup>	8,0x10 <sup>3</sup>	-	-	-	-
	4	0,99	-	-	1,0x10 <sup>3</sup>	18,0x10 <sup>3</sup>	3,5x10 <sup>3</sup>	-	-	-	-
	5	0,98	-	-	4,5x10 <sup>3</sup>	10,5x10 <sup>3</sup>	-	1,5x10 <sup>3</sup>	-	-	-

F.N.E.: fungo não esporulado

Tabela 7: Frequências absoluta e relativa (%) de isolamentos de fungos em amostras de ar.

<b>Gêneros</b>	<b>Frequência Absoluta</b>	<b>Frequência Relativa (%)</b>
<i>Cladosporium</i> spp	29	58
<i>Mucor</i> spp	11	22
<i>Aspergillus</i> spp	9	18
<i>Neurospora</i> spp	8	16
<i>Rhizopus</i> spp	7	14
<i>Helminthosporium</i> spp	4	8
<i>Penicillium</i> spp	4	8
<i>Sepedonium</i> spp	3	6
<i>Alternaria</i> spp	1	2
<i>Epicocum</i> spp	1	2
<i>Trichoderma</i> spp	1	2
F.N.E.	4	8
<b>Total de exposições: 50</b>		

F.N.E.: fungo não esporulado

Tabela 8: Frequências absoluta e relativa (%) de isolamentos de fungos em amostras de ar por coleta.

FREQUÊNCIA ABSOLUTA (FREQUÊNCIA REALATIVA %)					
Espécies	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	4ª coleta	5ª coleta
<i>Cladosporium</i> spp	1 (10)	8 (80)	3 (30)	9 (90)	8 (80)
<i>Mucor</i> spp	-	3 (30)	8 (80)	-	-
<i>Neurospora</i> spp	5 (50)	2 (20)	-	-	1 (10)
<i>Rhizopus</i> spp	4 (40)	-	-	-	3 (30)
<i>Helminthosporium</i> spp	2 (20)	-	2 (20)	-	-
<i>Penicillium</i> spp	2 (20)	-	-	2 (20)	-
<i>Sepedonium</i> spp	3 (30)	-	-	-	-
<i>Alternaria</i> spp	-	-	-	1 (10)	-
<i>Epicocum</i> spp	-	-	-	-	1 (10)
<i>Trichoderma</i> spp	-	1 (10)	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	1 (10)	-	-	-	-
<i>A. flavus</i>	-	-	-	3 (30)	-
<i>A. parasiticus</i>	2 (20)	-	-	1 (10)	-
F.N.E.	4 (40)	-	-	-	-
Levedura	2 (20)	-	-	2 (20)	-
<b>Total de Exposições: 50</b> (10 de cada coleta)					

F.N.E.: fungo não esporulado

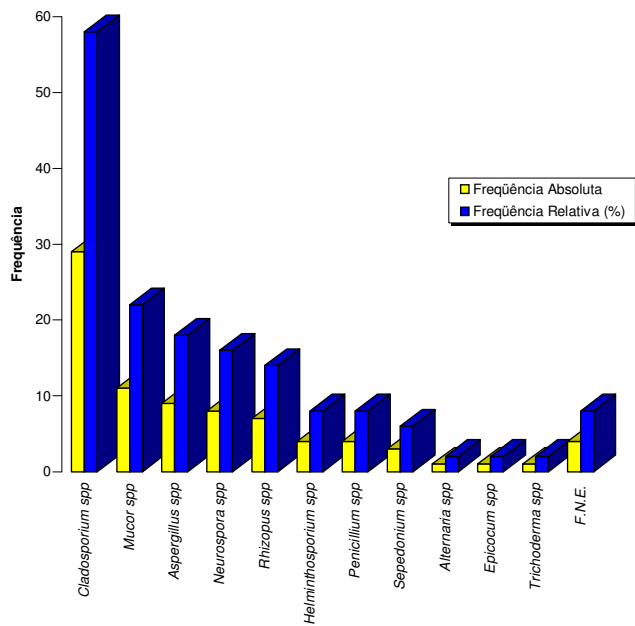


Figura 11: Frequências absoluta e relativa (%) de isolamento de fungos em amostras de ar.

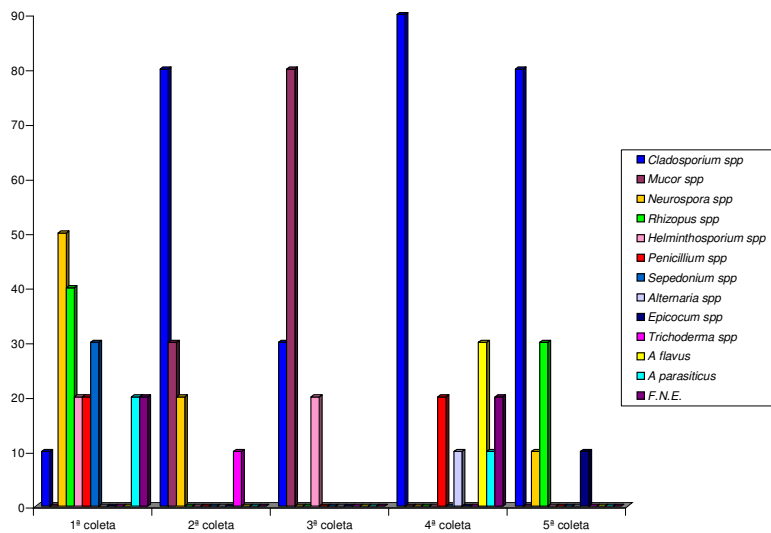


Figura 12: Frequência relativa (%) de isolamento de fungos em amostras de ar nos diferentes estágios de maturação dos frutos de amendoim.

Tabela 9: Valores de temperatura, pH e umidade do solo nos diferentes estágios de maturação do amendoim.

Amostras	1ª coleta			2ª Coleta			3ª coleta			4ª Coleta			5ª Coleta		
	T°C	pH	Um. %	T°C	pH	Um. %	T°C	pH	Um. %	T°C	pH	Um. %	T°C	pH	Um. %
1	26	7	12,5	25	6,8	37,5	23	7,0	3,12	27	6,8	12,5	26	7,0	3,12
2	27	6,8	25	25	6,8	37,5	23	7,0	3,12	27	7,0	3,12	27	7,0	3,12
3	27	6,8	12,5	25	6,8	37,5	25	7,0	3,12	27	7,0	6,25	28	7,0	3,12
4	25	7	12,5	26	6,8	37,5	24	7,0	3,12	27	7,0	3,12	27	7,0	6,25
5	27	7	12,5	26	6,8	37,5	25	7,0	0	28	7,0	3,12	28	7,0	3,12

T °C : Temperatura em °Celsius

Um.%: Umidade relativa do solo em porcentagem

Tabela 10: Regime térmico local (°C) registrado no período de novembro/2004 a março/2005.

Dia	Nov/2004		Dez/2004		Jan/2005		Fev/2005		Mar/2005	
	Tmáx	Tmin	Tmáx	Tmin	Tmáx	Tmin	Tmáx	Tmin	Tmáx	Tmin
1	31	20	33	20	36	23	33	19,5	35	22
2	34	20	33	19	34	22,5	31	20	31	19
3	36	23	32,5	21	27	23	32	21	30,5	19
4	30	19	35	21	25	22,5	32,7	21	32	17
5	29	20	33	21	30	22,5	33	20,9	32	17
6	24	20	35	23,5	29,6	21	30,7	19,5	32	17
7	29	21	29	21	29,6	21	31,3	16,8	35	19
8	31	16	32	22	35	25	30,8	17	36,5	22
9	34,5	18	29	22	32	22,5	32,5	16,7	37	19,5
10	34	22,5	30,5	21,5	32	23	33	18	37,5	22,5
11	27	20	30	18	30	23	33	18,5	39	23,5
12	26	16	30	17	30	21	32	18	38	23,5
13	30	14	32	19	33	20	33	18	35	24
14	31	17	32	20	34	21	32	18	29	25
15	22	19	34	20	35	24,5	34	19,5	27,5	21,5
16	29	21	35	21	31,5	25	34,5	22	30	21
17	29	21	32,5	20,5	31	21,5	37	22	33,5	22
18	28	21,5	32	23	29	23	37,5	23	34,5	23
19	31	21	33	22	31	24	35,5	21	35	20
20	30	14	31	23	27,5	22	35,5	21,5	32	20,5
21	30	17,5	28	22,5	28	23	35	20,5	30	22
22	32,5	16	24	19	36	23	35,5	20,5	30	22
23	34	19	24	18	35	22	37,5	20	33,5	22,5
24	36	22,5	31	17	32,5	21	38	18	28	22
25	25,5	22	34	22	32	24	37	25	31	20
26	37	23,5	26	20	26	21	32,1	22	30,5	18
27	36	24	31	21	24	20	32,5	22,5	31,5	16,4
28	30,5	22	33	19	29	21	34	21,3	33	17,5
29	32	21	35	21,5	29	22,5	-	-	33	20
30	32	20,5	34	22,5	31,5	22	-	-	35	22
31	-	-	34	19	33	22	-	-	34	22
<b>Média</b>	<b>30,7</b>	<b>19,7</b>	<b>31,5</b>	<b>20,5</b>	<b>31</b>	<b>22,3</b>	<b>33,8</b>	<b>20,06</b>	<b>33</b>	<b>19,9</b>



Tabela 11: Regime pluviométrico local (mm) registrado no período de novembro de 2004 a março de 2005.

