

GABRIELA MARTINS REIS

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE CEPAS DE
Aspergillus flavus ISOLADAS DE AMENDOIM**

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

Área de concentração: Micotoxinas

Orientador: Prof. Dr. Benedito Corrêa

São Paulo

2009

RESUMO

REIS, G. M. **Variabilidade genética de cepas de *Aspergillus flavus* isoladas de amendoim**. 2009. 113 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

O trabalho objetivou construir um dendograma filogenético das cepas de *Aspergillus flavus* isoladas de amendoim recém-colhido de quatro regiões de São Paulo (Cafelândia, Jaboticabal, Rosália e Tupã), avaliar o potencial toxigênico e agrupar as cepas quanto à produção de esclerócios. A técnica de AFLP foi utilizada para caracterização genotípica. O potencial aflatoxigênico foi avaliado pelo cultivo das cepas em meio de ágar coco, extração das aflatoxinas por clorofórmio, separação por CCD e quantificação por espectrodensitômetro CS-9000. A indução da produção de esclerócios foi feita pela incubação dos isolados em meio ágar Czapeck-DOX. AFLP gerou 78 fragmentos de 27 pb a 365 pb, sendo 13% não polimórficos. O perfil genotípico revelou 31 haplótipos e de 12 grupos no dendograma. A similaridade entre os isolados variou de 37 a 90 %. O potencial aflatoxigênico revelou 91,7 % de cepas produtoras, com níveis entre 39,27 µg/Kg e 28689,61 µg/Kg para AFB₁ e 1,50 µg/Kg a 9781,09 µg/Kg para AFB₂. Quanto aos esclerócios, 83,9% das cepas foram produtoras, sendo todas tipo S.

Palavras-chave: Aflatoxina. AFLP. Amendoim. *Aspergillus flavus*. Esclerócios. Variabilidade genética.

ABSTRACT

REIS, G. M. **Genetic variability of *Aspergillus flavus* strains isolated from peanut**. 2009. 113 p. Master thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

This study aimed to draw a phylogenetic dendrogram of *Aspergillus flavus* strains isolated from fresh harvested peanut from four regions of São Paulo state (Cafelândia, Jaboticabal, Rosália and Tupã), to determine the toxigenic potential and to group them regarding the sclerotia production pattern. The AFLP technique was used for genotypic characterization. Aflatoxin production was evaluated by inoculation of fungi in coconut agar, extraction with chloroform, TLC segregation and quantification by spectrophotometer CS-9000. Agar Czapeck-DOX was used to evaluate sclerotia production. AFLP generated 78 fragments varying from 27 pb to 365 pb, 13 % of them were not polymorphic. The genotypic profile showed 31 haplotypes and 12 groups in the dendrogram. The similarity among the isolates varied from 37 to 90 %. The aflatoxigenic potential showed 91,7 % of producer strains, with levels between 39,27 µg/Kg and 28689,61 µg/Kg for AFB₁ and between 1,50 µg/Kg and 9781,09 µg/Kg for AFB₂. Concerning the sclerotia production, 83,9 % of the strains were producers, all were S type.

Key words: Aflatoxin. AFLP. Peanut. *Aspergillus flavus*. Sclerotia. Genetic variability.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Amendoim (*Arachis hypogaea*)

A planta de amendoim pertence à família *Leguminosae*, subfamília *Papilionoideae* e gênero *Arachis*. É uma planta anual, herbácea, pubescente, de porte ereto ou rasteiro (CÂMARA, 1998). Seu modo de frutificação é bem característico, pois embora suas flores sejam aéreas, os frutos são subterrâneos, e em uma mesma planta existem flores estéreis e férteis.

As raízes do amendoim são pivotantes, ou seja, há uma raiz principal de onde surgem raízes laterais formando um conjunto bastante ramificado. Embora a raiz possa atingir até 1,30 m de profundidade (MARTIN, 1987), cerca de 60% do sistema radicular encontram-se nos primeiros 30 cm do solo (CÂMARA, 1998).

A parte aérea da planta possui um comprimento que pode variar de 15 a 70 cm. As flores surgem das axilas das folhas em inflorescência, produzindo de 3 a 5 flores. O gineceu é composto de um ovário sésil, com 2 a 5 óvulos e o androceu possui 10 estames, oito funcionais e 2 estéreis reduzidos aos filetes. A flor realiza autopolinização e, embora possa ocorrer cruzamento com outras plantas de amendoim próximas, essa taxa é baixa. Muitas flores são produzidas, porém apenas 10 a 15% produzem frutos normais, devido ao seu curto ciclo. Os frutos são vagens indeiscentes, uniloculadas, com 1 a 5 sementes presas á face interna e ventral do pericarpo. As sementes são compostas de um tegumento seminal delgado e do embrião, o qual possui 2 cotilédones volumosos, ricos em óleo e proteínas (CÂMARA, 1998).

O gênero *Arachis* é originário da região central do Brasil, e sua vagem, com um sistema radicular abundante e também um imenso potencial de recuperação relacionado ao estresse ambiental, é resultado de uma ampla variação climática imposta desde a origem deste gênero (KOKALIS-BURELLE et al., 1997). O amendoim (*Arachis hypogaea*) é considerado uma planta natural da América do Sul e o provável centro de sua origem é a região dos vales dos rios Paraná e Paraguai, no antigo lago do Gran Chaco (GILLIER e SILVESTRE, 1970).

O grão era encontrado em abundância do sul do Amazonas ao norte da Argentina (CÂMARA, 1998). Os indígenas foram os responsáveis pela difusão do amendoim às regiões da América do Sul e Central (PEIXOTO, 1972).

Desde o início do século XX o amendoim vem sendo amplamente estudado. A hibridização das sementes devido à disseminação em larga escala levou ao início dos estudos das variedades de amendoim nos Estados Unidos. Assim, em 1945, os norte-americanos criaram diversas variedades através da seleção de sementes de alta qualidade. No Brasil, os estudos começaram mais tarde, porém importantes pesquisas sobre melhoramento de sementes já foram realizadas (MARTIN, 1987) devido à grande importância econômica mundialmente estabelecida pelo consumo do amendoim.

A semente do amendoim é utilizada de diversas formas, tanto *in natura* como em alimentos processados, tais como paçocas, pés-de-moleque, balas, entre outros, além de ser altamente importante na indústria de óleo. O óleo do amendoim pode ser consumido na alimentação, bem como pode ser utilizado na indústria de conservas e de produtos medicinais na indústria farmacêutica (CÂMARA, 1998), e, o óleo mais grosseiro, pode ainda ser utilizado como combustível para lâmpadas de mineiros e para indústria de sabão (MARTIN, 1987).

O óleo do amendoim representa 45 % a 50 % do volume das sementes (SANTOS e GODOY, 1999). O farelo resultante da extração do óleo possui grande valor nutritivo e é destinado à alimentação animal (MARTIN, 1987) ou como adubo orgânico em culturas perenes, como café e citros (CÂMARA, 1998). Assim, 60 % da produção mundial de amendoim é destinada à extração de óleo e 40 % ao consumo humano (SANTOS, 2000). Da produção brasileira cerca de 8 milhões de toneladas anuais de grãos destinam-se ao consumo *in natura* ou industrializado, e 15 a 18 milhões são esmagados para a fabricação de óleo comestível (CONAB, 2007).

O amendoim possui um alto valor nutritivo e energético, sendo que cada 100 g do grão fornecem cerca de 580 calorias (CONAB, 2006). O amendoim é a quarta planta oleaginosa mais produzida no mundo, atrás apenas da soja, algodão e canola. Seu óleo contribui com 10 % da produção mundial, sendo o quinto mais consumido (SANTOS, 2000).

O Brasil possui condições naturais (solo e clima) para produzir amendoim de boa qualidade, sendo que a estimativa de produção nas safras de 2007/2008 foi de mais de 12 milhões de sacas de 25 Kg (REVISTA COPLANA, 2009b). O Estado de São Paulo é considerado o maior produtor (Quadro 1). A produção ocorre na região dos municípios de Ribeirão Preto, Jaboticabal, Sertãozinho e Dumont; e na região dos municípios de Marília, Tupã, Lins e Pompéia (CÂMARA, 1998).

Quadro 1- Produção do Brasil e estado de São Paulo nas últimas safras (produção em sacas de 25 Kg).

Ano	Safra	São Paulo	Brasil
2006	2005/2006	8.312.000	10.708.000
2007	2006/2007	6.936.000	9.028.000
2008	2007/2008	9.456.000	12.200.000

Fonte: CONAB, 2009.

