



**INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**  
**Centro de Ciências e Qualidade de Alimentos**

**FERNANDA RODRIGUES**

**OCORRÊNCIA DE FUNGOS PRODUTORES DE FUMONISINA B2 E  
OCRATOXINA A NO AMENDOIM**

**CAMPINAS**

**2021**



**FERNANDA RODRIGUES**

**OCORRÊNCIA DE FUNGOS PRODUTORES DE FUMONISINA B2 E  
OCRATOXINA A NO AMENDOIM**

*Dissertação apresentada ao Instituto de  
Tecnologia de Alimentos para obtenção do  
título de Mestre em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos.*

Aluno: Fernanda Rodrigues

Orientador: Prof. Dra. Marta Hiromi Taniwaki

Co-orientador: Josué José da Silva

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação defendida pelo aluno  
Fernanda Rodrigues e orientada pelo Prof. Dra. Marta Hiromi Taniwaki

**CAMPINAS**

**2021**

**Agência(s):**

**Nº do proc.:** O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Desenvolvimento da Pesquisa do Agronegócio (FUNDEPAG) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

**FICHA CATALOGRÁFICA**

Elaborada pela Bibliotecária Lucilene Paulina da Silva CRB/8 - 8507  
Biblioteca Central do Instituto de Tecnologia de Alimentos (Ital)

R696o Rodrigues, Fernanda.

Ocorrência de fungos produtores de Fumonisina B2 e Ocratoxina A no amendoim. Fernanda Rodrigues / Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas, SP: ITAL – Instituto de Tecnologia de Alimentos, 2021.

40 f.

Orientação: Profa. Dra. Marta Hiromi Taniwaki.  
Co-orientação: Dr. Josué José da Silva.

1. Ocratoxina A. 2. Fumonisina B2. 3. *Aspergillus* section *Nigri*. 4. Infecção. 5. Fungos. I. Instituto de Tecnologia de Alimentos (Ital). Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos (CCQA). II. Rodrigues, Fernanda. III. Título.

**Título em inglês:** Occurrence of Fungi Producing Fumonisin B2 and Ochratoxin A in Peanuts

**Key-words:** Ochratoxin A; Fumonisin B2; *Aspergillus* section *Nigri*; Contamination; Fungi.

**Titulação:** Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

**Banca Examinadora:** Dra. Marta Hiromi Taniwaki (orientadora), Dr. Josué José da Silva (co-orientador), Dra. Beatriz Thie Iamanaka (membro titular), Maria Antonia Calori Domingues (membro titular), Dr. Marcelo Morgano (membro suplente).

**Data da Defesa:** 05/08/2021

**Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos**

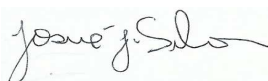
## BANCA EXAMINADORA

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida por Fernanda Rodrigues aprovada pela Comissão Julgadora em 05/08/2021.



---

Prof.(a) Dr.(a) Marta Hiromi Taniwaki  
CCQA/ITAL (Presidente)



---

Dr. Josué José da Silva  
CCQA/ITAL (co-orientador)



---

Dra. Beatriz Thie Iamanaka  
CCQA/ITAL (titular)



---

Dra. Maria Antonia Calori Domingues  
ESALQ/USP(titular)

---

Dr. Marcelo Morgano  
CCQA/ITAL (suplente)

A ata de defesa de dissertação de mestrado com as respectivas assinaturas dos membros da banca encontra-se arquivada junto à documentação do aluno.

## DEDICATÓRIA

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais Airton Rodrigues e Dalva Maria Faria Rodrigues por todo o incentivo e apoio durante toda minha vida acadêmica. Ao meu irmão Caio Henrique Rodrigues, minha madrinha Cidalma Bento Faria Faina e minha avó Margarida Alves de Jesus Faria por todo apoio e suporte.

Agradeço a minha orientadora Dra. Marta Hiromi Taniwaki pela confiança em me escolher para esse trabalho e por ter contribuído com muitos ensinamentos e aprendizados.

Agradeço a todos do laboratório, em especial a Dra Beatriz Thie Iamanaka, Lígia Manoel Martins, Josiane Bueno, Laís Tiemi Ono, Ana Laís Gaspardi e Tamara Oliveira pela paciência e amizade.

Agradeço ao programa de pós graduação, a banca examinadora e a todos que de alguma forma contribuíram com esse trabalho.

Meu muito obrigada.

## RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar as espécies de *Aspergillus* section *Nigri* em amostras de amendoim e no solo cultivado por essa cultura, bem como a presença de Ocratoxina A (OTA) nas amostras de amendoim. Um total de 583 cepas de *Aspergillus* section *Nigri* foram isoladas, sendo 316 provenientes de 42 amostras de solo e 212 provenientes de 52 amostras de amendoim. Com relação as amostras de solo, os fungos da seção *Nigri* e da seção *Flavi* foram os mais encontrados, com uma frequência de ocorrência de 71% e 100%, respectivamente. Foi realizado a caracterização morfológica e a identificação molecular de representantes dos morfogrupos. Foram identificadas seis espécies de *A.* section *Nigri*: *Aspergillus brasiliensis*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus neoniger*, *Aspergillus welwitschiae*, *Aspergillus japonicus* e *Aspergillus costaricensis*. Dentre as espécies identificadas, 3 isolados de *Aspergillus niger* e 9 de *Aspergillus welwitschiae* produziram OTA, 7 isolados de *Aspergillus niger* e 2 de *Aspergillus welwitschiae* produziram fumonisina B2 (FB2) e 2 isolados de *Aspergillus niger* produziram ambas as toxinas. Quanto a presença de OTA, das 52 amostras de amendoim analisadas, 15 apresentaram contaminação por essa toxina em valores de 0,060 µg/kg a 0,387 µg/kg. Esses dados revelam que o amendoim é uma matriz favorável à infecção por fungos produtores de OTA e FB2, e a OTA pode estar presente no amendoim.

### Palavras-chave:

Ocratoxina A; Fumonisina B2; *Aspergillus* section *Nigri*; Infecção; Fungos.



## ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the species of *Aspergillus* section *Nigri* in peanuts and in the soil and the presence of ochratoxin A (OTA) in peanuts. A total of 583 fungi of *Aspergillus* section *Nigri* were isolated, 316 from soil and 218 from peanut samples. In the soil samples, fungi from the *A.* section *Nigri* and *A.* section *Flavi* were the most found, with a frequency of occurrence of 71% and 100%, respectively. Morphological characterization and molecular identification of representatives of morphogroups were performed. Six species of *A.* section *Nigri* were identified: *Aspergillus brasiliensis*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus neoniger*, *Aspergillus welwitschiae*, *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus costaricaensis*. From these identified species, 3 isolates of *Aspergillus niger* and 9 of *Aspergillus welwitschiae* produced ochratoxin A (OTA), 7 isolates of *Aspergillus niger* and 2 of *Aspergillus welwitschiae* produced fumonisin B2 (FB2) and 2 isolates of *Aspergillus niger* produced both toxins. As for the presence of OTA, from 52 samples of peanuts, 15 showed the presence of this toxin ranging from 0.060 µg/kg to 0.387 µg/kg. These data reveal that peanuts is a favourable substrate for infection of OTA and FB2 producing fungi and OTA can be found in peanuts

### Key words:

Ochratoxin A; Fumonisin B2; *Aspergillus* section *Nigri*; Infection; fungi

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT .....	vii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	3
Objetivo principal.....	3
Objetivos específicos .....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
4.6.    TESTE DE PRODUÇÃO DE OCRATOXINA A.....	17
4.7.    TESTE DE PRODUÇÃO DE FUMONISINA B2.....	17
4.8.    DETERMINAÇÃO DE OCRATOXINA A NAS AMOSTRAS DE AMENDOIM 18	
4.9.    LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO .....	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
5.1.    OCORRÊNCIA DE <i>A. SECTION NIGRI</i> EM AMOSTRAS DE SOLO .....	19
5.3.    ASPERGILLUS SECTION NIGRI EM AMENDOIM .....	21
6. CONCLUSÕES .....	31
7. REFERÊNCIAS.....	32

## INTRODUÇÃO

O amendoim é considerado uma leguminosa de alto valor nutricional por ser rico em lipídeos e proteínas e pode ser usado na forma *in natura* ou como matriz para produção de óleo (SPINELLI; LONGON; SILVEIRA, 2018). Suas sementes possuem alto valor energético devido à presença de ácidos graxos insaturados, além de ser rico em vitamina E e vitaminas do complexo B (BONIFÁCIO et al., 2015).

De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), no ano de 2019/2020 a área plantada de amendoim foi de 160,5 mil hectares, sendo 153,3 mil hectares para a primeira safra e 7,2 mil hectares para a segunda safra. Já em janeiro de 2021, a estimativa de área plantada é de 157,9 mil hectares para a primeira safra, representando um aumento de 3% com relação à safra anterior. A produção no período de 2019/2020 foi de 554,8 mil toneladas para a primeira safra e 12,7 mil toneladas para a segunda. Para janeiro de 2021 a estimativa é de 561,6 mil toneladas para a primeira safra e 12,8 mil toneladas para a segunda, mostrando um aumento de 3,1 % e 0,8%, respectivamente, em comparação com a safra anterior (CONAB, 2020). Em 2020/2021 o Brasil ocupou a 15ª no ranking mundial na produção de amendoim.

O estado de São Paulo concentra a maior produção no país. O cultivo de amendoim é tradicionalmente conduzido com esquema de rotação de culturas, alternando com cana-de-açúcar e pastagens. Um dos benefícios das áreas de rotação é a baixa incidência de plantas daninhas na cultura principal, além de contribuir com o enriquecimento de nutrientes no solo que minimizam os custos dos canaviais (CONAB, 2020).

As características de sua produção, como o desenvolvimento no interior do solo, maturação desuniforme e ocorrência de chuvas na etapa da secagem tornam o grão de amendoim susceptível à invasão por microrganismos, especialmente por fungos, podendo ocorrer a deterioração do grão e a redução do poder germinativo (SANTOS et al., 2013).

Os fungos toxigênicos produzem vários metabólitos secundários, mas apenas alguns são classificados como micotoxinas. Condições ambientais favoráveis, particularmente temperatura e umidade relativa do ar, favorecem o desenvolvimento desses microrganismos e a produção das micotoxinas, que pode ocorrer desde o campo até a etapa de armazenamento (TANIWAKI; PITT; MAGAN 2018; NEME, 2017). O desenvolvimento de fungos toxigênicos em alimentos nas etapas de pré e pós-colheita pode levar ao acúmulo de micotoxinas, acarretando em risco à saúde do consumidor (OYEDELE, 2017).

De acordo com SACRAMENTO (2016), o clima tropical do Brasil e as condições inadequadas na cadeia produtiva de grãos e cereais, como colheita, secagem, transporte e armazenamento favorecem o desenvolvimento de fungos. A contaminação de grãos e seus subprodutos por micotoxinas causam grandes impactos econômicos na agricultura, deixando-os inviáveis para consumo (GONÇALVES; SANTANA; PELEGRINI, 2017). De acordo com TANIWAKI; IAMANAKA; SILVA (2014), os principais gêneros associados a produção de toxinas são *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*.

