

Detecção molecular de fungos com potencial toxigênico em amostras de amendoim vendidas no comércio varejista de Maringá/PR, Brasil

Alessandra Valéria de Oliveira *
Cintia Corteccioni Nuñez Del Prado
Nathan Gomes Modesto
Gislaine de Lucena

Centro Universitário CESUMAR
Avenida Guedner, 1610, CEP 87050-900, Maringá – PR, Brasil

* Autor para correspondência
alessandra.oliveira@unicesumar.edu.br
alessoli@hotmail.com

Submetido em 05/03/2014
Aceito para publicação em 07/01/2015

Resumo

Muitos alimentos são susceptíveis a contaminação por fungos. Os grãos, como o amendoim, são largamente acometidos, tendo como consequências o comprometimento de sua integridade e inviabilidade para o consumo humano e animal. Além disso, representam riscos à saúde, principalmente pela produção de micotoxinas. Dentre estas, as aflatoxinas, produzidas principalmente por *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, produzem diversos efeitos tóxicos carcinogênicos, teratogênicos, imunossupressores, hepatóxicos e nefrotóxicos. Técnicas moleculares têm sido utilizadas para identificação e discriminação de espécies de fungos em alimentos. O objetivo deste trabalho foi realizar a detecção molecular de espécies de *Aspergillus* em amostras de amendoim coletadas no comércio varejista de Maringá-PR, através da amplificação do material genético fúngico com *primers* específicos para o espaçador intergênico *aflR-aflJ* e posterior corte com enzimas de restrição. Das 50 amostras de amendoim analisadas, 27 foram positivas em relação à presença do espaçador intergênico *aflR-aflJ*, sendo que destas sete foram identificadas como *Aspergillus flavus*. Dessa forma, verifica-se a presença de amostras de amendoim contaminadas com fungos com potencial toxigênico no comércio varejista de Maringá/PR.

Palavras-chave: Aflatoxinas; Grãos; PCR

Abstract

Molecular detection of toxigenic potential of fungi in peanut samples collected in retail shops in Maringá/PR, Brazil. Many foods are susceptible to fungal contamination. Grains, such as peanuts, are commonly affected, with consequences including compromised integrity and infeasibility for human and animal consumption. Furthermore, some fungi may pose a health risk, largely due the production of mycotoxins. Among these, aflatoxins produced by *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* produce various carcinogenic, teratogenic, immunosuppressive, hepatotoxic and nephrotoxic effects. Molecular techniques have been used to identify and distinguish fungal species in foods. The objective of this study was molecular detection of *Aspergillus* species

in peanut samples collected in stores in Maringá-PR, by amplification of fungal genetic material with specific primers for the intergenic spacer *aflR-aflJ* and later cutting with restriction enzymes. Of the 50 peanut samples analyzed, 27 were positive for the intergenic spacer *aflR-aflJ*, seven of which were identified as *Aspergillus flavus*. Our results demonstrate that peanuts sold in retail stores in this region have potential for contamination with toxigenic fungi.

Key words: Aflatoxins; Grain; PCR

Introdução

Em diversos ecossistemas, os fungos são organismos decompositores, importantes parasitas facultativos, podendo obter nutrientes a partir de matéria orgânica morta ou de organismos vivos (BLACK, 2002). A água, o solo e os resíduos orgânicos constituem seus habitats naturais (BROOKS et al., 2012).

O Brasil tem uma grande quantidade de produtos agrícolas contaminados por fungos. A invasão por esses organismos pode ocorrer no solo, durante o processo de formação das sementes (ROSSETTO et al., 2003), na colheita, assim como nas fases de secagem, beneficiamento e armazenamento (FONSECA, 1976; BRUNO, 2000). Um dos fatores primordiais para a contaminação dos grãos por fungos é o elevado teor de água presente nas sementes. De acordo com Moraes e Mariotto (1985), os fungos contaminantes mais frequentes pertencem aos gêneros *Aspergillus* P. Micheli ex Haller, *Penicillium* Link, *Fusarium* Link e *Rhizopus* Ehrenb.

