

# Produção de aflatoxinas e ácido ciclopiazônico por cepas de *Aspergillus flavus* isoladas de amendoim

## *Production of aflatoxin and cyclopiazonic acid by Aspergillus flavus strains isolate from peanuts*

Edlayne González<sup>1\*</sup>, Janaina Lara da Silva<sup>1</sup>, Tatiana Alves dos Reis<sup>2</sup>, Viviane Kobushi Nakai<sup>2</sup>, Joana D'Arc Felício<sup>1</sup>, Benedito Corrêa<sup>2</sup>

**RESUMO:** *Aspergillus flavus* é um fungo filamentosos que pode produzir aflatoxinas e ácido ciclopiazônico, sendo que a presença dessas micotoxinas em alimentos e rações pode levar a um efeito tóxico no homem e em animais. Cepas de *A. flavus* produtoras de aflatoxinas e ácido ciclopiazônico são frequentemente isoladas do amendoim, indicando a natural co-ocorrência dessas toxinas neste substrato. Neste estudo, foram isoladas 47 cepas de *Aspergillus flavus* em grãos e cascas de amendoim durante diferentes fases de maturação do fruto e também durante seu armazenamento. Das cepas isoladas, foram avaliados os potenciais para produção de aflatoxinas e ácido ciclopiazônico, em que 91,5% foram produtoras de aflatoxinas e 70% produziram ácido ciclopiazônico, sendo que 63,8% produziram ambas as toxinas e 2,1% não produziu nenhuma. A presença de cepas toxigênicas de *A. flavus* nas amostras de amendoim analisadas indica um risco potencial da contaminação deste produto, caso seja exposto a condições ambientais favoráveis ao crescimento do fungo e produção de micotoxinas.

**PALAVRAS-CHAVE:** micotoxinas; fungos toxigênicos; produção de micotoxinas; ocorrência.

**ABSTRACT:** *Aspergillus flavus* is a filamentous fungus that can produce aflatoxins and cyclopiazonic acid, and the presence of these mycotoxins in food and feed can lead to a toxic effect on humans and animals. Strains of *A. flavus* producing aflatoxin and cyclopiazonic acid are often isolated from peanuts, indicating the co-occurrence of these toxins in the natural substrate. In this study, we isolated 47 strains of *A. flavus* on peanut kernels and hulls during different stages of fruit ripening and its storage. Of the isolated strains, we assessed the potential for aflatoxin and cyclopiazonic acid production, in which 91.5% could produce aflatoxins and 70% produced cyclopiazonic acid; 63.8% produced both toxins and 2.1% produced no toxin. The presence of toxigenic *A. flavus* strains in peanut samples indicate a potential risk of contamination of these products, if they are exposed to environmental conditions that are favorable to fungal growth and mycotoxin production.

**KEYWORDS:** mycotoxins; toxigenic fungi; mycotoxin production; occurrence.

<sup>1</sup>Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, Instituto Biológico de São Paulo – São Paulo (SP), Brasil.

<sup>2</sup>Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP) – São Paulo (SP), Brasil.

\*Autor correspondente: goncalez@biologico.sp.gov.br

Recebido em: 02/12/2011. Aceito em: 08/08/2013

## INTRODUÇÃO

Os fungos podem causar uma série de danos aos grãos durante o plantio e a colheita, bem como durante o armazenamento (SILLKER; ELLIOT, 1980), sendo que *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* são os principais gêneros de fungos que produzem micotoxinas em alimentos (SIAME *et al.*, 1998). Micotoxinas são substâncias tóxicas produzidas pelo metabolismo secundário de várias espécies de fungos filamentosos, os quais contaminam alimentos no campo, no armazenamento ou após a manufatura (MOSS, 1996). Os fungos toxigênicos são conhecidos por produzir uma ou mais micotoxinas (HUSSEIN, 2001). *Aspergillus flavus* é um fungo filamentoso que pode produzir aflatoxinas e ácido ciclopiazônico, sendo que a coprodução dessas micotoxinas pode resultar em efeito tóxico aditivo ou sinérgico nos consumidores, aumentando o potencial toxigênico deste fungo (GQALENI *et al.*, 1997). Em geral, amendoim, milho e sementes de algodão estão entre os grãos com maior risco de contaminação (ISMAIL, 2000). No Brasil, a contaminação de amendoins por aflatoxinas é um grande problema devido a fatores ambientais que favorecem o crescimento de fungos e a produção da toxina (CALORI-DOMINGUES; FONSECA, 1995). O ácido ciclopiazônico ocorre naturalmente no milho e no amendoim juntamente com as aflatoxinas (VAAMONDE *et al.*, 2003).