A legislação brasileira para aflatoxinas estabelece o limite máximo tolerado de 20 µg/kg para amendoim com casca, descascado, cru ou tostado além de pasta de amendoim e manteiga de amendoim (Brasil, 2011), mas não estabelece limites com relação à ocratoxina A (OTA) e fumonisina B2 (FB2). Alguns estudos relatam a presença dessas micotoxinas no amendoim, causando uma preocupação à saúde do consumidor. O International Agency for Researchon Cancer (IARC, 1993) classificou a ocratoxina A e as fumonisinas como possivelmente carcinogênicas para humanos (grupo 2B), além de causar efeitos hepatotóxicos, nefrotóxicos e ação imunossupressora. Apesar da fumonisina B1 ser a mais relatada, a fumonisina B2 é mais citotóxica e por isso seu potencial deve ser estudado (IARC, 1993).

## OBJETIVOS

### OBJETIVO PRINCIPAL

- Investigar a ocorrência de *Aspergillus section Nigri* nas amostras de amendoim e solo.
- Investigar a biodiversidade das espécies de *Aspergillus section Nigri* produtoras de ocratoxina A e fumonisina B2, isoladas do amendoim e do solo.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a ocorrência de *Aspergillus section Nigri* no amendoim e no solo onde o amendoim foi cultivado;
- Identificar os isolados de *Aspergillus section Nigri* através das características morfológicas, fisiológicas e moleculares;
- Investigar a produção de ocratoxina A (OTA) e fumonisina B2 (FB2) pelos isolados de *Aspergillus section Nigri*;
- Otimizar a metodologia de análise de OTA amendoim;
- Verificar a presença de OTA nas amostras amendoim.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1. ASPECTOS GERAIS

O amendoim é um grão que pertence à família das leguminosas, sendo cultivado em países de clima tropical e subtropical. É consumido principalmente na forma torrada, cru como ingrediente de alimentos processados ou usado como matéria prima na obtenção de óleo (LOZANO et al., 2019). Uma das suas origens sugerem que o amendoim tenha vindo do Peru, onde era cultivado pelos povos Incas (AKRAM; SHAFIQ; ASHRAF, 2018).

A cadeia produtiva do amendoim pode ser separada em três fases. A primeira é a produção, e envolve todas as etapas de pré e pós colheita como arranque, secagem e debulha. A segunda fase, compreende todo o processamento

secundário dos grãos, como descascamento e torração. Já a terceira fase, envolve todo o processo de fabricação de produtos até chegar no produto final de interesse. Para isso, nessa fase algumas etapas como moagem, prensagem, aquecimento e uso de embalagem podem ser utilizadas (NASCIMENTO et al., 2018). Na etapa de arranque, as plantas são colocadas em leiras com as vagens para cima para que possam ser secas. A umidade do amendoim no momento do arranque é de aproximadamente 45%. O grão continua secando até atingir uma umidade de 16 a 10%. Na etapa seguinte, as vagens são separadas das plantas no processo de despencamento quando atingem uma umidade de 8% (Brasil, 2008). Esse valor garante a segurança microbiológica do grão.

O amendoim é composto por uma casca externa e no seu interior normalmente há de 2 a 3 sementes constituídas de 2 cotilédones e do germe coberto por uma película externa (testa). Dependendo da variedade do amendoim, a cor da testa pode ser vermelha, marrom, roxa ou branca. A principal função dessa película externa, é proteger a semente de pragas e doenças. Os cotilédones compõem de 92 a 94% do peso da semente e a testa de 4 a 5% (FAO, 2002). Os cotilédones da semente de amendoim são constituídos de material de reserva de óleos e proteínas, que conferem gosto e valor comercial ao grão (CONAGIN, 1995).

A característica peculiar do amendoim é a formação subterrânea dos frutos e o desenvolvimento das vagens após a fertilização através de uma estrutura fibrosa chamada ginóforo ou “peg”. Para cada ciclo de crescimento, a planta produz um número de 250 a 350 flores dependendo da variedade botânica, mas nem todas as flores produzem vagens. Esse fato se deve a baixa habilidade do ginóforo desenvolver uma vagem viável que fica em torno de 22% em genótipos de porte ereto (LUZ et al., 2010). Genótipos que tem porte rasteiro possuem maior contato das “pegs” com o solo e por isso tendem a apresentar maior número de flores e frutos viáveis (SANTOS et al., 1997).

As variedades comerciais de amendoim podem ser separadas em três grupos. As plantas do tipo Virgínia podem ser eretas ou rasteiras e possuem ramos mais longos e em maior quantidade. As flores se desenvolvem nos ramos secundários, mas não no ramo principal. Esse grupo forma frutos e sementes grandes, que medem de 2 a 5 cm. Já as plantas dos grupos Spanish e Valência possuem menor quantidade de ramos e apresentam flores no ramo principal e são

do tipo ereto. As flores se acumulam nos primeiros nós dos ramos e a frutificação se concentra na base da planta. Os frutos irão distinguir esses dois grupos: frutos pequenos, de 1 a 3 cm, são característicos do tipo Spanish e frutos longos, de 1 a 6 cm, são do tipo Valência (CONAGIN, 1995).

Boote (1982) determinou os estágios reprodutivos das sementes de amendoim com base em observações visuais. Os estágios foram analisados com relação a floração, pegging, crescimento do fruto, crescimento das sementes e maturidade. Ao todo, o autor apontou 9 estágios reprodutivos que são nomeados de R1 a R9, sendo que o estágio inicial R1 compreende o início da floração, na qual cerca de 50% das plantas tiveram flor aberta e o estágio R9 compreende a super maturação das sementes acarretando em uma possível perda dos frutos. Os 9 estágios estão ilustrados na Figura 1.



**Figura 1** - Estágios reprodutivos do amendoim (Boote, 1982).

## 1.2. PRODUÇÃO

No ano de 2020, a China ocupou a primeira colocação na produção mundial de amendoim, com 17.500.000 toneladas, seguida da Índia e Nigéria com 6.500.000 e 3.900.000 toneladas, respectivamente. Os destaques no continente americano ficaram com os Estados Unidos e Argentina com 654.000 toneladas e 350.000 toneladas, respectivamente. O Brasil ocupou a vigésima quinta colocação com 160.000 toneladas (USDA, 2021). Com relação ao consumo, ainda de acordo com a USDA, no mesmo ano a China foi a maior consumidora de amendoim, chegando a 7.450.000 toneladas seguida da Nigéria, Indonésia, Estados Unidos e Índia. O Brasil ocupou a trigésima quarta posição, com um consumo de 81.000 toneladas (USDA, 2020).

O amendoim é uma cultura cultivada em duas safras. De acordo com o terceiro boletim de levantamento da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a estimativa de produção de amendoim em dezembro de 2020 foi de 586,1 mil toneladas para a primeira safra e 12,8 mil toneladas para a segunda safra. Com relação a área plantada, a estimativa para a primeira safra em dezembro de 2020 foi de 156,8 mil hectares e para a segunda safra de 7,2 mil hectares. A produtividade para o mesmo período foi de 3.738 Kg/hectare na primeira safra e 1.771 Kg/hectare na segunda safra. Ainda de acordo com a CONAB, a estimativa de área plantada para janeiro de 2021 será de 157,9 mil hectares para a primeira safra e 7,2 mil hectares para a segunda safra, mostrando um aumento de 0,7% comparado com o mês anterior. Com relação a produção, para a primeira safra de janeiro de 2021 a estimativa foi de 561,6 mil toneladas e para a segunda safra será de 12,8 mil toneladas, mostrando uma queda de 4,2% com relação ao ano anterior (CONAB, 2021).

O estado de São Paulo concentra a maior parte da produção nacional de amendoim, sendo a região de Jaboticabal de maior destaque. Na segunda safra, a redução da produção de amendoim se deve a rotação com a cana-de-açúcar e pastagens. Dessa forma, diversos benefícios são proporcionados à cultura principal, como a baixa incidência de plantas daninhas e permanência de nutrientes no solo que contribuirão com a redução de custos de implantação dos canaviais. Além disso, o estado de São Paulo concentra as principais agroindústrias do



amendoim, como o beneficiamento, as indústrias de óleo vegetal e confeitaria (CONAB, 2021).

### **1.3. FUNGOS TOXIGÊNICOS**

O crescimento fúngico nem sempre implica diretamente na produção de micotoxinas, porque nem todas os fungos produzem toxinas. Mas se houver fungos toxigênicos e condições para a produção de toxinas, esta poderá ocorrer em qualquer etapa do crescimento da planta, na colheita ou na estocagem, e esses metabólitos uma vez produzidos, podem permanecer no alimento mesmo após a destruição do fungo produtor (IAMANAKA; OLIVEIRA; TANIWAKI, 2010).

De acordo com MILLER (1995), os fungos toxigênicos são divididos em dois grupos distintos. O primeiro compreende os fungos que produzem as micotoxinas antes da colheita. Já o segundo engloba os que produzem toxinas após a colheita. As interações biológicas, como insetos, e plantas hospedarias são as principais causas de invasão de fungos no campo; além de fatores abióticos como o estresse hídrico. O crescimento do fungo toxigênico após a colheita é governado por fatores abióticos como temperatura, e umidade relativa do ar, bióticos, como insetos, pragas, e fatores culturais, como as variedades da semente e os seus nutrientes.

### **1.4. *ASPERGILLUS SECTION NIGRI***

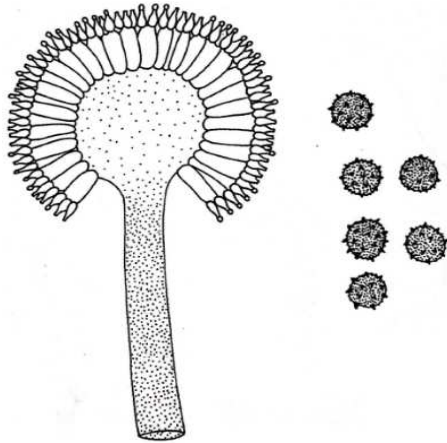
Os fungos do gênero *Aspergillus* foram descritos pela primeira vez em 1729 por Pier Antonio Micheli. Os fungos da seção *Nigri* são formados por espécies que são chamadas de “Aspergilos Negros” e são caracterizadas por produzir esporos assexuais (conídios) negros que fornecem resistência a radiação solar. Esses fungos estão distribuídos largamente na natureza e são fungos deteriorantes de alimentos (IAMANAKA; OLIVEIRA; TANIWAKI, 2010). Apesar da principal fonte ser o solo (VARGA et al.; 2011), alguns membros dessa seção foram relatados em diversos habitats, incluindo matéria orgânica em decomposição e na superfície de plantas vivas, além de causar deterioração em alimentos e doenças em milho, amendoim, cebolas e uvas (MUNKVOLD et al.; 2018). Podem se desenvolver em ambientes quentes e temperados, em condições de altas temperaturas e baixa

atividade de água podendo ser encontrados em castanhas, nozes e amendoim (PITT; HOCKING, 2009).

