DANIELLE DINIZ ATAYDE

**MICROBIOTA FÚNGICA E DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINAS
EM CULTIVAR DE AMENDOIM PLANTADO EM DIFERENTES
REGIÕES PRODUTORAS NO ESTADO DE SÃO PAULO**

Dissertação apresentada ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção de Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Benedito Corrêa.

SÃO PAULO

2009

RESUMO

ATAYDE, D. D. **Microbiota fúngica e determinação de aflatoxinas em cultivar de amendoim plantado em diferentes regiões produtoras no Estado de São Paulo.** 2009. 121 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Os principais objetivos do presente trabalho foram: identificar a microbiota fúngica e a ocorrência de aflatoxinas em cultivar de amendoim (Runner IAC 886), identificar a microbiota fúngica do solo e correlacionar os resultados obtidos com os níveis de atividade de água encontrados nas amostras analisadas. As amostras de solo e amendoim foram provenientes de quatro regiões produtoras no Estado de São Paulo: Jaboticabal, Rosália, Tupã e Cafelândia. A microbiota fúngica do solo, realizada pela técnica de Semeadura em Superfície em Meio de Martin, revelou que o fungo do gênero *Penicillium* foi o mais frequente (52,1%) nas quatro regiões avaliadas durante as duas coletas (após a emergência das plantas e duas semanas antes do arranquio). Dentro do gênero *Aspergillus*, *A. flavus* foi a espécie mais frequente (13,5%). A microbiota fúngica dos grãos e das cascas do amendoim, das quatro regiões estudadas, nas duas coletas (duas semanas antes do arranquio e após o arranquio), realizada pela técnica de Semeadura Direta em Meio AFPA (Ágar *Aspergillus flavus-parasiticus*), demonstrou maior frequência de isolamento do fungo do gênero *Fusarium* (70,2%). Do gênero *Aspergillus*, a espécie *A. flavus* foi a mais frequente (9,8%) em todas as regiões estudadas. A análise de aflatoxinas, dos grãos e cascas de amendoim, realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), revelou a presença de aflatoxinas em 5% das amostras de grãos analisadas, com níveis que variaram de 1,0 µg/kg a 12,7 µg/kg. Nas cascas, 13,75% das amostras analisadas apresentaram contaminação por aflatoxinas, em concentrações que variaram de 1,0 µg/kg a 117,8 µg/kg. Das 160 amostras de grãos e cascas analisadas nos dois períodos de coleta, 3,75% apresentaram contaminação por aflatoxinas com níveis acima do limite estabelecido pela legislação dos Ministérios da Saúde e da Agricultura para a somatória das aflatoxinas B₁ + B₂ + G₁ + G₂ (20 µg/kg).

Palavras-chave: Amendoim. Solo. Microbiota fúngica. Atividade de água. *Aspergillus flavus*. Aflatoxinas.

ABSTRACT

ATAYDE, D. D. **Mycoflora and determination of aflatoxins in peanut variety grown in different producing regions in the State of Sao Paulo.** 2009. 121 p. Master thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The main objectives of the present study were: to identify the mycoflora and the occurrence of aflatoxins in a peanut variety Runner IAC 886, identify the soil mycoflora and compare the acquired results with the levels of water activity found in the analyzed samples. The samples of peanut and soil were collected from four producing regions in the State of Sao Paulo: Jaboticabal, Rosália, Tupã and Cafelândia. The mycoflora of the soil, according to the method of Surface Sowing in Martin medium, revealed that the genus *Penicillium* was the most frequent (52.1%) in the four regions surveyed during the two trials (after the emergence of the plants and two weeks before the uprooting). Within the genus *Aspergillus*, *A. flavus* was the most frequent specie (13.5%). The mycoflora of the kernels and peanut hulls, from the four regions studied in the two trials (two weeks before the uprooting and after the uprooting), analyzed by the Direct Seeding method using the AFPA medium (*Aspergillus flavus-parasiticus* Agar), demonstrated greater frequency of isolation of the genus *Fusarium* (70.2%). Within the genus *Aspergillus*, *A. flavus* was the most frequent specie (9.8%) in all regions studied. The analysis of aflatoxins, in kernels and peanut hulls, carried out by high performance liquid chromatography (HPLC), revealed the presence of aflatoxins in 5% of the kernels samples analyzed, with levels ranging from 1.0 to 12.7 µg/kg. In peanut hulls, 13.75% of the samples analyzed presented aflatoxin contamination, at concentrations ranging from 1.0 to 117.8 µg/kg. Of the 160 samples of kernels and peanut hulls covered in the two collection periods, 3.75% were contaminated with aflatoxin levels above the limit set by the law of the Ministries of Health and Agriculture for the sum of aflatoxins B₁ + B₂ + G₁ + G₂ (20 µg/kg).

Keywords: Peanut. Soil. Mycoflora. Water activity. *Aspergillus flavus*. Aflatoxins.

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 História e Cultura do Amendoim

O amendoim é considerado uma planta natural da América do Sul (CÂMARA, 1998; KOKALIS-BURELLE et al., 1997), mais especificamente originado na região dos vales dos rios Paraná e Paraguai, no antigo lago do Gran Chaco (GILLIER e SILVESTRE, 1970).

Os indígenas foram responsáveis pela difusão inicial do amendoim, ao qual chamavam de “mandubi” ou “mandobim” em algumas tribos, ou de “manobi” em outras (MARTIN, 1987), às regiões da América do Sul, levando-o às ilhas do mar das Antilhas e possivelmente à América Central e também ao México (PEIXOTO, 1972). Desta forma, o grão já era conhecido e utilizado pelos índios brasileiros muito antes dos portugueses chegarem ao Brasil em 1500 (MARTIN, 1987).

Em 1578 foi registrada por Jean de Lery a primeira referência sobre o amendoim, na qual relatava a viagem de franceses pelo Nordeste brasileiro, onde conviveram com índios do Maranhão e, nesta oportunidade, experimentaram pela primeira vez o “manobi”. Posteriormente, os colonizadores portugueses adaptaram seu nome para “amendoim” por serem semelhantes às amêndoas em relação ao paladar. Assim surgiu o nome atual, amendoim (MARTIN, 1987).

Gradualmente a planta foi levada para outras colônias portuguesas da África e da Ásia, sendo valorizada e bastante consumida. Assim, o amendoim brasileiro foi apresentado a outros países da Europa e os ingleses levaram algumas sementes para os Estados Unidos (MARTIN, 1987). Os espanhóis o disseminaram nas costas do Oceano Pacífico e posteriormente para as Filipinas de onde foi levado para a China, Japão e Índia (CÂMARA, 1998).

1.2 Características do Amendoim

O amendoim é uma planta dicotiledônia, pertencente à família *Leguminosae*, subfamília *Papilionoideae* e ao gênero *Arachis*. É anual, herbácea, pubescente, de porte ereto ou rasteiro. O modo de frutificação da planta é bem característico, pois embora suas flores sejam aéreas, os frutos são subterrâneos (CÂMARA, 1998). O período de florescimento da planta tem início cerca de 3 - 4 semanas após sua emergência. Flores podem surgir até próximo do período final do ciclo. Aproximadamente uma semana após a fecundação da flor,

o tecido situado na base do ovário começa a crescer e o ovário se torna uma estrutura alongada e pontiaguda, chamada ginóforo ou “esporão”, que trás os óvulos na sua extremidade. Este, apresentando geotropismo positivo, encaminha-se para o solo onde penetra, e sua extremidade então começa a se espessar, dando início ao desenvolvimento do fruto e das sementes. Esse período de início da frutificação tem aproximadamente 40 - 50 dias, no qual, ocorre a fase de desenvolvimento dos frutos e de maturação, evoluindo até a colheita (CÂMARA, 1998). Na maturação das sementes, deve-se levar em conta que em uma mesma planta as vagens não ficam maduras simultaneamente; a vagem madura apresenta manchas escuras na parte interior das cascas, sendo que nas vagens ainda verdes esta parte interna apresenta-se branca (MARTIN, 1987).

1.3 Cultivo do Amendoim

O amendoim, como a maioria das culturas econômicas, requer a interação de condições adequadas ao seu bom desenvolvimento, a fim de controlar doenças e garantir a qualidade do produto. O solo rico em nutrientes não seria suficiente se os fatores climáticos fossem adversos, mostrando que a interação entre clima e solo tem um papel extremamente relevante no processo produtivo de uma cultura (MARTIN, 1987).

O amendoim pode ser cultivado em diversos tipos de solos, principalmente em arenosos, que são mais leves e profundos, sendo a leveza muito importante para facilitar a entrada do “esporão” que formará o fruto. Portanto, o solo bem arejado, que permite a boa drenagem da água, é o ideal para a cultura do amendoim. As melhores condições de germinação são atingidas quando 30 - 55% da porosidade são ocupadas pelo ar (MARTIN, 1987).