Vários estudos foram conduzidos para identificar a microbiota fúngica e as micotoxinas no amendoim durante a estocagem e em condições de campo experimentais, sendo que os principais gêneros encontrados foram *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, e entre as micotoxinas, as aflatoxinas e o ácido ciclopiazônico (LISKER *et al.*, 1993; HORN *et al.*, 1994; 1995; 2000; ANDERSON *et al.*, 1996; SIAME *et al.*, 1998; 2000; ISMAIL, 2000; BHATTACHARYA; RAHA, 2002; VAAMONDE *et al.*, 2006; MPHANE *et al.*, 2004; PILDAIN *et al.*, 2004; GONÇALEZ *et al.*, 2008a, 2008b; NAKAI *et al.*, 2008; ZORZETE *et al.*, 2011, 2013; ATAYDE *et al.*, 2012). BAQUIÃO *et al.* (2012) relataram alta frequência de *A. flavus* toxigênicos em solo no qual são coletadas castanhas do Brasil na Amazônia, assim como a presença destes nos frutos e casca.

A contaminação por aflatoxinas é o principal problema de segurança alimentar nas culturas de campo, particularmente de itens que são produzidos em climas tropicais e subtropicais em países nos quais a alta temperatura e a umidade promovem o crescimento e a proliferação de *Aspergillus* spp. (RUDREW *et al.*, 2013).

Este trabalho teve como objetivo isolar cepas de *Aspergillus flavus* das cascas e grãos de amendoim durante as diferentes fases de maturação do fruto durante um ano de armazenamento, verificando o potencial toxigênico destas quanto à produção de aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> e o ácido ciclopiazônico.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Local de coleta

O estudo foi realizado em Junqueirópolis, Estado de São Paulo, Brasil. A semente de amendoim utilizada no plantio foi da variedade Runner IAC 886, plantada no mês de dezembro de 2004. O amendoim foi colhido em março de 2005 e armazenado por um ano. Foram realizadas quatro coletas no campo de amendoim nas seguintes fases de maturação: fruto recém-formado, em início de granação, em granação, maduro e após a secagem. Os frutos foram armazenados por um ano, de junho de 2005 a junho de 2006. Foram realizadas coletas mensais em triplicata.

### Isolamento e identificação dos fungos

De cada uma das 25 amostras de amendoim foram retiradas, aproximadamente, 30 g para desinfecção em solução de hipoclorito de sódio 2% por 3 minutos. Após a desinfecção, separou-se a casca dos grãos do amendoim, que foram lavados com água estéril. Foram utilizadas, para cada amostra em meio de cultura, 3 placas de Petri contendo 11 grãos cada e 3 placas contendo cascas semeadas diretamente em meio Ágar DRBC e AFPA (PITT *et al.*, 1979). Todas as placas foram incubadas a 25°C por cinco dias e os resultados foram expressos em porcentagem do total de grãos inoculados contaminados por fungos. Em seguida, colônias de diferentes tipos morfológicos foram isoladas em Ágar Sabouraud Dextrose e submetidas à identificação por meio da técnica de microcultivo (RIDDELL, 1950). Os fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* foram classificados por espécie de acordo com os seguintes compêndios: ARX (1974), BARNETT; HUNTER (1965), BARRON (1972), ELLIS (1993), NELSON *et al.* (1983), RAPER; FENNEL (1965).

### Produção de Micotoxinas

#### Aflatoxinas

As cepas de *Aspergillus* spp. isoladas e identificadas como *A. flavus* (47) foram mantidas em tubos contendo o meio Ágar Batata Dextrose (BDA) para avaliação do potencial toxigênico, utilizando a metodologia descrita por LIN; DIANESE (1976). As cepas foram mantidas em BDA por dez dias a 25°C e, em seguida, um fragmento de cada colônia foi inoculado em uma placa de Petri contendo o meio Ágar Coco, sendo incubada, novamente, por dez dias a 25°C. Após o crescimento, o conteúdo das placas foi triturado e pesado, e as aflatoxinas foram extraídas com 30 mL de clorofórmio para cada de 10 g do cultivo. Após 30 minutos de agitação, o solvente foi filtrado em papel de filtro contendo sulfato de sódio e terra de diatomácea. O filtrado foi evaporado até a secura e transferido para um volume conhecido e aplicado em placa de sílica gel G 60 (Merck), acompanhado de um padrão quantitativo de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>. A placa foi eluída unidimensionalmente

com a mistura de solventes clorofórmio:acetona (9:1 v/v) (Aoac, 1980). Após a secagem do solvente, realizou-se a leitura das amostras e do padrão em fotodensitômetro (CS 9000, Shimadzu). A quantificação foi feita por comparação das áreas das amostras com as áreas dos padrões de aflatoxinas.