Atualmente *A. section Nigri* é composta por 28 espécies (SAMSON et al., 2014), divididos em sete clados: *A. tubingensis*, *A. niger*, *A. brasiliensis*, *A. carbonarius*, *A. heteromorphus*, *A. homomorphus* e *A. aculeatus*. As espécies *A. costaricaensis*, *A. luchuensis*, *A. neoniger*, *A. piperis*, *A. tubingensis*, *A. eucalypticolae* e *A. vadensis* (clado *A. tubingensis*); *A. niger*, *A. vinaceuse* e *A. welwitschiae* (clado *A. niger*) e *A. brasiliensis* (clado *A. brasiliensis*) são morfologicamente indistinguíveis, e são chamados de agregado *Aspergillus niger*.

Com relação a fumonisina B2 (FB2), o trabalho de Frisvad et al. (2007) mostrou, pela primeira vez, que alguns isolados de *A. niger* foram capazes de produzir essa micotoxina. Até então, apenas *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* e outras espécies do gênero haviam sido relatadas como produtoras de fumonisinas. Mais tarde em 2011, a pesquisa realizada por FRISVAD et al. (2011) mostrou que *A. niger* pode produzir tanto a fumonisina B2 quanto a B4 e B6. Na mesma pesquisa, os autores também mostraram que as espécies de *A. welwitschiae* podem produzir FB2 (FRISVAD et al., 2011).

De acordo com PITT; HOCKING (2009), os fungos da espécie *A. niger* possuem conidióforos com paredes lisas de largura entre 1,0 e 3,0  $\mu\text{m}$ . As vesículas são esféricas com diâmetro de 50 a 75  $\mu\text{m}$  com métulas e/ou fiálides recobrimdo toda a vesícula. As métulas e fiálides possuem comprimentos de 10 a 15  $\mu\text{m}$  e 7 a 10  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Os conídios possuem formato esférico com diâmetros de 4 a 5  $\mu\text{m}$  e paredes ásperas ou estriadas. Os fungos dessa espécie estão ilustrados na Figura 2.



**Figura 2** - Conidióforo e conídios *Aspergillus niger* (SAMSON et al., 2010)

A espécie *A. welwitschiae* (antes *A. awamori*) foi descrita por NAKAZAWA (1907) pela primeira vez com base numa cepa padrão usada na fermentação alcoólica da bebida awamori, típica de Okinawa (Japão) feita com grãos de arroz. Em 2011, esta espécie foi separada do táxon *Aspergillus niger* após as análises moleculares (HONG et al., 2013; PERRONE et al., 2011) e denominada *A. welwitschiae*. As espécies *A. niger* e *A. welwitschiae* não podem ser distinguidas por dados ecológicos ou fenotípicos (PERRONE et al., 2011). A ocorrência destas duas espécies tem sido investigada em vários países devido a sua capacidade de produzir as micotoxinas FB2 e OTA.

SUSCA et al. (2016) avaliaram a produção de FB2 e OTA em 92 isolados de *A. niger* e *A. welwitschiae* de diferentes culturas e regiões geográficas. Os níveis produzidos de OTA e FB2 variaram acentuadamente de 30 a 590 µg/kg e de 0,1 a 44,4 µg/kg, respectivamente. Além disso, 74% das cepas de *A. niger* e 16% das cepas de *A. welwitschiae* produziram FB2. Com relação a produção de OTA, apenas 4% das cepas de *A. niger* e 25% de *A. welwitschiae* produziram OTA. Para a produção de ambas toxinas, a frequência de isolados das duas espécies foi semelhante: 8% das cepas de *A. welwitschiae* e 4% das cepas de *A. niger*. Em contraste, os isolados que não produziram nenhuma das micotoxinas foi de 13% e 68% para *A. welwitschiae* e *A. niger*, respectivamente.

FRISVAD et al. (2011) analisaram a capacidade das cepas industriais de *Aspergillus niger* produzirem FB2 e OTA. Os autores utilizaram 180 cepas

industriais de *A. niger* e 228 cepas de outras espécies da seção *Nigri*. Das cepas industriais, 83% produziram FB2, FB4 e FB6, 33% produziram OTA e 26% produziram ambas toxinas.

SHIMIZU et al. (2015) estudou 12 cepas de *A. niger* com relação a produção de FB2 e foi constatado que 5 cepas com o gene *fum8* ( $\alpha$ -oxoamine sintase) produziram a toxina. Já para a produção de OTA, os genes PKS An15g07920 (policetídeo sintase) foram os responsáveis pela produção (ZHANG et al., 2016). MASSI et al. (2020) analisaram cepas da seção *Nigri* isoladas de cebola. O estudo mostrou que das 242 cepas sequenciadas, 237 (97,7%) foram identificadas com o *A. welwitschiae* e 5 (2,1%) como *A. niger*. A pesquisa mostrou que em 36% das cepas de *A. welwitschiae* foi encontrado o gene *fum8* e em 2,8% foram encontrados os genes *radH* e *PKS*. No estudo conduzido por FERRACIN et al. (2012), os autores investigaram 119 cepas de *A. niger* com relação à presença/ausência do gene *PKS* e a capacidade de produção de OTA. O estudo revelou que das 119 cepas o gene *PKS* foi encontrado em todas as produtoras (31) e não foi detectado nas não produtoras (88), confirmando esta associação entre o gene *PKS* e a produção de OTA pela cepa. De acordo com SAMSON et al. (2010), de 6 a 10% das cepas de *A. niger* são capazes de produzir OTA.

## 1.5. MICOTOXINAS

No ano de 1960, as implicações das micotoxinas na saúde humana ganharam maior atenção devido à doença X que vitimou milhares de aves, principalmente perus, no Reino Unido. (SAKATA; SABBAG; MAIA, 2011; SACRAMENTO, 2016). Em 1969, a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) iniciou o programa de Monografia para avaliar as substâncias químicas que tem risco cancerígeno para humanos. Desde então, o programa foi ampliado para outras substâncias que também podem trazer esse risco que são classificados em 5 grupos: Carcinogênicas para humanos (Grupo 1), provavelmente carcinogênicas para humanos (Grupo 2A), possivelmente carcinogênica para humanos (Grupo 2B), não classificável quanto a sua carcinogenicidade para humanos (Grupo 3) e provavelmente não carcinogênica para humanos (Grupo 4) (IARC, 1993; OSTRY et al., 2016).

As fumonisinas foram descritas e caracterizadas em 1988 na África do Sul (BEZUIDENHOUT et al., 1988). São compostos secundários produzidos por fungos de gênero *Fusarium*, particularmente por *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum* e por espécies de *A. niger* e *A. welwitschiae* (KALTNER et al., 2017).

Estudos têm associado o consumo de alimentos contaminados por fumonisinas B1 e B2 ao aumento das taxas de câncer de esôfago na China e África do Sul, embora os mecanismos de toxicidade envolvidos nesses casos ainda não tenham sido elucidados. As toxinas produzidas por *F. verticillioides* foram classificadas no Grupo 2B, como possivelmente carcinogênicas para humanos (IARC, 1993; OSTRY et al., 2016).

A Ocratoxina A (OTA) foi relatada pela primeira vez em 1965 como um composto secundário do fungo *Aspergillus ochraceus* (VAN DER MERWE et al., 1965). A OTA consiste em uma porção de para-clorofenólica contendo um grupo di-hidroiso-cumarina ligado por uma amida a L-fenilalanina.

Em 1987, devido a dados insuficientes, a OTA foi classificada pelo IARC no Grupo 3 como não classificável quanto a sua carcinogenicidade para humanos. Mas, em 1993, alguns estudos mostraram que houve um aumento de tumores hepatocelulares em camundongos e também tumores renais em ratos e camundongos, o que levou a reclassificação da OTA no Grupo 2B, como possivelmente carcinogênico para humanos, causando danos nos rins, fígado e ação imunossupressora (IARC, 1993; OSTRY et al., 2016).

A produção de OTA em amendoim está associada à secagem insuficiente ou armazenamento impróprio. Em regiões temperadas, os principais fungos produtores de OTA são: *Penicillium verrucosum* e *P. nordicum*; em regiões mais quentes os principais produtores são do gênero *Aspergillus*, como *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae*, *Aspergillus carbonarius* e *A. niger* (STREIT et al., 2012). OTA tem sido encontrada em cereais, grãos, café, uvas, temperos e amendoim entre outros.

A maioria das micotoxinas é estável a tratamentos térmicos. A OTA e fumonisinas podem ser parcialmente destruídas a 200 e acima de 180°C, respectivamente, mas não totalmente eliminadas (LIU et al., 2020).

Para minimizar a contaminação por micotoxinas em produtos agrícolas, algumas práticas pré, durante e pós colheita como selecionar variedades de grãos resistentes, irrigação adequada, gestão de infestação de pragas, colheita

adequada, limpeza, secagem adequada e boas práticas de armazenamento devem ser empregadas (SHI et al., 2018).

## **1.6. LEGISLAÇÃO**

A legislação brasileira estabelece limites máximos tolerados de ocratoxina A e fumonisina B2 para diversos alimentos. Com relação a OTA, produtos de cacau e chocolate, vinho, amêndoa de cacau e especiarias possuem limites de 5, 2, 10 e 30 µg/kg, respectivamente. Além dos alimentos citados acima, a legislação também estabelece limites para cereais, feijão, café torrado e solúvel, suco de uva e frutas secas. Para fumonisinas (B1+B2), a legislação estabelece limites máximos toleráveis para milho, alimentos à base de milho para produtos infantis, farinha de milho e amido de milho de 2000, 200, 2500 e 2000 µg/kg, respectivamente.

No entanto, para amendoim e seus derivados, a legislação estabelece limite máximo tolerado de 20 µg/kg para às aflatoxinas (BRASIL, 2011).

## **1.7. OCORRÊNCIA DE OCRATOXINA A EM AMENDOIM**

Algumas pesquisas relatam níveis de OTA em amendoim produzidos por *Aspergillus section Nigri*. A Tabela 1 mostra dados de ocorrência de OTA em amendoim e produtos de amendoim.