Em relação à umidade, é importante que o tempo esteja seco durante a época de colheita. A temperatura ideal para a germinação das sementes situa-se entre 23 e 24 °C, sendo que entre 30 e 33 °C o processo ocorre rapidamente e em altas porcentagens. Porém, nesta faixa, embora o florescimento seja abundante, a produção de frutos diminui bastante (MARTIN, 1987).

Quando a colheita do amendoim se concentra nos meses de janeiro e fevereiro, têm-se a colheita “das águas”, devido à grande frequência de chuvas nestes meses; e quando ocorre nos meses de maio a julho, têm-se a safra “da seca” devido ao predomínio de ambiente mais seco (CÂMARA, 1998). Geralmente, no Estado de São Paulo, o maior volume de produção de amendoim é proveniente da safra denominada “das águas”, sendo uma situação

desfavorável à obtenção de amendoim adequadamente seco, pois o maior teor de umidade acarretará maiores problemas de contaminação durante o armazenamento (FONSECA, 2006b).

O processo de arranquio da planta pode ser realizado mecanicamente ou manualmente, sempre evitando o desperdício de frutos, que podem continuar dentro da terra (MARTIN, 1987).

Depois de colhidas, as plantas são enleiradas para o processo de secagem, considerada uma das mais importantes operações (MARTIN, 1987), já que as vagens, no momento do arranquio, contêm cerca de 40% de umidade. O intervalo de 22 – 20 até 11% de umidade é um período crítico, pois se houver demora da secagem nesta fase, a probabilidade de contaminação fúngica do amendoim será maior. Desta forma, abaixo de 20% de umidade o amendoim deve ser seco o mais rapidamente possível até 11%, umidade ideal para que o amendoim seja armazenado (FONSECA, 2006b).

Após a secagem as ramas das vagens são retiradas em um processo de batedura, que pode também ocorrer mecanicamente, ou manualmente. As vagens então são limpas e ensacadas para o armazenamento (MARTIN, 1987).

Os armazéns devem ser bem secos e ventilados, protegidos de ratos e de diversos tipos de pragas que podem atacar o grão. Além desses cuidados, as pilhas de sacas não devem ser muito altas, pois seu peso pode danificar os amendoins das sacas de baixo, quebrando algumas sementes (MARTIN, 1987).

A eficiência no planejamento das atividades relacionadas à produção de amendoim, como a época adequada ao plantio, pode certamente influenciar o rendimento e, consequentemente, o lucro dos agricultores.

1.4 Cultivar “Runner IAC 886”

A cultivar de amendoim mais plantada atualmente em São Paulo é a Runner IAC 886 (Figura 1), que descende da multilinha Florunner, de origem americana. As sementes foram cedidas em 1970 pelo programa de melhoramento da Flórida (EUA) e introduzidas na coleção de germoplasma do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) com o número 886 (IAC, 2003).

Em condições-padrão de cultivo para amendoins rasteiros, principalmente quando as doenças foliares são eficientemente controladas, esta cultivar supera as médias de IAC Caiapó em 9% a 11%, podendo ultrapassar 6.500 kg/hectare (potencial produtivo). Em experimentos

comparativos a outras cultivares genericamente denominadas “runners” (sementes sem origem definida encontradas regionalmente com produtores), a Runner IAC 886 apresentou produtividade média entre 10% e 27% superior a esses materiais (IAC, 2003).

A cultivar Runner IAC 886 é de hábito de crescimento rasteiro. Suas plantas diferem das de IAC Caiapó (também do grupo rasteiro) por apresentarem folhagem de tonalidade ligeiramente mais escura e haste principal mais destacada. Nas condições de São Paulo, seu ciclo, do plantio à maturação é, em média, de 130 dias. É suscetível às manchas castanha e preta e à ferrugem; comparativamente a cultivares eretos precoces conhecidos, apresenta moderada resistência à mancha-barrenta e moderada suscetibilidade à verrugose. As vagens são uniformes, apresentam baixa reticulação e produzem duas sementes com película clara, de tonalidade rosada. Em condições normais de cultivo, sua “renda” varia entre 18 e 20 kg de grãos/25 kg em casca (IAC, 2003).

Figura 1: Cultivar Runner IAC 886 (INSTITUTO AGRÔNOMICO DE CAMPINAS, março/2008).

O porte de planta e o ciclo mais longo são características típicas de cultivares do grupo rasteiro e trazem vantagens ao produtor nos sistemas mais avançados. Plantas rasteiras possuem arquitetura mais adequada para a colheita totalmente mecanizada. Para São Paulo e regiões de clima semelhante, o ciclo ao redor de 130 dias propicia que se evite a colheita no

período mais chuvoso. Além do alto potencial produtivo, Runner IAC 886 produz grãos que atendem integralmente aos quesitos para o padrão comercial “runner”, o mais difundido no mercado internacional, nos aspectos físicos (tamanho, uniformidade, cor da película) e químicos (relação de ácidos graxos oléico / linoléico entre 1,6 e 1,8, em média) (IAC, 2003).

1.5 Importância econômica

A semente de amendoim, além de ser utilizada no consumo alimentício, também é altamente importante para a indústria de óleo. O óleo bruto refinado, resultado do processamento do grão, pode ser consumido na alimentação humana ou também utilizado na indústria de conservas e de produtos medicinais na indústria farmacêutica (CÂMARA, 1998). O óleo mais grosseiro, de segunda, pode ser usado como combustível para lâmpadas dos mineiros, e também na indústria de sabões (MARTIN, 1987).

O óleo do amendoim representa 45 a 50% do volume das sementes (SANTOS e GODOY, 1999), sendo que o bagaço resultante é transformado na chamada “torta de amendoim”. Posteriormente, a partir dessa torta é formado o farelo, de grande valor nutritivo (alta porcentagem de proteínas) e comercial, destinado à alimentação animal (MARTIN, 1987), e também utilizado como adubo orgânico em culturas perenes, como o café e citros (CÂMARA, 1998). Assim, dentro da produção mundial de grãos de amendoim, 60% são destinados à extração de óleo e os 40% restantes são utilizados como alimento humano (SANTOS, 2000).

O amendoim possui um inestimável valor cultural, econômico, nutritivo e energético, sendo que cada 100 g do grão fornecem 580 calorias (CONAB, 2007). Dentre as oleaginosas cultivadas no mundo, o amendoim é a quarta mais produzida, atrás apenas da soja, algodão e colza (canola). Seu óleo contribui com 10% da produção mundial, sendo o quinto mais consumido (SANTOS, 2000).

As ramas da planta apresentam valor nutritivo na forma de forragem, sendo ricas em minerais e proteínas. A casca do amendoim possui de 6 a 7% de proteína, além de apresentar nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre em sua composição. A semente é constituída de 22 - 33% de proteína, 43 - 54% de materiais graxos, 10 - 16% de carboidratos, 3 - 4% de fibras, 1 - 3% de minerais, além de vitaminas B1, B2, niacina, e E. O óleo de amendoim também possui uma grande quantidade de proteínas, variando de 45 a 50% (CÂMARA, 1998).

Atualmente o amendoim é cultivado em larga escala na Índia, China, África, nos Estados Unidos, Indonésia, e em diversos países da América Latina, entre os quais o Brasil (MARTIN, 1987), sendo a China e a Índia os maiores produtores.

O Brasil possui plenas condições naturais (solo e clima) para produzir amendoim de boa qualidade. Dentro do Estado de São Paulo, a produção ocorre em duas regiões distintas: a região Norte – Noroeste, representada pelos municípios de Ribeirão Preto, Jaboticabal, Sertãozinho e Dumont e a região Sul - Sudoeste, representada pelos municípios de Marília, Tupã, Lins e Pompéia (CÂMARA, 1998). O restante da produção brasileira está no Paraná, Rio Grande do Sul, Minas Gerais e Mato Grosso (AGROBYTE, 2005).

A produção do amendoim brasileiro, além de atender o mercado interno, também é motivada pela oportunidade de exportação do grão, apresentando uma exigência cada vez maior quanto à qualidade do produto (IAC, 2003).

O Estado de São Paulo, maior produtor nacional do grão, em 2008 respondeu por cerca de 80% da produção nacional e 70% do total da área plantada. Segundo as previsões e estimativas de safra do Instituto de Economia Agrícola (IEA), em 2008, a safra paulista de amendoim foi caracterizada pelo aumento de produtividade (Figura 2). A produção do amendoim das águas, que representou 88% do total, foi 28% superior ao volume produzido em 2007. Esse percentual de aumento é composto pelo incremento na produção das principais regionais agrícolas produtoras. Já para a safra da seca o aumento da produção foi de 32,5%, porém reflete uma elevação concentrada nas regionais agrícolas de Presidente Prudente, Marília, Lins e Dracena. Por outro lado, somando-se as duas safras, a área plantada foi 10% superior em relação a 2007 (IEA, 2008).

Figura 2: Produtividade Média do Amendoim, Estado de São Paulo, 2000-2008. Fonte: IEA, 2008.