A produção do amendoim brasileiro também é motivada pela sua exportação, o que exige um controle cada vez maior da qualidade do produto (Instituto Agrônomo de Campinas, IAC, 2003). Em 2007, o Brasil exportou cerca de 25 mil toneladas de amendoim, sendo que a região de Jaboticabal foi responsável por cerca de 50 % dessa exportação (REVISTA COPLANA, 2009a).

A variedade de amendoim mais importante no estado de São Paulo é a Runner. O cultivar “Runner IAC 886” descende da multilinha Florunner, que, em 1970 foi cedida pelo programa de melhoramento da Flórida (EUA) e incorporada na coleção de germoplasma do IAC sob o número 886. O produto originado se adaptou muito bem às condições de clima e solo da região paulista (IAC, 2003).

O cultivar Runner IAC 886 possui diversas vantagens como o crescimento rasteiro que permite a colheita totalmente mecanizada, ciclo rápido e de 130 dias, o que evita a colheita no período chuvoso, resistência moderada às doenças como a mancha-barrenta, não produz brotações precoces, assegurando melhor qualidade à colheita, sua produtividade é até 27 % maior que outros cultivares “runners” e possui vagens de maior tamanho e grãos uniformes. Essas características tornam esse cultivar o mais atrativo para a indústria (IAC, 2003).

Geralmente, no estado de São Paulo, o maior volume de produção de amendoim é proveniente da safra denominada “das águas”, devido à grande frequência de chuva nesse mês, o que é uma situação desfavorável à obtenção de amendoim adequadamente seco, pois um maior teor de umidade pode acarretar em maiores problemas de contaminação durante o armazenamento (FONSECA, 2006).

No momento do arranquio as vagens contêm cerca de 40 % de umidade. O intervalo crítico de umidade varia de 22 a 20 %, com mínimo de 11 % (umidade ideal para o armazenamento do amendoim). Se houver retardo na secagem das vagens

nessa fase, haverá uma alta probabilidade de contaminação fúngica do amendoim (FONSECA, 2006b).

Assim, os grãos em geral, como amendoim, milho, sorgo, e soja são constantemente expostos, no campo, a uma ampla variedade de microrganismos, incluindo fungos, provenientes da poeira, água, plantas doentes, insetos, fertilizantes e material orgânico de animais, sendo que seus esporos ou fragmentos de micélio darão início à contaminação e desenvolvimento do fungo na planta, particularmente em sementes imaturas. A quantidade e os tipos destes microrganismos dependem da resistência dos mesmos, do tipo de solo, da presença de roedores e especialmente de condições climáticas presentes (SILLIKER e ELLIOTT, 1980); além do estágio de desenvolvimento e maturação do grão (LACEY, 1975).

Em sementes de amendoim são frequentemente detectados fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Fusarium*; além de *Alternaria*, *Nigrospora*, *Trichoderma*, *Dothiorella* e *Pestalotia*. Os fungos *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp. e *Rhizopus* spp. são os de maior incidência, causando decréscimo de germinação e promovendo lesões nas plântulas, desencadeando menor desenvolvimento destas (ROSSETTO et al., 2005).

Dentre os efeitos da invasão fúngica, destacam-se a diminuição do poder de germinação, emboloramento visível, descoloração, odor desagradável, perda de matéria seca, aquecimento, cozimento, mudanças químicas e nutricionais e produção de micotoxinas (CHRISTENSEN, 1982). As vagens do amendoim, por serem frutos subterrâneos, estão diretamente expostos à contaminação, a qual pode ocorrer também durante a floração da planta (HORN et al., 2000).

Nakai et al. (2008) analisaram a microbiota fúngica em amostras de amendoim armazenado (cascas e grãos), provenientes de Tupã, estado de São Paulo, Brasil. Os resultados mostraram uma predominância de *Fusarium* spp. (32,8 % nas cascas e 25,7 % 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 %).

O experimento realizado por Bhattacharya e Raha (2002) demonstrou a presença dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Curvularia* e *Mycelia sterilia*. Dentre o gênero *Aspergillus*, *A. niger* (55 %), *A. ruber* (45 %) e *A. flavus* (40 %) foram as espécies mais frequentes.

1.2 *Aspergillus flavus*

Aspergillus é um gênero composto por mais de 180 espécies anamórficas aceitas (PITT et al., 2000), com o telemorfismo descrito em nove gêneros diferentes (PITT e SAMSOM, 2000). Este gênero é subdividido em 7 subgêneros que é posteriormente dividido em seções (KLICH, 2002). Embora o gênero contenha mais de 260 espécies já estudadas por vários séculos, sua sistemática ainda está em estado de fluxo, sempre evoluindo (SAMSON e VARGA, 2009). O gênero é facilmente identificado pelas características do conidióforo, mas a identificação das espécies e a diferenciação é complexa, sendo tradicionalmente baseada nas características morfológicas (RODRIGUES et al., 2007).

Dentre as as características macromorfológicas consideradas estão a coloração conidial e micelial, diâmetro da colônia, coloração do reverso da colônia, produção de exudados e pigmentos solúveis, presença de esclerócio e cleistotécio. Micromorfológicamente, a caracterização é principalmente dependente da seriação, forma e tamanho da vesícula, morfologia do conídeo e do estipe, presença de células de Hülle e a morfologia do cleistotécio e dos ascósporos (RODRIGUEZ et al., 2007).

O gênero *Aspergillus*, primeiramente descrito pelo botânico Pier Antonio Micheli (MACKENZIE, 1988), é caracterizado pelo desenvolvimento de colônias verdes a amarelas-oliva, tornando-se acinzentadas com a idade e por produzir conídeos em cabeças do tipo “mop-like” (escovão) (PITT e HOCKING, 1997).

Aspergillus flavus pertence ao Reino Fungi, Divisão Ascomycota, à classe Ascomycetes, à ordem Eurotiales e à família *Trichomaceae* (KIRK et al., 2008). Seus conidióforos 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 cabeça conidial (vesícula, métula, fiálides e cadeias de conídeos) é predominantemente unisseriada na espécie *A. parasiticus*, enquanto que em *A. flavus* é variável (KOKALIS-BURELLE et al., 1997). Em sua fase teleomórfica, *A. flavus* é denominado *Petromyces flavus* (HORN et al., 2009a) pela formação de múltiplos ascocarpos não estiolados dentro da matriz pseudoparenquimatosa do estroma (MALLOCH e CAIN, 1972; HORN et al., 2009b).

A. flavus é freqüentemente detectado em sementes de amendoins e sua grande importância deve-se à sua capacidade de produzir micotoxinas, sendo as mais abundantes conhecidas como aflatoxinas. Pertence também ao gênero *Aspergillus* seção *Flavi*, outras espécies produtoras de micotoxinas, tais como *A. parasiticus* e *A. nomius*, bem como os chamados bolores de Koji, que inclui *A. oryze* e *A. sojae*, ambos reconhecidos como seguros pela “U.S. Food and Drugs Administration” (TAILOR et al., 1979) na utilização pela indústria para produção de sakê, miso e molho de soja por apresentar um histórico seguro de não-produção de toxinas (BARSBESGAARD et al., 1992).

A. flavus se desenvolve muito bem em substratos oleaginosos, tais como amendoim que é rico em lipídeos, onde pode aumentar o nível de produção de micotoxinas. Se o amendoim for plantado em solos ricos em zinco, a produção de aflatoxinas por isolados presentes nesse solo também é favorecida (LACEY e MAGAN, 1991).

Fatores como umidade relativa do ar entre 80 e 90 % e temperatura acima de 25 °C, permitem um ótimo desenvolvimento de *A. flavus*, caracterizando-o como contaminante típico de armazenamento. Essas condições abióticas são comuns em países tropicais, o que favorece a contaminação de grãos no Brasil.

De acordo com Moss (1991) a atividade de água (Aa) mínima para *A. flavus* se desenvolver é de 0,78 com teor de umidade mínima de 16 %, condições, segundo Puzzi (1986), geralmente encontradas no amendoim. Além disso, durante o armazenamento, a escassez de atmosfera rica em CO₂ e pobre em O₂ facilita o crescimento de bolores.

Pitt e Miscamble (1994), avaliando o crescimento de *A. flavus* em diferentes atividades de água (0,75 a 0,96) e temperaturas (25, 30 e 37 °C), constataram que os valores mínimos para o crescimento do fungo eram 0,82 a 25 °C, 0,81 a 30 °C e 0,80 a 37 °C. Por sua vez, FARAJ et al. (1991) demonstraram altos níveis de aflatoxinas em cepas *A. flavus cultivadas* a 30 °C em substrato com Aa de 0,95 a 0,98.