**Tabela 1** – Ocorrência de OTA em amendoim e produtos em diferentes partes do mundo.

Alimento	Média OTA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Método de detecção	Local	Referência
Pasta de amendoim	9,8	UHPLC- MS/MS	Costa do Marfim	MANIZAN et al. (2018)
Amendoim	5,3	LC-MS/MS	Porto	CUNHA et al. (2018)
Farinha de amendoim	1,9	HPLC- MS/MS	Ruanda	UMEREWENEZA et al. (2017)
Amendoim	3,7 a 5	LC	República do Níger	TOFFA et al. (2013)
Amendoim	2,75 a 7,42	ELISA	Jordânia	NIDA, AHMAD (2010)
Amendoim	60	HPLC	Tunísia	ZAIED et al. (2010)
Amendoim	5,6 a 130	HPLC	Argentina	MAGNOLI et al. (2007)
Amendoim	0,6 a 64	HPLC	Costa do Marfim	SANGARE-TIGORI et al. (2006)

Dois trabalhos reportaram a contaminação por FB2 em amendoim e produtos. UMEREWENEZA et al. (2018) estudaram a ocorrência de micotoxinas em farinha de milho, farinha de amendoim e farinha de mandioca consumidas em Ruanda. Os autores detectaram ocratoxina A em concentrações de 2,7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 0,2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  e 2,8  $\mu\text{g}/\text{kg}$  em amostras de farinha de amendoim de 3 mercados. Também foi detectado fumonisina B2 na farinha de amendoim, mas em níveis abaixo de 0,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . CUNHA et al. (2018) analisaram 37 amostras de alimentos obtidas da região do Porto. Dentre as amostras, 4 foram de amendoim e, dessas 4, os autores encontraram fumonisina B2 em 1 amostra, em um nível de 5,08  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . *Aspergillus* section *Nigri* produtores de OTA e FB2 já foram relatados em diversos trabalhos, bem como a presença dessas toxinas nos alimentos em que foram isolados. As investigações sobre a ocorrência de *A. section Nigri* em amendoim são escassas em todo o mundo, portanto, é de suma importância investigar a diversidade desse

grupo no amendoim brasileiro, afim de, caracterizar a ocorrência de espécies potencialmente toxigênicas e a contaminação por OTA e FB2, e assim garantir a segurança do alimento para consumo, minimizando os riscos à saúde pública.

## MATERIAL E MÉTODOS

### **1.8. AMOSTRAGEM**

Foram obtidas 52 amostras de amendoim, destas, 42 amostras foram recém colhidas de um campo experimental da cidade de Araraquara e as demais (10) amostras foram fornecidas pela Cooperativa dos Plantadores de Cana do Oeste do Estado de São Paulo (Coopercana), da cidade de Sertãozinho. As amostras do campo experimental foram colhidas, separadas em 42 embalagens e levadas até o Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL para serem secas até atingir a atividade de água de 0,7 e armazenadas a temperatura ambiente.

As amostras recebidas da Coopercana já estavam secas e separadas em 10 embalagens de 1 kg cada uma. Tais amostras foram armazenadas a temperatura ambiente.

Além das 42 amostras de amendoim do campo experimental, 42 amostras de solo foram obtidas do mesmo local para posteriores análises. Essas amostras foram coletadas, separadas em 42 embalagens e levadas até o ITAL onde foram armazenadas em câmara fria.

### **1.9. ATIVIDADE DE ÁGUA**

A medida da atividade de água (aw) das amostras foi realizada em triplicata, utilizando equipamento AquaLab – Decagon (Decagon, Pullman, Wa, USA) a 25 °C ( $\pm 1$  °C).

### **1.10. ISOLAMENTO FÚNGICO E CONTAGEM**

A análise micológica das amostras de amendoim e do solo foi realizada segundo PITT; HOCKING (2009).



Um total de 50 grãos de cada amostra de amendoim foi desinfetado em solução de hipoclorito de sódio 0,4% por 2 minutos. Em seguida, foi realizado o plaqueamento direto de 50 grãos, distribuídos em 10 placas (5 grãos por placa) contendo agardicloran 18% glicerol (DG18). As placas foram incubadas à 25°C por 5 dias e os resultados expressos em porcentagem de amendoim infectado.

As amostras de solo foram analisadas conforme a técnica de diluição em placas, utilizando 25 g de solo e 225 ml de água peptonada e diluição em série. Alíquotas de 0,1 ml foram plaqueadas no meio DG18. As placas foram incubadas a 25°C por 7 dias. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g).

### **1.11. IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA**

As cepas do gênero *Aspergillus* section *Nigri* foram isoladas no meio Ágar Extrato de Levedura Czapek (CYA) e incubados a 25°C por 7 dias. As cepas foram identificadas e separadas em grupos de acordo com suas características macroscópicas e microscópicas de acordo com PITT; HOCKING (2009).

Com base nas características morfológicas de *A.* section *Nigri*, foram criados morfogrupos, onde representantes de cada grupo foram amostrados para a identificação a nível de espécie, com base em análises moleculares.

### **1.12. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR**

#### **1.12.1. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO**

As cepas selecionadas foram inoculadas em meio CYA (ágar Czapek Yeast Autolysate) para obtenção de colônias monospóricas. As cepas purificadas foram crescidas em meio líquido YES (Yeast Extract Sucrose) a 25°C por 3 dias até a formação de uma película micelial, que foi então macerada manualmente com o auxílio de nitrogênio líquido. O material macerado foi utilizado para obtenção do DNA genômico através do kit Gel DNA Purification (Mebep Bioscience) conforme protocolo recomendado pelo fabricante.

A quantificação do DNA foi inicialmente determinada por método espectrofotométrico, em NanoDrop® (ThermoScientific), e posteriormente a quantidade de DNA foi confirmada em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL), através da comparação da fluorescência sob luz UV entre as bandas de DNA obtidas e uma amostra de DNA de concentração já conhecida. Após a quantificação, as amostras foram armazenadas a -20°C, onde permaneceram até o momento do uso.

### **1.12.2. PCR E SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO DA CALMODULINA (CAM)**

Para identificação das cepas, selecionadas foi realizada a amplificação de parte do gene que codifica a Calmodulina (*CaM*). Uma PCR foi conduzida utilizando o par de primers cmd5 (5'- CCG AGT ACA AGG ARG CCT TC -3') e cmd6 (5'- CCG ATR GAG GTC ATR ACG TGG -3') descritos por HONG et al. (2005). A amplificação foi realizada sob os seguintes parâmetros: a reação foi composta em um volume final de 25 µL, contendo 2,5 µL de 10X tampão de PCR (Invitrogen Life Technologies, USA), 0,2 mmol L<sup>-1</sup> de dNTP (Invitrogen Life Technologies, USA), 0,4 µmol L<sup>-1</sup> de cada um dos respectivos primers (Invitrogen, Life Technologies, USA), 2,0 mmol L<sup>-1</sup> de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen Life Technologies, USA), 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Life Technologies, USA) e 20 ng de DNA genômico. Uma reação controle foi realizada a partir da substituição de DNA genômico por água ultrapura. As reações foram submetidas a um termociclador VERITI® 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA), programado para um ciclo inicial de desnaturação a 95 °C por dois minutos, seguido de 35 ciclos compostos por 45 segundos de desnaturação a 94°C, 45 segundos a 55°C para o anelamento e 60 segundos a 72°C para extensão, seguida de uma extensão final de cinco minutos a 72°C, os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio e fotografado sob luz UV. O DNA Ladder 1 kb Plus® (Invitrogen Life Technologies, USA) foi utilizado como padrão de tamanho para os produtos da PCR.

Os produtos da amplificação foram purificados utilizando ExoProStar™ 1 Step (GE Healthcare Life Sciences, UK) conforme protocolo do fabricante. Os

fragmentos foram submetidos ao sequenciamento direto, utilizando o Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, USA) e submetidos ao aparelho SeqStudio Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

As sequências obtidas foram comparadas através de alinhamento local utilizando a ferramenta BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) contra os bancos de dados do NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e MYCOBANK MLST database ([https://www.mycobank.org/page/Pairwise\\_alignment](https://www.mycobank.org/page/Pairwise_alignment)). Adicionalmente, uma árvore filogenética de máxima verossimilhança foi inferida com base no modelo evolutivo de Tamura-Nei (TAMURA; NEI, 1993) e para determinar o suporte para cada clado, uma análise de bootstrap foi realizada com 1.000 réplicas no programa MEGA 7.0 (KUMAR et al., 2016).

#### TESTE DE PRODUÇÃO DE OCRATOXINA A

Os fungos isolados foram testados quanto à produção de ocratoxina A pelo método de ágar *plug* (FILTENBORG; FRISVAD; SVENDENSEN, 1983). Os isolados de *A. section Nigri* foram inoculados em meio ágar extrato de levedura 15% Sacarose (YESA) e incubados a 25°C por 7 dias. O *plug* de cada isolado foi aplicado na placa de Cromatografia de Camada Delgada (CCD), com padrão de OTA. A fase móvel utilizada foi tolueno/acetato de etila /ácido fórmico/ clorofórmio (7:5:2:5). A detecção da OTA foi realizada através da luz UV (365 nm) no Cromatovisor. Os isolados que apresentaram um fator de retenção e um spot de fluorescência semelhante ao padrão de OTA foram considerados produtores desta toxina.

#### TESTE DE PRODUÇÃO DE FUMONISINA B2

As cepas de *A. section Nigri* foram inoculadas em meio ágar Czapek extrato de levedura 20% de sacarose (CY20S) e incubadas a 25°C por 7 dias, de acordo com o método de FRISVAD et al. (2007).

A detecção de fumonisina B2 foi realizada conforme metodologia modificada de FERRANTI et al. (2017) utilizando cromatografia líquida de alta eficiência

(HPLC). Cinco pedaços do micélio fúngico foram retirados e transferidos para um frasco de vidro estéril. Em cada frasco, foi colocado 1 mL de metanol e foi agitado por 3 minutos. Duas filtrações foram feitas utilizando uma membrana acoplada a uma seringa de 5 mL para limpar o extrato, sendo ambas com membrana de 0,22 µm. Na etapa seguinte, 165 µL do filtrado foram transferidos para um frasco com 165 µL do reagente o-phthaldialdehydo (OPA) para reação de derivatização da fumonisina (VISCONTI; SOLFRIZZO; GIROLAMO, 2001). O frasco foi agitado por 30 segundos e foi injetado um volume de 20 µL, juntamente com o padrão de FB2 no Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE).

Foi utilizado o equipamento CLAE com detector de fluorescência (Agilent 1260 Infinity model system, CA, USA). Uma coluna cromatográfica C18 foi utilizada com as dimensões de 4,6 mm x 150 mm e tamanho da partícula de 5 µm, com fase móvel contendo acetonitrila:água:ácido acético (51:47:02 v/v/v) filtrada em membrana de 0,45 µm. O fluxo programado da fase móvel foi de 1,0 mL/min e a temperatura de forno foi de 40°C.

## DETERMINAÇÃO DE OCRATOXINA A NAS AMOSTRAS DE AMENDOIM

As amostras de amendoim foram trituradas para obtenção de partículas mais homogêneas e foram armazenadas em câmara fria à temperatura de 4°C.