Se na safra 2006/07 as condições climáticas não favoreceram as lavouras de amendoim, na safra 2007/08 essa variável contribuiu para o bom andamento das etapas de produção desde o plantio até a colheita, e, em conjunto com o patamar tecnológico adotado e os investimentos disponíveis, formaram condições favoráveis para os bons resultados alcançados em 2008, que se refletem nas exportações das principais mercadorias da cadeia de produção do amendoim paulista (IEA, 2008).

Das mercadorias da cadeia de produção do amendoim (amendoim em casca, amendoim descascado, amendoim preparado, óleo bruto e outros óleos de amendoim), no período de janeiro a setembro de 2008, as exportações de amendoim descascado representaram 67% do volume total e cerca de 52% do total em valores exportados. Em comparação ao ano anterior, o volume exportado em 2008, no período janeiro a setembro, foi 32% superior, porém quando se consideram valores para o mesmo período, nota-se aumento de 104%. Essa relação mostra a continuidade da dinâmica do último ano de maior valorização deste produto, tanto que as informações de 2008 comparadas a 2006 apontam redução de 22 % no volume exportado e incremento de 73% no total em valores (Figura 3) (IEA, 2008).

Figura 3: Exportações de amendoim descascado, Estado de São Paulo, Jan. a Set. de 2002-2008. Fonte: IEA, 2008.

Se o mercado externo sinaliza a valorização do produto, no mercado interno o movimento dos produtos derivados de amendoim está estimado em torno de R\$ 1,1 bilhão ao ano. Em 2007 foram vendidas 55 mil toneladas de paçocas e pés-de-moleque, numa evolução

média de 8,5% nos últimos cinco anos. Esse aquecimento em parte é reflexo da inserção de produtos do chamado consumo *on-the-go*, trabalhados pela indústria confeitaria, que envolve embalagens individuais e porções fracionadas (SILVA, 2008), bem como o estabelecimento de um novo patamar tecnológico e de qualidade presente em todos os elos da cadeia de produção do amendoim paulista (IEA, 2008).

As estratégias do setor de processamento industrial e o comportamento do consumidor nacional, assim como as condições do mercado externo, têm influenciado a produção agrícola e os preços praticados no mercado interno. Em setembro de 2007, quando se iniciaram os preparativos para a safra 2007/08, os preços recebidos pelos produtores registravam alta de 15,76%, permanecendo em alta até fevereiro de 2008, com variação mensal entre 5,15% e 14,60%. Março de 2008, mês de colheita do amendoim das águas, registrou queda de 21,01% e tendência de elevação nos meses seguintes, encerrando setembro com alta de 0,83%. Esse panorama mostra que os estoques de passagem do amendoim encontram-se mais elevados em comparação aos níveis existentes no início do plantio da safra 2007/08. Outra variável importante, o custo de produção da safra 2008/09, foi estimado em R\$ 2.812,94/ha para as variedades eretas e em R\$ 3.027,51/ha para as variedades rasteiras. Em comparação à safra anterior houve aumento impulsionado principalmente pelos preços das sementes e dos fertilizantes, além do custo com as operações de máquinas puxado pelo óleo diesel (IEA, 2008).

A safra paulista 2008/09 de amendoim obteve resultados próximos aos alcançados na safra 2007/08, porém a dinâmica de produção do grão respondeu também a outras variáveis, dentre elas a disponibilidade de terras atrelada à renovação dos canaviais e de pastagens, bem como a oferta de financiamento aos produtores e não mais importante, mas fundamental, às condições climáticas favoráveis especialmente nas etapas de plantio e colheita.

1.6 Microbiota Fúngica

Os alimentos, independentemente de sua origem, apresentam uma microbiota natural extremamente variável, concentrada principalmente na região superficial. Os fungos e as bactérias são os microrganismos de maior destaque, tanto como agentes potenciais de deterioração do produto, ou como eventuais patógenos do homem. Porém, nas diversas etapas de processamento, os alimentos estão sujeitos à contaminação por diversos outros microrganismos que não fazem parte desta microbiota natural (LEITÃO, 1988).

Em relação ao ambiente onde vivem, os fungos foram divididos por Burgess et al. (1981) em fungos do solo, que habitam partes subterrâneas e aéreas inferior das plantas, fragmentos de vegetais e compostos orgânicos depositados no solo, fungos do ar, encontrados nas partes superiores das plantas além de fungos do solo e do ar, que colonizam ambos os ambientes.

Os fungos são os mais numerosos dentre os patógenos do amendoim, envolvendo aproximadamente 50 gêneros (KOKALIS-BURELLE et al., 1997). O desenvolvimento destes microrganismos não ocorre somente no campo, mas também durante o processo de formação das sementes, na colheita, nas fases de secagem, beneficiamento e armazenamento (ROSSETTO et al., 2005); e ainda no manuseio e transporte até o consumidor (SANTOS et al., 2001). O impacto econômico da invasão fúngica inclui a diminuição do poder de germinação, emboloramento visível, descoloração, odor desagradável, perda de matéria seca, aquecimento, cozimento, mudanças químicas e nutricionais com consequente perda da qualidade, produção de micotoxinas, tornando-os impróprios para o consumo (CHRISTENSEN, 1982; PASTER e BULLERMAN, 1988).

O solo é um reservatório primário de muitos fungos, inclusive os do gênero *Aspergillus* (SMITH e ROSS, 1991). Em sementes de amendoim, são frequentemente detectados fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Fusarium*, além de *Alternaria*, *Nigrospora*, *Trichoderma*, *Dothiorella* e *Pestalotia* (ROSSETTO et al., 2005).

No Brasil, Prado et al. (1999) analisaram grãos de amendoim provenientes de Campinas e constataram a incidência dos seguintes gêneros: *Penicillium* (50%), *Geothrichum* (50%), *Fusarium* (12,5%) e *Cladosporium* (12,5%).

Rossetto et al. (2005), analisando grãos de amendoim armazenados provenientes de Seropédica, RJ, verificaram a presença dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus* e *Cladosporium* na microbiota fúngica das amostras.

Nakai et al. (2008) analisaram a microbiota fúngica de amostras de amendoim (cultivar Runner IAC 886) armazenados (cascas e grãos), provenientes de Tupã, Estado de São Paulo, Brasil. Os resultados mostraram uma predominância de *Fusarium* spp. (67,7% nas cascas e 25,8% nos grãos) e de *Aspergillus* spp. (10,3% nas cascas e 21,8% nos grãos), e a presença de outros cinco gêneros de fungos filamentosos. *A. flavus* foi isolado tanto nas cascas (10,3%) como nos grãos (21,2%).

Gonzalez et. al. (2008a) pesquisaram a microbiota fúngica de amostras de grãos de amendoim (cultivar Runner IAC 886) e de solo, provenientes de Junqueirópolis, Estado de São Paulo, Brasil. Os resultados mostraram uma prevalência de *Fusarium* spp. e *Aspergillus*

flavus em, respectivamente, 26% e 17% das amostras de grãos de amendoim analisadas. Nas amostras de solo, os gêneros *Penicillium* e *Fusarium* foram os mais frequentemente detectados, e *A. flavus* foi detectado em 8% das amostras analisadas.

Gonçalves et. al. (2008b) pesquisaram também a microbiota fúngica de amostras de cascas de amendoim (cultivar Runner IAC 886), provenientes de Junqueirópolis (SP, Brasil). Os principais fungos isolados foram *Fusarium* spp. (78,75%), *Rhizopus* spp. (14,1%) e *A. flavus* (11,75%).

1.6.1 *Aspergillus* spp.

O gênero *Aspergillus* foi descrito pela primeira vez pelo botânico italiano Pier Antonio Micheli em 1729 (MACKENZIE, 1988).

As espécies de *Aspergillus* são microrganismos cosmopolitas, capazes de colonizar uma grande variedade de substratos (LAFORET, 2008). Em geral, são frequentes em climas tropicais e subtropicais, comumente implicados na deterioração de alimentos (TANIWAKI e SILVA, 2001). Muitos possuem importância ecológica, genética, capacidade de exportação biotecnológica, sem falar de seus aspectos patogênicos e micotoxicológicos relacionados com o homem e com os animais (POWELL et al., 1994).

Em relação à taxonomia, o *Aspergillus* spp. é agrupado à divisão *Deuteromycotina*, à classe dos *Hyphomycetes*, à ordem *Moniliales*, e à família *Moniliaceae*. São fungos caracterizados pelo desenvolvimento de colônias coloridas e brilhantes e por produzir conídios em cabeças típicas, do tipo “mop-like” (escovão) (PITT e HOCKING, 1997).

Aspergillus flavus e *Aspergillus parasiticus* compreendem duas das espécies mais importantes do gênero, e são frequentemente detectados em sementes de amendoim. Apresentam colônias caracteristicamente verdes a amarelas-oliva, embora eventualmente possam apresentar-se amarelas puras, tornando-se acizentadas com a idade (PITT e HOCKING, 1997).