Apesar da maior frequência de *A. parasiticus* no solo, comparativamente ao *A. flavus* (HORN et al., 1994), este último parece ser dominante no cultivo do amendoim, sugerindo maior agressividade da espécie (PITT et al., 1991; HORN et al., 1994). Outros estudos demonstram que o isolamento de *A. parasiticus* em

sementes de amendoim é de apenas 10-12 % entre as duas espécies (HILL et al., 1983; BLANKENSHIP et al., 1984).

1.3 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).

O estudo das micotoxinas ganhou maior atenção a partir da descoberta das aflatoxinas na Inglaterra, em 1960. Hoje, sabe-se que diversos tipos de substratos, como o milho, amendoim, sorgo, caroço de algodão e nozes, em geral, são os mais freqüentemente acometidos (STOLOFF, 1976), condenando várias culturas, tanto na pré como na pós-colheita (STEINHART, 1996; COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2003).

A produção de micotoxinas 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; 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).

As micotoxinas são metabólitos secundários, produzidos no final da fase de crescimento exponencial, dependendo do acúmulo de precursores originados do metabolismo primário, como acetatos, piruvatos e aminoácidos (STEYN, 1977).

Vários relatos colocam as micotoxinas como responsáveis por surtos que ocorreram em várias fases da história. As micotoxicoses foram confundidas diversas vezes com pragas, envenenamentos e eplepsias. Há indícios de micotoxicose nas 10 pragas do Egito, quando tumores e úlceras dizimaram os rebanhos do povo egípcio (SABINO, 2004). O episódio conhecido como “Fogo de Santo Antônio”, em 1850, foi relacionado com a ingestão de centeio contaminado pelo fungo *Claviceps purpurea*, produtor da toxina ergot (SANTURIO, 2000). Há relatos no Japão de mortes associadas à ingestão de arroz contaminado com fungo do gênero *Penicillium* (SAITO et al., 1971) e na Rússia de ulcerações necróticas na mucosa

oral e lábios causadas pelo fungo *Fusarium sporotrichoides* (CAMPBELL e STOLOFF, 1974).

Estas micotoxinas mantêm sua atividade biológica por um longo período, podendo causar as micotoxicoses (JAY, 1994); e 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, apresenta efeitos mais significativos que as exposições agudas, sendo diretos e substanciais na saúde humana. As micotoxinas tem 100 vezes mais potencial carcinogênico relativo do que outras categorias de substâncias da dieta, como pesticidas, aditivos ou codimentos (MILLER, 1994).

A relação das micotoxinas com outros organismos pode variar desde a inibição do crescimento do organismo não produtor da micotoxina até a inibição, remoção ou degradação da micotoxina pelo organismo não produtor (TANIWAKI e SILVA, 2001). Há muitas micotoxinas com a capacidade de alterar o sistema de defesa do hospedeiro, e pela atividade imunodepressiva, estas micotoxinas ajudam o fungo a invadir o tecido do hospedeiro pelos fatores de virulência (KAMEI e WATANABE, 2005). Entre as micotoxinas produzidas por *Aspergillus* spp., estão por exemplo, as aflatoxinas que inibem a função dos macrófagos (LIOI et al., 2004) e as ocratoxinas que são conhecidas por serem citotóxicas aos linfócitos (LIOI et al., 2004) e inibir as funções dos linfócitos, monócitos e granulócitos (MULLER et al., 2004), dentre outras como gliotoxina e fumagilina, também consideradas imunodepressivas (KAMEI e WATANABE, 2005).

Como característica geral, as micotoxinas são produzidas lentamente, atingindo níveis detectáveis após um longo período de cultivo do fungo, o que significa que o tempo de liberação para o meio de cultura é tempo-dependente. Esta produção lenta significa que as micotoxinas não parecem ser fatores de virulência (KAMEI e WATANABE, 2005).

Dentro de uma mesma espécie, pode haver cepas produtoras de micotoxinas e cepas não produtoras (ROSSETO et al., 2005). A falta de sinais da presença do fungo não pode ser interpretada como ausência de micotoxinas no alimento, já que

essa pode permanecer no alimento mesmo após o fungo produtor ter sido eliminado (TANIWAKI e SILVA, 2001).

Tanto o homem quanto os animais podem apresentar diferenças na susceptibilidade às micotoxinas inerentes de fatores como genética (espécie, raça, linhagem), fisiológicos (idade, nutrição, condição imunológica) e ambientais (climáticas e de manejo) (SMITH e ROSS, 1991).

Na maioria das vezes, as micotoxinas provocam síndromes leves que são facilmente confundidas com outras doenças. Nas micotoxicoses crônicas, geralmente estão presentes alguns sinais clínicos como a diminuição do desempenho produtivo dos animais (tais como ingestão de alimentos e ganho de peso) e a diminuição da fertilidade (DILKIN e MALLMANN, 2004).

As micotoxinas são compostos de difícil detecção, sendo o diagnóstico fundamentado na detecção e quantificação da toxina no alimento, nas alterações clínicas e patológicas, na constatação de resíduos do metabolismo das micotoxinas nos tecidos afetados e nas evidências epidemiológicas (WILSON et al., 1981).

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 as de 3 grandes grupos: 1- aflatoxinas e ácido ciclopiazônico, produzidas principalmente, por *Aspergillus* spp.; 2- fusariotoxinas, representadas pela zearalenona, fumonisinas, moniliforminas e tricotecenos, produzidas por *Fusarium* spp.; 3- ocratoxinas, produzidas por *Aspergillus alutaceus* (*A. ochraceus*) e várias espécies do gênero *Penicillium* (CLEVSTROM, 1986).

1.4 Aflatoxinas

O primeiro relato sobre aflatoxina foi realizado por Stevens et al. (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). Sargeant et al. (1961)

isolaram o fungo *A. flavus*, confirmando-o como responsável pela produção da toxina que causou as mortes. A toxina recebeu então o nome de aflatoxina.

As aflatoxinas, aparentemente, não são essenciais para o crescimento dos fungos (EHRLICH et al., 2005), porém, existem algumas propostas para a função das mesmas, a saber: proverem uma maneira de remover o excesso de carbono, quando o fungo está crescendo em um ambiente rico em fonte de carbono (BU'LOCK, 1965); agirem como sinal químico entre as espécies (LILLEHOJ, 1991); estarem envolvidas em processos de desenvolvimento fúngico (COTTY, 1988; KALE, 1996) e, finalmente, o fato de protegerem o fungo produtor contra a microbiota do solo e da competição por insetos (MATSUMURA e KNIGHT, 1967; DOWD, 1992).

As aflatoxinas não são fitopatogênicas (McLEAN et al., 1995; HASAN, 2001) e acredita-se que elas não sejam fatores de virulência de plantas, pois cepas não aflatoxigênicas são igualmente capazes de invadir culturas susceptíveis (COTTY, 1989).

As 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). Atualmente se conhecem 18 compostos denominados aflatoxinas sendo as mais comuns as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, conforme a fluorescência que emitem quando expostos à luz ultravioleta (B= Blue e G= Green) (Figura A.1) (HARTLEY et al., 1963; NESBITT, 1962; SHARMA, 1991). Outras aflatoxinas, como M₁, M₂, P₁, Q₁ e aflatoxicol, ocorrem como produtos do metabolismo fúngico ou da biotransformação hepática (DIENER et al., 1987; SMITH e ROSS, 1991; YANNIKOURIS e JUANY, 2002) (Figura A.2). Pelo menos 23 reações enzimáticas estão envolvidas na formação da aflatoxina. Não menos que 15 intermediários da aflatoxina estruturalmente definidos foram identificados na via biosintética da aflatoxina (GUO et al., 2008).

Todas as aflatoxinas têm efeito carcinogênico (LEGATOR, 1966), sendo que a aflatoxina B₁ (AFB₁) é considerada a mais tóxica do grupo, seguida das aflatoxinas G₁, B₂ e G₂ (BENNET e FRENHOLZ, 1978; SHARMA e SALUNKE, 1991; ZERINGUE et al., 1993), sendo também a mais comumente encontrada nos alimentos contaminados por aflatoxinas. A aflatoxina B₁ é uma das substâncias mais

tóxicas de ocorrência natural registradas até hoje. As aflatoxinas foram classificadas na classe 1 dos carcinógenos humanos pela International Agency for Research on Cancer (IARC, 1993).