Diferentes grupos de fungos podem ser produtores de micotoxinas, que são substâncias químicas derivadas do metabolismo secundário de fungos filamentosos, altamente tóxicas, que causam sérias consequências em humanos e animais (MURRAY et al., 2009). O desenvolvimento dessas toxinas depende de muitos fatores tais como composição do substrato, umidade relativa do ar e temperatura. Além disso, nem todos os fungos de um mesmo gênero ou espécie as produzem, e mesmo a presença de fungos produtores não implica em presença da toxina, já que esta depende de condições biológicas e ambientais favoráveis. Conhecer essas condições torna-se importante para desenvolver medidas de prevenção que evitem o desenvolvimento dos fungos e das toxinas (OGA et al., 2008).

De acordo com a FAO (2009), os fungos produtores de micotoxinas são responsáveis por perdas econômicas em diversos produtos agrícolas, atingindo a produtividade animal e o comércio nacional e internacional, com efeito estendido ao consumidor. Aproximadamente 25% da agricultura mundial é afetada por fungos produtores de micotoxinas o que leva à perda de alimentos em grande escala (MIDORIKAWA, 2009).

Dentre as distintas micotoxinas já isoladas, as aflatoxinas produzidas pelo gênero *Aspergillus*, sobretudo pelas espécies *Aspergillus flavus* P. Micheli e *Aspergillus parasiticus* P. Micheli possuem grande relevância devido seu potencial hepatotóxico, carcinogênico e teratogênico. Taxonomicamente, essas duas espécies pertencem à seção *flavi* do gênero *Aspergillus* (GAMS et al., 1985). As aflatoxinas mais conhecidas pela sua elevada toxicidade em ordem decrescente são: B1, M1, G1, B2, M2 e G2. As denominações B e G estão relacionadas à cor de fluorescência apresentada perante a luz ultravioleta, na coloração azul (blue) e verde (green) respectivamente (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009). Essas toxinas são substâncias apolares (lipossolúveis, portanto), solúveis em solventes como clorofórmio e metanol, instáveis na luz UV, mas estáveis em altas temperaturas (MIDIO; MARTINS, 2000) e estão associadas principalmente à castanha, ao amendoim e à soja (MIDORIKAWA, 2009); entretanto, já foram detectadas também em milho, feijão, café, trigo, batata doce, arroz, mandioca, leite entre outros (HOBBS; ROBERTS, 1993).

Dentre os grãos, o amendoim possui altos índices de proteínas e óleos e se destaca pela grande susceptibilidade à contaminação por fungos, que pode ocorrer em todas as fases da produção em decorrência de alterações de temperatura e umidade. Isso acaba inviabilizando o grão e prejudicando a segurança do alimento para consumo humano e animal (EMBRAPA, 2004). Para

evitar essa situação, é necessário manter esses alimentos em umidade inferior a 10%, principalmente durante o armazenamento (SUASSUNA et al., 2008).

Atualmente, aspectos gerais de qualidade e principalmente higiênico-sanitários são fundamentais na aceitação de qualquer produto, especialmente os destinados à alimentação humana. A contaminação dos grãos por fungos traz grande preocupação com relação à segurança alimentar e à saúde do consumidor, visto que as informações disponíveis sobre a presença das aflatoxinas, bem como das consequências do constante consumo são insuficientes ou inexistentes. Dessa forma, torna-se necessário o emprego de tecnologias que permitam identificar esses organismos em alimentos.