A contaminação do amendoim por *A. flavus* e *A. parasiticus* é considerado um problema mundial, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. Pode ocorrer no campo, por via sistêmica, pela flor, ou diretamente pela parede das vagens durante seu desenvolvimento no interior do solo (ROSSETTO et al., 2003). Ocorre também frequentemente na etapa de armazenamento (KOKALIS-BURELLE et al., 1997).

Os conidióforos de *Aspergillus flavus* e de *A. parasiticus* surgem a partir de hifas vegetativas septadas. As fiálides podem surgir diretamente de uma vesícula globosa (condição

unisseriada) ou a partir da métula que envolve a superfície da vesícula (condição bisseriada). A vesícula, a métula quando presente, as fiálides, e as cadeias de conídios compreendem a cabeça conidial, que no *A. parasiticus*, é predominantemente unisseriada, enquanto no *A. flavus*, a seriação é mais variável (KOKALIS-BURELLE et al., 1997).

1.7 Atividade de Água

A atividade de água (Aa) é um conceito físico-químico, introduzido por Scott (1957) ao demonstrar a relação da Aa nos alimentos e a habilidade dos microrganismos se desenvolverem neles. Assim, a Aa é um fator intrínseco de grande importância na manutenção ou degradação de alimentos (PITT e HOCKING, 1997).

A atividade de água de um alimento é descrita por Taniwaki e Silva (2001), refletindo a quantidade de água livre disponível, ou seja, a água não comprometida com ligações químicas, dissolução de solutos e outros. A facilidade com que a porção fracamente ligada pode ser removida depende do conteúdo de água do substrato (LACEY, 1988).

A expressão de disponibilidade de água pode ser obtida através do conteúdo de água, atividade de água (Aa) ou potencial de água (y). A Aa é a mais largamente utilizada em estocagem e em microbiota de alimentos, e o y em microbiologia de alimentos (LACEY, 1988).

A Aa pode ser definida como a relação entre a pressão de vapor de água de um determinado substrato e a pressão de vapor de água pura, nas mesmas condições, sendo expresso da seguinte maneira:

$Aa = p / p_0$, onde p é a pressão de vapor da solução, e p_0 é a pressão de vapor do soluto (TROLLER et al., 1984).

A disponibilidade de água no substrato determina quais microrganismos são capazes de se desenvolver, além da taxa de germinação dos esporos e subsequente crescimento, suas interações com outros fungos, habilidade em produzir esporos e atividades metabólicas (LACEY, 1988; TROLLER et al., 1984).

A água disponível para o desenvolvimento fúngico em grãos pode ser resultado de uma secagem inadequada antes do processo de armazenamento. A deterioração dos grãos por insetos pode aumentar a temperatura durante sua atividade metabólica, transportando a água para diversas partes do grão (CHRISTENSEN e KAUFMANN, 1974).

Os valores de Aa oscilam entre 0 e 1, sendo 1 o valor encontrado na água pura (Quadro 1). Todos os fungos toxigênicos apresentam valores mínimo, ótimo e máximo para

seu crescimento (JAY, 1994); e a maioria cresce em uma atividade de água de 0,85 (TANIWAKI e SILVA, 2001).

Quadro 1: Valores de atividade de água em diferentes substratos e valores mínimos para o desenvolvimento de alguns fungos.

Aa	Substratos e Fungos
1,0	Água pura
0,99	Meios micológicos clássicos
0,98	Água do mar
0,97	<i>Penicillium veridicatum</i> e maioria dos fungos da madeira
0,95	Pães e alguns basidiomicetos
0,92	<i>Rhizopus</i> spp.
0,90	Presunto, <i>Neurospora crassa</i> , <i>Trichotecium roseum</i>
0,87	<i>Fusarium verticillioides</i>
0,85	<i>Saccharomyces rouxii</i> em solução salina, salame
0,80	<i>Aspergillus flavus</i> e <i>Penicillium citrinum</i>
0,75	Solução saturada de cloreto de sódio e <i>Aspergillus candidus</i>
0,65	Glicerol 22 molar
0,60	<i>S. rouxii</i> (em solução com açúcar) e <i>Monascus</i>
0,58	Esporos de algumas espécies de <i>Eurotium</i> , <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> , capazes de sobreviver por alguns anos
0,55	Solução de glicose saturada e DNA desnaturado
0,48	Vales áridos do Continente Antártico

Fonte: Carlile e Watkinson, 1994; Leitão, 1988.

Os níveis mínimos de atividade de água para o desenvolvimento dos principais fungos toxigênicos são 0,78 para *A. flavus* (Quadro 2), 0,80 para *Penicillium citrinum*, e 0,87 para *Fusarium verticillioides* (CAHAGNIER et al., 1995).

Quadro 2: Níveis mínimos de atividade de água necessários para o crescimento e produção de micotoxinas das principais espécies toxigênicas do gênero *Aspergillus*.

Fungos	Aa mínima		Micotoxinas produzidas
	Crescimento	Produção de micotoxinas	
<i>A. flavus</i>	0,78 – 0,80	0,83 – 0,87	Aflatoxinas
<i>A. parasiticus</i>	0,78 – 0,82	0,87	Aflatoxinas
<i>A. clavatus</i>	0,85	0,99	Patulina
<i>A. alutaceus</i>	0,76 – 0,83	0,83 – 0,87	Ocratoxinas
<i>A. versicolor</i>	0,78	ND	Patulina, Esterigmatocistina
<i>A. fumigatus</i>	0,82 – 0,94	ND	Fumigatoxina, Gliotoxina

Fonte: Lacey et al., 1991; Leitão, 1988.

1.8 Micotoxinas

O termo micotoxina é originado da palavra grega “mykes”, que significa fungo; e do latim “toxicum”, que significa veneno ou toxina (BULLERMAN, 1979; GOLDBLATT, 1972).

Os metabólitos primários dos fungos, e também de outros organismos, são aqueles compostos que são indispensáveis ao seu crescimento, como carbono, açúcares e lipídios (BU’LOCK, 1980). Já os metabólitos secundários, que caracterizam as quinomas, os pigmentos, os antibióticos e as micotoxinas, são produzidos por diversas espécies de fungos ao final da fase de crescimento exponencial, dependendo do acúmulo dos precursores originados do metabolismo primário, como acetatos, piruvatos e aminoácidos (STEYN, 1977).

O problema das micotoxinas já existia há muito tempo e, provavelmente, vários surtos de micotoxicoses foram confundidos com pragas, envenenamentos, e epilepsia. No Antigo Testamento, as 10 pragas do Egito, quando Moisés tentava libertar os hebreus do domínio faraônico, evidenciaram o problema destes metabólitos. Também há indícios na peste que dizimou os rebanhos e induziu tumores e úlceras nos animais e no povo egípcio (SABINO, 2004). Em 1850, ocorreu o episódio chamado de “Fogo de Santo Antônio”, no qual a ingestão de centeio infectado por *Claviceps purpurea* foi relacionada com características do ergotismo, levantando a possibilidade do perigo de metabólitos tóxicos produzidos por fungos (SANTURIO, 2000). No Japão, muitas mortes foram associadas a ingestão de arroz contaminado por *Penicillium* spp. (SAITO et al., 1971); e na Rússia, por *Fusarium sporotrichioides*, que causou ulcerações necróticas nos lábios e mucosa oral da população (CAMPBELL e STOLOFF, 1974).

A produção de micotoxinas pelos fungos depende de uma série de fatores, incluindo a susceptibilidade do substrato à colonização do fungo produtor; fatores físicos como temperatura do ambiente, umidade do substrato, umidade relativa do ar durante o armazenamento, aeração, danos mecânicos e tempo de armazenamento e fatores biológicos como capacidade genética do fungo em produzir micotoxinas, quantidade de esporos viáveis, interação de diferentes fungos existentes no mesmo substrato, interação de micotoxinas e presença de insetos (CIEGLER, 1978).

Estas micotoxinas mantêm sua atividade biológica por um longo período, podendo causar as micotoxicoses (JAY, 1994); quando associadas aos alimentos e ração animal, são ingeridas, causando graves efeitos sobre a saúde animal e humana (SANTURIO, 2000), acarretando efeitos tóxicos agudos ou crônicos, dependendo do sistema teste, dosagem e frequência da exposição (JAY, 1994). Segundo Miller (1994), a exposição crônica às micotoxinas através da dieta, ou seja, a ingestão de pequenas doses por um longo período, acarreta efeitos mais significativos que a exposição aguda, sendo diretos e substanciais na saúde humana.

Existem centenas de micotoxinas detectadas produzidas por pelo menos 350 espécies de fungos (SABINO, 2004), porém as mais estudadas e comumente encontradas em alimentos são: aflatoxinas e ácido ciclopiazônico, produzidas principalmente, por *Aspergillus* spp.; fusariotoxinas, representadas pela zearalenona, fumonisinas, moniliforminas e tricotecenos, produzidas por *Fusarium* spp.; e ocratoxinas, produzidas por *Aspergillus alutaceus* (*A. ochraceus*) e várias espécies do gênero *Penicillium* (CLEVSTROM, 1986).