Dez gramas das amostras de amendoim moído foram extraídos com 200 mL de solução de metanol bicarbonato de sódio 3% (1:1). A suspensão foi agitada durante 30 minutos em shaker. Esta mistura homogeneizada foi duplamente filtrada através de papel filtro nº4 e filtro de fibra de vidro. A seguir, 20 mL do filtrado foi diluído em 20 mL de tampão fosfato salino (PBS) com 0,01% Tween 20. Essa mistura passou através de uma coluna de imunoafinidade da marca R-Biopharm específica para Ocratoxina A, em um fluxo de 2-3 mL/min, seguindo-se de lavagem com 20 mL de água destilada. Na etapa seguinte, 4 mL foi eluído com metanol HPLC em um frasco âmbar. A solução foi evaporada sob um fluxo de nitrogênio a 40°C e o extrato seco foi ressuspenso em 300 µL de fase móvel.

Um padrão de OTA de concentração de 1 mg/mL foi utilizado para a construção da curva padrão, com a área dos picos versus a massa da toxina (ng).

A concentração de OTA no extrato da amostra foi determinada pela interpolação da área do pico resultante no gráfico de calibração. O volume de injeção foi 20 µL.

A determinação de OTA foi feita em duplicata para cada amostra de amendoim.

## LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram obtidos através de 8 repetições com nível de 0,50 µg/kg utilizando amostras de amendoim que não apresentaram contaminação natural.

A recuperação foi calculada através de 3 extrações com padrão de OTA nos níveis de 0,50µg/kg, de 5µg/kg e 15 µg/kg. Para otimizar o método, as recomendações do manual da EURACHEM GUIDES (2014) foram utilizadas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### OCORRÊNCIA DE *A. SECTION NIGRI* EM AMOSTRAS DE SOLO

Foram isoladas 316 cepas de *A. section Nigri* do solo. Apenas em uma amostra não houve crescimento deste grupo.

A frequência de ocorrência (FO) (número de amostras contaminadas com a espécie fúngica/total de amostras analisadas) foi de 98% e a média de contagem foi de  $2,49 \times 10^4$  UFC/g, variando de <100 a  $1,60 \times 10^4$  UFC/g. A média de atividade de água foi de 0,976, variando de 1,000 a 0,892.

### **1.13. OCORRÊNCIA FÚNGICA EM AMOSTRAS DE AMENDOIM**

A Tabela 2 mostra a ocorrência dos fungos no amendoim após a secagem. Em todas as amostras houve crescimento de fungos. Foram isoladas 218 cepas de *A. section Nigri* das 52 amostras de amendoim, sendo que 121 dessas cepas foram isoladas das 42 amostras do campo experimental e 97 foram isoladas das 10 amostras da cooperativa

Após a secagem, as amostras do campo experimental apresentaram uma atividade de água de 0,540 a 0,679.

**Tabela 2** - Frequência de ocorrência, média e variação de infecção fúngica (%) nas amostras de amendoim.

Fungos	Média de infecção (%)	FO %	Varição (%)
<i>A. section Nigri</i>	9,06	71,15	6,00 – 42,00
<i>A. section Flavi</i>	45,38	100,00	4,00 – 100,00
<i>Aspergillus terreus</i>	9,58	71,15	6,00 – 32,00
<i>Aspergillus tamaraii</i>	0,31	1,92	2,00 – 3,00
<i>Rhizopus sp.</i>	7,41	0,25	2,00 – 7,00
<i>Wallemia sp</i>	0,50	13,46	2,00 – 4,00
Zigomicetos	0,38	13,46	2,00 – 18,00
<i>A. section Aspergillus</i>	9,65	57,69	4,00 – 40,00
<i>Syncephalastrum sp</i>	0,04	1,92	0,00 – 2,00
Fungos dematiáceous	0,15	11,54	2,00 – 4,00

FO % = Frequência de ocorrência (nº de amostras contaminadas/nº total de amostras)

Média de infecção = Soma dos valores da % de infecção pelo gênero ou grupo fúngico nas amostras/nº total de amostras analisadas

*A. section Nigri* foi encontrado em 71% das amostras, com infecção média de 9% e variação de 6 a 42%, sendo o segundo grupo fúngico mais frequente nas amostras de amendoim (Tabela 2). *Aspergillus section Flavi* foi encontrado em 100% das amostras e *A. section Aspergillus* (antes *Eurotium* spp.) em 58% das amostras. Além destes grupos, foram encontradas as espécies de *A. terreus*, *A. tamaraii*, *Rhizopus* spp., *Syncephalastrum* sp., outros zigomicetos e fungos dematiáceous (Tabela 2).

Os resultados encontrados mostram que o amendoim é uma matriz favorável ao crescimento de diversos gêneros e grupos de fungos, incluindo grupos potencialmente toxigênicos. Alguns desses gêneros também foram encontrados nos trabalhos de BEDIAKO et al. (2019), que isolou *Aspergillus*, *Rhizopus* spp., *Colletotrichum* spp., *Penicillium* spp. e *Curvularia* spp. do amendoim.

Resultados semelhantes foram encontrados por ZORZETE et al. (2013) que isolaram *Aspergillus* section *Flavi*, *Aspergillus* section *Nigri*, além de *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e *Rhizopus* spp.

ATAYDE et al. (2012) isolaram *Fusarium* e fungos do gênero *Aspergillus* de amendoim, além de *Rhizopus* spp., *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp., *Neurospora* spp., *Nigrospora* spp., *Trichoderma* spp. e *Alternaria* spp.

O trabalho de NESCI et al. (2011) também reportou fungos do gênero *Penicillium*, *Fusarium*, *A.* section *Flavi*, *Cladosporium*, *A.* section *Nigri*, *Alternaria* e *A.* section *Aspergillus* em amendoim.

NAKAI et al. (2008) isolaram dos grãos de amendoim 25,8% de *Fusarium* spp., 21,8% de *Aspergillus* spp., além de *Rhizopus*, *Penicillium*, *Drechslera* e *Trichoderma* spp.



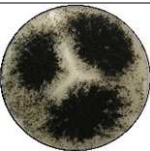


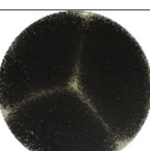


MAGNOLI et al. (2007) encontraram fungos de *A.* section *Nigri* (agregados de *A. niger*) e *A.* section *Flavi* em amostras de amendoim na Argentina.

#### ASPERGILLUS SECTION NIGRI EM AMENDOIM

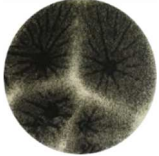
Foram isoladas um total de 218 cepas de *A.* section *Nigri* das amostras de amendoim e agrupados de acordo com suas características morfológicas. Um total de 9 morfogrupos foram caracterizados com base nas características morfológicas tais como: tamanho e forma de vesículas, esporos e o crescimento a 25°C.

Dos 9 grupos, a formação de esclerócio foi observada apenas no Grupo 1. Com relação ao formato dos esporos, os Grupos 3, 4, 5 e 6 apresentaram paredes rugosas. Nos demais grupos, os esporos tinham paredes lisas. Os diâmetros dos esporos variaram de 3 a 5 µm. As vesículas variaram de 25 a 80 µm de diâmetro. A Tabela 3 mostra as características de cada grupo.

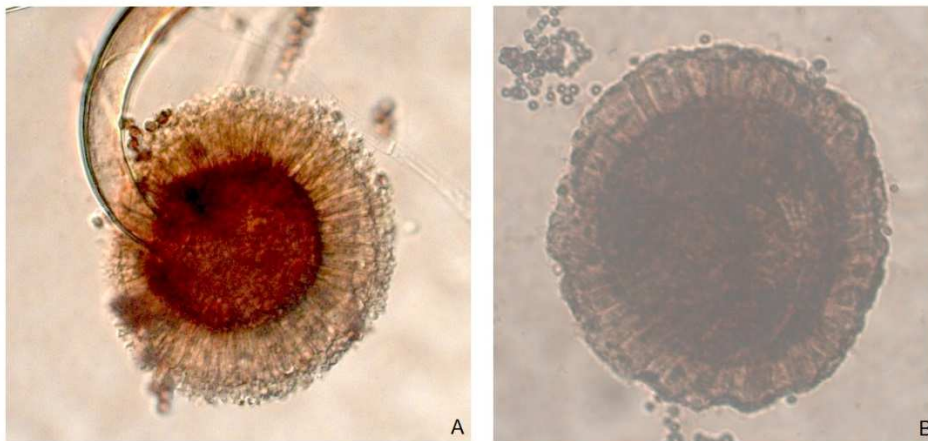
**Tabela 3** – Características observadas dos 9 morfogrupos formados

Grupos	Colônia a 25°C	Diâmetro Vesícula/esporos	Total de cepas
<b>Grupo 1</b>		30 a 45 $\mu\text{m}$ / 3,5 a 4,5 $\mu\text{m}$	40
<b>Grupo 2</b>		50 a 80 $\mu\text{m}$ / 3,1 a 4,5 $\mu\text{m}$	51
<b>Grupo 3</b>		20 a 30 / 3 a 5 $\mu\text{m}$	10
<b>Grupo 4</b>		35 a 50 / 3,5 a 5 $\mu\text{m}$	29
<b>Grupo 5</b>		45 a 80 / 3,5 a 5 $\mu\text{m}$	15
<b>Grupo 6</b>		25 a 40 $\mu\text{m}$ / 4 a 5 $\mu\text{m}$	22
<b>Grupo 7</b>		30 a 45 $\mu\text{m}$ / 3 a 4,5 $\mu\text{m}$	9
<b>Grupo 8</b>		35 a 50 $\mu\text{m}$ / 4 a 5,5 $\mu\text{m}$	28



<b>Grupo</b>		40 a 50 $\mu\text{m}$ / 2,5 a 3,5 $\mu\text{m}$	14
<b>9</b>			

Todos os isolados dos 9 morfogrupo foram observados com relação à presença ou ausência de métula (bisseriadas ou unisseriadas, respectivamente). Das 218 cepas totais, 95 foram identificadas como bisseriadas e 123 foram identificadas como unisseriadas, como mostrado na Figura 4.