Dia	Nov/2004	Dez/2004	Jan/2005	Fev/2005	Mar/2005
1	3	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	0	0	4	0	0
4	37	0	5,2	38	0
5	0	75	9	9	0
6	1,4	0	1	21,5	0
7	0	22	6,2	0	0
8	0	25	0	0	0
9	0	8,5	53,5	0	0
10	8	29	1,5	0	0
11	47	2	4	0	0
12	1,5	0	15,4	0	0
13	0	0	2	0	0
14	0	0	0	0	6
15	0	0	0	0	5
16	27	0	0	0	0,5
17	47	17	11	0	0
18	0	0	21	0	0
19	1	14	14	0	0
20	0	4	20,5	0	2
21	0	12	19,5	0	2,5
22	0	3	29,6	0	0,5
23	0	11,5	0	0	0
24	0	0	37,1	0	45
25	0	0	7,5	0	0
26	0	19,5	28	0	0
27	0	2,5	2	0	0
28	6	4	4	6	0
29	0	0	10		0
30	0	0	5		0
31		0	2		0
<b>Total</b>	<b>177</b>	<b>249</b>	<b>312,9</b>	<b>72,8</b>	<b>61,5</b>
<b>Média</b>	<b>5,9</b>	<b>8</b>	<b>10,09</b>	<b>2,6</b>	<b>2,05</b>

Tabela 12: Incidência de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> (µg/kg) em amostras de grãos de amendoim em diferentes estágios de maturação.

Amostras	Aflatoxinas	Formação da vagem	Início da Granação	Granação	Fruto Maduro (colheita)	Após Secagem
1	AFB <sub>1</sub>	ND	ND	18,96	10,711	ND
	AFB <sub>2</sub>	ND	ND	0,347	0,323	ND
	AFG <sub>1</sub>	ND	ND	ND	ND	ND
	AFG <sub>2</sub>	ND	ND	0,169	ND	ND
2	AFB <sub>1</sub>	ND	ND	ND	86,164	ND
	AFB <sub>2</sub>	ND	ND	ND	2,777	ND
	AFG <sub>1</sub>	ND	ND	ND	ND	ND
	AFG <sub>2</sub>	ND	ND	ND	0,341	ND
3	AFB <sub>1</sub>	ND	ND	ND	91,888	579,452
	AFB <sub>2</sub>	ND	ND	ND	1,29	9,528
	AFG <sub>1</sub>	ND	ND	ND	detectado	163,475
	AFG <sub>2</sub>	ND	ND	ND	0,581	25,771
4	AFB <sub>1</sub>	ND	ND	ND	ND	10,191
	AFB <sub>2</sub>	ND	ND	ND	ND	0,254
	AFG <sub>1</sub>	ND	ND	ND	ND	2,15
	AFG <sub>2</sub>	ND	ND	ND	ND	0,228
5	AFB <sub>1</sub>	ND	ND	ND	326,065	35,728
	AFB <sub>2</sub>	ND	ND	ND	5,738	1,872
	AFG <sub>1</sub>	ND	ND	ND	ND	ND
	AFG <sub>2</sub>	ND	ND	ND	0,403	ND

AFB<sub>1</sub>: aflatoxina B<sub>1</sub>; AFB<sub>2</sub>: aflatoxina B<sub>2</sub>; AFG<sub>1</sub>: aflatoxina G<sub>1</sub>; AFG<sub>2</sub>: aflatoxina G<sub>2</sub>

Tabela 13: Incidência de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> (µg/kg) em amostras de cascas de amendoim em diferentes estágios de maturação.

Amostras	Aflatoxinas	Formação da vagem	Início da Granação	Granação	Fruto Maduro (colheita)	Após Secagem
1	AFB <sub>1</sub>	ND	ND	1092,61	23,655	ND
	AFB <sub>2</sub>	ND	ND	detectado	ND	ND
	AFG <sub>1</sub>	ND	ND	detectado	ND	ND
	AFG <sub>2</sub>	ND	ND	ND	1,8	ND
2	AFB <sub>1</sub>	ND	ND	ND	ND	ND
	AFB <sub>2</sub>	ND	ND	ND	ND	ND
	AFG <sub>1</sub>	ND	ND	ND	ND	ND
	AFG <sub>2</sub>	ND	ND	ND	ND	ND
3	AFB <sub>1</sub>	ND	ND	ND	detectado	27,08
	AFB <sub>2</sub>	ND	ND	ND	ND	1,74
	AFG <sub>1</sub>	ND	ND	ND	ND	ND
	AFG <sub>2</sub>	ND	ND	ND	0,949	ND
4	AFB <sub>1</sub>	ND	ND	ND	21,450	ND
	AFB <sub>2</sub>	ND	ND	ND	detectado	ND
	AFG <sub>1</sub>	ND	ND	ND	detectado	ND
	AFG <sub>2</sub>	ND	ND	ND	1,595	ND
5	AFB <sub>1</sub>	ND	ND	ND	585,495	ND
	AFB <sub>2</sub>	ND	ND	ND	9,155	ND
	AFG <sub>1</sub>	ND	ND	ND	48,460	ND
	AFG <sub>2</sub>	ND	ND	ND	ND	ND

AFB<sub>1</sub>: aflatoxina B<sub>1</sub>; AFB<sub>2</sub>: aflatoxina B<sub>2</sub>; AFG<sub>1</sub>: aflatoxina G<sub>1</sub>; AFG<sub>2</sub>: aflatoxina G<sub>2</sub>

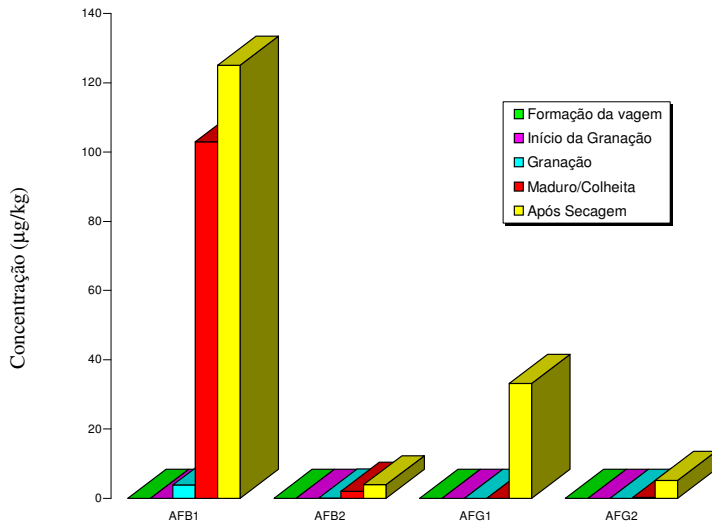


Figura 13: Concentrações ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 em grãos de amendoim em diferentes estágios de maturação.

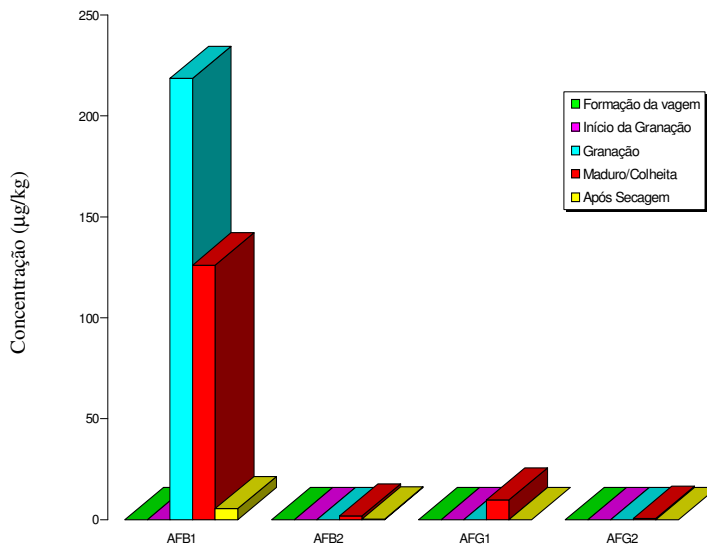


Figura 14: Concentrações ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 em cascas de amendoim em diferentes estágios de maturação

Tabela 14: Incidência de ácido ciclopiazônico ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) em amostras de grãos de amendoim em diferentes estágios de maturação.