### Ácido ciclopiazônico

As cepas estudadas foram mantidas em tubos contendo Ágar batata dextrose a 25°C por sete dias. Foram inoculados 1,0 mL de suspensão de esporos, de cada cepa, em frascos contendo 25 mL de caldo de Czapeck-Dox (DIFCO) e incubados a 25°C por 12 dias. As culturas foram filtradas e os caldos foram extraídos duas vezes com 25 mL de clorofórmio (SANCHEZ *et al.*, 2004). Os extratos foram filtrados, evaporados até a secura e rediluídos com 1,0 mL de metanol grau CLAE. O ácido ciclopiazônico foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), tendo como fase móvel acetonitrila:tampão acetato de amônio (0,05 M, pH 5) (8:2 v/v), fluxo de 0,6 mL.min<sup>-1</sup>, detector de UV em 284 nm (LOSITO *et al.*, 2002), coluna ODS C8 4,6X250 mm de 5 micron (Shimadzu). O método de quantificação das amostras foi padrão externo, utilizando curva de calibração com 5 pontos (0,611; 1,223; 2,446; 4,892 e 9,798 mg.mL<sup>-1</sup>).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cepas de *A. flavus* produtoras de ACP e aflatoxinas são frequentemente isoladas de amendoim (LUK *et al.*, 1977;

GALLAGHER *et al.*, 1978; VAAMONDE *et al.*, 2006), indicando a natural ocorrência simultânea dessas toxinas neste substrato. Tendo em vista os danos à saúde humana e animal causados pela ocorrência simultânea das aflatoxinas e do ACP, a produção dessas toxinas em produtos agrícolas deve ser controlada (VAAMONDE *et al.*, 2006).

Neste estudo foram isoladas 47 cepas de *A. flavus*, sendo 2 nas cascas dos frutos recém-formados; 3 nos grãos e 2 nas cascas no estágio de granação; 5 nos grãos e 1 nas cascas dos frutos maduros; 3 nos grãos e 1 nas cascas dos frutos após a secagem; 12 nas cascas e 18 nos grãos dos frutos armazenados. Das cepas isoladas no campo, 88,2% foram produtoras de aflatoxinas, 41,7% foram produtoras de ACP, 35,3% produziram ambas as toxinas, 52,9% produziram apenas aflatoxinas, 5,8% produziram apenas ACP e 5,8% não foram produtoras. Já durante o armazenamento, 93,3% foram produtoras de aflatoxinas, 86,6% foram produtoras de ACP, 80,0% produziram ambas as toxinas e 6,6% produziram apenas ACP. As concentrações de aflatoxina B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> variam de 18.560 a 30,0 mg.kg<sup>-1</sup> e de 220 a 1,0 mg.kg<sup>-1</sup>, respectivamente, e as de ACP variam de 17,45 a 2,36 mg.mL<sup>-1</sup>, nos frutos colhidos durante a maturação (Tabela 1). Nas amostras coletadas durante o armazenamento, as concentrações de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e ACP variaram de 14.128 a 0,10 mg.kg<sup>-1</sup>, de 420 a 0,19 mg/kg e de 67,61 a 0,64 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabela 2).

Em média, as cepas isoladas no campo produziram maior quantidade de aflatoxinas (AFB<sub>1</sub> = 5.309,88 mg.kg<sup>-1</sup> e AFB<sub>2</sub> = 71,64 mg.kg<sup>-1</sup>) em relação às isoladas

**Tabela 1.** Concentrações de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> (mg.kg<sup>-1</sup>) e ácido ciclopiazônico (mg.mL<sup>-1</sup>) de cepas de *Aspergillus flavus* isoladas de amostras de grãos e cascas de amendoim em diferentes estágios de maturação.