As espécies *A. flavus* e *A. parasiticus* são estreitamente relacionadas filogeneticamente e sua discriminação microscópica requer especialistas em taxonomia de fungos filamentosos (KLICH, 2002). Diversos testes moleculares têm sido utilizados para separação dessas espécies como os baseados em PCR (Polymerase Chain Reaction) e RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (CHEN et al., 2002; SOMASHEKAR et al., 2004; KHOURY et al., 2011; MOUBASHER et al., 2013). A utilização de *primers* específicos para a amplificação de genes que codificam proteínas-chave da via de biossíntese das aflatoxinas, ou para amplificação de regiões entre esses genes, torna o procedimento rápido e com alto grau de especificidade, uma vez que as regiões analisadas são exclusivas de fungos do gênero *Aspergillus* produtores de aflatoxinas (TRAIL et al., 1995; SHAPIRA et al., 1996; KUSUMOTO et al., 1998; BROWN et al., 1999; YU et al., 2004). Entre essas regiões se encontra a região intergênica *aflR-aflJ* que tem sido utilizada para discriminação das espécies *A. flavus* e *A. parasiticus* (KHOURY et al., 2011).

O objetivo desse trabalho foi realizar a detecção molecular de fungos do gênero *Aspergillus* com potencial toxigênico em amostras de amendoim vendidas no comércio varejista da cidade de Maringá/PR, Brasil, através da técnica de RFLP/PCR, com amplificação da região intergênica *aflR-aflJ* do DNA fúngico e posterior corte com enzimas de restrição.

Material e Métodos

Coleta das amostras

Foram coletadas 50 amostras de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) em casas de produtos naturais (18 amostras), feiras do produtor (14 amostras) e supermercados do comércio de Maringá-PR (18 amostras). As amostras de grãos foram acondicionadas em sacos estéreis e transportadas até o Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular do Centro Universitário CESUMAR – UniCesumar, onde foram mantidas sob refrigeração entre 6°C e 8°C, até o momento das análises (três dias após as coletas). Além disso, foram analisadas cinco amostras derivadas de culturas puras da espécie *Aspergillus flavus*, obtidas do Laboratório de Microbiologia da UniCesumar.

Cultura das amostras

A análise microbiológica das amostras foi feita pela inoculação em triplicata no meio de cultura Sabourand-dextrose (SDA) com cloranfenicol. As placas com amostras de amendoim foram mantidas em temperatura ambiente (25°C) de 7 a 15 dias e a leitura foi realizada a partir do 5º dia.

Leitura dos resultados de cultura

As culturas foram analisadas de acordo com os aspectos morfológicos da colônia como cor, textura e reverso. O resultado foi considerado positivo para *A. flavus* e/ou *A. parasiticus* quando as colônias apresentavam coloração amarelo oliva a verde, tornando-se acinzentada com o tempo e reverso de cor creme podendo apresentar pregas (PITT; HOCKING, 1997).

Após detecção das amostras positivas pela análise microbiológica foi realizada a separação do fungo de interesse por meio de repiques para uma nova placa de Petri com meio Sabourand-dextrose com cloranfenicol.

Extração de DNA

Uma parcela do micélio das amostras consideradas positivas foi transferida para microtubo contendo 500 µL de meio de cultura dextrose-batata. Os tubos foram

mantidos por sete dias a 25°C e, após o crescimento, o processo de extração do DNA foi realizado, segundo Cenis (1992).

A quantificação do DNA extraído foi realizada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e posterior comparação com DNA lambda de concentração conhecida.

Amplificação do DNA via PCR

A metodologia para amplificação de ácidos nucleicos foi baseada em Muller et al. (1998). Os reagentes utilizados para a reação de PCR foram tampão 10X PCR Buffer (1,3 µl), água ultra-pura (6,48 µl), magnésio (0,52 µl), nucleotídeos (1,0 µl), *primers* (1,0 µl), Taq Polimerase (0,3 µl) e amostra de DNA (2,0 µl).

Os *primers* específicos IGS-F/IGS-R e TubF/TubR foram utilizados de acordo com Khoury et al. (2011), que amplificam, respectivamente, a região do espaçador intergênico *aflR-aflJ* (fragmento de 674 pb) e a região do gene da β-tubulina (340 pb), utilizado como controle positivo da reação.