Amostras	Formação da vagem	Início da Granação	Granação	Fruto Maduro (colheita)	Após Secagem
1	ND	ND	ND	512	652
2	ND	ND	554	896	ND
3	ND	ND	ND	264	648
4	ND	ND	ND	ND	ND
5	ND	ND	966	1328	ND

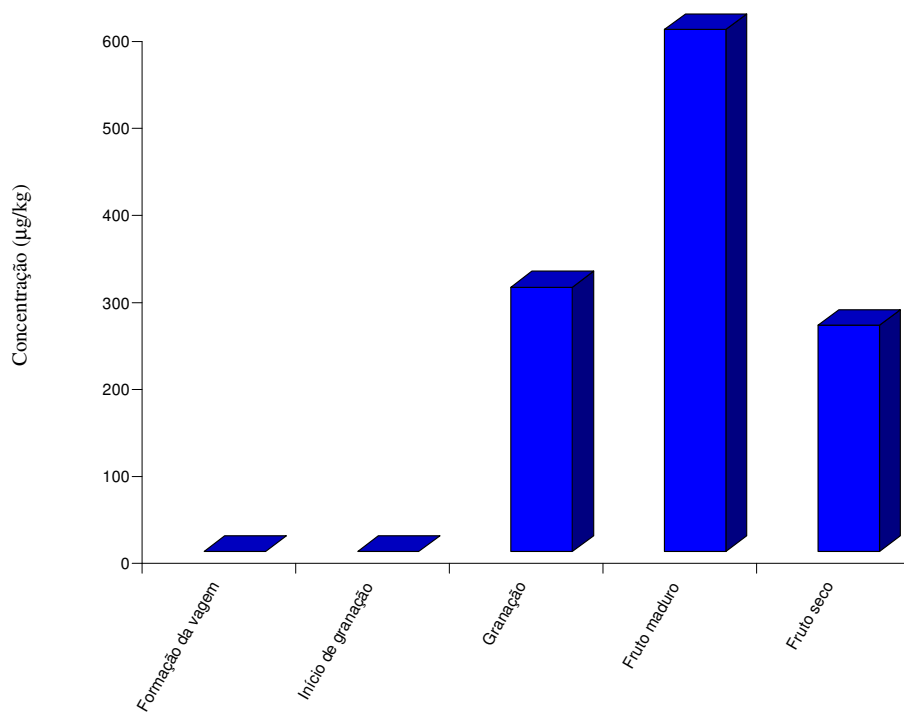


Figura 15: Concentrações (µg/kg) de ácido ciclopiazônico em grãos de amendoim em diferentes estágios de maturação.

Tabela 15: Concentração de aflatoxinas B1 e B2 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) e ácido ciclopiazônico ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de cepas de *A. flavus* isoladas de amostras de sementes plantadas, solo, ar, grãos e cascas de amendoim.

Nº da cepa	Coleta	Material de procedência	AFB <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	ACP
1	1 <sup>a</sup>	Semente	6.700	260	11,85
2	1 <sup>a</sup>	Solo	8,00	ND	ND
3	4 <sup>a</sup>	Solo	ND	ND	ND
4	4 <sup>a</sup>	Ar	20	ND	ND
5	4 <sup>a</sup>	Grão (granação)	ND	ND	ND
6	4 <sup>a</sup>	Grão (granação)	13.900	50	ND
7	4 <sup>a</sup>	Grão (granação)	ND	ND	4,48
8	5 <sup>a</sup>	Grão (maduro)	18.560	150	8,07
9	5 <sup>a</sup>	Grão (maduro)	4.300	220	ND
10	5 <sup>a</sup>	Grão (maduro)	13.390	140	11,16
11	5 <sup>a</sup>	Grão (maduro)	870	60	12,18
12	5 <sup>a</sup>	Grão (maduro)	1.011	110	ND
13	6 <sup>a</sup>	Grão (seco)	600	10	ND
14	6 <sup>a</sup>	Grão (seco)	270	3,00	15,34
15	6 <sup>a</sup>	Grão (seco)	9.130	160	ND
16	3 <sup>a</sup>	Casca (recém-formada)	30	4,00	17,45
17	3 <sup>a</sup>	Casca (recém-formada)	190	1,00	ND
18	4 <sup>a</sup>	Casca (granação)	7.700	200	2,36
19	4 <sup>a</sup>	Casca (granação)	11.460	40	ND
20	5 <sup>a</sup>	Casca (maduro)	87	ND	ND
21	6 <sup>a</sup>	Casca (seco)	8.770	70	ND

AFB<sub>1</sub>: Aflatoxina B<sub>1</sub>; AFB<sub>2</sub>: Aflatoxina B<sub>2</sub>; ACP: Ácido Ciclopiazônico

Tabela 16: Concentração de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> (µg/kg) de cepas de *A. parasiticus* isoladas de amostras de sementes plantadas, solo, ar, grãos e cascas de amendoim.

Nº da cepa	Coleta	Material de procedência	AFB <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	AFG <sub>1</sub>	AFG <sub>2</sub>
1	1 <sup>a</sup>	Ar	24.340	250	300	45
2	4 <sup>a</sup>	Ar	34.300	230	880	220
3	5 <sup>a</sup>	Grão (maduro)	1.300	60	100	30
4	6 <sup>a</sup>	Grão (seco)	5.060	30	1.210	900

AFB<sub>1</sub>: Aflatoxina B<sub>1</sub>; AFB<sub>2</sub>: Aflatoxina B<sub>2</sub>; AFG<sub>1</sub>: Aflatoxina G<sub>1</sub>; AFG<sub>2</sub>: Aflatoxina G<sub>2</sub>



## 6 DISCUSSÃO

O amendoim é uma planta originária da América do Sul, provavelmente da região do Gran Chaco, incluindo os vales do Rio Paraná e Paraguai, sendo uma excelente fonte de proteínas, lipídios e vitaminas ([www.agrobyte.com.br/amendoim.htm](http://www.agrobyte.com.br/amendoim.htm)). É uma planta que se desenvolve em regiões de clima tropical e subtropical, com flores aéreas e frutos subterrâneos (TAKAHASHI, 1997). No Brasil, São Paulo destaca-se como o maior Estado produtor, seguido pelos Estados do Paraná, Rio Grande do Sul, Minas Gerais e Mato Grosso ([www.agrobyte.com.br/amendoim.htm](http://www.agrobyte.com.br/amendoim.htm)).

Sua diversidade na forma de consumo faz com que esta cultura tenha grande importância econômica. Os grãos são consumidos “in natura” ou processados industrialmente (SANTOS et al., 1997), já suas cascas são utilizadas como cama de frangos, cama para gado leiteiro, fonte de fibras para gado de corte entre outros (COLLINS e POST, 1981; LIEN et al., 1998; HILL, 2002).

No Brasil, diversos autores têm pesquisado a ocorrência de aflatoxinas em amendoim e produtos de amendoim comercializados em diversas cidades (FONSECA, 1973, 1975; FONSECA et al., 1991; SCUSSEL e RODRIGUEZ-AMAYA, 1985; SABINO et al., 1989; BRIGIDO et al., 1995; RODRIGUEZ-AMAYA e SABINO, 2002.).

Muitos produtos agrícolas são invadidos por fungos antes, durante e após a colheita, na secagem, transporte e/ou estocagem. Em geral, amendoim, milho, sementes de algodão estão entre os grãos com maior risco de contaminação (ISMAIL, 2000).

O solo da região do plantio, Junqueirópolis, foi avaliado quanto à atividade de água, temperatura, umidade, pH e microbiota fúngica desde o plantio até à colheita (Tabela 9). O pH (neutro) não sofreu qualquer alteração durante o estudo, assim como a atividade de água (média 0,96) (Tabelas 6 e 9). A temperatura do solo sofreu pouca alteração durante as coletas, oscilando entre 23 °C a 28 °C

(Tabela 9), faixa considerada boa para o crescimento da maioria das espécies de fungos toxigênicos bem como para a produção de micotoxinas (SMITH e MOSS, 1985). Já a umidade variou bastante entre as coletas, devido a um período de seca logo após o plantio que se estendeu até a colheita (Tabela 11).