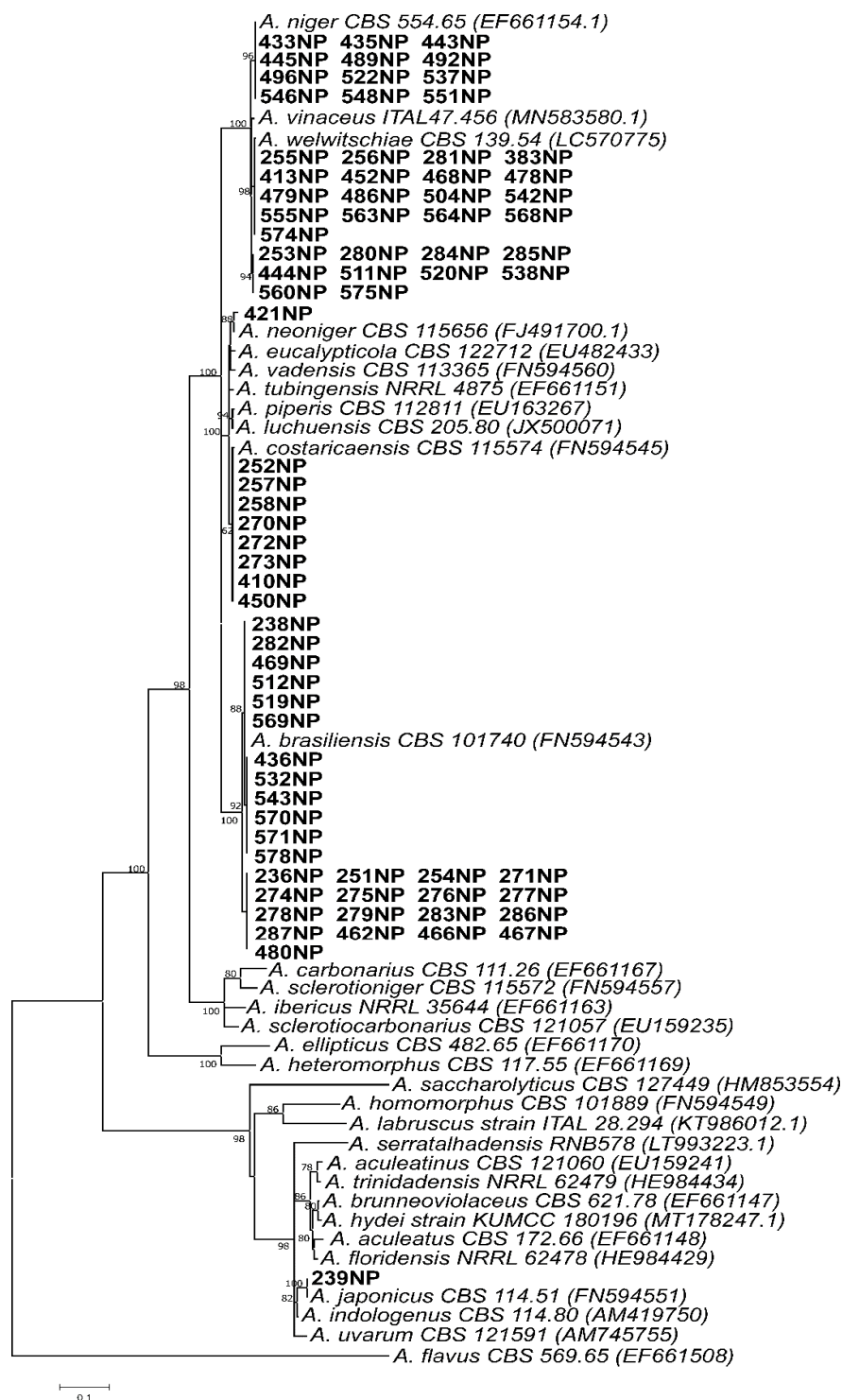
**Figura 3** - Cepas observadas em microscópio: (A) Bisseriada, (B) Unisseriada

Todas as 95 cepas bisseriadas foram submetidas aos testes para produção de ocratoxina A e fumonisina B2 em cromatografia de camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), respectivamente. Dessas, 23 cepas produziram algumas das toxinas ou ambas, sendo que 10 cepas produziram OTA, 11 cepas produziram FB2 e 2 cepas produziram ambas as toxinas. Das 23 cepas produtoras de OTA e/ou FB2 17 pertenciam as amostras da cooperativa e 6 das amostras do campo experimental.

Após a formação dos morfogrupo e a verificação da presença ou ausência de métula, um total de 79 cepas foram selecionadas para a análise molecular, sendo 23 cepas produtoras de FB2 e/ou OTA e 56 não produtoras, escolhidas com base em características morfológicas.

Das 79 cepas selecionadas da amostra de amendoim, as espécies identificadas foram *Aspergillus brasiliensis* (n=29), *Aspergillus costaricensis* (n=8),

*Aspergillus japonicus* (n=1), *Aspergillus neoniger* (n=1), *Aspergillus niger* (n=12) e *Aspergillus welwitschiae* (n=28). A Figura 4 mostra as espécies encontradas nas amostras com base na sequência do gene da calmodulina (CaM).



**Figura 4** - Árvore de máxima verossimilhança reconstruída com base nos dados do gene da calmodulina (CaM). Bootstrap com valores acima de 60% são mostrados. Isolados do presente estudo estão em negrito. *A. flavus* é o outgroup

As espécies mais frequentes foram *A. brasiliensis*, *A. welwitschiae*, seguidas de *A. niger*, *A. costaricaensis*, *A. japonicus* e *A. neoniger*. Trabalhos encontrados na literatura mostraram a prevalência de *A. niger* em amendoim, em concordância com o presente trabalho.

CHEIN et al. (2019) isolaram 85 fungos de amostras de amendoim em Miamar, das quais 20 foram identificadas como *A. niger*. Enquanto que OYEDELE et al. (2017) relatam a presença de *A. niger* em amostras de amendoim, além de *A. Section Flavi*, *Fusarium* e *Penicillium*.

DING et al. (2015) isolaram 100 cepas do gênero *Aspergillus* em amendoim das quais 17% foram identificadas como *A. niger*.

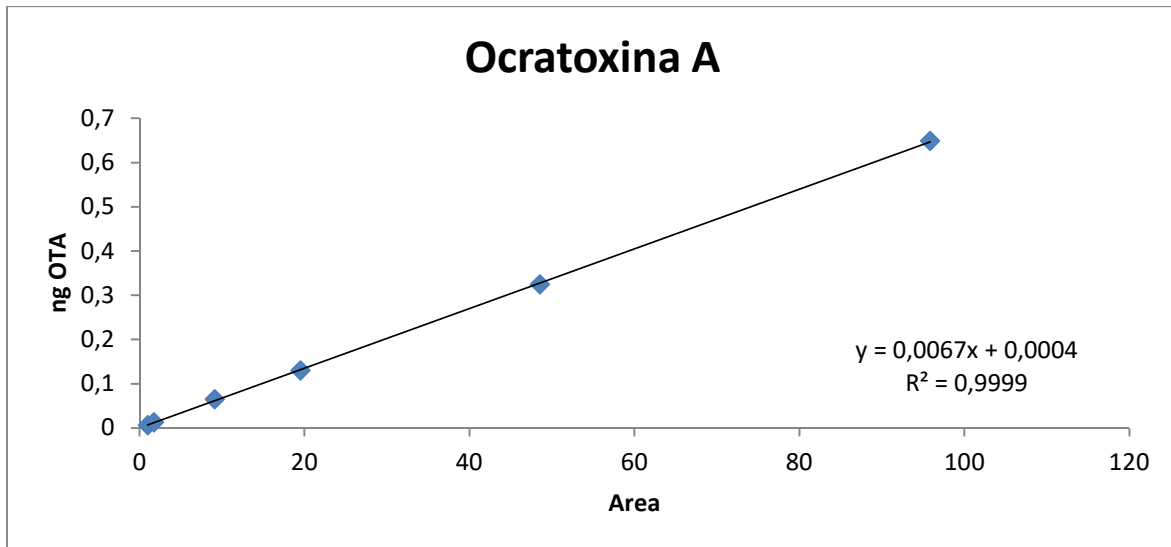
PALENCIA et al. (2014) isolaram 150 cepas sendo a espécie *A. niger* a mais encontrada em amostras de amendoim e milho. A espécie *A. japonicus* também foi relatada, mas com menor frequência, corroborando nossos achados.

PRIYANKA et al. (2013) analisaram *Aspergillus* em amendoim e a espécie de *A. niger* foi isolada em 3 das 4 regiões estudadas numa frequência de 91% a 100%.

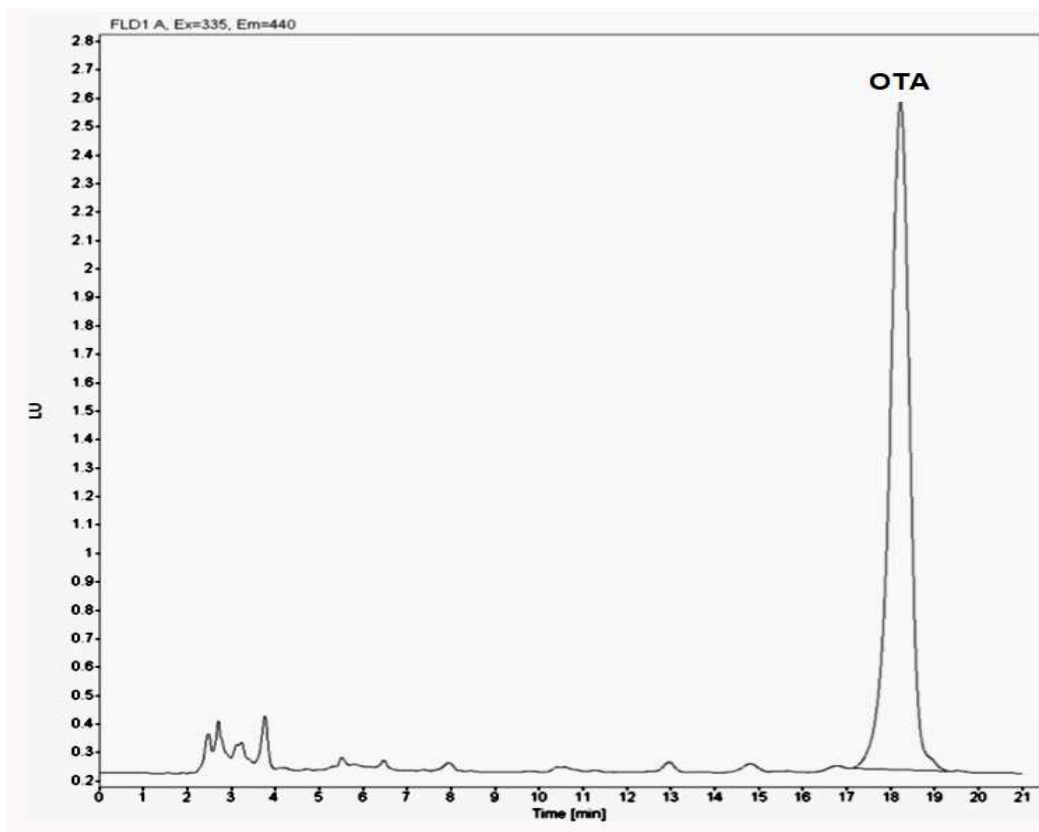
Até onde sabemos esse é o primeiro relato da presença de *A. brasiliensis*, *A. welwitschiae*, *A. costaricensis* e *A. neoniger* em amendoim brasileiro. Poucos trabalhos têm sido feitos com o objetivo específico de investigar a biodiversidade de *A. section Nigri* em amendoim, e a maioria não fez uso de dados moleculares, essenciais para a identificação das espécies crípticas de *A. section Nigri*. O presente trabalho apresenta de modo inédito um perfil da biodiversidade desse grupo em amendoim brasileiro.