Na verdade a AFB₁ é um pró-carcinógeno que requer ativação para exercer suas ações citotóxicas e genotóxicas (HSIEH e ATKINSON, 2001). A propriedade tóxica da AFB₁ manifesta-se após a conversão hepática da AFB₁ pelas enzimas microsossomais do sistema citocromo P 450 na forma ativa AFB₁-epóxido, o qual reage com proteínas e ácidos nucleicos (OLIVEIRA, 2004) (Figura A.2). Ligações covalentes da aflatoxina resultam no decréscimo da síntese de DNA e RNA no fígado. A inibição da síntese de proteína não é tão rápida ou extensa como as dos ácidos nucleicos, ocorre uma desagregação polissomal paralelamente e é o que parece representar o modo de inibição da síntese de proteína (ROEBUCK e MAXUITENKO, 1994). As aflatoxinas podem causar danos como hemorragia, edemas, imunossupressão e carcinoma hepático (SMITH e ROSS, 1991). A formação de aductos ocorre através da ligação epóxido-guanina na posição 7 do nitrogênio do gene p53, gene supressor de tumor, no códon 249. Existe a possibilidade dos aductos serem retirados metabolicamente, originando um ponto de mutação no DNA pela transversão de GC para TA (AGUILAR et al., 1993). A inativação do gene supressor de tumor p53 leva ao desenvolvimento do câncer primário de fígado (BRESSEC et al., 1991).

Dentre as características das aflatoxinas, podemos citar o baixo peso molecular, baixa solubilidade em água (o que acarreta na difícil eliminação do organismo), alta solubilidade em solventes moderadamente polares (clorofórmio, metanol e dimetilsulfóxido). São sensíveis à luz, principalmente à ultravioleta e, quando secas, são estáveis em temperaturas muito elevadas. O ponto de fusão das aflatoxinas é de 269 °C e são destruídas por autoclavagem na presença de amônia e em tratamento com hipoclorito (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1979).

As aflatoxinas podem ser detectadas através de métodos analíticos, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), a Cromatografia em Camada Delgada (CCD), a Cromatografia Gasosa (CG) e ELISA (SCOTT, 1990). Assim, concentrações em ppm podem ser facilmente detectadas em países de clima quente e úmido, em regiões tropicais e subtropicais no mundo, embora possam ser controladas com métodos adequados de secagem e conservação dos grãos (BHAT

et al., 1996), pois *A. flavus* necessita de uma atividade de água mínima de 0,78 para se desenvolver e produzir micotoxinas.

Açúcares simples como glicose, sacarose e maltose promovem a formação de aflatoxina, enquanto peptona, sorbose ou lactose não promovem sua formação. Fontes de nitrogênio afetam a formação de aflatoxinas de diversas formas e os níveis de produção são diferentes quando *Aspergillus* spp. está em meio com nitrato ou em meio com nitrito (GUO et al., 2008).

Mesmo antes da Era Cristã, os alimentos já eram submetidos a legislações e inspeções. Essas legislações foram evoluindo até o início do século XX, quando se adotou-se uma legislação oficial, com o propósito de controlar a qualidade e proteger o consumidor, sendo incluído então, regulamentos para contaminantes (SABINO, 2004). No Brasil, o Ministério da Saúde através da Resolução RDC 274, ANVISA, 15/10/02 (BRASIL, 2002) e o Ministério da Agricultura com a Portaria MAARA nº183, 21/03/96 estabeleceram o limite de 20 µg/kg para aflatoxinas B1 + B2 + G1 + G2 (BRASIL, 1996).

Diversos trabalhos tem sido desenvolvidos visando o estudo da ocorrência de aflatoxinas em amendoim, como por exemplo, o trabalho de Caldas et al. (2002) que 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.

Trabalho realizado por Gonzalez et al. (2006), analisando 21 cepas de *A. flavus* isoladas do amendoim no campo, demonstrou que 85,7 % das cepas foram produtoras de aflatoxinas. As concentrações variaram de 18.560 µg/kg a 8,0 µg/kg (AFB₁) e de 260 µg/kg a 1,0 µg/kg, (AFB₂). Da mesma maneira, Almeida et al. (2005) verificaram a produção de aflatoxinas por 92,9 % dos isolados, em concentrações de 10,5 a 482,6 µg/kg (AFB₁) e 2,9 a 132,5 µg/kg (AFB₂).

1.5 Esclerócios

Esclerócios são estruturas de resistência produzidas por algumas espécies fúngicas, incluindo *A. flavus*, que visam suportar condições ambientais adversas

(WICKLOW et al., 1984). Geralmente apresentam-se ovaladas a globosas, de coloração escura, rígidas e composta por uma massa compacta de hifas inativas com material de reserva que se mantém dormente até que uma condição favorável favoreça o crescimento micelial (WICKLOW, 1983).

Acredita-se que os esclerócios possam servir como fonte de inoculação primária através da germinação miceliogênica em algumas culturas (WICKLOW e DONAHUE, 1984). Em seu estudo, Horn et al. (1994) reportaram pela primeira vez a ocorrência de esclerócios de *Aspergillus* seção *Flavi* em amendoim pré-colheita, sendo que os esclerócios que cobriam o amendoim estavam relacionados com danos causados por insetos. A infecção por *A. flavus* pode ser explicada pela perda na produção de fitoalexinas durante a fase de seca do grão junto com a falta do fator resistência adicional presente nos grãos maduros (DORNER et al., 1989).

Quanto à produção de esclerócios, as cepas de *Aspergillus flavus*, podem ser divididas em dois grupos: cepas S, produtoras de numerosos e pequenos esclerócios (diâmetro < 400 µm) e altos níveis de aflatoxinas; e as cepas L, produtoras poucos e grandes esclerócios (diâmetro > 400 µm) e baixos níveis de aflatoxina (SAITO et al., 1986; COTTY, 1989). Os isolados do tipo S são subdivididos em S_B, produtores apenas de aflatoxinas do tipo B, ou em S_{BG}, isolados atípicos que produzem aflatoxinas do tipo B e G (SAITO et al., 1989; COTTY e CARDWELL, 1999). É importante lembrar que o fenótipo esclerocial S não é necessariamente previsível com respeito à produção de aflatoxinas (GEISER et al., 2000).

Estudo desenvolvido por Cardwell e Cotty (2002) na América do Norte, demonstrou que cepas S são freqüentemente encontradas em regiões com altas temperaturas e baixo índice pluviométrico. Os autores postularam que a produção de pequenos esclerócios pelas cepas S pode ser um mecanismo de sobrevivência para um organismo adaptado à flutuações climáticas.

1.6 Variabilidade genética

O interesse por fungos de interesse médico e a necessidade de identificá-los até o nível de espécie e discriminá-los individualmente dentro de uma mesma

espécie têm estimulado o desenvolvimento de métodos de tipagem da variação encontrada no DNA fúngico. Prestando atenção nos atributos do ciclo de vida, como o modo de reprodução e a diferenciação ou isolamento genético, micologistas podem dizer quais os grupos intraespecíficos a serem identificados e determinar o número e tipo de marcadores necessários para isso (TAYLOR et al., 1999).

Sem um conhecimento adequado, os estudos de tipagem de cepas geralmente assumem que o fungo é assexuado, tem reprodução clonal e não está subdividido em populações geneticamente isoladas (TAYLOR et al., 1999).

Inicialmente, a maioria das aplicações sobre a variação do DNA fúngico para o estudo da evolução se dava diretamente acima do nível de espécie (BOWMAN et al., 1996; TAYLOR et al., 1999). O interesse em distinguir cada indivíduo de uma espécie está nos levando à direção da identificação de cada genótipo utilizando apenas uma técnica molecular (TAYLOR et al., 1999). Em outras palavras, com um pouco mais de esforço, o estudo da tipagem de cepas poderia revelar características básicas da história da vida dos fungos, cuja informação teria um grande impacto para a pesquisa que visa o controle de fungos potencialmente toxigênicos.

A técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorfism*) foi a primeira técnica de marcadores de DNA utilizada para o estudo da biologia evolucionária de fungos. Essa técnica avalia a variação na seqüência de DNA do genoma pelo uso de endonucleases de restrição que geram curtos fragmentos de seqüência de DNA. Alterações na seqüência de reconhecimento impedem a ação da endonuclease ou altera o padrão do tamanho do fragmento formado.

Outra técnica utilizada para a mesma finalidade é a técnica de RAPD (*Randomly amplified polymorphc DNA*). É uma técnica similar ao RFLP no que diz respeito à análise de variações em pequenas regiões na seqüência de DNA, porém ao invés do foco estar nas seqüências de reconhecimento de endonucleases de restrição, é focada na região de ligação de iniciadores de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (WILLIAN et al., 1990). A substituição de nucleotídeos na região de ligação dos iniciadores pode impedir a ligação dos iniciadores e, conseqüentemente, a amplificação da seqüência de DNA pela PCR. O RAPD utiliza um pequeno iniciador de PCR (cerca de 10 pb) e uma baixa temperatura de ligação para gerar muitos fragmentos em uma única amplificação. A análise por RAPD é uma técnica simples e freqüentemente detecta variação entre isolados que não se mostravam

variantes com a análise de RFLP, e por isso se tornou muito popular (TAYLOR et al., 1999).