Com relação a microbiota fúngica do solo, nossas análises revelaram alta incidência de *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *A. terreus* e *Mucor* spp (Tabelas 4 e 5; Figuras 9 e 10). Estudos realizados em solos provenientes de outras regiões do Estado de São Paulo, também demonstraram *Penicillium* spp. como o fungo de maior prevalência (ALMEIDA et al., 2002; POZZI et al., 2005). Neste sentido, Klich (1998), isolou várias espécies de *Penicillium*, *Fusarium* e *Aspergillus* em amostras de solo no Arizona e na Califórnia. Em nosso experimento, o isolamento de *A. flavus* nas amostras de solo na 1<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> coletas (Tabela 5; Figura 10), e a presença do fungo nos frutos do amendoim sinalizam o solo com o reservatório primário de *A. flavus* e *A. parasiticus* e, sendo o amendoim um fruto subterrâneo, suas vagens estão diretamente expostas à contaminação (HORN et al., 1994; HORN et al., 2000). A severidade da infecção do amendoim pelo *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* é influenciada pela densidade destes no solo (HORN, 2006).

Analisando os fungos contaminantes do ar, observamos elevada frequência dos gêneros *Cladosporium*, *Mucor* e *Aspergillus* (Tabelas 7 e 8; Figuras 11 e 12). Considerados dominantes universais, estes foram isolados em diversas cidades do Brasil (GAMBALE et al., 1983; ALMEIDA et al., 2002). Na presente investigação, *A. flavus* foi isolado do ar atmosférico durante a 4<sup>a</sup> coleta e *A. parasiticus* na 1<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> coletas (Tabela 8 e Figura 12). O isolamento de *A. flavus* na semente do amendoim utilizada no plantio (1<sup>a</sup> coleta) e no ar atmosférico (4<sup>a</sup> coleta) pode justificar a presença do fungo nas amostras de solo (Tabela 8 e Figura 12).

As flores e o ginóforo não contribuíram para a contaminação dos frutos com *A. flavus* e *A. parasiticus*, uma vez que, destas amostras, somente foi isolado *Fusarium* spp (Tabela 1). Cole et al. (1986), inoculando *A. flavus* nas flores do amendoim, verificaram que suas hifas alcançaram o topo do ovário, sugerindo que

esta seria via natural de contaminação. Já em condições de campo, Griffin et al. (1976) e Cole et al. (1986) verificaram baixa colonização dos frutos do amendoim por *A. flavus* e *A. parasiticus* via flores, sendo pouco significativa quando comparada com a contaminação via solo.

Durante a formação da vagem do amendoim e início da granação, os frutos são constituídos por uma grande quantidade de água. Nestes estágios, encontramos uma alta incidência de *Fusarium* spp., fungo melhor adaptado a substratos com maior disponibilidade de água (HORN, 2005). A não detecção de aflatoxinas e ácido ciclopiazônico nestas amostras (Tabela 12, 13 e 14) vêm ao encontro dos achados de Cole et al. (1985). Segundo os autores, grãos imaturos de amendoim parecem possuir algum mecanismo de resistência, tal como maior conteúdo de água, que inibe o crescimento de *A. flavus* e a produção de aflatoxinas. Nos estágios seguintes, granação e no fruto já maduro, *A. flavus* foi isolado em algumas das amostras analisadas (Tabelas 2 e 3 e Figuras 6 e 7). Nestas amostras, as aflatoxinas foram detectadas tanto nos grãos como nas cascas do amendoim, em concentrações variáveis (Tabelas 12 e 13 e Figuras 13 e 14), enquanto que ácido ciclopiazônico foi detectado somente nos grãos. Dorner et al. (1989) demonstraram que a diminuição do conteúdo de água dos grãos também reduz a capacidade destes de produzir fitoalexinas, resultando em crescimento fúngico e produção de aflatoxinas.

Das 5 amostras de grãos de amendoim maduro recém colhido analisadas, 4 (80%) apresentaram contaminação por aflatoxinas, sendo 3 (60%) delas com níveis acima do limite estabelecido pela legislação (20 ppb) (BRASIL, 1996) (Tabelas 12 e Figura 13). Na presente investigação, a presença de *A. flavus* e *A. parasiticus* também foi constatada após a secagem do amendoim, apesar da diminuição da atividade de água para níveis abaixo do valor mínimo requerido para estas espécies (0,80) (Tabela 2 e 3 e Figuras 6, 7 e 8) (SMITH e MOSS, 1985). Nesta fase, as aflatoxinas foram detectadas em 3 amostras de grãos e em 01 de casca, com níveis acima do permitido pela legislação (BRASIL, 1996) (Tabelas 12 e 13 e Figuras 13 e 14). Segundo Fonseca (2004), a maior ocorrência de aflatoxinas no

amendoim, comparativamente a outros produtos, deve-se a freqüência de fungos aflatoxigênicos bem como a determinados fatores climatológicos, principalmente o retardamento e a freqüência de chuvas no período de secagem após o arranquio (colheita).

Nossos resultados também são concordantes com os obtidos por outros autores, analisando a microbiota fúngica e a ocorrência de micotoxinas no amendoim, durante condições de campo e de armazenamento. Com relação aos fungos, os principais gêneros isolados (*Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*) são considerados os mais importantes do ponto de vista toxigênico. Entre as micotoxinas, as aflatoxinas e ácido ciclopiazônico foram as mais detectadas (HILL et al., 1983; SANDERS et al., 1984; COLE et al., 1986; EL-MAGHRAGY e EL-MARAGHRY, 1987, 1988; LISKER et al., 1993; HORN et al., 1994 e 1995; ANDERSON et al., 1996; SIAME et al., 1998; HORN et al., 2000; ISMAIL, 2000; BHATTACHARYA e RAHA, 2002; VAAMONDE et al., 2003; MPHANE et al., 2004; PILDAIN et al., 2004).

Os menores percentuais de umidade registrados nas amostras de solo (Tabela 9), no período de formação da vagem até a colheita (3<sup>a</sup> a 5<sup>a</sup> coleta), podem ser atribuídos ao período de seca ocorrido na região (Tabela 11). Vale frisar que, durante os estágios de granação e do fruto maduro, foram registrados os menores índices médios de pluviometria de 0,43 a 5,5 mm, respectivamente. A maior contaminação dos frutos do amendoim por *A. flavus* e conseqüente produção de aflatoxinas podem ser atribuídos aos baixos índices pluviométricos registrados no período, especialmente entre a 4<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> semanas de crescimento das vagens (granação e maturação). Tal possibilidade também foi descrita anteriormente por outros autores (TAKAHASHI 1997; ANDERSON et al., 1996; HORN et al., 2000; SANDERS et al., 1984).

Observou-se, pelas análises estatísticas, que a atividade de água foi uma importante variável para contaminação dos grãos maduros com aflatoxinas ( $p < 0,05$  e  $r^2 = 0,85$ ) e que a umidade do solo foi estatisticamente significativa para a contaminação dos grãos em granação e maduro pelo fungo *A. flavus* ( $p < 0,001$ ).

Outros autores não isolaram *A. flavus* e *A. parasiticus* e tampouco aflatoxinas e ácido ciclopiazônico foram detectadas em atividade de água de 0,98 (HORN, 2005; BLANKENSHIP et al., 1984; DORNER et al., 1989). A contaminação por *A. flavus* e *A. parasiticus* apresentou correlação positiva com a presença de aflatoxinas em grãos após a secagem, destacando-se a presença de *A. parasiticus* como um fator muito importante para esta contaminação ( $p < 0,01$  e  $r^2 = 0,90$ ).

Os valores médios de atividade de água nas cascas de amendoim variaram de 0,99 a 0,61, sendo que no estágio de granação ( $a_w = 0,96$ ) e no fruto maduro ( $a_w = 0,90$ ) este fator foi importante para contaminação por *A. flavus* ( $p < 0,05$  e  $r^2 = 0,62$ ). Nas cascas de frutos após a secagem, *A. flavus* não foi isolado, sendo que nestas amostras a média de atividade de água foi de 0,61, valor abaixo do considerado ideal para do crescimento do fungo que é de 0,8 (SMITH e MOSS, 1985). Em cascas de frutos maduros, a atividade de água também foi um fator importante para contaminação por aflatoxinas ( $p < 0,05$  e  $r^2 = 0,75$ ). A análise estatística dos resultados obtidos revelou que a presença de *A. flavus* no solo do local do plantio contribuiu para contaminação das cascas por aflatoxinas nos frutos maduros ( $p < 0,05$  e  $r^2 = 0,80$ ) e que, em todos os estágios de maturação, a contaminação das cascas e dos grãos por aflatoxinas estão relacionadas ( $p < 0,05$  e  $r^2 = 0,90$ ). Sanders et al. (1984), relataram que a contaminação de cascas de amendoim por aflatoxinas estaria relacionada com a presença da toxina nos grãos e que esta contaminação seria proveniente de partes de amendoim presentes nas cascas, fato relacionado com a eficiência dos métodos de remoção das cascas.