#### **1.14. OCORRÊNCIA DE OCRATOXINA A NO AMENDOIM**

A Figura 5 mostra a curva de calibração do padrão de OTA em seis pontos de áreas do pico versus massa de OTA (ng). A equação da curva obteve um  $R^2$  de 0,9999. O padrão de OTA detectado no tempo 18,223 está ilustrado na Figura 6.



**Figura 5** - Curva de calibração do padrão de Ocratoxina A

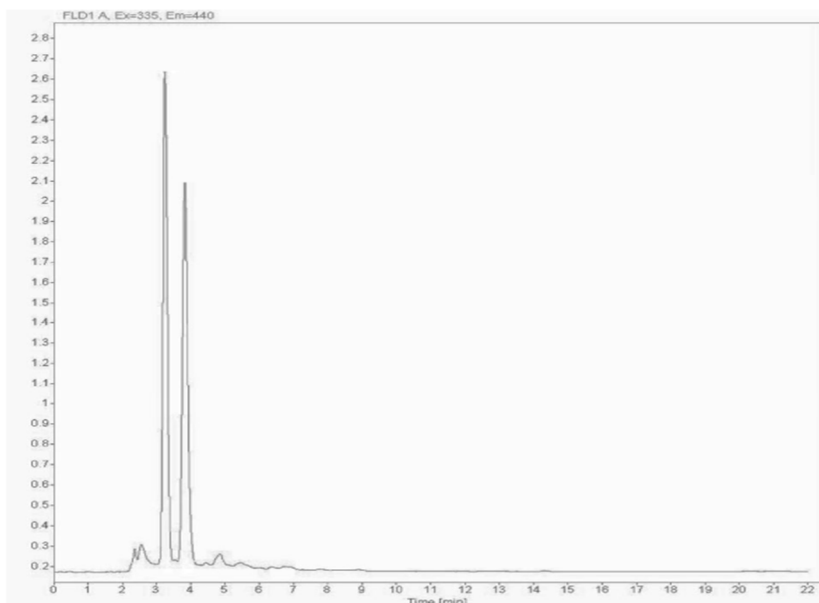


**Figura 6** - Cromatograma de Ocratoxina A do padrão de OTA

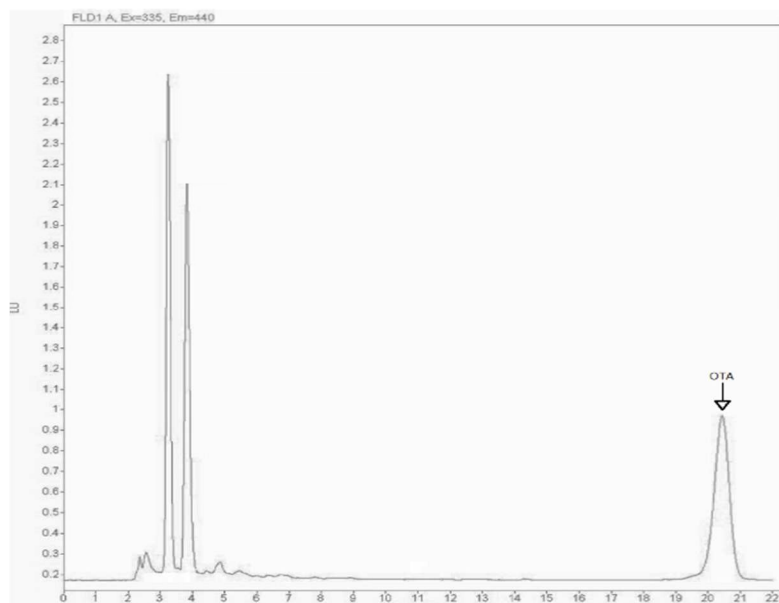
Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) do método foram de 0,08 µg/kg e 0,27 µg/kg, respectivamente. A recuperação para os níveis de contaminação de até 0,4µg/kg, de 5,0µg/kg e acima de 12µg/kg foi de 87,60%, 91,69% e 89,80% respectivamente. Esses valores encontram-se dentro da faixa de 50 a 120% para nível baixo e 70 a 110% para nível médio estabelecidos pela Diretiva da Comunidade Europeia EC 401/2006 (CE, 2006).

Das 52 amostras analisadas, 15 apresentaram contaminação de OTA, ou seja, 28,84% das amostras. Das 15 amostras, 6 foram provenientes do campo experimental e 9 da cooperativa. A variação da contaminação de OTA foi de <LOD a 0,387 µg/kg. A Tabela 5 dispõem os dados de OTA nas amostras de amendoim. A Figura 7 o cromatograma de uma amostra em que a OTA não foi encontrada e a Figura 8 o cromatograma de uma amostra positiva.

Amostra	OTA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Media OTA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
Amostras cooperativa	0,172	0,140
	0,108	
	0,096	0,092
	0,088	
	0,186	0,160
	0,135	
	0,181	0,152
	0,123	
	0,036	<LOD
	0,093	
0,106	0,100	
0,094		
0,081	0,090	
0,102		
0,177	0,150	
0,126		
0,171	0,154	
0,136		
Amostras campo experimental	0,137	0,166
	0,195	
	0,111	0,126
	0,141	
	0,166	0,176
	0,186	
	0,289	0,260
	0,231	
	0,099	0,106
	0,113	
0,402	0,387	
0,375		



**Figura 7** - Cromatograma para amostra que não foi detectado OTA



**Figura 8** - Cromatograma para amostras que foi detectado OTA

Os valores encontrados no presente estudo são semelhantes aos encontrados por DO et al. (2020) que estudaram amendoim de 3 províncias do Vietnã e encontraram amostras contaminadas com OTA, sendo em Hanoi valores de 0,150 a 0,625  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , em Thanh Hoa valores de 0,565 a 1,03  $\mu\text{g}/\text{kg}$  e em Há Giang valores de 1,78 a 2,25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .



Os valores encontrados por UMEREWENEZA et al. (2017) também foram semelhantes aos encontrados neste trabalho. Os autores detectaram OTA em concentrações de 2,7 µg/kg, 0,2 µg/kg e 2,8 µg/Kg em amostras de farinha de amendoim de 3 mercados de Ruanda. Os autores também detectaram fumonisina B2 na farinha de amendoim, mas em níveis abaixo de 0,1 µg/kg.

TOFFA et al. (2013) encontraram níveis de 3,7 a 5 µg/kg em amostras de amendoim da República do Níger que foram maiores do que os encontrados no presente trabalho.

IDA e AHMAD. (2010) verificaram a presença de OTA em 7 amostras (1 de avelã, 2 de amendoins e 4 de nozes) na Jordânia, com níveis variando de 2,75 – 7,42 µg/kg. Esses valores foram maiores do que os encontrados na dissertação.

MAGNOLI et al. (2007) relataram presença de OTA nas amostras de amendoim de armazenamento na cidade de Córdoba (Argentina). No trabalho destes autores, foram isoladas 322 cepas das amostras, sendo 104 produtoras de OTA (2 a 24 µg/L) e em 50% das amostras houve produção de OTA, com níveis médios variando de 5,6 a 130 µg/kg.

SANGARE-TIGORI et al. (2006) encontraram OTA em concentração média de 23±24 µg/kg e uma variação de 20 a 64 µg/kg, valores maiores dos que foram encontrados no nosso trabalho.

A presença de *Aspergillus section Nigri* é comum em amendoim, tornando esse grão susceptível à contaminação por OTA e FB2. Apesar dos valores de OTA encontrados nesse trabalho terem sido menores dos encontrados em outras pesquisas, o amendoim é um bom substrato potencial para a produção de OTA pelos fungos desta seção *Nigri*.

## CONCLUSÕES

*Aspergillus section Nigri* foi incidente em amostras de amendoim e solo cultivado por essa cultura. Foram identificadas seis espécies dessa seção: *A. niger*, *A. welwitschiae*, *A. japonicus*, *A. neoniger*, *A. costaricaensis* e *A. brasiliensis*, sendo *A. brasiliensis* a espécie mais frequente.

Cepas potencialmente produtoras de OTA e/ou FB2 foram encontradas entre os isolados de *A. niger* e *A. welwitschiae*. Esse é um dado preocupante e mais

estudos são necessários para entender em que condições essas toxinas são produzidas no amendoim.

O presente trabalho relatou pela primeira vez a ocorrência de *A. neoniger*, *A. costaricensis* e *A. brasiliensis* em amostras de amendoim.

O estudo também revelou a presença de OTA nas amostras de amendoim. Este fato mostra que essa matriz é susceptível à contaminação de OTA e possivelmente FB2, já que os fungos encontrados podem ser produtores de ambas toxinas.

O trabalho demonstrou alta incidência de espécies potencialmente toxigênicas em amendoim, mostrando a presença de OTA em algumas amostras. Mais estudos são necessários para investigar a dinâmica de infecção desse substrato, e sob quais condições ocorre a contaminação por micotoxinas, incluindo a FB2.

## REFERÊNCIAS

AKRAM, N. A., SHAFIQ, F., & ASHRAF, M. Peanut (*Arachis hypogaea* L.): A prospective legume crop to offer multiple health benefits under changing climate. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 17(5), 1325-1338, 2018.

ATAYDE, D. D. et al. Mycobiota and aflatoxins in a peanut variety grown in different regions in the state of São Paulo, Brazil. *Crop Protection*, v. 33, p. 7-12, 2012.

BEDIAKO, K, A. et al. Prevalence of fungi and aflatoxin contamination in stored groundnut in Ghana. *Food Control*, v. 104, p. 152-156, 2019.

BEZUIDENHOUT, S. C. et al. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, n. 11, p. 743 – 745, 1988.

BONIFÁCIO, T. Z. et al. Avaliação da Contaminação Fúngica em Amendoim Comercializado a Granel no Município de JI-Paraná/RO. *South American*

- Journal of Basic Education, Technical and Technological, v. 2, n. 1, p. 2446 – 4821, 2015.
- BOOTE, K. J. Growth stages of peanut (*Arachis hypogaea* L.). Peanut science, v. 9, n. 1, p. 35-40, 1982.
- BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº7 de 18 de fevereiro de 2011. Diário Oficial da União. n. 37, seção 1, 22 de fevereiro de 2011.
- BRASIL. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Produção Integrada no Brasil: agropecuária sustentável, alimentos seguros. 2008.
- CHEIN, S. H. et al. Prevalence and identification of *Aspergillus* and *Penicillium* species isolated from peanut kernels in central Myanmar. Journal of Food Safety, v. 39, n. 6, p. e12686, 2019
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Acompanhamento da safra brasileira de grãos, v. 8, safra 2020, n. 3, terceiro levantamento, Brasília, p. 1 – 86, 2020.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Acompanhamento da safra brasileira de grãos, v. 8, safra 2020, n. 3, quarto levantamento, Brasília, p. 1 – 86, 2021.
- CONAGIN, C. H.T.M. Morfologia da flor e formação do fruto no amendoim cultivado (*Arachishypogaea* L). Bragantia: Boletim técnico do instituto agrônômico de São Paulo, vol. 14, n. 24, p. 259-266, 1955.
- CUNHA, S. C., SA, S. V., FERNANDES, J. O. Multiple mycotoxin analysis in nut products: Occurrence and risk characterization. Food and Chemical Toxicology, 114, 260-269, 2018.