O ciclo de PCR foi composto por desnaturação inicial de 94°C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 40 segundos, 58°C por 40 segundos e 72°C por 1 minuto, seguido de extensão final a 72°C por 10 minutos (KHOURY, 2011).

A análise dos resultados da amplificação foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 1,4% corado com brometo de etídio. As bandas geradas nas amostras a partir dos *primers* específicos foram comparadas com o padrão de DNA Ladder 100 pb.

Clivagem com enzimas de restrição

Os produtos de PCR foram digeridos com a enzima de restrição *BglIII*. O mix da reação de clivagem consistiu de 15 unidades da enzima, 4 µl de tampão, 15 µl do produto da PCR e água ultrapura para 40 µl. A mistura de reação foi incubada a 37°C por 3 h e os fragmentos obtidos foram separados por eletroforese em gel de agarose 2% e visualizados sob luz ultravioleta.

Análise estatística

Para verificar a associação entre o local da coleta e a contaminação, foi realizado o teste de qui quadrado utilizando-se 5% de significância. Para análise dos dados utilizou-se o pacote computacional R (2011).

Resultados e Discussão

Após cultura, 50 amostras de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) coletadas no comércio varejista de Maringá/PR, apresentaram, de acordo com a análise microbiológica, crescimento fúngico e foram consideradas como positivas, seguindo para as próximas análises. Das 50 amostras analisadas, 27 demonstraram aspecto de colônia característico de *Aspergillus*, apresentando coloração amarelo oliva tornando-se acinzentada com o tempo e reverso de cor creme podendo apresentar pregas (PITT; HOCKING, 1997). A análise macroscópica das colônias não permitiu discriminar *A. flavus* e *A. parasiticus*. Outros grupos fúngicos também puderam ser observados nas culturas.

As 27 amostras consideradas positivas para *Aspergillus* (54% do total), bem como as cinco amostras provenientes de culturas puras do Laboratório de Microbiologia da UniCesumar apresentaram após amplificação com os *primers* IGS-F/IGS-R um fragmento de DNA de aproximadamente 674pb (Figura 1), correspondente à região intergênica *aflR-aflJ* (KHOURY et al., 2011). O gene da β-tubulina, utilizado como controle positivo, foi amplificado em todas as 50 amostras que apresentaram crescimento fúngico (fragmento de 340pb).

Considerando as amostras coletadas no comércio varejista de Maringá que resultaram positivas para o espaçador intergênico *aflR-aflJ*, 12 foram encontradas em casas de produtos naturais (66%). Das amostras coletadas em supermercados, seis foram positivas (33%), e em feiras livres nove amostras foram positivas (50%) (Tabela 1).

FIGURA 1: Amplificação de DNA de *Aspergillus* com *primer* específico para espaçador intergênico *aflR-aflJ*. (L) Marcador de peso molecular Ladder 100 pb. (B) Controle negativo da reação. (1, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 16, 17, 18, 20, 21, 25, 27 e 28) Amostras positivas para o espaçador intergênico *aflR-aflJ*.