O ácido ciclopiazônico foi detectado nos mesmos estágios de maturação onde as aflatoxinas estavam presentes, em concentrações que variaram de 260  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a 600  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Tabela 14 e Figura 15). O máximo de produção de ACP foi detectado em grãos maduros com atividade de água de 0,96 e temperatura do solo de 27 °C (Tabelas 2, 3 e 9 ). A análise estatística mostrou a influência da temperatura do solo na produção de ACP pelo *A. flavus* durante o estágio de maturação dos grãos de amendoim ( $r^2 = 0,48$ ). Em condições experimentais, Vaamonde et al. (2006),

relataram que atividade de água de 0,94 e temperatura de 25 °C são as condições ideais para que *A. flavus* produza ACP, após 28 dias de incubação. Gqaleni et al. (1996), analisando em condições laboratoriais controladas os fatores que influenciam a produção de ACP por *A. flavus*, constataram que a combinação de alta atividade de água e baixa temperatura favorece altas produções de ACP. Por outro lado, níveis reduzidos foram verificados em baixa atividade de água e altas temperaturas. A co-ocorrência de aflatoxinas e ACP em amendoim foi descrita anteriormente por outros autores (GQALENI et al., 1997; FERNÁNDEZ-PINTO et al., 2001; MPHANE et al., 2004; DORNER, 2008), sendo que as condições ótimas para produção destas toxinas pelo *A. flavus* são diferentes (VAAMONDE et al., 2006). As temperaturas ótimas para produções de aflatoxinas e ACP são de 30 °C e 25 °C, respectivamente (GQALENI et al., 1997), isto poderia explicar as concentrações mais altas de ACP que aflatoxinas encontradas neste estudo (Tabelas 12 e 14) onde a média de temperaturas do solo foi  $\leq 27$  °C. A presença de ambas toxinas em alimentos pode ser resultado de efeitos aditivos ou sinérgicos (VAAMONDE et al., 2006).

Cepas de *A. flavus* produtoras de aflatoxinas e ACP foram isoladas de amostras de sementes utilizadas no plantio, solo, ar e frutos do amendoim (grão e cascas), sendo que as cepas isoladas de grãos maduros foram as que apresentaram maior concentração de aflatoxinas (Tabela 15). Outros autores também isolaram cepas de *A. flavus* produtoras de aflatoxinas e ACP de grãos de amendoim diretamente do campo como tanto após o armazenamento (VAAMONDE et al., 2003, 2006; PILDAIN et al., 2004).

Fumonisin B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> não foram detectadas em nenhuma das amostras de amendoim analisadas. A ausência da toxina pode ser atribuída ao reduzido percentual de contaminação do substrato por *Fusarium verticillioides* (Tabela 1, 2 e 3), principal fungo produtor de fumonisin, que foi isolado de grãos somente após a secagem das vagens e em uma amostra das sementes plantadas, bem como aos valores baixos de atividade de água, 0,72 e 0,49 respectivamente. Apesar das duas cepas de *F. verticillioides* isoladas serem produtoras de

fumonisinias, segundo Christensen e Kaufmann (1969, 1974) e Marin et al. (1995), os valores mínimos de atividade de água para o crescimento do fungo variam de 0,80 a 0,90 e para produção da toxina de 0,92 a 0,96. Fumonisinias também não foram detectadas em amostras de amendoim na Botswana e no Japão (SIAME et al., 1998; SUGITA-KONISHI et al., 2006). SANGARE-TIGORE et al., 2006, detectou fumonisinina B1 em 70% das amostras de amendoim analisadas na Costa do Marfim.

As cascas de amendoim analisadas neste trabalho foram utilizadas por granjas da região de Bastos, como cama de frango. Este uso deveria ter sido feito com critério, uma vez que amostras analisadas encontravam-se contaminadas com aflatoxinas e fungos aflatoxigênicos.

A contaminação do amendoim por aflatoxinas e ACP antes da colheita, representa um grande problema econômico para a indústria de alimentos e para saúde humana e animal. Desde a formação do fruto do amendoim até a colheita, condições ambientais ideais para o desenvolvimento de fungos toxigênicos e produção de micotoxinas foram encontradas no campo, portanto boas práticas agrícolas são indicadas para região do estudo, uma vez que o solo e as futuras sementes se encontram contaminadas com *A. flavus* e *A. parasiticus*.

## 7 CONCLUSÕES

- ✓ A presença de *A. flavus* e *A. parasiticus* no solo, ar e sementes plantadas, levaram a contaminação dos frutos do amendoim a partir do estágio de granação, onde também ocorreu o período de seca e alta temperatura na região.
- ✓ As flores e ginóforo não contribuíram para contaminação dos frutos, uma vez que somente foram isolados *Fusarium* spp. destas amostras.
- ✓ A contaminação dos frutos de amendoim por *A. flavus* deve ter ocorrido via solo, uma vez que as vagens são subterrâneas e este fungo foi isolado de amostras de solo.
- ✓ As concentrações de aflatoxinas encontradas nos grãos maduros e após a secagem estavam, na sua maioria, acima do permitido pela legislação.
- ✓ A presença de fungos aflatoxigênicos nos frutos após a secagem representa um risco ao consumo, uma vez que a contaminação ocorreu no campo antes da maturação dos frutos.
- ✓ Apesar de terem sido isoladas duas cepas toxigênicas de *Fusarium verticillioides*, não foram detectadas fumonisinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> nas amostras de grãos e cascas de amendoim analisadas.
- ✓ Boas práticas agrícolas, levando em conta a qualidade das sementes plantadas e a rotação de culturas, são indicadas para região, uma vez que o solo e as futuras sementes se encontram contaminadas com *A. flavus* e *A. parasiticus*.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A. P.; FONSECA, H.; FANCELLI, A. L.; DIREITO, G. M.; ORTEGA, E.M.; CORRÊA, B. Mycoflora and fumonisin contamination in Brazilian corn from sowing to harvest. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, n. 13, p. 3877-3882, 2002.

ANDERSON, W. F.; HOLBROOK, C. C. ; WILSON, D. M. Development of greenhouse screening for resistance to *Aspergillus parasiticus* infection and preharvest aflatoxin contamination in peanut. **Mycopathologia**, n. 135, p. 115-118, 1996.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis**. 3. ed. Washington, D.C.: AOAC, 1980.

AOAC Official Method 991.31. Aflatoxins in corn, raw peanuts and peanut butter. Immunoaffinity column (aflatest) method. **AOAC International**, p. 49.2.18, 2000.

ARX, J. A. **The genera of fungi sporulating in pure culture**. 2. ed. Vaduz: J. Cramer, 1974. 315 p.

ARAÚJO, W. F.; FERREIRA, L. G. R. Efeito do déficit hídrico durante diferentes estágios do amendoim. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 32, n. 5, p. 481-184, 1997.

BABABUNMI, E. A. Toxins and carcinogens in the environment: na observation in the tropics. **J. Toxicol. Environ. Health**, v. 4, p. 691-699, 1978.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated Genera of Imperfect Fungi**. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1965. 232 p.

BARRON, G. L. **The Genera of Hyphomycetes from soil**. New York: Robert E. Krieger Publishing Company, 1972. 364 p.

BENNET, J. W.; FERNHOLZ, F. A. Effect of light on aflatoxins, anthraquinones, and sclerotia in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Mycologia**, v. 70, p. 106-16, 1978.

BERJAK, P. Report of seed storage committee working group on the effects of storage fungi on seed viability. 1980-1983. **Seed Sci. Technol.**, v. 12, p. 233-253, 1984.

BHATTACHARYA, K.; RAHA, S. Deteriorative changes of maize, groundnut and soybean seeds by fungi in storage. **Mycopathologia**, v. 155, p. 135-141, 2002.

**De acordo com:**

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NRB 6023**: Informações e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BILGRAMI, K. S.; SINHA, K. K. Aflatoxins: their biological effects and ecological significance. In: **HANDBOOK of applied mycology: mycotoxins in ecological systems**. New York: Marcel Dekker, 1992. v. 5, p. 59-78.

BLANKENSHIP, P. D.; COLE, R. J.; SANDERS, T. H.; HILL, R. A. Effect of geocarposphere temperature on pre-harvest colonization of drought-stressed peanuts by *Aspergillus flavus* and subsequent aflatoxin contamination. **Mycopathologia**, v. 85, n. 1-2, p. 69-74, 1984.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Leis e Decretos. Portaria no. 183, de 21 de março de 1996. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 25 de mar. 1996. Seção 1, p. 4929.

BRIGIDO, B. M.; BADOLATO, M. I. C.; FREITAS, V. P. S. Contaminação de amendoim e seus produtos comercializados na região de Campinas –SP, por aflatoxinas durante o ano de 1994. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 55, p. 85-90, 1995.

BULLERMAN, L. B. Significance of mycotoxins to food safety and human health. **J. Food Protect.**, v. 42, n. 1, p. 65-86, 1979.

CALORI-DOMINGUES, M. A.; FONSECA, H. Laboratory evaluation of chemical control of aflatoxin production in unshelled peanuts (*Arachis hypogaea* L.). **Food Addit. Contam.**, v. 12, n. 3, p. 347-350, 1995.