- DING, N. et al Variation in fungal microbiome (mycobiome) and aflatoxin in stored in-shell peanuts at four different areas of China. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, p. 1055, 2015.
- DO, T. H. et al. Dietary exposure and health risk characterization of aflatoxin B1, ochratoxin A, fumonisin B1, and zearalenone in food from different provinces in Northern Vietnam. *Food Control*, v. 112, p. 107108, 2020.
- FAO, Groundnut: Post-Harvest Operations. FAO, Rome (2002).
- FERRACIN, L. M. et al. Strain-specific polyketide synthase genes of *Aspergillus niger*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 155, n. 3, p. 137-145, 2012.
- FERRANTI, L. S. et al. Occurrence and fumonisin B 2 producing potential of *Aspergillus* section *Nigri* in Brazil nuts. *Mycotoxin research*, v. 33, n. 1, p. 49-58, 2017.
- FRISVAD, J. C. et al. Fumonisin and Ochratoxin Production in Industrial *Aspergillus niger* Strains. *PLoS ONE*, v. 6, n. 8, p. 1 - 5, 2011.
- FRISVAD, J. C. et al. Fumonisin B<sub>2</sub> Produção de *Aspergillus niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , v. 55, n. 23, p. 9727-9732, 2007.
- GONÇALVES, B.; SANTANA, B.; PELEGRINI, P. Micotoxinas: uma revisão sobre as principais doenças desencadeadas no organismo humano e animal. *Revista de Saúde da Faciplac*, v. 4, n. 1, 2017.
- HONG, S. B. et al. *Aspergillus luchuensis*, an Industrially Important Black *Aspergillus* in East Asia. *Plos One*, n. 5, v. 8, p. e63769, 2013.
- IARC. International Agency for Research on Cancer. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and

- mycotoxins In: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, v. 56. Lyon, France, p. 571, 1993.
- KALTNER, F. et al. Development and Validation of a Cost-Effective HPLC-FLD Method for Routine Analysis of Fumonisin B1 and B2 in Corn and Corn Products. *Food Analytical Methods*, v. 10, n. 5, p. 1349 -1358, 2017.
- LIU, Y.; YAMDEU, J. H. G.; GONG, Y. Y.; ORFILA, C. A review of postharvest approaches to reduce fungal and mycotoxin contamination of foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 19, n. 4, p. 1521-1560, 2020.
- LOZANO, M. G. et al. Selected nutrients and antinutrients in peanut cultivars harvested in Brazil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 99, n. 12, p. 5334-5340, 2019.
- LUZ, L. N. D. et al. Estimativas de parâmetros genéticos em linhagens de amendoim baseadas em descritores associados ao ginóforo. *Revista Ciência Agronômica*, v. 41, n. 1, p. 132-138, 2010.
- MAGNOLI, C. et al. Ochratoxin A and *Aspergillus* section *Nigri* in peanut seeds at different months of storage in Córdoba, Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, v. 119, p. 213-218, 2007.
- MANIZAN, Ama Lethicia et al. Multi-mycotoxin determination in rice, maize and peanut products most consumed in Côte d'Ivoire by UHPLC-MS/MS. *Food Control*, v. 87, p. 22-30, 2018.
- MASSI, F. P. et al. Molecular analysis of *Aspergillus* section *Nigri* isolated from onion samples reveals the prevalence of *A. welwitschiae*. *Brazilian Journal of Microbiology*, p. 1-6, 2020.
- MILLER, J. David. Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. *Journal of stored products research*, v. 31, n. 1, p. 1-16, 1995.

- MUNKVOLD, G. P.; WEIENETH, L.; PROCTOR, R. H.; BUSMAN, M.; BLANDIO, M.; SUSCA, A.; LOGRIECO, A.; MORETTI, A. Pathogenicity of Fumonisin-producing and Nonproducing Strains of *Aspergillus* Species in *Section Nigri* to Maize Ears and Seedlings. *Plant Disease*, v. 102, n. 2, p. 282 - 291, 2018.
- NASCIMENTO, M. S. et al. *Salmonella*, *Escherichia coli* and Enterobacteriaceae in the peanut supply chain: From farm to table. *Food research international*, v. 105, p. 930-935, 2018.
- NAKAI, V. K.; et al. Distribution of fungi and aflatoxins in a stored peanut variety. *Food Chemistry*, v. 106, p. 285-290, 2008.
- NAKAZAWA, R. Onkoji fungus, *Aspergillus awamori*. Report of Agriculture, Government Research Institute of Formosa, v. 1, 1907.
- NEME, K; MOHAMMED, A Mycotoxin occurrence in grains and the role of postharvest management as a mitigation strategies. A review. *Food Control*, v. 78, p. 412-425, 2017.
- NESCI, A.; et al. Prevention of aflatoxin contamination in stored grains using chemical strategies. *Current Opinion in Food Science*, v. 11, p. 56-60, 2016.
- NIDA, S; AHMAD, R. Mycotoxins in food from Jordan: preliminary survey. *Food Control*, v. 21, n. 8, p. 1099-1103, 2010.
- OSTRY, V. et al. Mycotoxins as human carcinogens—the IARC Monographs classification. *Mycotoxin research*, v. 33, n. 1, p. 65-73, 2016.
- OYEDELE, O A. et al. Mycotoxin risk assessment for consumers of groundnut in domestic markets in Nigeria. *International Journal of Food Microbiology*, v. 251, p. 24-32, 2017.

- PALENCIA, E. R. et al. Analyses of black *Aspergillus* species of peanut and maize for ochratoxins and fumonisins. *Journal of food protection*, v. 77, p. 805-813, 2014.
- PERRONE, G. et al. *Aspergillus niger* contains the cryptic phylogenetic species *A. awamori*. *Fungal biology*, v. 115, n. 11, p. 1138-1150, 2011.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. *Fungi and food spoilage*. Springer Science Business Media: New York, 593, 2009.
- PRIYANKA, S. R. et al. Occurrence and molecular detection of toxigenic *Aspergillus* species in food grain samples from India. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 94, n. 3, p. 537-543, 2013.
- SACRAMENTO, T. R. Importância da contaminação de alimentos por Aflatoxinas para a incidência de câncer hepático. *Revista Ciências Exatas e Naturais*, v. 18, n. 1, p. 141-169, 2016.
- SAKATA, R. A.; SABBAG, S. P.; MAIA, J. T. L. M. Ocorrência de Aflatoxinas em produtos alimentícios e o desenvolvimento de enfermidades. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer-Goiânia*, v. 7, n. 13, p. 144, 2011.
- SAMSON, R. A. et al. *Food and Indoor Fungi*. Holanda: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2010.
- SAMSON, R. A. et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, v. 78, p. 141 – 173, 2014.
- SANGARE-TIGORI, B. et al. Preliminary survey of ochratoxin A in millet, maize, rice and peanuts in Côte d'Ivoire from 1998 to 2002. *Human & experimental toxicology*, v. 25, n. 4, p. 211-216, 2006

- SANTOS, F. et al. Qualidade de sementes de amendoim armazenadas no estado de São Paulo. *Bragantia*, v. 72, n. 3, p. 310 – 317, 2013.
- SANTOS, R. C.; MORAES, J. S.; GUIMARÃES, M. B. Caracteres de floração e reprodução em genótipos de amendoim do tipo ereto, ramador e decumbente. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 32, n. 12, p. 1257-1262, 1997.
- SHI, H., LI, S. et al.. Mycotoxin contamination of food and feed in China: Occurrence, detection techniques, toxicological effects and advances in mitigation technologies. *Food Control*, v. 91, p. 202-215, 2018.
- SHIMIZU, K. et al. The  $\alpha$ -oxoamine synthase gene *fum8* is involved in fumonisin B2 biosynthesis in *Aspergillus niger*. *Mycoscience*, 56(3), 301-308, 2015.
- SPINELLI, L.; LONGONI, L.; SILVEIRA, A. B. Análise microbiológica de amostras de amendoim provenientes do mercado público de Porto Alegre/RS. *Revista de Ciências Ambientais*, v. 12, n. 2, 2018
- STREIT, E. et al. Current situation of mycotoxin contamination and co-occurrence in animal feed—Focus on Europe. *Toxins*, v. 4, n. 10, p. 788-809, 2012.
- SUDHIR, K. et al. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets, *Molecular Biology and Evolution*, v. 33, p. 1870–1874, 2016. Disponível em <<https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>>. Acesso em 10/05.
- SUSCA, A. et al. Variação na produção de fumonisina e ochratoxina associada a diferenças no conteúdo genético biossintético em *Aspergillus niger* e *A. welwitschiae* isolados de múltiplas origens agrícolas e geográficas. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, 2016.



- TAMURA, K. NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, v. 10, p. 512 - 526, 1993.
- TANIWAKI, M. H.; IAMANAKA, B. T.; SILVA, N. *Fungos Deterioradores de Alimentos: Ocorrência e Detecção*. Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, 2014.
- TANIWAKI, M. H., PITT, J. I., MAGAN, N. *Aspergillus* species and mycotoxins: occurrence and importance in major food commodities. *Current Opinion in Food Science*, 23, 38-43, 2018.
- TOFFA, D. D. et al. First survey on the presence of ochratoxin A and fungi in raw cereals and peanut available in the Republic of Niger. *Food control*, v. 32, p. 558 – 562, 2013.
- UMEREWENEZA, D; KAMIZIKUNZE, T; MUHIZI, T. Assessment of mycotoxins types in some foodstuff consumed in Rwanda. *Food Control*, v. 85, p. 432-436, 2018
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). Foreign agricultural service. production, supply and distribution. Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/psdQuery.aspx>>. Acesso em: 12/04.
- VAN DER MERWE, K. J. et al. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature*, v. 205, n. 4976, p. 1112 – 1113, 1965.
- VARGA, J. et al. New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology*, v. 69, p. 1 – 17, 2011.
- VISCOTI, A.; SOLFRIZZO, M.; GIROLAMO, A. Determination of fumonisins B1 and B2 in corn and corn flakes by liquid chromatography with immunoaffinity

column cleanup: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, v. 84, n. 6, p. 1828 - 1838, 2001.

ZAIED, Chiraz et al. Ochratoxin A levels in spices and dried nuts consumed in Tunisia. *Food Additives and Contaminants: Part B*, v. 3, n. 1, p. 52-57, 2010.

ZHANG, Z. et al. Determination for multiple mycotoxins in agricultural products using hplc–ms/ms via a multiple antibody immunoaffinity column. *Journal of Chromatography B*, V. 1021, P. 145-152, 2016.