Do mesmo modo, a técnica de AFLP (Amplified Fragment Length Polymorfism) é uma técnica cuja análise do polimorfismo depende da diferença nos sítios das endonucleases de restrição, assim como acontece no RFLP. Entretanto, o AFLP requer a criação de uma biblioteca dos fragmentos de restrição gerados e amplificados por PCR, representando o genoma completo do fungo. Um número maior de fragmentos é gerado na reação de AFLP do que do que aquele gerado por RFLP e ocorre uma maior reprodutibilidade comparada com a técnica RAPD (VOS et al., 1995).

A técnica de AFLP pode produzir um complexo perfil de marcadores sem a necessidade de prévia clonagem ou obtenção de dados de seqüenciamento, e permite a geração de um grande número de marcadores dependendo do tamanho do genoma e dos iniciadores selecionados, muito mais rápido do que é possível nas técnicas de RAPD ou RFLP (BARROS et al., 2007).

AFLP permite a verificação de um grande número de polimorfismos, com pequenas variações no protocolo, e por isso é extremamente útil para a descoberta de seqüências de marcadores específicos (SCHIMIDT et al., 2003; HYNES et al., 2006). O grande número de marcadores gerados por AFLP permite uma maior robustez na análise estatística e, a utilidade, reprodutibilidade e eficiência do AFLP faz da técnica uma importante ferramenta molecular, o que levou à sua ampla aplicação para análise populacional de fungos (BROWN, 1996; BARROS et al., 2007), pois, uma vez os dados de tipagem das cepas nas mãos, eles podem ser usados para a análise da diversidade genotípica entre os isolados fúngicos.

Recentemente a técnica de AFLP tem sido aplicada para a verificação da variabilidade genética entre populações dos três maiores gêneros toxigênicos, *Fusarium* (ABD- ELSALAM et al., 2003; ZELER et al., 2004; SCHEMALE et al., 2006), *Aspergillus* (ABD- ELSALAM et al., 2003; SCHIDMIT et al., 2004; PERRONE et al., 2006) e *Penicillium* (CASTELLA et al., 2002; FRISVAD et al., 2005).

Serra et al. (2006), Perrone et al. (2006) e Esteban et al. (2008) utilizaram a técnica de AFLP para determinar a diversidade genética de espécies pertencentes à *Aspergillus* seção *Nigri* obtidos de uvas e solo de plantio, sugerindo em seus trabalhos a real possibilidade do uso de AFLP como marcador de população/origem.

Montiel et al. (2003) e Barros et al. (2007) utilizaram AFLP para estudar a relação genética entre isolados de *Aspergillus* seção *Flavi* isolados de amendoim.

Outros trabalhos que objetivaram estudar a diversidade genética de isolados de uma mesma espécie fúngica aprovam a técnica de AFLP por obter resultados satisfatórios e reprodutíveis, dentre eles podemos citar o estudo da diversidade genética de isolados de *Sporothrix schenkii* (NEYRA et al., 2005) e de *Bouveria bassiana* (KU et al., 2006).

É importante considerar cuidadosamente as funções dos diferentes tipos de caracteres no delineamento dos limites entre as espécies. Caracteres como seqüências de DNA variáveis nos dá o melhor meio de inferência da relação entre os organismos, simplesmente porque é possível amostrar um grande número de caracteres variáveis, e na maioria das vezes, estes caracteres variam porque eles estão sobre pequena ou muito fraca seleção (GAISER et al., 2007). Portanto, para delimitar uma espécie ou fazer análises populacionais, um estudo polifásico deve ser considerado como 'padrão ouro', usando a combinação de dados de seqüências multilocus, dados morfológicos, características fisiológicas e dados ecológicos (SANSON e VARGA, 2009).

4 CONCLUSÕES

Nas condições da realização deste experimento, e dentro dos objetivos propostos, pode-se concluir que:

- Do total de cepas de *Aspergillus flavus* analisadas, 91,7,% foram aflatoxigênicas, produtoras de aflatoxinas B₁ e B₂;
- Na região de Tupã foi isolado o maior número de cepas de *A. flavus* produtoras de AFB₁ e AFB₂ (40,99 % do total de cepas produtoras), e na região de Jaboticabal o menor número de cepas aflatoxigênicas (18,02 % do total de cepas produtoras);
- A região de Cafelândia teve a maior porcentagem relativa de cepas aflatoxigênicas (96 %), enquanto a região de Jaboticabal teve a menor (78,4 %);
- Os maiores níveis de AFB₁ foram constatados nos isolados do amendoim procedentes de Cafelândia (28696,39 µg/Kg);
- Pesquisa de esclerócio em 242 isolados de *A. flavus* revelou que 83,9% delas foram produtoras e classificadas como pertencentes ao tipo S;
- O elevados percentuais de cepas aflatoxigênicas (91,7 %) e de cepas produtoras de esclerócios (83,9 %) demonstram correlação entre a presença da estrutura e a produção de aflatoxinas;
- Não houve correlação entre os haplótipos produzidos pela técnica de AFLP com os níveis de aflatoxinas, produção de esclerócios, região de estudo e parte do amendoim de onde a cepa foi isolada;

- Da mesma forma, não houve correlação entre os grupos formados na tipologia com os níveis de aflatoxinas, produção de esclerócios, região de estudo e parte do amendoim de onde a cepa foi isolada;
- Os níveis de similaridade e distância genética encontrados variaram de 59 % (D= 0,41) a 100 % (D=0) com relação a cepa de *A. flavus* padrão, porém, não houve correlação do grau de similaridade com os outros fatores estudados;
- Os níveis de similaridade entre os grupos variaram de 37 % entre isolados do grupo G12 e G2 a 90 % entre isolados do G3 e G4;
- Os dados obtidos nesse trabalho sugerem que os isolados de *A. flavus*, independente das diferentes regiões estudadas, sofreram variabilidade genética acentuada, devido ao grande número de polimorfismos detectados e à ausência de agrupamentos específicos no dendograma;
- Neste trabalho, o AFLP foi capaz de detectar diferenças intraespecíficas e interespecíficas nos padrões de fragmentos gerados entre os isolados de *A. flavus* estudados e a cepa de *A. parasiticus* padrão (formação do “outgroup”);
- O AFLP não detectou marcadores origem geográfica-específicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-ELSALAM, K. A.; SCHNIEDER, F.; KHALIL, M.S.; ASRAN-AMAL, A.; VERREET, J. A. Use of AFLP fingerprint to analyze genetic variation within and between populations of *Fusarium* spp. derived from Egyptian cotton cultivars. **J. Plant Pathol.**, v. 85, n. 2, p.99-103, 2003.

AGUILAR, F.; HUSSAIN, S. P.; CERUTTI, P. Aflatoxin B1 induces the transversion of G/T in códon 249 of the p53 tumor suppressor gene in human hepatocytes. **Proc. Natl. Sci. USA**, v.90, p. 8586-8590, 1993.

ALMEIDA, A.P.; SABINO, M.; FONSECA, H.; CORREA, B. Potencial toxigênico de cepas de *Aspergillus flavus* isoladas de grãos de milho, da semeadura à colheita, provenientes das regiões de Capão Bonito/SP e Ribeirão Preto/ SP. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v.64, n.1, p. 79-84, 2005.

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

AZEVEDO, M. O.; FELIPE, M. S. S.; BRÍGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q.; SOUZA, M. T. (Ed.). **Técnicas básicas em biologia molecular**. Brasília: Universidade Federal de Brasília, 2003. 211 p.

BARBESGAARD, P.; HELDT-HANSEN, H.P.; DIDERICHSEN, B. On the safety of *Aspergillus oryzae*: a review. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.36, p.569-572, 1992.

BARROS, G. G.; CHIOTTA, M. L.; REYNOSO, M. M.; TORRES, A. M.; CHULZE, S. N. Molecular characterization of *Aspergillus* section *Flavi* isolates collected from peanut fields in Argentina usin AFLPs. **J. Appl. Microb.**, v. 103, p. 900-909, 2007.

BATTACHARYA, K.; RAHA, S. Deteriorative changes of maize, groundnut and soybean seeds by fungi in storage. **Mycopathologia**, v. 155, n. 3, p. 135-141, 2002.