CHAN, D.; MacDONALD, S. J.; BOUGHTFLOWER, V.; BRERETON, P. Simultaneous determination of aflatoxins and ochratoxin A in food using a fully automated immunoaffinity column clean-up and liquid chromatography-fluorescence detection. **J. Chromat. A.**, v. 1059, p. 13-16, 2004.

CHATTERJEE, D.; MUKHERJEE, S. K.; DEY, A. Nuclear disintegration in chicken peritoneal macrophages exposed to fumonisin B<sub>1</sub> from Indian maize. **Let. Appl. Microbiol.**, v. 20, p.184-185, 1995.

CHRISTENSEN, C. M.; KAUFMANN, H. H. **Grain storage: the role of fungi quality loss**. Minneapolis: University Minnesota Press, 1969.

CHRISTENSEN, C.M.; KAUFMANN, H.H. Mycoflora. In: CHRISTENSEN, C.M. (Ed.). **Storage of Cereal Grains and Their Products**. Minnesota: American Association of Cereal Chemists, 1974. p.158-192.

COLE, R. J.; SANDERS, T. H.; HILL, R. A.; BLANKENSHIP, P. D. Mean geocarposphere temperatures that induce preharvest aflatoxin contamination of peanuts under drought stress. **Mycopathologia**, v. 91, n. 1, p. 41-46, 1985.

COLE, R. J.; HILL, R. A.; BLANKENSHIP, P. D. ; SANDERS, T. H. Color mutants of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in a study of preharvest invasion of peanuts. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 52, n. 5, p. 1128-1131, 1986.

COLLINS, J. L.; POST, A. R. Peanut hull flour as a potencial source of dietary fiber. **J. Food Sci.**, v. 46, p. 445-448 e 451, 1981.

COULOMBE, R. A. Aflatoxins. In: SHARMA R. P.; SALUNKHE, D. K. (Ed.). **Mycotoxins and Phytoalexins**. London: CRC Press, 1991. p. 103-144.

DALVI, R. R. Miscellaneous mycotoxins. In: SHARMA, R. P.; SALUNKHE, D. K. (Ed.). **Mycotoxins and Phytoalexins**. Londres: CRC Press, 1991. p. 775.

DELP, R. B.; STWELL, L. J.; MAROIS, J. J. Evaluation of field sampling techniques for estimation of disease incidence. **Phytopathology**, v. 76, p. 1299-1305, 1986.

De IONGH, H.; BEERTHUIS, R. K.; VLES, R. Q.; BARRET, C. B.; ORD, W. O. Investigation of the factor in groundnut meals responsible for "turkey X disease". **Bioch. Biophys. Acta**, v. 65, p. 548-551, 1962.

DIAZ, G. J.; BOERMANS, H. J. Fumonisin toxicosis in domestic animals: a review. **Vet. Hum. Toxicol.**, v.36, n. 6, p. 548-555, 1994.

DORNER, J. W.; COLE, R. J.; SANDERS, T. H.; BLANKENSHIP, P. D. Interrelationship of kernel water activity, soil temperature, maturity, and phytoalexin production in preharvest aflatoxin contamination of drought-stressed peanuts. **Mycopathologia**, v. 105, n. 2, p. 117-128, 1989.

DORNER, J. W. Management and prevention of mycotoxins in peanuts. **Food Addit. Contam.**, v. 25, n. 2, p. 203-208, 2008.

ELLIS, M. B. **Dematiaceous Hyphomycetes**. Wallingford, U. K.: CAB International, 1993. p. 608.

EL-MAGHRABY, O. M. O.; EL-MARAGHY, M. Mycoflora and mycotoxins of peanuts (*Arachis hypogaea* L.) seeds in Egypt. I- sugar fungi and natural occurrence of mycotoxins. **Mycopathologia**, v. 98, p. 165-170, 1987.

EL-MAGHRABY, O. M. O.; EL-MARAGHY, M. Mycoflora and mycotoxins of peanuts (*Arachis hypogaea* L.) seeds in Egypt. III- cellulose-decomposing and mycotoxins-producing fungi. **Mycopathologia**, v. 104, p. 19-24, 1988.

FAGUNDES, M. H. **Sementes de amendoim**: alguns comentários. Disponível em <[www.conab.gov.br](http://www.conab.gov.br)>. Acesso em: 28 ago. 2006.

FERNÁNDEZ-PINTO, V. E.; PATRIARCA, A.; LOCANI, O.; VAAMONDE, G. Natural co-occurrence of aflatoxin and cyclopiazonic acid in peanuts growth in Argentina. **Food Addit. Contam.**, v. 18, p. 1017-1020, 2001.

FONSECA, H. Ocorrência de aflatoxina em farelo de amendoim (*Arachis hypogaea* L) na região de Sorocabana, Estado de São Paulo. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v. 30, p. 423-439, 1973.

FONSECA, H. Ocorrência de aflatoxina em farelos de amendoim na região Araraquarense, Estado de São Paulo. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v. 32, p. 7-19, 1975.

FONSECA, H.; VALARINI, I.; CALORI-DOMINGUES, M. A.; WETTSTEIN, A. S. R.; SILVA, A. E. G. Ocorrência de aflatoxina em amendoim, no Estado de São Paulo, durante os anos de 1988 e 1989. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v. 48, p. 301-316, 1991.

FONSECA H. Prevenção e controle de micotoxinas em produtos agrícolas. **Boletim Técnico nº 07**. Disponível em <[www.micotoxinas.com.br](http://www.micotoxinas.com.br)>. Acesso em: 17 nov. 2004a.

FONSECA H. A aflatoxina e o amendoim. **Boletim Técnico nº 13**. Disponível em <[www.micotoxinas.com.br](http://www.micotoxinas.com.br)>. Acesso em: 17 nov. 2004b.

GAMBALE, W. **Ação de fatores abióticos na dispersão aérea de fungos**. Tese (doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1980.

GAMBALE, W., PURCHIO, A., PAULA, C. R. Ação de fatores abióticos na dispersão aérea de fungos na cidade de São Paulo, Brasil. **Rev. Microbiol.**, v. 14, p. 204-214, 1983.

GELDERBLOM, W. C. A. ; MARASAS, W. F. O. ; VLEGGAR, R. ; THIEL, P. G. ; CAWOOD, M. E. - Fumonisin: isolation, chemical characterization and biological effects. **Mycopathologia**, v. 117, p. 11-6, 1992.

GOTO, T.; SHINSHI, E.; TANAKA, K.; MANABE, M. Analysis of cyclopiazonic acid by normal phase high-performance liquid chromatography. **Agric. Biol. Chem.**, v. 51, n. 9, p. 2581-2582, 1987.

GQALENI N.; SMITH, J. E.; LACEY, J. Co-production of aflatoxins and cyclopiazonic acid in isolates of *Aspergillus flavus*. **Food Addit. Contam.**, v. 13, p. 677-685, 1996.

GQALENI, N.; SMITH, J. E.; LACEY, J.; GETTINBY, G. Effects of temperature, water activity, and incubation time on production of aflatoxins and cyclopiazonic acid by na isolate of *Aspergillus flavus* in surface agar culture. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, n. 3, p. 1048-1053, 1997.

GRIFFIN, G. J.; GARREN, K. H. Colonization of aerial peanut pegs of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* group fungi under field conditions. **Phytopathology**, v. 66, p. 1161-1162, 1976.

HENRY, M. H.; WYATT, R. D. The toxicity of fumonisin B1, B2 and B3, individually and in combination, in chicken embryos. **Environ. Health**, v. 80, p. 401-407, 2001.

HARTLEY, R. D.; O'KELLY, J. Toxicity and fluorescence properties of aflatoxins. **Nature**, p. 196:1001, 1963.

HAYASHI, Y.; YOSHIZAWA, T. Analysis of cyclopiazonic acid in corn and rice by a newly developed method. **Food Chem.**, v. 93, p. 215-221, 2005.

HILL, R. A.; BLANKESHIP, P. D.; COLE, R. J. e SANDERS, T. H. Effects of soil moisture and temperature on preharvest invasion of peanuts by *Aspergillus flavus* group and subsequent aflatoxin development. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 45, n. 2, p. 628-33, 1983.

HILL, G. M. Peanut by-products fed to cattle. **Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.**, v. 18, n. 2, p. 295-315, 2002.

HORN, B. W.; DORNER, J. W.; GREENE, R. L.; BLANKENSHIP, P. D.; COLE, R. J. Effect of *Aspergillus parasiticus* soil inoculum on invasion of peanut seeds. **Mycopathologia**, v. 125, p. 179-191, 1994.

HORN, B. W.; GREENE, R. L.; DORNER, J. W. Effect of corn and peanut cultivation a soil populations of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in Souhwestern Georgia. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, n. 7, p. 2472-75, 1995.