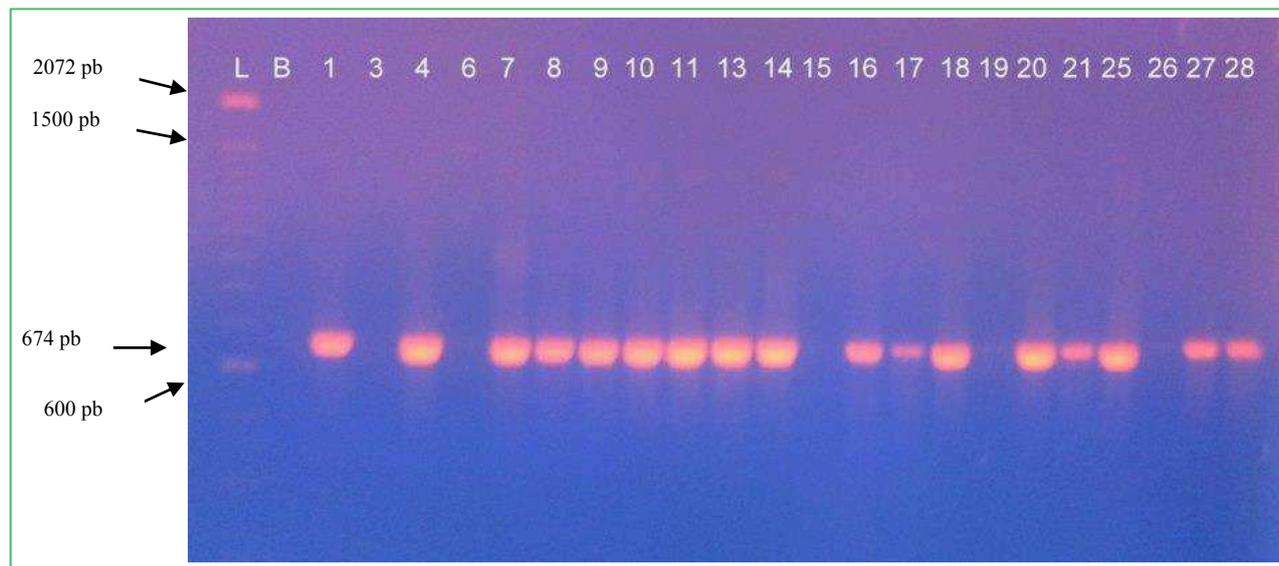


TABELA 1: Percentual de contaminação de amendoim por fungos do gênero *Aspergillus*, em amostras do comércio varejista de Maringá/PR.

Locais de coleta	Número de amostras coletadas	Número de amostras contaminadas	% de amostras contaminadas
Casas de produtos naturais	18	12	66%
Feiras livres	14	9	50%
Supermercados	18	6	33%
Total	50	27	54%

Não houve associação significativa entre o local da coleta e a contaminação ($p > 0,05$), verificando que a contaminação das amostras utilizadas nesse trabalho independe do local da coleta. No entanto, houve uma maior porcentagem de contaminação em amostras coletadas em casas de produtos naturais e feiras livres.

As 27 amostras positivas para o espaçador intergênico *aflR-aflJ* foram clivadas com a enzima de restrição *BglIII*. Dessas, sete amostras apresentaram três fragmentos de DNA (362pb, 210pb e 102pb), assim como as amostras derivadas de culturas puras. As demais amostras não apresentaram resultados conclusivos.

Taniwaki e Silva (2001) relatam que o principal

motivo da contaminação de grãos por fungos está relacionado ao manejo inadequado, que, somados às variações ambientais, principalmente em relação à umidade e à temperatura, facilitam o desenvolvimento desses organismos. Entre esses fungos, *Aspergillus* é um gênero de grande importância médica no que diz respeito a infecções oportunistas como a aspergilose (colonização das vias e do trato respiratório) e alergias respiratórias. Atualmente constituem-se num dos principais problemas de qualidade dos grãos armazenados, devido à possibilidade da presença de micotoxinas. Segundo estudo realizado por Vaamonde et al. (2003), dos 130 isolados de diferentes substratos (amendoim, soja e trigo) a espécie *A. flavus* foi a mais frequente. Nesse mesmo estudo, nas amostras de amendoim foi obtida quase a mesma proporção entre *A. flavus* e *A. parasiticus*, as principais espécies contaminantes de alimentos. Um maior percentual de amostras de amendoim contaminadas por *A. flavus* foi identificado por Gonzalez et al. (2008) e estudos realizados em milho e sorgo apontaram que dos 41% de grãos de milho e 25% de sorgo contaminados, obteve-se uma incidência maior de *A. flavus* em relação a espécie *A. parasiticus* (MPUCHANE et al.; 1997). Testes diagnósticos baseados em PCR também têm