BAYMAN, P.; COTTY, P.J. Association with aflatoxin production and morphology. **Can. J. Bot.**, v. 71, n.1, p. 23-31, 1993.

***De acordo com:**

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

BENNET, J. W.; FERNHOLZ, F. A. Effect of light on aflatoxins, anthraquinones, and sclerotia in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Mycologia**, v. 70, p. 106-116, 1978.

BHAT, R. V.; VASANTHI, S.; RAO, B. S.; RAO, V. S.; NAGARAJA, K. V; BAI, R. G.; PRASAD, C. A.; VANCHINATHAN, S.; ROY, R.; MUKHERJEE, A.; GHOSH, P. K.; TORTEJA, G. S.; SAXENA, B. N. Aflatoxin B1 contamination in groundnut samples collected from different geographical regions of India: a multicentre study. **Food Addit. Contam.**, v. 13, n. 3, p. 325-331, 1996.

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, p. 69-74, 1984.

BLOUNT, W. P. Turkey "X" disease. **Turkeys**, v. 9, n. 2, p. 52-67, 1961.

BOWMAN, B. H.; WHITE, T. J.; TAYLOR, J. W. Evolutionary relationships of human pathogenic fungi: multiple origins of pathogenicity in the fungal order Onygenales. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 6, p. 89-96, 1996.

BRASIL. Leis e Decretos. Ministério da Agricultura. Portaria nº. 183, de 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, de 15 de outubro de 2002, **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo**, Brasília, DF, 16 out. 2002.

BRESSAC, B.; KEW, M.; WANDS, J.; OZTURK, M. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. **Nature**, v. 350, p. 429-431, 1991.

BROWN, J. K. L. The choice of molecular marker methods for population genetics studies of plant pathogens. **New Phytol.**, v. 133, p. 183-117, 1996.

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. (Ed.). The biosynthesis of natural products. New York: McGraw-Hill, 1965.

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.

CARDWELL, K. F.; COTTY, P. J. Distribution of *Aspergillus* section *Flavi* among field soils from four agroecological zones of the Republic of Bénin, West Africa. **Plant Dis.**, v. 86, p. 434-439, 2002.

CASTELLA, G.; LARSEN, T. O.; CABAÑES, J.; SCHIMIDT, H.; ALBORESI, A.; NIESSEN, L.; FÄRBER, P.; GEISEN, R. Molecular characterization of ochratoxin A producing strains of the genus *Penicillium*. **System. Appl. Microbiol.**, v. 25, p. 74-83, 2002.

CHRISTENSEN, C. M. (Ed.). **Storage of cereal grains and their products**. 3th ed. St. Paul: American Association Cereal Chemistry, 1982. p.145-217.

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

CLEVSTROM, G. (Ed.). **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.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Amendoim – Março 2004**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/download/cas/especiais/AMENDOIM-perspectiva%20do%20mercado-Safra%202004-2005.pdf>>. Acesso em: 20 mar. 2006.

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

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Amendoim – Safra 2007/2008**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 27 ago. 2009a.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Amendoim – Normas específicas de Amendoim**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/download/moc/titulos/T43s2008-2009.pdf>>. Acesso em: 27 ago. 2009b.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY (CAST). Mycotoxins- Risks in Plant, Animal and Human Systems. USA: Task Force Report, Iowa, n.139, 2003. 199 p.

COTTY, P. Aflatoxin and sclerotial production by *Aspergillus flavus*: influence of pH. **Phytopathology**, v. 78, p. 1250-1253, 1988.

COTTY, P. J. Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. **Phytopathology**, v. 79, p. 808-814, 1989.

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

COTTY, P. J. Aflatoxin-producing potential of communities of *Aspergillus* section *Flavi* from cotton producing áreas in United States. **Mycol. Res.**, v. 101, p. 698-704, 1997.

COTTY, P. J.; CARDWELL, K. F. Divergence of West African and North American communities of *Aspergillus* section *Flavi*. **Appl. Environ. Microb.**, v. 65, p. 2264-2266, 1999.

DIENER, U. L.; COLE, R. J.; SANDERS, T. H.; PAYER, G. A.; LEE, L. S.; KLICH, M. A. Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. **Ann. Rev. Phytopathol.**, v. 25, p. 249-270, 1987.

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.

DOWD, P. F. Insect interaction with mycotoxin-producing fungi and their hosts. In: BHATNAGAR, D., LILLEHOJ, E. B.; ARORA, D. K. **Mycotoxins in Ecological Systems. Handbook of Applied Mycology**. New York, NY: Marced Dekker, 1992. v. 5, p. 137-155.

EHRlich, K. C.; YU, J.; COTTY, P. J. Aflatoxin biosynthesis gene clusters and flanking region. **J. Appl. Microbiol.**, v. 99, p. 518-527, 2005.

EHRlich, K. C.; KOBMAN, K.; MONTALBANO, B. G.; COTTY, P. J. Aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Thailand. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 114, p. 153-159, 2007.

ESTEBAN, A.; LEONG, S. L.; HOCKING, A. D.; ABARCA, M. L.; CABAÑES, F. J.; TRAN-DINH, N. Utility of microsatellite markers and amplified fragment length polymorphism in the study of potentially ochratoxigenic black *Aspergillus*. **Curr. Microbiol.**, v. 57, p. 348-355, 2008.

FARAJ, M. K.; SMITH, J. E.; HARRAN, G. Interaction of water activity and temperature on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* in irradiated maize seeds. **Food Addit. Contam.**, v. 8, p. 731-736, 1991.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA, 1998. 220 p.

FONSECA, H.; MARTINELLI FILHO, A.; NERY, H.; RONCATTO, E. Espécies de *Aspergillus* produtoras de aflatoxina na região Araraquarense, SP. **Anais da ESALQ**, Piracicaba, SP, v.31, p. 519-536, 1974.

FONSECA, H. **A aflatoxina e o amendoim. Boletim técnico nº13**. Disponível em: <www.micotoxinas.com.br>. Acesso em: 15 ago. 2006.

FRISVAD, J. C.; LUND, F.; ELMHOLT, S. Ochratoxin A producing *Penicillium verrucosum* isolates from cereals reveal large AFLP fingerprinting variability. **J. Appl. Microbiol.**, v. 98, p. 684-692, 2005.

GAMBALE, W. Fungos contaminantes. In: ZAITZ, C. et al. São Paulo: Médica e Científica Ltda., 1998. p. 113-121.

GEISEN, R. PCR methods for the detection of mycotoxin-producing fungi. In: BRIDGE, P.D.; ARORA, D. K.; REDDY, C. A.; ELANDER, R. P. **Applications of PCR mycology**. London: CAB International, 2000. p. 357.

GEISER, D. M.; PITT, J. I.; TAYLOR, J. W. Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 388-393, 1998.

GEISER, D. M.; DORNER, J. W, HORN, B. W.; TAYLOR, J. W. The phylogenetics of mycotoxin and sclerotium production in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. **Fungal Genet. Biol.**, v. 31, p. 169-179, 2000.

GEISER, D. M.; KLICH, M. A.; FRISVAD, J. C.; PETERSON, S. W.; VARGA, J.; SAMSON, R. A. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. **Stud. Mycol.**, v. 59, p. 1-10, 2007.

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

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

GONÇALEZ, E. **Distribuição de fungos e de micotoxinas em amostras de amendoim do plantio à colheita**. 2006. Tese - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

GUO, B.; CHEN, Z. Y.; LEE, R. D.; SCULLY, B. T. Drought stress and preharvest aflatoxin contamination in agricultural commodity: genetics, genomics and proteomics. **J. Integr. Plant Biol.**, v. 50, n. 10, p. 1281–1291, 2008.

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

HASAN, H. A. Phytotoxicity of pathogenic fungi and their mycotoxins to cereal seedling viability. **Acta. Microbiol. Immunol. Hung.**, v. 48, p. 27-37, 2001.

HILL, R. A.; BLANKENSHIP, P. D.; COLE, R. J.; SANDERS, T. H. Effects of soil moisture and temperature on preharvest invasion of peanuts by the *Aspergillus flavus* group and subsequent aflatoxin development. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 45, p. 628-633, 1983.

HORN, B. W.; DORNER, J. W. Soil population of *Aspergillus* species from section *Flavi* along a transect through peanut-growing regions of the United States. **Mycologia**, v. 90, p. 767-776, 1998.

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

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, p. 81-92, 2000.

HORN, B. W.; RAMIREZ-PRADO, J. H.; CARBONE, I. Sexual reproduction and recombination in the aflatoxin-production fungus *Aspergillus parasiticus*. **Fungal Genet. Biol.**, v. 46, p. 169-175, 2009a.