Nº da cepa	Estágio de maturação	Material de procedência	AFB <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	ACP
01	granação	Grão	ND	ND	ND
02	granação	Grão	13.900	50	ND
03	granação	Grão	ND	ND	4,48
04	maduro	Grão	18.560	150	8,07
05	maduro	Grão	4.300	220	ND
06	maduro	Grão	13.390	140	11,16
07	maduro	Grão	870	60	12,18
08	maduro	Grão	1.011	110	ND
09	seco	Grão	600	10	ND
10	seco	Grão	270	3,00	15,34
11	seco	Grão	9.130	160	ND
12	recém-formado	Casca	30	4,00	17,45
13	recém-formado	Casca	190	1,00	ND
14	granação	Casca	7.700	200	2,36
15	granação	Casca	11.460	40	ND
16	maduro	Casca	87	ND	ND
17	seco	Casca	8.770	70	ND

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

**Tabela 2.** Concentrações de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> (mg.kg<sup>-1</sup>) e ácido ciclopiazônico (mg.mL<sup>-1</sup>) de cepas de *Aspergillus flavus* isoladas de amostras de grãos e cascas de amendoim armazenados.

Nº da cepa	Material de procedência	AFB <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	ACP
01	Grão	0,56	ND	34,50
02	Grão	0,24	ND	23,67
03	Grão	1,92	0,4	45,54
04	Grão	203,36	4,69	0,64
05	Grão	11.983	107	1,82
06	Grão	95,90	2,0	6,09
07	Grão	4.462	10,05	40,63
08	Grão	0,58	ND	ND
09	Grão	185,04	1,61	9,08
10	Grão	246,36	1,53	21,58
11	Grão	7,29	1,5	6,34
12	Grão	14.128	420	14,93
13	Grão	0,20	ND	50,64
14	Grão	171,86	2,14	1,05
15	Grão	2,09	0,4	56,52
16	Grão	ND	ND	24,49
17	Grão	105,27	0,79	ND
18	Grão	209,85	1,34	33,58
19	Casca	118,82	0,99	67,41
20	Casca	ND	ND	32,68
21	Casca	37,36	1,39	31,81
22	Casca	3,00	1,50	1,10
23	Casca	0,10	0,3	11,82
24	Casca	76,20	0,19	29,81
25	Casca	30,52	0,9	ND
26	Casca	67,35	0,16	1,40
27	Casca	12,64	0,5	ND
28	Casca	61,43	0,39	4,49
29	Casca	3.236	290	4,16
30	Casca	82,63	2,02	4,83

AFB<sub>1</sub>: Aflatoxina B<sub>1</sub>; AFB<sub>2</sub>: Aflatoxina B<sub>2</sub>; ACP: Ácido Ciclopiazônico; ND: Não Detectado.

no armazenamento (AFB<sub>1</sub> = 1.182,91 mg.kg<sup>-1</sup> e AFB<sub>2</sub> = 28,39 mg.kg<sup>-1</sup>), enquanto a produção de ACP foi maior pelas cepas isoladas no armazenamento (18,68 mg.mL<sup>-1</sup>) do que no campo (4,17 mg.mL<sup>-1</sup>), resultados significantes pelo teste ANOVA (p < 0,05). Quando aplicado o teste de Tukey-Kramer, somente considerou-se estatisticamente significante (p < 0,001) a diferença de concentrações entre a aflatoxina B<sub>1</sub> do campo e do armazenamento. Outros estudos relataram a presença de *A. flavus* em grãos e cascas de amendoim das variedades Runner IAC 886 e Caiapó em diferentes estágios de maturação, e também durante o armazenamento, assim como a presença de aflatoxinas e ACP (ZORZETE *et al.*, 2012; 2013). A alta frequência de *A. flavus* e a presença de aflatoxinas foram verificadas em campos de amendoim de diferentes regiões do estado São Paulo (ATAYDE *et al.*, 2012).

No Brasil, além de amendoim, há relatos de ACP em produtos derivados de tomates e em leite comercial, coletados no estado de São Paulo (MOTTA; SOARES, 2000; 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Os achados de ACP em amendoim e milho indicam que a extensão do potencial de exposição do homem e animais a esta toxina é maior do que se acreditava (NORRED, 1987), sendo que o ACP pode ter contribuído com as aflatoxinas, para a “Tukey X Disease” (VAAMONDE *et al.*, 2003).

## CONCLUSÃO

Cepas de *Aspergillus flavus* produtoras de aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> e de ácido ciclopiazônico foram isoladas em grãos de casca de amendoim antes, após e durante a colheita, assim como no armazenamento.