revelado a presença desses fungos em grãos de diferentes regiões do país (MIDORIKAWA, 2009; REIS, 2009; GONZÁLES-SALGADO et al., 2011). No presente trabalho, evidenciou-se expressiva contaminação de amendoim por fungos do gênero *Aspergillus* (54% do total de amostras analisadas), especialmente em casas de produtos naturais e feiras livres, o que provavelmente está relacionado ao constante contato e manipulação dos grãos vendidos a granel, muitas vezes também associado ao armazenamento incorreto. A técnica utilizada permitiu a amplificação específica da região espaçadora intergênica *afIR-afIJ*, que indica a presença de contaminação das amostras com fungos com potencial toxigênico. A região analisada está compreendida na rota de genes relacionados à biossíntese das aflatoxinas que é exclusiva de fungos do gênero *Aspergillus* produtores de aflatoxinas (TRAIL et al., 1995; SHAPIRA et al., 1996; KUSUMOTO et al., 1998; BROWN et al., 1999; YU et al., 2004). De acordo com Khoury et al. (2011), os *primers* utilizados são altamente específicos para a amplificação de um fragmento de 674 pb correspondente à região intergênica *afIR-afIJ* de *A. flavus* e *A. parasiticus*, sendo que nenhuma outra espécie apresenta resultado positivo com essa técnica. Além da presença de fungos com potencial toxigênico nas amostras, outros grupos fúngicos puderam ser observados nas culturas, no entanto, uma análise macroscópica e microscópica detalhada das colônias é necessária para identificação correta das espécies, o que não foi realizado nesse trabalho.

A análise do padrão de bandas obtido com o corte do fragmento de 674pb, com a enzima de restrição *BglII*, permitiu identificar a presença da espécie *A. flavus* nas amostras. O mesmo padrão de bandas foi obtido nas culturas puras analisadas nesse trabalho e por Khoury et al. (2011) estudando a discriminação de *A. flavus* e *A. parasiticus* em uvas contaminadas com aflatoxinas. Análises de fragmentos gerados pelo corte com enzimas de restrição, a partir de produtos amplificados por PCR, tem se tornado adequadas para estudos taxonômicos e diferenciação entre espécies. Paterson (2006) e González-Salgado et al. (2005) evidenciaram que a análise de fragmentos de restrição obtidos de sequências de rDNA amplificadas por PCR foi adequada para estudos taxonômicos em várias

espécies de fungos produtores de micotoxinas. A amplificação de espaçadores internos (ITS) de DNA ribossomal, combinada com sequenciamento e análise de similaridade de sequências obtidas no Gene Bank permitiu a identificação de espécies de fungos do gênero *Aspergillus* em trabalho realizado por Chen et al. (2002). Somashekar et al. (2004), utilizando digestão de um fragmento do gene *afIR*, foram capazes de discriminar *A. parasiticus* de *A. flavus* em milho.

Nesse trabalho, o método descrito por Khoury et al. (2011) se mostrou rápido e eficaz para a identificação da espécie *Aspergillus flavus* em amostras de amendoim. Métodos convencionais requerem, além do isolamento do fungo de interesse, uma trabalhosa identificação taxonômica, que inclui a análise microscópica de sua estrutura reprodutiva. Considerando a diferenciação entre *A. flavus* e *A. parasiticus*, a primeira possui a morfologia da cabeça conidial variável e produz conídios bastante variáveis na forma e no tamanho, com paredes relativamente finas, podendo ser muito ou pouco rugoso; a segunda espécie apresenta vesículas unisseriadas e conídios esféricos e com paredes rugosas (PITT; HOCKING, 1997). A análise macroscópica da colônia não permite a identificação das espécies, como observado em nosso trabalho. Dessa forma tornam-se relevantes os estudos que contemplam a identificação molecular desse fungo contaminante em alimentos, principalmente aqueles envolvidos com a alimentação diária humana.