De acordo com Taniwaki e Silva (2001), as micotoxinas muitas vezes ocorrem em baixas concentrações, o que dificulta sua detecção. Além disso, uma mesma toxina pode ser produzida por uma variedade de fungos, porém, nem todos os fungos são produtores de micotoxinas. Dentro de uma mesma espécie, existem cepas produtoras e outras não produtoras de micotoxinas (ROSSETTO et al., 2005). A ausência de sinais visíveis do crescimento fúngico não pode ser totalmente interpretada como ausência de toxinas, já que estas são capazes de permanecer em um alimento, mesmo depois que o fungo produtor tenha sido eliminado (TANIWAKI e SILVA, 2001).

1.9 Aflatoxinas

O primeiro relato sobre a aflatoxina foi realizado por Stevens et al. em 1960, que descreveram a morte de aproximadamente 100.000 perus na Inglaterra, apresentando sintomas típicos de ingurgitamento e congestão renal com hemorragia ou necrose do fígado. O episódio foi atribuído a uma nova doença, denominada por Blount (1961) de “Turkey X Disease”. Verificou-se que o fator comum em todos os surtos era a ingestão de rações contendo farelo de amendoim de procedência brasileira (BLOUNT, 1961; ASPLIN e CARNAGHAN, 1961).

Farelos provenientes de outros países como Quênia, Nigéria, Gâmbia na África Ocidental, Uganda e Índia também provocaram os mesmo sintomas (CARNAGHAN e SARGEANT, 1961). Em 1961, Sargeant et al. isolaram o *Aspergillus flavus*, confirmando-o como fungo produtor da toxina responsável pelas mortes dos perus. A toxina recebeu então o nome de aflatoxina. Posteriormente verificou-se que o ácido ciclopiazônico, outra micotoxina produzida por *A. flavus*, pode também ter sido responsável por diversos dos sintomas anteriormente reportados no episódio dos perus (KOKALIS-BURELLE et al., 1997).

A primeira evidência do efeito carcinogênico foi relatada em 1961, quando ratos ingeriram ração contaminada com a toxina em níveis abaixo daqueles que causam sintomas de intoxicação aguda e desenvolveram tumores malignos (LANCASTER et al., 1961).

No Brasil, a primeira referência sobre a ocorrência de aflatoxinas parece ser a de Amaral (1961)¹ apud Moraes (1964), que atribuiu à administração de farelo de torta de amendoim a mortalidade observada em várias criações de suínos no Estado de São Paulo. Posteriormente, Raimo et al. (1962)² e Andrade et al. (1962)³ apud Moraes (1964) incriminaram o farelo de torta de amendoim como responsável pela queda progressiva da eclosão dos ovos de incubação e o baixo rendimento de frangos ocorridos durante os anos de 1958 e 1959, nas criações de aves do Estado de São Paulo. Desde então, as publicações

sobre o assunto referem-se principalmente a detecção de aflatoxinas em amostras de amendoim e produtos derivados, cultivados e comercializados em diversas regiões do Brasil (RODRÍGUEZ-AMAYA e SABINO, 2002).

Quimicamente, as aflatoxinas possuem uma estrutura policíclica derivada de um núcleo cumarínico, ligado a um sistema bifurânico de um lado e a uma pentona (aflatoxinas da série B) de outro ou uma lactona de seis membros (aflatoxinas da série G) (Figura 4) (OGA, 1996).

Figura 4: Estrutura química das Aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂.

¹ AMARAL, L. S. Torta de amendoim e morte de suínos. **O Biológico**, v. 27, 1961, p. 63.

² RAIMO, H. F.; CORRÊA, R.; ANDRADE, R. M. Ação tóxica do farelo de torta de amendoim, produzido em São Paulo, para aves e outros animais. **Bol. Ind. Ani.**, v. 20, 1962, p. 361-364.

³ ANDRADE, B. M.; PENTEADO, L. A.; RAIMO, H. F. Ação tóxica dos farelos de tortas de café e de amendoim nas aves em crescimento. **Bol. Ind. Ani.**, v. 20, 1962, p. 379-383.

Atualmente são conhecidos 18 compostos diferentes, entretanto, as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ são as mais comumente encontradas na natureza, e são designadas conforme a fluorescência que emitem quando expostas à luz ultravioleta (360 nm). A fluorescência azul (blue) é representada pelas aflatoxinas B₁ e B₂, e a fluorescência verde (green) pelas aflatoxinas G₁ e G₂ (HARTLEY e O'KELLY, 1963).

As outras aflatoxinas, como M₁, M₂, P₁ e Q₁ e aflatoxicol, ocorrem como produtos do metabolismo fúngico ou da biotransformação hepática (SMITH e ROSS, 1991).

As aflatoxinas possuem baixo peso molecular, sendo pouco solúveis em água e bastantes solúveis em solventes moderadamente polares, como clorofórmio, metanol e dimetilsulfóxido; neste caso, são relativamente sensíveis à luz, particularmente à radiação ultravioleta. Quando secas, são estáveis em temperaturas elevadas e o ponto de fusão da AFB₁ é de 269 °C, sendo destruídas por autoclavagem na presença de amônia e em tratamento com hipoclorito (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1979).

Em geral, as aflatoxinas podem ser detectadas através de diversos métodos analíticos, como por exemplo, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), a Cromatografia em Camada Delgada (CCD), a Cromatografia Gasosa (CG) e ELISA (SCOTT, 1990).

O principal gênero relacionado à produção de aflatoxinas é o *Aspergillus*, sendo *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* as espécies principais, possuindo grande importância na agricultura. As aflatoxinas mais comumente produzidas pelo *A. flavus* são as AFB₁ e AFB₂, enquanto que *A. parasiticus* e *A. nomius* produzem além das duas aflatoxinas já mencionadas, as AFG₁ e AFG₂ (SMITH e ROSS, 1991). A aflatoxina B₁ é a mais tóxica das quatro principais substâncias, apresentando propriedades hepatotóxicas, teratogênicas e mutagênicas (SANTOS et al., 2001), podendo causar danos como hemorragias, edemas, imunossupressão e carcinoma hepático (SMITH e ROSS, 1991). A aflatoxina B₁ é classificada na classe IA dos carcinógenos humanos pela “International Agency for Research on Cancer” (IARC, 1993).

A exposição humana em relação à aflatoxina pode ocorrer através da ingestão de alimentos diretamente contaminados, principalmente por AFB₁; ou também de outros produtos como leite e carne, originários de animais que consumiram ração contaminada (MOSS, 1989).

Os efeitos toxicológicos das aflatoxinas somente ocorrem após a ativação metabólica de suas moléculas pelas enzimas hepáticas (HUSSEIN e BRASEL, 2001). No caso de aves, elas são extremamente tóxicas, devido sua rápida absorção pelo trato gastrointestinal, evidenciando o aparecimento da toxina imediatamente após a ingestão (WYATT, 1991). Os

sinais clínicos da aflatoxicose aguda poderão iniciar seis horas após a ingestão, refletindo em depressão, presença de sangue nas fezes, tremores musculares, incoordenação motora com hipertermia (até 41 °C) que decresce, podendo ocorrer a morte entre as 12 e 24 horas seguintes (DILKIN e MALLMANN, 2004).

O amendoim é um produto com alto risco de contaminação pelas aflatoxinas devido a demora no período de secagem após o arranquio e a ocorrência de chuvas, facilitando o crescimento fúngico (FONSECA, 2006a). Dentre as condições favoráveis à produção de aflatoxina em sementes de amendoim destacam-se a elevada temperatura e o estresse hídrico prolongado, durante as últimas 3 a 6 semanas do período de crescimento (KOKALIS-BURELLE et al., 1997). O estresse na fase de maturação é determinante na produção de aflatoxina nas sementes não danificadas e em maior quantidade nas sementes com danos causados por insetos (MEHAN et al., 1991). As mais altas concentrações de aflatoxinas estão associadas ao crescimento de *A. flavus* após a colheita (MOSS, 1998).

Assim, as aflatoxinas, principalmente AFB₁, afetam diretamente a qualidade do amendoim e dos derivados para o consumo alimentar animal e humano (PRADO et al., 1999), podendo causar alteração no metabolismo de carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (PIEIDADE et al., 2002).

Os alimentos em geral, antes da Era Cristã, já eram submetidos a legislações e inspeções, com o propósito de controlar sua qualidade e proteger a saúde do consumidor, prevenindo fraudes. Consequentemente, as legislações foram se desenvolvendo até o início do século XX, quando se adotou uma legislação oficial e, a partir de então, já foram incluídos regulamentos específicos para contaminantes de alimentos (SABINO, 2004).