HORN, B. W.; MOORE, G. G.; CARBONE, I. Sexual reproduction in *Aspergillus flavus*. **Mycologia**, v. 101, n. 3, p. 423-429, 2009b.

HSIEH, D. P. H.; ATKINSON, D. N. Bifuranoid mycotoxins: their genotoxicity and carcinogenicity. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 167, p. 101-134, 2001.

HUANG, C.J.; CHUANG, T.Y.; TSENG, T.C. Contamination of *Aspergillus flavus* on corn kernels and production of aflatoxin by fungus in Taiwan. **Plant Protect. Bull.**, v. 32, p. 195-202, 1990.

HYNES, S. S.; CHAUDHRY, O.; PROVIDENTI, M. A.; SMITH, M. L. Developing of AFLP-derived, functionally specific markers for environmental persistence studies of fungal strains. **Can. J. Microbiol.**, v. 52, p. 451-461, 2006.

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

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

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Aflatoxins: Natural occurring aflatoxinas (Group 1), aflatoxin M1 (Group 2B)**. Lyon: IARC Scientific Publications, 1993. n. 56.

KALE, S. P.; CARY, J. W.; BHATNAGAR, D.; BENNET, J. W. Characterization of experimentally induced, nonaflatoxigenic variant strains of *Aspergillus parasiticus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, p. 3399-3404, 1996.

KAMEI, K.; WATANABE, A. *Aspergillus* mycotoxins and their effect on the host. **Med. Mycol. Suppl.**, v. 43, p. 595-599, 2005.

KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; MINTER, D. W.; STALPES, J. A. **Dictionary of Fungi**. 10 ed. United Kingdom: Cabi Europe, 2008. 771 p.

KLICH, M. A. Identification of common *Aspergillus* species. Netherlands: CBS, 2002.

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

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

KU, D.; REINEKE, A.; REDDY, N. N.; RAO, C.U.; PADMAVATHI, J. Genetic diversity, reproductive biology, and speciation in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. **Genome**, v.49, n.5, p. 495-504, 2006.

LACEY, J. Airborne spores in pastures. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, v. 64, p. 1-17, 1975.

LACEY, J. Water availability and the occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in stored products. In: **International IUPAC symposium on mycotoxins and phycotoxins**. Tokyo: IUPAC, 1988. v. 6, p.186-89.

LACEY, J.; MAGAN, N. Fungi in cereal grain: their occurrence and water and temperature relations. In: CHELKOWSKI, J. **Cereal grain: mycotoxins, fungi and quality in drying and storage** (Ed.). Amsterdam: Elsevier Science, 1991. p. 77-118.

LEE, C. Z.; LIOU, G. Y.; YUAN, G. F. Comparison of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae* by amplified fragment length polymorphism. **Bot. Bull. Acad. Sin.**, v. 45, p. 61-68, 2004.

LEGATOR, M. Biological effects of aflatoxin in cell culture. **Bacteriol. Rev.**, v. 30, p. 471-477, 1966.

LESLIE, J.F.; SUMMERELL, B.A. **The Fusarium Laboratory Manual**. Iowa: Blackwell Publishing, 2006. p. 64-77.

LILLEHOJ, E. B. Aflatoxin: an ecologically elicited genetic/ activation signal. In: SMITH, J. E.; HENDERSON, R. S. **Mycotoxins and Animal Foods** (Ed.). Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 2-30.

LIN, M.T.; DIANESE, J.C. A coconut-agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. **Phytopathology**, v.66, n.12, p. 1466-1469, 1976.

LIOI, M.; SANTORO, A.; BARBIERI, R.; SALZANO, S.; URSINI, M. Ochratoxin A and zearalenone: a comparative study on genotoxic effects na cell death induced in bovine lymphocytes. **Mutat. Res.**, v. 557, p. 19-27, 2004.

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

LOURENÇO, A.; DURIGON, E.L.; ZANOTTO, P.; MADEIRA, J.E.G.C.; ALMEIDA, A.P.; CORREA, B. Genetic diversity of environmental *Aspergillus flavus* strains in the state of São Paulo, Brazil by random amplified polymorphic DNA. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 102, n.6, p. 687-692, 2007.

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

MALLOCH, D.; CAIN, R. F. The Trichocomataceae: ascomycetes with *Aspergillus*, *Paecilomyces* and *Penicillium* imperfect states. **Can. J. Bot.**, v. 50, p. 2613-2628, 1972.

MARTIN, P. S. **Amendoim**: uma planta de história no futuro brasileiro. 2. ed. São Paulo: Ícone Editora, 1987. 69 p.

MATIOLI, S.R.; PASSOS-BUENO, M.R.S. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucleicos. In: MATIOLI, S.R. (Ed.). **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos editor, 2001. 202 p.

MATSUMURA, F.; KNIGHT, S. G. Toxicity and chemosterilizing activity of aflatoxin against insects. **J. Econ. Entomol.**, v. 60, p. 871-872, 1967.

McLEAN, M.; WATT, M. P.; BERJAK, P. DUTTON, M. F. Aflatoxin B1 – its effects on an in vitro plant system. **Food Addit. Cantam.**, v. 12, p. 435-443, 1995.

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

MONTIEL, D.; DICKINSON, M. J.; LEE, H. A.; DYER, P. S. JEENES, D. J.; ROBERTS, I. N.; JAMES, S.; FULLER, L. J; MATSUCHIMA, K.; ARCHIER, D. B. Genetic differentiation of the *Aspergillus* section *flavi* complex using AFLP fingerprints. **Mycol. Res.**, v. 107, n.12, p. 1427-1434, 2003.

MOSS, M. O. Economic importance of mycotoxins-recent incidence in the United States. **Anim. Sci.**, v.27, p. 3941-3949, 1991.

MULLER, G.; BURKERT, B.; MOLLER, U. Ochratoxin A and some of its derivatives modulate radical formation of porcine blood monocytes and granulocytes. **Toxicology**, v. 199, p. 251-159, 2004.

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

NEI, M.; LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 76, p. 5269-5273, 1979.

NESBITT, B. F.; O'KELLY, J.; SARGEANT, K.; SHERIDAN, A. Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. **Nature**, v. 195, p. 1062-1063, 1962.

NEYRA, E.; FONTAYNE, P. A.; SWINNE, D.; FAUCHE, F.; BUSTAMANTE, B.; NOLARD, N. Epidemiology of human sporotrichosis investigated by Amplified Fragment Length polymorphism. **J. Clin. Microbiol.**, v.43, n.3, p.1348-1352, 2005.

NOVAS, M.V.; CABRAL, D. Association of mycotoxin and sclerotia production with compatibility groups in *Aspergillus flavus* from peanut in Argentina. **Plant Dis.**, v. 86, p. 215-219, 2002.

OLIVEIRA, C. A. F. Avaliação da exposição humana às micotoxinas. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 11., 2004, Piracicaba. **Resumos...** Piracicaba: Laboratório de Micotoxinas – LAN/ESALQ-USP, 2004. p. 9.

O'BRIAN, G. R.; GEORGIANNA, D. R.; WILKINSON, J. R., YU, J.; ABBAS, H. K.; BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T. E.; NIERMAN, W.; PAYNE, G. A. The effect of elevated temperature on gene transcription and aflatoxin biosynthesis. **Mycologia**, v. 99, p. 232–239, 2007.

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

PAPA, K. E. Heterokaryon incompatibility in *Aspergillus flavus*. **Mycologia**, v. 78, p. 98-101, 1986.

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

PERRONE, G.; MULE, G.; SUSCA, A.; BATTILANI, P.; PIETRI, A., LOGRIECO, A. Ochratoxin A production and amplified fragment length polymorphism analysis of *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus tubigiensis* and *Aspergillus niger* strains isolated from grapes in Italy. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, p. 680-685, 2006.

PIER, A. C. Mycotoxins and mycotoxicoses. In: BIBERSTEN, E. L.; ZEE, Y. C. **Review of Veterinary Microbiology**. London: Blackwell Scientific Publication, 1990. p. 346-55.

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

PITT, J. I.; DYER S. K.; McCOMMON, S. Systemic invasion of developing peanut plants by *Aspergillus flavus*. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 13, p. 16-20, 1991.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. *Aspergillus* and related teleomorphs. In: PITT, J. I. **Fungi and food spoilage**. London: Chapman & Hall, 1997. p. 339-416.

PITT, J. I.; MISCAMBLE, B. F. Water relations of *Aspergillus flavus* and closely related species. **J. Food. Protect.**, v. 58, n. 86-90, 1994.