Referências

- BLACK, J. G. **Microbiologia: fundamentos e perspectivas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2002. 829 p.
- BROOKS, G. F.; CARROLL, K. C.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A.; MIETZNER, T. A. **Microbiologia médica de Jawetz, Melnick e Adelberg**. Porto Alegre: AMGH, 2012. 828 p.
- BROWN, M. P.; BROWN-JENCO, C. S.; PAYNE, G. A. Genetic and molecular analysis of aflatoxin biosynthesis. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 26, p. 81-98, 1999.
- BRUNO, R. L. A. Qualidade fisiológica e microflora de sementes de amendoim cv. Br-1 durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Oleaginosa e Fibrosa**, Campina Grande, v. 4, n. 3, p. 141-152, 2000.
- CENIS, J. L. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 20, n. 9, p. 2380, 1992.
- CHEN, R. S.; TSAY, J. G.; HUANG, Y. F.; CHIO, R. Y. Polymerase chain reaction mediated characterization of molds belonging to the *Aspergillus flavus* group and detection of *A. parasiticus* in peanut

- kernels by multiplex polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 65, n. 5, p. 840-844, 2002.
- EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Manual de segurança e qualidade para a cultura do amendoim**. Brasília: Campo PAS – Programa Alimentos Seguros, 2004. 44 p.
- FAO. **Micotoxinas**. 2009. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em <<http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/mycotoxins/es/>>. Acesso em: 29 mar. 2013.
- FOODS INGREDIENTS BRASIL. **As Micotoxinas**. 2009. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/90.pdf>>. Acesso em: 23 abr. 2013.
- FONSECA, H. Estudo da aflatoxina no amendoim, da colheita à industrialização. **Anais ESALQ**, Piracicaba, v. 33, p. 365-405, 1976.
- GAMS, W.; CHRISTENSEN, M.; ONIONS, A. H. S.; PITT, J. I.; SAMSON, R. A. Intrageneric taxa of *Aspergillus*. In: SAMSON, R. A.; PITT, J. I. (Ed.). **Advances in Aspergillus and Penicillium Systematics**. New York: Plenum Press, 1985. p. 55-62.
- GONÇALEZ, E.; NOGUEIRA, J. H. C.; FONSECA, H.; FELÍCIO, J. D.; PINO, F. A.; CORRÊA, B. Mycobiota and mycotoxins in Brazilian peanut kernels from sowing to harvest. **International Journal of Food Microbiology**, Summit-Argo, v. 123, p. 184-190, 2008.
- GONZÁLEZ-SALGADO, A.; GONZÁLEZ-JAÉN, T.; VÁZQUEZ, C.; PATIÑO, B. Highly sensitive PCR-based detection specific to *Aspergillus flavus*. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 739, p. 211-216, 2011.
- GONZÁLEZ-SALGADO, A.; PATIÑO, B.; VÁZQUEZ, C.; GONZÁLEZ-JAÉN, T. Discrimination of *Aspergillus niger* and other *Aspergillus* species belonging to section Nigri by PCR assays. **FEMS Microbiology Letters**, Birmingham, v. 245, p. 353-361, 2005.
- HOBBS, B. C.; ROBERTS, D. **Toxinfecções e controle higiênico-sanitário de alimentos**. São Paulo: Varela, 1993. 376 p.
- KHOURY, A. E.; ATOUI, A.; RIZK, T.; LTEIF, R.; KALLASSY, M.; LEBRIHI, A. Differentiation between *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* from pure culture and aflatoxin contaminated grapes using PCR-RFLP analysis of *aflR-aflJ* intergenic spacer. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 76, n. 4, p. 247-253, 2011.
- KLICH, M. A. **Identification of common Aspergillus species**. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002. 116 p.
- KUSUMOTO, K. I.; YABE, K.; NOGATA, Y.; OTHA, H. Transcript of a homolog of *aflR*, a regulatory gene for aflatoxin synthesis in *Aspergillus parasiticus*, was not detected in *Aspergillus oryzae* strains. **FEMS Microbiology Letters**, Birmingham, v. 169, p. 303-307, 1998.