No Brasil, o Ministério da Saúde (Resolução RDC 274, ANVISA, 15/10/02) e o Ministério da Agricultura (Portaria MAARA nº 183, 21/03/96) estabeleceram o limite de 20 µg/kg para aflatoxinas B₁ + B₂ + G₁ + G₂ (BRASIL, 1996; BRASIL, 2002).

Diversos trabalhos têm sido realizados no que diz respeito à ocorrência de aflatoxinas em grãos de amendoim.

O trabalho realizado por Fonseca (1976) avaliou a incidência de aflatoxina em grãos de amendoim em diversos estágios da agroindústria: da colheita até a entrega do amendoim na fábrica, durante o armazenamento ou após a extração do óleo (farelo). Constatou-se que 90% das amostras continham aflatoxina, sendo que o nível foi aumentando da colheita até o armazenamento, no qual atingiu níveis mais altos (15 mg/kg), decrescendo após este período.

Em 1989, Prado et al., analisando 400 amostras de amendoim cru comercializados em Belo Horizonte, MG, Brasil, verificaram que 246 (61,5%) eram positivas, com níveis variando de 4,0 a 1034 $\mu\text{g/kg}$ de AFB₁.

Santos et al. (2001) analisaram a contaminação de aflatoxinas em 77 amostras de grãos de amendoim comercializados na região de São José do Rio Preto, SP, durante o período de Agosto de 1996 a Dezembro de 2000. Os autores observaram que 28 (15,7%) das amostras apresentaram-se positivas para AFB₁ (38,7%) e AFG₁ (27,5%).

Caldas et al. (2002) estudaram a ocorrência de aflatoxinas em diversos alimentos, inclusive 226 amostras de amendoim e derivados. Os resultados demonstraram que 72 destas amostras encontraram-se positivas, sendo que 97% estavam contaminadas com AFB₁ e 96,7% com AFB₂.

Nakai et al. (2008) pesquisaram a ocorrência de aflatoxinas em amostras de amendoim (cultivar Runner IAC 886) armazenados (cascas e grãos), provenientes de Tupã, Estado de São Paulo, Brasil. Nas cascas, 6,7% das amostras estavam contaminadas por AFB₁ (níveis médios = 15 - 23,9 $\mu\text{g/kg}$) e AFB₂ (níveis médios = 3,3 - 5,6 $\mu\text{g/kg}$); nos grãos, 33,3% apresentaram AFB₁ (níveis médios = 7,0 - 116,15 $\mu\text{g/kg}$) e 28,3% AFB₂ (níveis médios = 3,3 - 45,5 $\mu\text{g/kg}$).

Gonçalez et. al. (2008a) pesquisaram a ocorrência de aflatoxinas em amostras de grãos de amendoim (cultivar Runner IAC 886), do plantio a colheita, em quatro diferentes estágios de maturação, provenientes de Junqueirópolis, Estado de São Paulo, Brasil. As análises indicaram que 32% das amostras estavam contaminadas por aflatoxinas. As aflatoxinas B₁ e B₂ estavam presentes em todas as amostras contaminadas (níveis médios = 3,79 – 125,07 $\mu\text{g/kg}$ para AFB₁ e 0,07 – 2,3 $\mu\text{g/kg}$ para AFB₂). As aflatoxinas G₁ e G₂ foram detectadas, respectivamente, em 37,5% e 62,5% das amostras contaminadas.

Gonçalez et. al. (2008b) pesquisaram a ocorrência de aflatoxinas também em amostras de cascas de amendoim (cultivar Runner IAC 886), em diferentes estágios de maturação, provenientes de Junqueirópolis (SP), Brasil. Das 25 amostras analisadas, 6 (24%) apresentaram contaminação por aflatoxinas. As aflatoxinas foram detectadas em amostras a partir do estágio de granação, em concentrações que variaram de 5,42 $\mu\text{g/kg}$ a 218,52 $\mu\text{g/kg}$. A aflatoxina B₁ foi detectada em 100% das amostras contaminadas e as aflatoxinas B₂, G₁ e G₂ foram detectadas em 83,3%, 50% e 50%, respectivamente.

2 CONCLUSÕES

Dentro dos objetivos propostos, e nas condições de realização deste trabalho, as conclusões atingidas foram as seguintes:

- ✓ O isolamento de *A. flavus* e *A. parasiticus* no solo sinaliza que esta seja a principal via de contaminação do amendoim;
- ✓ A média do crescimento de *A. flavus* no solo é maior 10 a 15 dias após o plantio (1ª coleta) do que duas semanas antes do arranquio (2ª coleta);
- ✓ Dentro do gênero *Aspergillus*, a espécie *A. flavus* foi a mais frequente nas amostras de grãos e cascas, nos dois períodos de coletas e nas quatro regiões estudadas;
- ✓ Quanto maior a atividade de água, maior é, em média, o crescimento de *A. flavus* nos grãos e nas cascas de amendoim;
- ✓ Em média, quanto maior o crescimento de *A. flavus* nas cascas maior é o crescimento do mesmo fungo nos grãos de amendoim;
- ✓ As amostras de amendoim provenientes da região de Tupã – SP apresentaram maior frequência de isolamento de *A. flavus* tanto nas cascas quanto nos grãos de amendoim, antes e após o arranquio (na secagem);
- ✓ As regiões de Rosália e Cafelândia apresentam maior média de crescimento de *A. parasiticus* nas cascas e nos grãos de amendoim do que as regiões de Tupã e Jaboticabal. Para a casca concluiu-se ainda que a média de crescimento de *A. parasiticus* é menor logo após o arranquio do que duas semanas antes do arranquio;
- ✓ A chance de uma amostra de casca das regiões de Tupã e Cafelândia conter aflatoxinas B₁ e B₂ é maior do que essa mesma chance em Rosália e Jaboticabal. Em Tupã e Cafelândia, a média da produção de aflatoxinas nas cascas aumenta à medida que se aumenta a atividade de água e o crescimento de *A. flavus*;

- ✓ Das 160 amostras de amendoim coletadas e analisadas das quatro regiões estudadas e nos dois períodos, 6 (3,75%) apresentaram contaminação por aflatoxinas com níveis acima de 20 ppb, nível máximo permitido pela legislação brasileira para a somatória das aflatoxinas $B_1 + B_2 + G_1 + G_2$;
- ✓ Apesar do isolamento de *A. flavus* e *A. parasiticus* nos grãos e nas cascas do amendoim, poucas foram as amostras contaminadas com aflatoxinas, demonstrando que a presença de *A. flavus* e *A. parasiticus* no amendoim não significa necessariamente que a aflatoxina esteja presente no substrato;
- ✓ Sendo o amendoim um bom substrato para a contaminação fúngica e subsequente produção de aflatoxinas, boas práticas agrícolas, como a utilização de sementes de boa qualidade e rotação de culturas, são recomendadas às regiões estudadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

AGROBYTE. **Amendoim**. Disponível em: <<http://www.agrobyte.com.br/amendoim.htm>>. Acesso em: 6 set. 2005.

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, p. 3877-3882, 2002.

ARAÚJO, A. E. S.; CASTRO, A. P. G.; ROSSETTO, C. A. V. Avaliação de metodologia para detecção de fungos em sementes de amendoim. **Rev. Bras. Sementes**, v. 26, n. 2, p. 45-54, 2004.

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

ASPLIN, F. D.; CARNAGHAN, R. B. A. The toxicity of certain groundnut meals for poultry with special reference to their effect on ducklings and chickens. **Vet. Rec.**, v. 73, n. 46, p. 1215-1219, 1961.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Method 991.31. Aflatoxins in corn, raw peanuts and peanut butter. Immunoaffinity column (aflatest) method. **J. AOAC Int.**, p. 49.2.18, 2000.

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

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.

* De acordo com:

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

BÍSCOLA, V.; CALORI-DOMINGUES, M. A.; GLÓRIA, E. M.; ZAMBELO, I. V.; MORAES, A. R.; IEMMA, A. F. Resistência à produção de aflatoxinas em grãos de amendoim sob condições naturais. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 11., 2004, Piracicaba. **Resumos...** Piracicaba: Laboratório de Micotoxinas – LAN/ESALQ-USP, 2004. p. 50-52.

BLOUNT, W. P. Turkey “X” disease. **Turkeys**, v. 9, n. 2, p. 52, 55-58, 61, 67, 1961.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria MAARA nº. 183, 21 de março de 1996. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 25 mar. 1996. Seção 1, p. 4929.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº. 274, da ANVISA, 15 de outubro de 2002. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 out. 2002.

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

BU’LOCK, J. D. Mycotoxins as secondary metabolites. In: STEYN, P. S. (Ed.). **The biosynthesis of mycotoxins**. New York: Academy Press, 1980. p. 1-16.

BURGESS, L. W.; NELSON, P. E.; TOUSSON, T. A. **Laboratory Manual of a *Fusarium* studies**. Sidney: Univ. Sidney, 1981. 50 p.