## REFERÊNCIAS

- ANDERSON, W.F.; HOLBROOK, C.C.; WILSON, D.M. Development of greenhouse screening for resistance to *Aspergillus parasiticus* infection and preharvest aflatoxin contamination in peanut. *Mycopathologia*, New York, v.135, p.115-118, 1996.
- ARX, J.A. *The genera of fungi sporulating in pure culture*. 2. ed. Vaduz: J. Cramer, 1974. 315p.
- ATAYDE, D.D.; REIS, T.A.; GODOY, I.J.; ZORZETE, P.; REIS, G.M.; CORREA, B. Mycobiota and aflatoxins in a peanut variety grown in different regions in the state of São Paulo, Brazil. *Crop Protection*, Londres, v.33, p.7-12, 2012.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). *Official Methods of Analysis*. 3. ed. Washington, D.C.: AOAC, 1980.
- BAQUIÃO, A.C.; ZORZETE, P.; REIS, T.A.; ASSUNÇÃO, E.; VERGUEIRO, S.; CORREA, B. Mycoflora and mycotoxins in field samples of Brazil nuts. *Food Control*, Vurrey, v.28, p.224-229, 2012.
- BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1965. 232p.
- BARRON, G.L. *The Genera of Hyphomycetes from soil*. New York: Robert E. Krieger Publishing Company, 1972. 364p.
- BHATTACHARYA, K.; RAHA, S. Deteriorative changes of maize, groundnut and soybean seeds by fungi in storage. *Mycopathologia*, New York, v.155, p.135-141, 2002.
- CALORI-DOMINGUES, M.A.; FONSECA, H. Laboratory evaluation of chemical control of aflatoxin production in unshelled