HORN, B. W.; GREENE, R. L.; SORENSEN, R. B.; BLANKENSHIP, P. D.; DORNER, J. W. Conidial movement of nontoxigenic *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in peanut fields following application to soil. **Mycopathologia**, v. 151, n. 81-92, 2000.

HORN, B. W. Colonization of wounded peanuts seeds by soil fungi: selectivity for species from *Aspergillus* section *Flavi*. **Mycologia**, v. 97, n. 1, p. 202-217, 2005.

HORN, B. Relationship between soil densities of *Aspergillus* species and colonization of wounded peanut seeds. **Can. J. Microbiol.**, v. 52, p. 951-960, 2006.

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

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Aflatoxins**: Natural occurring aflatoxinas (Group 1), aflatoxin M<sub>1</sub> (Group 2B). Lyon: IARC Scientific Publications, 1993. n. 56, p. 245.

ISMAIL, M. A. Deterioration and spoilage of peanuts and desiccated coconuts from two sub-saharan tropical East African countries due to the associated mycobiota and their degradative enzymes. **Mycopathologia**, v. 150, p. 67-80, 2000.

JOHNSON, V. J.; SHARMA, R. P. Gender-dependent immunosuppression following subacute exposure to fumonisin B<sub>1</sub>. **Int. Immunopharmacol.**, v. 1, p. 2023-2034, 2001.

KLICH, M. A. M. Soil fungi of some low-altitude desert cotton fields and ability of their extracts to inhibit *Aspergillus flavus*. **Mycopathologia**, v. 142, p. 97-100, 1998.

KAMALAVENKATESH, P.; VAIRAMUTHU, S.; BALACHANDRAN, C.; MANOHAR, B. M.; RAJ, G. D. Immunopathological effect of the mycotoxins cyclopiazonic acid and T-2 toxin on broiler chicken. **Mycopathologia**, v. 159, n. 2, p. 273-279, 2005.

LANDSEN, J. A. Liquid chromatographic analysis system for cyclopiazonic acid in peanuts. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 67, n. 4, p. 728-731, 1984.

LEGATOR, M. Biological effects of aflatoxin in cell culture. **Bacteriol. Rev.**, v. 30, p. 471-7, 1966.

LIEN, R. J.; HESS, J. B.; CONNER, D. E.; WOOD, C. W.; SHELBY, R. A. Peanut hulls as a litter source for broiler breeder replacement pullets. **Poult. Sci.**, v. 77, p. 41-46, 1998.

LIN, M. L.; DIANESE, L. C. A coconut agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus spp.* **Phytopathology**, v. 66, p. 1466-69, 1976.

LISKER, N.; MICHAELI, R.; FRANK, Z. R. Mycotoxigenic potential of *Aspergillus flavus* strains isolated from groundnuts growing in Israel. **Mycopathologia**, v. 122, p. 177-183, 1993.

LOSITO, I.; MONACI, L.; ARESTA, A.; ZAMBONIN, C. G. LC-ion trap electrospray MS-MS for determination of cyclopiazonic acid in milk samples. **Analyst**, p. 499-502, 2002.

MAGNOLI, C. E.; SAENZ, M. A.; CHIACCHIERA, S. M.; DALCERO, A. M. Natural occurrence of *Fusarium* species and fumonisin-production by toxigenic strains isolated from poultry feeds in Argentina. **Mycopathologia**, v. 145, p. 35-41, 1999.

MARASAS, W. F. O Fumonisin: Their Implication for Human and Animal Health **Nat. Toxins**, v. 3, p. 193-198, 1995.

MARÍN, S.; SANCHIS, V.; VINAS, I.; CANELA, R.; MAGAN, N. Effect of water activity and temperature on growth and fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* on maize grain. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 21, p. 298-301, 1995.

MARTIN, J. P. Use of acid rose Bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. **Soil Sci.**, v. 69, p. 215-232, 1950.

MARTINS, R. Amendoim: monitoramento da cadeia de produção. **Análise e indicadores dos agronegócios**. Disponível em: <www.iea.sp.gov.br>. Acesso em 28 ago. 2006a.

MARTINS, R. Amendoim: perspectivas de aumento da produtividade até 2010. **Análise e indicadores dos agronegócios**. Disponível em: <www.iea.sp.gov.br>. Acesso em: 28 ago. 2006b.

MARTINS, R. Amendoim: perspectivas para safra 2007/2008. **Análise e indicadores dos agronegócios**. Disponível em: <www.iea.sp.gov.br>. Acesso em: 28 jan. 2008.

MOSS, M. O. Mycotoxic fungi. In: ELEY, A. R. (Ed.). **Microbial Food Poisoning**. 2. ed. London: Chapman, 1996. p.75-93.

MOTTA, S.; SOARES, L. M. V. Simultaneous determination of tenuazonic and cyclopiazonic acids in tomato products. **Food Chem.**, v. 71, p. 111-116, 2000.

MOTTA, S.; SOARES, L. M. V. Survey of brazilian tomato products for alternariol, alternariol monomethyl ether, tenuazonic and cyclopiazonic acids. **Food Addit. Contam.**, v. 18, n. 7, p. 630-634, 2001.

MPHANE, F. A.; SIAME, B. A.; TAYLOR, J. E. Fungi, aflatoxin and cyclopiazonic acid associated with peanut retailing in Botswana. **J. Food Protect.**, v. 67, n. 1, p. 96-1002, 2004.

NAKAI, V. K.; ROCHA, L. O.; GONÇALEZ, E.; FONSECA, H.; ORTEGA, E. M. M.; CORRÊA, B. Distribution of fungi and aflatoxins in a storage peanut variety. **Food Chem.**, v. 106, p. 285-290, 2008.

NESBITT, B. F.; O'KELLY, J.; SARGEANT, K.; SHERIDAN, A. Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. **Nature**, v. 195, p. 1062-63, 1962.

NELSON, P. E.; TOUSON, T. A.; MARASAS, W. F. O. **Fusarium species. An illustrated manual for identification**. Pennsylvania: University Press, 1983. p. 193.

NEWBERNE, P. M.; BUTLER, W. H. Acute and chronic effects of aflatoxin on the liver of domestic and laboratory animals: a review. **Cancer Res.**, v. 29, p. 236-250, 1969.

NORRED, W.P. Liquid chromatographic determination of cyclopiazonic acid in poultry meat. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 70, n. 1, p. 121-126, 1987.

NORRED, W. P.; RILEY, R. T. Toxicology and mechanism of action of selected mycotoxins. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS: MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS IN PERSPECTIVE AT

THE TURN OF MILLENIUM, 10., 2000, Guarujá. **Proceedings...** Northerlands: Ponsen Looyen, 2001. p. 211-222.

OFFIAH, N.; ADESIYUM, A. Occurrence of aflatoxins in peanuts, milk, and animal feed in Trinidad. **J. Food Prot.**, v. 70, n. 3, p. 771-775, 2007.

OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1996.

OLIVEIRA, C. A.; ROSMANINHO, J.; ROSIM, R. Aflatoxin M1 and cyclopiazonic acid in fluid milk traded in São Paulo, Brazil. **Food Addit. Contam.**, v. 23, n. 2, p. 196-201, 2006.

ORSI, R. B.; CORRÊA, B.; POSSI, C. R.; SCHAMMASS, E. A.; NOGUEIRA, J. R.; DIAS, S. M. C.; MALLOZZI, M. A. B. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. **J. Stored Prod. Res.**, v. 36, p. 75-87, 2000.

PASTER, N.; BULLERMAN, L. B. Mould spoilage and mycotoxins formation in grains as controlled by physical means. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 7, p. 257-265, 1988.

PILDAIN, M. B.; VAAMONDE, G. ; CABRAL, D. Analysis of population structure of *Aspergillus flavus* peanut based on vegetative compatibility, geographic origin, mycotoxin and sclerotia production. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 93, p. 31-40, 2004.

PITT, J. I.; KING, A. D.; HOCKING, A. D. Dchloran-rose Bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 37, p. 959-970, 1979.

POZZI, C. R.; BRAGHINI, R.; ARCARO, J. R.; ZORZETE, P.; POZAR, I. O.; DENUCCI, S. ; CORREA, B. Mycoflora and occurrence of alternariol and alternariol monomethyl ether in Brazilian sunflower from sowing to harvest. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 53, n. 14, p. 5824-5828, 2005.

RAO, B. L.; HUSAIN, A. Presence of cyclopiazonic acid in kodo millet (*Paspalum scrobiculatum*) causing "Koda poisoning" in man and its production by associated fungi. **Mycopathologia**, v. 89, p. 177-180, 1985.

RAPER, K.B.; FENNEL, D.I. **The genus Aspergillus**. Baltimore: Willians Wilkins, 1965. p. 686.