CAHAGNIER, B.; MELCION, D.; RICHARD-MOLARD, D. Growth of *Fusarium moniliforme* and its biosynthesis of B1 on maize grain as function of different water activities. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 20, p. 247-251, 1995.

CALDAS, E. D.; SILVA, S. C.; OLIVEIRA, J. N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e risco para a saúde humana. **Rev. Saúde Pública**, v. 36, n. 3, p. 319-323, 2002.

CÂMARA, G. M. S. **Introdução à cultura do amendoim**. Piracicaba: Departamento de Agricultura, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 1998. 21 p.

CAMPBELL, C.; STOLOFF, L. Implication of mycotoxins for human health. **J. Agric. Food Chem.**, v. 22, p. 1006-1015, 1974.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C. **The Fungi**. Londres: Academic Press, 1994. 180 p.

CARNAGHAN, R. B. A.; SARGEANT, K. The toxicity of certain groundnuts meals to poultry. **Vet. Rec.**, v. 73, n. 29, p. 726, 1961.

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. Chromatogr. A.**, v. 1059, p. 13-16, 2004.

CHRISTENSEN, C. M.; KAUFMANN, H. H. Mycoflora. In: CHRISTENSEN, C. M. (Ed.). **Storage of Cereal Grains and their Products**. Minnessota: American Association of Cereal Chemists, 1974. p. 158-92.

CHRISTENSEN, C. M. (Ed.). **Storage of Cereal Grains and Their Products**. 3rd. ed. St. Paul, Minnesota: Am. Assoc. Cereal Chem., 1982. p.145-217.

CIEGLER, A. Fungi that produce mycotoxins: condition and occurrence. **Mycopathology**, v. 65, p. 5-11, 1978.

CLEVSTROM, G. **Studies of fungi flora of plants and feeds**: the influence of formic acid on growth and aflatoxin production in *Aspegillus flavus*. Sweden, Upsala, 1986. p. 11-46.

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, p. 41-46, 1985.

COMAPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Amendoim – Safra 2006/2007**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 3 jul. 2007.

DEACON, J. W. **Introduction to modern mycology**. London: Blackwell Sci. Publ., 1980. p. 197.

DILKIN, P.; MALLMANN, C. A. Sinais clínicos e lesões causadas por micotoxinas. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 11., 2004, Piracicaba. **Resumos...** Piracicaba: Laboratório de Micotoxinas – LAN/ESALQ-USP, 2004. p. 32-35.

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, p. 117-128, 1989.

FONSECA, H. Estudo da aflatoxina, da colheita à industrialização, na região de Monte Alto, SP. **Anais da ESALQ**, Piracicaba, SP, v. 33, p. 375-384, 1976.

FONSECA, H. **Prevenção e controle de micotoxinas em produtos agrícolas**. Boletim Técnico nº 07. Disponível em: <www.micotoxinas.com.br> Acesso em: 15 ago. 2006a.

FONSECA, H. **A aflatoxina e o amendoim**. Boletim Técnico nº 13. Disponível em: <www.micotoxinas.com.br>. Acesso em: 15 ago. 2006b.

FRANK, Z. R.; BEM-YEPHER, Y. Fusarium disease. In: BACKMAN, P. A. et al. **Compendium of peanut diseases**. Minnesota: The American Phytopathological Society, 1997. 94 p.

FREITAS, V. P.; BRIGIDO, B. M. Occurrence of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in peanuts and their products marketed in the region of Campinas, Brazil, in 1995 and 1996. **Food Addit. Contam.**, v. 15, n. 7, p. 807-811, 1998.

GAMBALE, W. Fungos Contaminantes. In: ZAITZ, C.; CAMPBELL, I.; MARQUES, S. A.; RUIZ, L. R.; SOUZA, V. M. (Ed.). **Compêndio de Micologia Médica**. São Paulo, 1988. p. 113-121.

GILLIER, P.; SILVESTRE, P. **El cacahuete o maní**. Barcelona: Ed. Blume, 1970. 281 p.

GODOY, I. J.; MINOTTI, D. **Consultoria técnica ao Centro de Produções Técnicas (Viçosa-MG) para produção de vídeo sobre produção de amendoim**, Viçosa, MG: CPT, 2005.

GOLDBLATT, L. A. Implications of mycotoxins. **Clin. Toxicol.**, v. 5, p. 453-458, 1972.

GONÇALEZ, E.; PINTO, M. M.; FELICIO, J. D. Análise de micotoxinas no Instituto Biológico de 1989 a 199. **Biológico (Divulgação Técnica)**, v. 63, n. 1/2, p. 15-19, 2001.

GONÇALEZ, E.; NOGUEIRA, J. H.; FONSECA, H.; FELICIO, J. D.; PINO, F. A.; CORRÊA, B. Mycobiota and mycotoxins in Brazilian peanut kernels from sowing to harvest. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 123, Issue 3, p. 184-190, 2008a.

GONÇALEZ, E.; SOUZA, T. N.; ROSSI, M. H.; FELICIO, J. D.; CORRÊA, B. Avaliação da microflora e ocorrência de micotoxinas em cascas de amendoim em diferentes estágios de maturação da vagem. **Ciênc. Agrotecnol.**, Lavras, v. 32, p. 1380-1386, 2008b.

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

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

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

INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS. Cultivares IAC do amendoim. **Agrônomo**, v. 55, n. 1, p. 26-29, 2003.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA. **Amendoim**: depois da boa safra em 2008, o quê esperar em 2009?, vol. 3, n. 11, 2008. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br>>. Acesso em: 4 jun. 2009.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Some naturally occurring substances**: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Geneva, IARC, 1993. v. 56, p. 489-521.

JAY, J. M. **Microbiologia Moderna de Los Alimentos**. 3. ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 1994. 753 p.

KLINCH, 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.

KOKALIS-BURELLE, N.; PORTER, D. M.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; SMITH, D. H.; SUBRAHMANYAM, P. **Compendium of peanut diseases**. 2. ed. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1997. 94 p.

KOZAKIEWICZ, Z. **Aspergillus species on stored products**. CAB International, Wallingford, 1989. 188 p.

LACEY, J. Water availability and the occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in stored products. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS. **Anais...** 1988, Tokyo. Tokyo: IUPAC, 1988. v. 6, p.186-89.

LACEY, J.; RAMAKRISHNA, N.; HAMER, A.; MAGAN, N.; MARFLEET, C. Grain Fungi. In: DILIP, K.; ARORA, K. G.; MUKERJI, E.; MARTH, H. (Ed.). **Handbook of Applied Mycology: foods and feeds**. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 12-77.

LAFORET, E. P. El género *Aspergillus*: Métodos, claves y referencias actuales para las espécies comunes em clínica y em ambientes diversos. **Boletín Micológico**, v. 23, 2008.

LANCASTER, M. C.; JENKINS, F. P.; PHILIP, J. McL. Toxicity associated with certain samples of groundnuts. **Nature**, v. 192, p. 1095, 1961.

LEITÃO, M. F. Microbiologia de alimentos. In: ROITMAM, I.; TRAVASSOS, L. R.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Tratado de Microbiologia**. São Paulo: Manole, 1988. p. 1-81.

LI, F. Q.; LI, Y. W.; WANG, Y. R.; LUO, X. Y. Natural occurrence of aflatoxins in Chinese peanut butter and sesame paste. **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, p. 3519-3524, 2009.

LILLEHOJ, E. B.; KWOLEK, W. F.; GUTHRIE, W. D.; BARRY, D.; McMILLIAN, W. W.; WIDSTROM, N. W. Aflatoxin accumulation in preharvest maize (*Zea mays* L.) kernels, interactions of 3 fungal species European corn borer *Ostrinia nubilis* and 2 hybrids. **Plant Soil**, v. 65, p. 95-102, 1982.

MACKENZIE, D. W. R. Keynote lecture: *Aspergillus* in man. In: VANDEN BOSSCHE, H.; MACKENZIE, D. W. R.; CAUWENBERGH, G. (Ed.). **Aspergillus and Aspergillosis**. New York: Plenum Press, 1988. p. 332.

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.

MARTIN, P. S. **Amendoim**: Uma planta da história no futuro brasileiro. 2. ed. São Paulo: Ícone Editora, 1987. 68 p.

MEHAN, V. K.; MAYEE, C. D.; JAYANTHI, S.; McDONALD, M. Preharvest seed infection by *Aspergillus flavus* group fungi and subsequent aflatoxin contamination in groundnuts in relation to soil types. **Plant and Soil**, v. 136, n. 2, p. 239-248, 1991.

MILLER, J. R. Epidemiology of *Fusarium* ear diseases of cereals. In: MILLER, J. D.; TRENHOLM, H. L. (Ed.). **Mycotoxins in Grain**. St. Paul: Eagan Press, 1994. p. 19-36.