- peanuts (*Arachis hypogaea* L.). *Food Additives and Contaminants*, Londres, v.12, n.3, p.347-350, 1995.
- ELLIS, M.B. *Dematiaceous Hyphomycetes*. Wallingford, Reino Unido: CAB International, 1993. 608p.
- GALLAGHER, R.T., RICHARD, J.L., STAHR, H.M., COLE, R.J. Cyclopiazonic acid production by aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. *Mycopathologia*, New York, v.66, p.31-36, 1978.
- GONÇALEZ, E.; NOGUEIRA, J.H.C.; FONSECA H.; FELICIO, J.D.; PINO, F.A.; CORRÊA, B. Mycobiota and mycotoxins in Brazilian peanut kernels from sowing to harvest. *International Journal of Food Microbiology*, v.123, p.184-190, 2008a.
- GONÇALEZ, E.; SOUZA, T.N.; ROSSI, M.H.; FELICIO, J.D.; CORRÊA, B. Avaliação da micoflora e ocorrência de micotoxinas em cascas de amendoim em diferentes estágios de maturação da vagem. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v.32, p.1380-1386, 2008b.
- GOALENI, N.; SMITH, J.E.; LACEY, J.; GETTINBY, G. Effects of temperature, water activity, and incubation time on production of aflatoxins and cyclopiazonic acid by an isolate of *Aspergillus flavus* in surface Ágar culture. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.63, n.3, p.1048-1053, 1997.
- HORN, B.W.; DORNER, J.W.; GREENE, R.L.; BLANKENSHIP, P.D.; COLE, R.J. Effect of *Aspergillus parasiticus* soil inoculum on invasion of peanut seeds. *Mycopathologia*, New York, v.125, p.179-191, 1994.
- HORN, B.W.; GREENE, R.L.; DORNER, J.W. Effect of corn and peanut cultivation a soil populations of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in Souhwestern Georgia. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.61, n.7, p.2472-75, 1995.
- HORN, B. W.; GREENE, R. L.; SORENSEN, R. B.; BLANKENSHIP, P. D.; DORNER, J. W. Conidial movement of nontoxigenic *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in peanut fields following application to soil. *Mycopathologia*, New York, v.151, p.81-92, 2000.
- HUSSEIN, S.H.; BRASEL, J.M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, v.167, p.101-134, 2001.
- ISMAIL, M.A. Deterioration and spoilage of peanuts and desiccated coconuts from two sub-saharan tropical East African countries due to the associated mycobiota and their degradative enzymes. *Mycopathologia*, New York, v.150, p.67-80, 2000.
- LISKER, N.; MICHAELI, R.; FRANK, Z.R. Mycotoxigenic potential of *Aspergillus flavus* strains isolated from groundnuts growing in Israel. *Mycopathologia*, New York, v.122, p.177-183, 1993.
- LOSITO, I., et al. LC-ion trap eletrospray MS-MS for determination of cyclopiazonic acid in milk samples. *Analyst*, Londres, v.127, n.4, p.499-502, 2002.
- LUK, K.C., KOBBE, B., TOWNSEND, J.M. Production of cyclopiazonic acid by *Aspergillus flavus* link. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.33, p.211-212, 1977.
- MOSS, M.O. Mycotoxic fungi. In: ELEY, A.R. (Ed.). *Microbial Food Poisoning*. 2. ed. Londres: Chapman, 1996. p.75-93.
- MPHANE, F.A.; SIAME, B.A.; TAYLOR, J.E. Fungi, aflatoxin and cyclopiazonic acid associated with peanut retailing in Botswana. *Journal Food Protection*, Des Moines, v.67, n.1, p.96-1002, 2004.
- NAKAI, V.K.; ROCHA, L.O.; GONÇALEZ, E.; FONSECA, H.; ORTEGA, E.M.M.; CORRÊA, B. Distribution of fungi and aflatoxin in a stored peanut variety. *Food Chemistry*, Barking, v.106, p.285-290, 2008.
- NELSON, P.E.; TOUSON, T.A.; MARASAS, W.F.O. *Fusarium species. An illustrated manual for identification*. Pennsylvania: University Press, 1983. 193p.
- OLIVEIRA, C.A.; ROSMANINHO, J.; ROSIM, R. Aflatoxin M1 and cyclopiazonic acid in fluid milk traded in São Paulo, Brazil. *Food Additives and Contaminants*, Londres, v.23, n.2, p.196-201, 2006.
- PILDAIN, M.B.; VAAMONDE, G.; CABRAL, D. Analysis of population structure of *Aspergillus flavus* peanut based on vegetative compatibility, geographic origin, mycotoxin and sclerotia production. *International Journal Food Microbiology*, v.93, p.31-40, 2004.
- PITT, J.I.; KING, A.D.; HOCKING, A.D. Dicloran-Rose Bengal Medium for enumeration and isolation of molds from foods. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.37, p.959-970, 1979.
- RAPER, K.B.; FENNEL, D.I. *The genus Aspergillus*. Baltimore: Willians Wilkins, 1965. 686p.
- RIDELL, R.W. Permanent stained mycological preparations obtained by slid culture. *Mycologia*, New York, v.42, p.265-270, 1950.
- RUDREW, S.; CRAFT, J.; AIDOO, K. Occurrence of toxigenic *Aspergillus* spp. and aflatoxins in selected food commodities of Asian origin in the west of Scotland. *Food and Chemical Toxicology*, Oxford, v.55, p.653-658, 2013.
- SANCHEZ, E.; HEREDIA, AN.; GARCIA, S. Inhibition of growth and mycotoxins production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* by extracts of *Agave* species. *International Journal Food Microbiology*, v.98, p.271-278, 2004.
- SIAME, B.A.; MPUCHANE, S.F.; GASHE, B.A.; ATTLEY, J.; TEFFERA, G. Occurrence of aflatoxins, fumonisin B<sub>1</sub> and zearalenone in foods and feeds in Botswana. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v.61, n.12, p.1670-1673, 1998.
- SILKER, J.H.; ELLIOT, R.P. *Ecologia Microbiana de los Alimentos. Acribia*, Zaragoza, v.1, p.74-96, 1980.

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

VAAMONDE, G.; PATRIARCA, A.; PINTO, V.F. Effects of water activity and temperature on production of aflatoxin and cyclopiazonic acid by *Aspergillus flavus* in peanuts. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, New York, v.571, p.225-235, 2006.

ZORZETE, P; REIS, T.A.; FELICIO, J.D.; BAQUIÃO, A.C.; MAKIMOTO, P.; CORREA, B. Fungi, mycotoxins and phytoalexin in peanut varieties, during plant growth in the field. *Food Chemistry*, Barking, v.129, p.957-964, 2011.

ZORZETE, P; BAQUIÃO, A.C.; ATAYDE, D.D.; REIS, T.A.; GONÇALEZ, E.; CORREA, B. Mycobiota, aflatoxins and cyclopiazonic acid in stored peanut cultivars. *Food Research International*, Essex, v.52, p.380-386, 2013.