REDDY, V. R. et al. Devepopmental Effects of Fumonisin B<sub>1</sub> in Mice. **Mycopathology**, v. 134, p. 161-166, 1996.

RIDELL, R. W. Permanent stained mycological preparations obtained by slid culture. **Mycologia**, v. 42, p. 265-270, 1950.



RILEY, R. T. Liquid Chromatographic Determination of sphinganine and Sphingosine: Use of the Free Sphinganine-to-Sphingosine Ratio as a Biomarker for Consumption of Fumonisin. **J. AOAC Int.**, v. 77, n. 2, p. 544-540, 1994.

RILEY, R. T.; WANG, E.; SCHROEDER, J. J.; SMITH, E. R.; PLATTNER, R. D.; ABBAS, H.; YOO, H. S.; MERRILL, A. H.; Evidence for Disruption of Sphingolipid Metabolism as a Contributing Factor in The Toxicity and Carcinogenicity of Fumonisin. **Nat. Toxins**, v. 4, n. 1, p. 3-15, 1996.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; SABINO, M. Mycotoxins Research in Brazil: The Last Decade in Review. **Braz. J. Microbiol.**, v. 33, p. 1-11, 2002.

ROSS, P. F.; NELSON, H. A.; RICHARD, J. L.; PLATTNER, R. D.; RICE, L. G.; OSWEILER, G. D.; WILSON, T. M. Production of fumonisin by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and pulmonary edema syndrome swine. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, p. 3224-3226, 1990.

ROSS, P. F.; RICE, L. G.; PLATTNER, R. D.; OSWEILER, G. D.; WILSON, T. M.; OWENS, D. L.; NELSON, H. A. ; RICHARD, J. L. Concentrations of fumonisin B<sub>1</sub> in feeds associated with animal health problems. **Mycopathologia**, v. 114, p. 129-135, 1991.

SABINO, M.; ZORZETTO, M. A. P.; PEDROSO, M. O.; MILANEZ, T. V. Incidência de aflatoxinas em amendoim e produtos de amendoim consumidos na Cidade de São Paulo, durante o período de 1980 a 1987, **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 49, p. 41-44, 1989.

SANCHEZ, E.; HEREDIA, N.; GARCIA, S. Inhibition of growth and mycotoxins production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* by extracts of *Agave* species. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 98, p. 271-278, 2004.

SANDERS, T. H.; BLANKENSHIP, P. D.; COLE, R. J. ; HILL, R. A. Effect of soil temperature and drought on peanut pod and stem temperature relative to *Aspergillus flavus* invasion and aflatoxin contamination. **Mycopathologia**, v. 86, p. 51-54, 1984.

SANGARE-TIGORI, B.; MOUKHA, S.; KOUADIO, H. J.; BETBEDER, A. N.; DANO, D. S.; CREPPY, E. E. Co-occurrence of aflatoxin B<sub>1</sub>, fumonisin B<sub>1</sub>, ochratoxin A and zearalenone in cereals and peanuts from Côte d'Ivoire. **Food Addit. Contam.**, v. 23, n.10, p. 1000-1007, 2006.

SANTOS, R. C.; MELO, P. A.; BRITO, S. F. M. ; MORAES, J. S. Fenologia de genótipos de amendoim dos tipos botânicos valência e Virgínia. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 32, n. 5, p. 481-184, 1997.

SCUSSEL, V. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Teores de aflatoxinas em amendoim e seus produtos comercializados na cidade de Campinas em 1980-1982. **Bol. Soc. Brás. Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 19, p. 109-119, 1985.

SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em alimentos**. São Paulo: Insular, 1998. p. 19-22.

SHARMA, R. P.; SALUNKHE, D. K. Introduction to mycotoxins. In: SHARMA, R. P.; SALUNKHE, D. K. (Ed.). **Mycotoxins and Phytoalexins**. Londres: CRC Press, 1991. p. 775.

SIAME, B. A.; MPUCHANE, S. F.; GASHE, B. A.; ALLTEY, J. ; TEFFERA, G. Occurrence of aflatoxins, fumonisin B<sub>1</sub> and zearalenone in foods and feeds in Botswana. **J. Food Protect.**, v. 61, n. 12, p. 1670-1673, 1998.

SILKER, J. H.; ELLIOTT, R. P. Ecologia Microbiana de los Alimentos. **Acribia**, v.1, p.74-96, 1980.

SMITH, J. E.; HENDERSON, R. S. **Mycotoxins and animal foods**. London: CRC Press, 1991. p.816-841.

SMITH, J. E.; MOSS, M. O. **Mycotoxins, formation, analysis and significance**. London: John Wiley, 1985. p. 10-31.

STEINHART, C. E.; DOYLE, M. E.; COCHRANE, B. **A Food safety**. New York: Marcel Dekker, 1996. p. 376-394.

SUGITA-KONISHI, Y.; NAKAJIMA, M.; TABATA, S.; ISHIKUNO, E.; TANAKA, T.; NORIZUKI, H.; ITOH, Y.; AOYAMA, K.; FUJITA, K.; KAI, S.; KMAGAI, S. Occurrence of aflatoxins, ochratoxin A and fumonisin retail foods in Japan. **J. Food Protect.**, v. 69, n. 6, p. 1365-1370, 2006.

SWANSON, K. M.; BUSTA, F. F.; PETTERSON, E. H.; JOHNSON, M. G. Colony Count Methods. In: VANDEZANT, C.; SPLITTOESSER, D. S. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. New York: American Public Health Association, 1992.

SYDENHAM, E. W.; SHEPHARD, G. S.; THIEL, P. G.; STOCKENSTROM, S.; SNIJMAN, P. W. Liquid chromatographic determination of fumonisins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>3</sub> in corn: AOAC – IUPAC colaborativy study. **J. Assoc. Chem. Int.**, v. 79, n. 3, p. 688-696, 1996.

TAKAHASHI, H. Infection and aflatoxin contamination by *Aspergillus flavus* in groundnuts. In: **TEXTBOOK for group training course in mycotoxin inspection in food**. Japan: JICA, 1997. p. 4.1-4.21.

TARIN, A.; ROSELL, M. G.; GUARDINO, X. Use of high-performance liquid chromatography to assess airborne mycotoxins aflatoxins and ochratoxin A. **J. Chromatogr. A.**, v. 1047, p. 235-240, 2004.

TOLLESON, W. H. et al. Fumonisin B<sub>1</sub> induces apoptosis in cultured human keratinocytes through sphinganine accumulation and ceramide depletion. **Int. J. Oncol.**, v. 14, n. 5, p. 833-843, 1999.

URANO, T.; TRUCKSESS, M. W.; BREAYER, R. W.; WILSON, D. M.; DORNER, J. W.; DOWELL, F. E. Co-ocurrence of cyclopiazonic acid and aflatoxins in corn and peanuts. **J. AOAC Int.**, v. 75, n. 5, p. 838-841, 1992.

VISCONTI, A.; SOLFRIZZO, M.; GIROLAMO, A. Determination of fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in corn and corn flakes by liquid chromatography with immunoaffinity column cleanup: collaborative study. **Food Chem. Contam.**, v. 84, p. 1828-1837, 2001.

VAAMONDE, G.; PATRIARCA, A.; PINTO, V. F.; COMERIO, R. ; DEGROSSI, C. Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus section flavi* from different substrates in Argentina. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 88, n. 79-84, 2003.

VAAMONDE, G.; PATRIARCA, A.; PINTO, V. F. Effects of water activity and temperature on production of aflatoxin and cyclopiazonic acid by *Aspergillus flavus* in peanuts. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 571, p. 225-235, 2006.

WANG, E.; NORRED, W. P.; BACON, C. W.; RILEY, R. T.; MERRIL JR., A. M. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 1486-90, 1991.

WEIBKING, T. S.; LEDOUX, D. R.; BERMUDEZ, A. J.; TURK, J. R. e ROTTINGHAUS, G. E. Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B<sub>1</sub>, on the young broiler chick. **Poult. Sci.**, v. 72, p. 456-466, 1993.

YAMAMOTO, K. Sampling for aflatoxin analysis. In: **TEXTBOOK for group training course in mycotoxin inspection food**. Japan: JICA, 1997. p. 8.1-8, 53.

YOSHISAWA, T. General View on Mycotoxins. In: **TEXTBOOK for Group Training Course in Mycotoxin Inspection in Food**. Japan: JICA, 1997. p. 5-1 – 5-22.

YU, F. L.; BENDER, W.; GERONIMO, I. H. Base and sequence specificities of aflatoxin B<sub>1</sub> binding to single and double-stranded DNAs. **Carcinogenesis**, v. 11, p. 475-478, 1990.

ZERINGUE JR., H. J.; BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T.E. C<sub>15</sub>H<sub>24</sub> volatile compounds unique to aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, p. 2264-2270, 1993.