MINISTÉRIO DO TRABALHO E EMPREGO. **Mapa do Estado de São Paulo**. Disponível em: http://www.perfildomunicipio.caged.gov.br/sp/mapa_sp.gif. Acesso em: 12 jan. 2009.

MORAES, G. W. G. **Estudos sobre aflatoxina. II Extração e identificação da aflatoxina no farelo de amendoim**. Belo Horizonte: Arquivos da Escola de Veterinária, 1964. p. 1. Separata do vol. XVI.

MOSS, M. O. Mycotoxins of *Aspergillus* and others filamentous fungi. **J. Appl. Bacteriol.**, p. 69-81, 1989. Suppl.

MOSS, M. O. Recent studies of mycotoxins. **J. Appl. Microbiol. Symp.**, v. 84, p. 62-76, 1998. Suppl.

MPHANE, F. A.; SIAME, B. A.; TAYLOR, J. E. Fungi, aflatoxins, and cyclopiazonic acid associated with peanut retailing in Botswana. **J. Food Prot.**, v. 67, n. 1, p. 96-102, 2004.

MUTEGI, C. K.; NGUGI, H. K.; HENDRIKS, S. L.; JONES, R. B. Prevalence and factors associated with aflatoxin contamination of peanuts from Western Kenya. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 130, p. 27-34, 2009.

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

NYRVALL, R. F.; KOMMEDAHL, T. Saprophytism and survival of *Fusarium moniliforme* in corn stalks. **Phitopathology**, v. 6, p. 1233-1235, 1970.

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

OLIVEIRA, C. A. F.; GONÇALVES, N. B.; ROSIM, R. E.; FERNANDES, A. M. Determination of aflatoxins in peanut products in the Northeast region of São Paulo, Brazil. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 10, p. 174-183, 2009.

PARK, D. L.; LIANG, B. Perspectives on aflatoxin control for human food and animal feed. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 4, p. 334-342, 1993.

PASTER, N.; BULLERMAN, L. B. Mould spoilage and mycotoxins formation in grains as controlled by physical means. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 7, p. 257-65, 1988.

PEIXOTO, A. R. **Plantas oleaginosas herbáceas**. São Paulo: Ed. Nobel. Peixoto, 1972. 171 p.

PELTRONEN, K.; EL-NEZAMI, H.; HASKARD, C.; AHOKAS, J.; SALMINEN, S. Aflatoxin B₁ binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria, **J. Dairy Sci.**, v. 84, p. 2152-2156, 2001.

PIEDADE, F. S.; FONSECA, H.; GLÓRIA, E. M.; et al. Distribution of aflatoxins in contaminated corn fractions segregated by size. **Braz. J. Microbiol.**, v. 33, n. 1, p. 12-16, 2002.

PITT, J. I.; GLENN, D. R.; HOCKING, A. D. An improved medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 54, p. 109–114, 1983.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. London: Blackie Academic Professional, 1997. 593 p.

PORTER, D. M. Peanut Diseases. In: BACKMAN, P. A et al. **Compendium of peanut diseases**. Minnesota: The American Phytopathological Society, 1997. 94 p.

POZZI, C. R.; BRAGHINI, R.; ARCARO, J. R.; ZORZETE, P.; POZAR, I. O.; DENUCCI, S.; CORRÊA, 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.

POWELL, K. A.; RENWICK, A.; PEBERDY, J. F. (Ed.). **The Genus *Aspergillus***: from taxonomy and genetics to industrial application. New York: Plenum Press, 1994.

PRADO, G.; MATTOS, S. V. M.; PEREIRA, E. C. Níveis de aflatoxinas em alguns alimentos consumidos em Belo Horizonte no período de 1983 a 1988. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 9, p. 138-147, 1989.

PRADO, G.; OLIVEIRA, M. S.; GASSINELLI MADEIRA, J. E. C.; GODOY, I. J.; CORRÊA, B.; JUNQUEIRA, R. G.; FERREIRA, S. O. Resistência de quatro genótipos de amendoim à produção de aflatoxina B₁ após inoculação com *Aspergillus flavus* Link. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 19, n. 1, p. 84-87, 1999.

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

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

RILEY, R. T.; NORRED, W. P.; BACON, C. W. Fungal toxins in foods: recent concers. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 13, p. 167-189, 1993.

RODRÍGUEZ-AMAYA, D. B.; SABINO, M. Mycotoxins research in Brazil: The last decade in review. **Braz. J. Microbiol.**, v. 33, n. 1, p. 1-11, 2002.

ROSSETTO, C. A. V.; LIMA, T. M.; VIEGAS, E. C.; SILVA, O. F.; BITTENCOURT, A. M. Efeito da calagem, da colheita e da secagem na qualidade sanitária de amendoim na seca. **Pesq. Agropec. Brás.**, v. 38, n. 5, p. 567-573, 2003.

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

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

SABINO, M.; MILANEZ, T. V.; LAMARDO, L. C. A.; INOMATA, E. I.; ZORZETTO, M. A. P.; NAVAS, S. A.; STOFER, M. Occurrence of aflatoxins in peanuts and peanut products consumed in the state of São Paulo/Brazil from 1995 to 1997. **Rev. Microbiol.**, v. 30, p. 85-88, 1999.

SABINO, M. Retrospectiva e situação atual das micotoxinas. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 11., 2004, Piracicaba. **Resumos das palestras e trabalhos apresentados**. Piracicaba: Laboratório de Micotoxinas – LAN/ESALQ-USP, 2004. p. 10-12.

SAITO, M.; ENOMOTO, M.; TATSUNO, T.; URAGUCHI, K. Yellowed rice toxins. In: CIEGLER, A.; KADIS, S.; AHL, S. J. (Ed.). **Microbial Toxins, a Comprehensive Treatise: Fungal Toxins**. London: Academic Press, 1971. v. 6, p.299-380.

SANTOS, R. C.; GODOY, I. J. Hibridação em amendoim. In: BORÉM, A. (Ed.). **Hibridação artificial de plantas**. Viçosa: UFV, 1999. p. 83-100.

SANTOS, R. C. BRS 151 L-7: Nova cultivar de amendoim para as condições do nordeste brasileiro. **Pesq. Agropec. Brás.**, v. 35, n.3, p. 665-670, 2000.

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

SANTURIO, J. M. Micotoxinas e micotoxicoses na avicultura. **Rev. Bras. Ciênc.**, v. 2, n. 1, p. 1-12, 2000.

SARGEANT, K.; SHERIDAN, A.; O'KELLY, J.; CARNAGHAN, R. B. A. Toxicity associated with certain samples of groundnuts. **Nature**, v. 192, p. 1096-1097, 1961.

SCOTT, W. J. Water relation of food spoilage microorganisms. **Adv. Food Res.**, v. 7, p. 83-127, 1957.

SCOTT, P. M. Natural poisons. In: HELRICH, K. et al. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. (Ed.). Arlington: The Association, 1990. 1193 p.

SILVA, L. H. **Lenha na fogueira, pode soltar foguete**. Disponível em: <<http://www.docerevista.com.br>>. Acesso em: 3 nov. 2008.

SMITH, J. E.; ROSS, I. C. The toxigenic *Aspergillus*. In: SMITH, J. E.; HENDERSON, R. S. **Mycotoxins and Animal Foods**. London: CRC Press, 1991. p. 31-61.

STEVENS, A. J.; SAUNDERS, C. N.; SPENCE, J. B.; NEWHAM, A. C. Investigations into "diseases" of turkey poults. **Vet. Rec.**, v. 72, n. 31, p. 627-628, 1960.

STEYN, P. S. Mycotoxins, excluding aflatoxins, zearalelone and the trichothecenes. In: RODRICKS, J. V. et al. **Mycotoxins in human and animal health**. Illinois: Pathotox Publishers, 1977. p. 419-467.

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

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

TROLLER, J. A.; BERNARD, D. T.; SCOTT, N. C. Measurement of water activity. In: SPECK, L. M. (Ed.). **Compendium of Methods for the microbiological examination of foods**. New York: American Public health Association, 1984. p. 124-34.

TRUCKESS, M. W.; STACK, M. E.; NESHEIN, S.; PAGE, S. W.; ALBERT, R. H.; HANSEN, T. J.; DONAHUE, K. F. Immunuaaffinity column coupled with solution fluorometry or liquid chromatography post column derivatization for determination of aflatoxin in corn, peanuts and peanuts butter collaborative study. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 74, p. 81-88, 1991.

WICKLOW, D. T.; HORN, B. W.; SHOTWELL, O. L.; HESSELTINE, C. W.; CALDWELL, R. W. Fungal interference with *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin contamination of maize grown in a controlled environment. **Phytopatology**, v. 78, p. 68-7, 1988.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Mycotoxins Environmental Health Criteria**. Geneva: WHO, 1979. v. 11, p. 21-84.

WYATT, R. D. Poultry. In: SMITH, J. E.; HENDERSON, R.S. (Ed.). **Mycotoxins and Animal Foods**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 553-605.