PITT, J. I.; SAMSON, R. A. In: SAMSON, R. A.; PITT, J. I. (Ed.). **Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification**. Hardwood: Academic Publishers Reading, 2000. p. 51-72.

PITT, J. I.; SAMSON, R. A.; FRISVAD, J. C. In: SAMSON, R. A.; PITT, J. I. (Ed.). **Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification**. Hardwood: Academic Publishers Reading, 2000. p. 9-50.

PRINGLE, A.; BAKER, D. M.; PLATT, J. L.; LATGE, J. P.; TAYLOR, J. W. Cryptic speciation in the cosmopolitan and clonal human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. **Evolution**, v. 59, p. 1886-1899, 2005.

PUZZI, D. **Abastecimento e armazenagem de grãos**. Campinas: ICEA, 1986. 603 p.

REVISTA COPLANA: ABRIL 2008. **Na região o clima favorece a safra de 2007/2008**. Disponível em: <<http://www.coplana.com/gxpfiles/ws001/design/RevistaCoplana/2008/Abril/pag10-11.pdf>>. Acesso em: 04 set. 2009a.

REVISTA COPLANA: OUTUBRO 2008. **Novos horizontes na produção de amendoim**. Disponível em: <<http://www.coplana.com/gxpfiles/ws001/design/RevistaCoplana/2008/Outubro/pag06-07.pdf>>. Acesso em: 04 set. 2009b.

RIDLEY, M. **Evolução**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 752 p.

RODRIGUES, P.; SOARES, C.; KOZAKIEWICZ, Z.; PATERSON, R. R. M.; LIMA, N.; VENÂNCIO, A. Identification and characterization of *Aspergillus flavus* and aflatoxins. **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**, p. 527-534, 2007.

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

ROEBUCK, B. D.; MAXUITENKO, Y. Y. Biochemical mechanisms and biological implications of the toxicity of aflatoxins as related to aflatoxin carcinogenesis. In: ROEBUCK, B. D.; MAXUITENKO, Y. Y. (Ed.). **The toxicology of aflatoxins: Human health, veterinary and agricultural significance**. London: Academic Press, 1994. p. 27-41.

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.

SABINO, M. Retrospectiva e situação atual das micotoxinas. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 11., 2004, Piracicaba. **Resumos...** 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.

SAITO, M.; TSURUTA, O.; SIRIACHA, P.; KAWASUGI, S.; MANABE, M.; BUANGSUMON, D. Distribution and aflatoxin productivity of the atypical strains of *Aspergillus flavus* isolated from soils in Thailand. **Proc. Jpn. Assoc. Mycotoxicol.**, v. 24, p. 41-46, 1986.

SAITO, M.; TSURUTA, O.; SIRIACHA, P.; KAWASUGI, S.; MANABE, M.; BUANGSUMON, D. Atypical strains of *Aspergillus flavus* isolated in maize fields. **Proc. Jpn. Assoc. Mycotoxicol.**, v. 23, p. 151-154, 1989.

SAITON, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.**, v.4, n.4, p.406-425, 1987.

SAMSON, R. A.; VARGA, J. "What is a species in *Aspergillus*?". **Med. Mycol.**, v. 47, p. 13-20, 2009.

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

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

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.

SCHEMALE, D. G.; LESLIE, J. K.; ZELLER, K. A.; SALEH, A. A.; SHIELDS, E. J. Genetic structure of atmospheric populations of *Giberella zea*. **Phytophatology**, v. 96, p. 1021-1026, 2006.

SCHMIDT, H.; EHRMANN, M.; VOGEL, R. F.; TANIWAKI, M. H.; NIESSEN, L. Molecular typing of *Aspergillus ochraceus* and construction of species specific SCAR-primers based on AFLP. **System. Appl. Microbiol.**, v. 26, p. 138-146, 2003.

SCHMIDT, H.; TANIWAKI, M. H.; VOGEL, R. F.; NIESSEN, L. Utilization of AFLP markers for PCR-based identification of *Aspergillus carbonarium* and indication of its presence in green coffee samples. **J. Appl. Microbiol.**, v. 97, p. 899-909, 2004.

SCHMIDT-HEYDT, M.; ABDEL-HADI, A.; MAGAN, N.; GEISEN, R. Complex regulation of the aflatoxin biosynthesis gene cluster of *Aspergillus flavus* in relation to various combinations of water activity and temperature. **Int. J. Food Microbiol.**, 2009. In press.

SCOTT, P.M. Natural poisons. In: HELRICH, K. (Ed.). **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 15th. ed. Washington: AOAC, 1990. 1193 p.

SERRA, R.; CABAÑES, F. J.; PERRONE, G.; CASTELLÀ, G.; VENÂNCIO, A.; MULÈ, G.; KOZAKILWICZ, Z. *Aspergillus ibericus*: a new species of section *Nigri* isolated from grapes. **Mycologia**, v. 98, n. 2, p. 295-306, 2006.

SHARMA; S. Introduction to mycotoxins. In: SHARMA; S. **Mycotoxins and Phytoalexins**. Londres: CRC Press, 1991. 775 ps.

SILLIKER, J. H.; ELLIOTT, R. P. **Ecología Microbiana de los Alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1980. p. 74-96.

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.

SOARES, L. M. V.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and stregmatocystin in some brazilian foods by using multi-toxin thin layer chromatographic method. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 72, p. 22-6, 1989.

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

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

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.

STOLOFF, L. Occurrence of mycotoxins in foods and feeds. In: RODRICKS, J. W. **Mycotoxins and other fungal related problems**. Washington: American Chemical Society, 1976.

SWOFFORD, D.L. **PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods)**. 4th ed. Massachusetts: Sinauer Associates Inc., 1998.

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

TAYLOR, J. W.; GEISER, D. M.; BURT, A.; KOUFOPANOU, V. The evolutionary biology and population genetics underlying fungal strain typing. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, n. 1, p. 126-146, 1979.

TAYLOR, J. W.; JACOBSON, D. J.; KROKEN, S.; KASUGA, T.; GEISER, D. M.; HIBBETT, D. S.; FISHER, M.C. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. **Fungal Genet. Biol.**, v. 31, p. 21-32, 1999.

TRAN-DINH, N.; KENNEDY, I.; BUI, T.; CARTER, D. Survey of Vietnamese Peanuts, Corn and Soil for the Presence of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Mycopathologia**, 2009. In press.

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

VOS, P. R.; HOGER, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acid Res.**, v. 23, p. 4407-4414, 1995.

WICKLOW, D. T. Taxonomic features and ecological significance of sclerotia. In: DIENER, U. L.; ASQUITH, R. L.; DICKENS, J. W. (Ed.). **Aflatoxin and Aspergillus flavus in Corn**. Southern Cooperative Series Bulletin. Auburn: Auburn University, 1983. v. 79, p. 6-12.

WICKLOW, D. T.; DONAHUE, J. E. Sporogenic germination of sclerotia in *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, v. 82, p. 621-624, 1984.

WICKLOW D. T.; HORN, B. W.; BURG, W. R.; COLE, R. J. Sclerotium dispersal of *Aspergillus flavus* and *Eupenicillium ochrosalmoneum* from maize during harvest. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, v. 83, p. 299-303, 1984.

WILLIAN, J. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

WILSON, T. M; NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T. A.; MARASAS, W. F. O. The Fusarium research center and proposed diagnostic, reference and research center for Fusarium mycotoxicoses in animals. **Proc. Ann. Meet. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn.**, v. 24, p. 261-276, 1981.

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

YANNIKOURIS, A.; JUANY, J. P. Les mycotoxines dans les aliments des ruminants, leur devenir et leurs effets chez l'animal. **INRA Prod. Anim.**, v. 15, p. 3-16, 2002.

YIN, Y.; LOU, T.; YAN, L.; MICHAILIDES, T. J.; MA, Z. Molecular characterization of toxigenic and atoxigenic *Aspergillus flavus* isolates, collected from peanut fields in China. **J. Appl. Microbiol.**, 2009. In press.

ZELLER, K. A.; BOWDEN, R. L.; LESLIE, J. F. Population differentiation and recombination in wheat scab populations of *Giberella zeae* from United States. **Mol. Ecol.**, v. 13, p. 563-571, 2004.

ZERINGUE, H. J.; BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T. E. C₁₅H₂₄ volatile compounds unique to aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.59, p. 2264-2270, 1993.

ZEVADA, M. Z. Producción de aflatoxinas por cepas aisladas de maíz. **Rev. Latinoam. Microbiol.**, v. 13, p. 263-6, 1997.