- MIDIO, A. F.; MARTINS, D. I. **Toxicologia de alimentos**. São Paulo: Varela, 2000. 295 p.
- MIDORIKAWA, G. E. O. **Desenvolvimento de um método de PCR específico para detecção de Aspergillus flavus aflatoxigênico em grãos brasileiros**. 2009. 146 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) – Universidade Católica de Brasília, Brasília. 2009.
- MORAES, S. A.; MARIOTTO, P. R. Diagnóstico da patologia de sementes de amendoim no Brasil. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 7, p. 41-6, 1985.
- MOUBASHER, H.; ABU TALEB, A.; SENOUSY, H. H. Molecular differentiation between aflatoxinogenic and non-aflatoxinogenic strains of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Microbiology**, New York, v. 82, n. 5, p. 642-646, 2013.
- MPUCHANE, S. F.; TALIGoola, H. K.; GASHE, B. A.; ZINZOMBE, I.; MATSHEKA, M. A mycological study of stored maize and sorghum grains. **Botswana Notes and Records**, Gaborone, n. 29, p. 81-91, 1997.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2009. 327 p.
- OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 2008. 677 p.
- PATERSON, R. R. M. Identification and quantification of mycotoxigenic fungi by PCR. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v. 41, p. 1467-1474, 2006.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. London: Blackie Academic and Professional, 1997. 593 p.
- REIS, G. M. **Variabilidade genética de cepas de Aspergillus flavus isoladas de amendoim**. 2009. 113 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo. 2009.
- ROSSETTO, C. A. V.; VIEGAS, E. C.; LIMA, T. M. Contaminação fúngica do amendoim em função das doses de calcário e das épocas de amostragem. **Bragantia**, Campinas, v. 62, 2003.
- SHAPIRA, R.; PASTER, N.; EYAL, O.; MENASHEROV, M.; METT, A.; SALOMON, R. Detection of aflatoxin molds in grains by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 9, p. 3270- 3273, 1996.
- SOMASHEKAR, D.; RATI, E. R.; CHANDRASHEKAR, A. PCR-restriction fragment length analysis of *aflR* gene for differentiation and detection of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in maize. **Journal of Food Microbiology**, Summit-Argo, v. 93, p. 101-107, 2004.
- SUASSUNA, T. M. F.; COUTINHO, W. M.; SOFIATTI, V.; SUASSUNA, N. D.; GONDIM, T. M. S. **Manual de boas práticas agrícolas para a produção do amendoim no nordeste do Brasil**. Campina Grande: EMBRAPA, 2008. 28 p.
- TANIWAKI, M. H.; SILVA, N. **Fungos em alimentos: ocorrência e detecção**. Campinas: Núcleo de Microbiologia/ITAL, 2001. 82 p.
- TRAIL, F.; MAHANTI, N.; RARICK, M.; MEHIGH, R.; LIANG, S. H.; ZHOU, R.; LINZ, J. E. Physical and transcriptional map of an aflatoxin gene cluster in *Aspergillus parasiticus* and functional disruption of a gene involved early in the aflatoxin pathway. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 7, p. 2665-2673, 1995.
- VAAMONDE, G.; PATRIARCA, A.; PINTO, V. F.; COMERIO, R.; DEGROSSI, C. Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* section *flavi* from diferente substrates in Argentina. **Journal of Food Microbiology**, Summit-Argo, v. 88, p. 79-84, 2003.
- YU, J.; WHITELAW, C. A.; NIERMAN, W. C.; BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T. E. *Aspergillus flavus* expressed sequence tags for identification of genes with putative roles in aflatoxin contamination of crops. **FEMS Microbiology Letters**, Birmingham, v. 15, n. 237, p. 333-340, 2004.