



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JULIANA SOARES GONÇALVES

**ANÁLISE MOLECULAR DE FUNGOS DA SEÇÃO *FLAVI*
ISOLADOS DE CASTANHA-DO-BRASIL**

Londrina
2011

JULIANA SOARES GONÇALVES

**ANÁLISE MOLECULAR DE FUNGOS DA SEÇÃO *FLAVI*
ISOLADOS DE CASTANHA-DO-BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Helena Pelegrinelli Fungaro

Londrina
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

G625a Gonçalves, Juliana Soares.
Análise molecular de fungos da seção *Flavi* isolados de castanha-do-brasil /
Juliana Soares Gonçalves. – Londrina, 2011.
71 f. : il.

Orientador: Maria Helena Pelegrinelli Fungaro.
Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade
Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação
em Genética e Biologia Molecular, 2011.
Inclui bibliografia.

1. Castanha-do-pará – Melhoramento genético – Teses. 2. Fungos – Genética –
Teses. 3. Polimorfismo (Genética) – Teses. 4. Plantas – Genética molecular –
Teses. 5. Micotoxinas – Teses. 6. *Aspergillus* – Teses I. Fungaro, Maria Helena
Pelegrinelli. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas.
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Instituto
Agrônomo do Paraná. IV. EMBRAPA. V. Título.

CDU 631.52:634.53

JULIANA SOARES GONÇALVES

**ANÁLISE MOLECULAR DE FUNGOS DA SEÇÃO *FLAVI* ISOLADOS
DE CASTANHA-DO-BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Helena Pelegrinelli
Fungaro
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Rogério Fernandes de Souza
UEL – Londrina – PR

Profa. Dra. Beatriz Thie Iamanaka
ITAL – São Paulo – SP

Londrina, 24 de fevereiro de 2011

DEDICATÓRIA

***À minha família, amigos e à Dr^a. Maria
Helena P. Fungaro.***

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tornar possível esta conquista;

Aos meus pais, Antonio Carlos e Suely, e meus irmãos, Marco Aurélio e Giselle por todo incentivo, amor, paciência e confiança durante a realização deste trabalho;

Aos meus grandes e eternos amigos, Ana Maria, Andrey, Carolina, Eliseu, Íris, Lucas, Mayara, Rodrigo, Talita e Viviane, pelo carinho, amizade e incentivo durante tantos anos juntos. Em tempo em que quase ninguém se olha nos olhos, em que a maioria das pessoas pouco se interessa pelo que não lhe diz respeito, só mesmo agradecendo àqueles que percebem nossas descrenças, indecições, suspeitas, tudo o que nos paralisa, e gastam um pouco da sua energia conosco, insistindo.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Maria Helena P. Fungaro, pela orientação, dedicação, exemplo e confiança em meu trabalho;

À Prof^a. Dr^a. Elisabete Y. Ono e ao Prof. Dr. Rogério Fernandes de Souza pelas críticas e sugestões durante do exame de qualificação;

À Ms. Carla de Freitas Munhoz, pelo auxílio nas análises dos dados;

À Dr^a. Marta Hiromi Taniwaki do Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL, Campinas-SP, pelas colaborações;

Aos amigos de Laboratório, Daniel Vinícius Ferri, Daniele Sartori, pela amizade, companheirismo, em especial à Lara Munique Ferracin por todo apoio e colaboração durante todo trabalho;

À Maria Sueli Trindade Miranda, secretária da pós-graduação, pela disposição e auxílio sempre que necessário;

A todos os professores do Mestrado em Genética e Biologia Molecular pelos ensinamentos no decorrer das disciplinas;

A todos os colegas do Mestrado em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina;

À Universidade Estadual de Londrina – UEL; pela oportunidade e apoio à minha formação;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos;

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

GONÇALVES, Juliana Soares. **Análise molecular de fungos da seção *Flavi* isolados de castanha-do-brasil**. 2011. 71 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RESUMO

A castanha-do-brasil é o principal produto extrativista comercializado dos estados do norte do Brasil. Entretanto, a ocorrência de fungos e aflatoxinas na castanha-do-brasil têm ocasionado grandes perdas econômicas. As aflatoxinas são micotoxinas produzidas, preponderantemente, por espécies de *Aspergillus* seção *Flavi*. A identificação das espécies da seção *Flavi* por métodos tradicionais, aliada ao uso de métodos moleculares, está somando conhecimentos e estabelecendo maior eficiência na caracterização de isolados. Diante deste contexto, este trabalho teve por objetivo, através de métodos moleculares, ampliar os conhecimentos acerca das espécies de *Aspergillus* da seção *Flavi* que contaminam com aflatoxinas este importante produto extrativista da região norte do Brasil. Para tanto, foi realizada uma análise de Polimorfismos de DNA Amplificado ao Acaso (RAPD) de 81 isolados de *Aspergillus* seção *Flavi*, obtidos de amêndoa e casca de castanha-do-brasil, provenientes dos estados do Amazonas e Pará. A partir dos *fingerprints* de DNA gerados os isolados de amêndoa foram subdivididos em 6 grupos e os de casca em 7 grupos. O sequenciamento de porções dos genes que codificam para β -tubulina e calmodulina, de representantes de cada grupo obtido pelo RAPD, permitiu identificar espécies filogeneticamente relacionadas: *A. flavus*, *A. nomius*, *A. bombycis*, *A. arachidicola*, *A. tamaritii* e *A. caelatus*. Os dados moleculares também sugeriram a existência, tanto em amêndoas como em cascas, de uma espécie ainda não descrita na literatura. Além disso, foram investigadas possíveis deleções no *cluster* gênico da aflatoxina em isolados de *A. flavus* não produtores de aflatoxinas, através de PCR específica. Foram observados seis padrões de deleção do *cluster* gênico, mostrando que a deleção no *cluster* da aflatoxina não é rara e os padrões podem ser diversos.

Palavras-chave: Aflatoxinas. Castanha-do-brasil. Identificação molecular. *Aspergillus* seção *Flavi*.

GONÇALVES, Juliana Soares. **Molecular analysis of fungi from section *Flavi* isolated from Brazil nut. 2011.** 71 f. Dissertation (Master's Degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

ABSTRACT

The Brazil-nut is the main extractive product commercialized in the states of northern Brazil. However, the occurrence of fungi and aflatoxins in Brazil nuts has caused major economic losses. Aflatoxins are mycotoxins produced mainly by species of *Aspergillus* section *Flavi*. The identification of species from section *Flavi* by traditional methods associated with the use of molecular methods is adding knowledge and providing greater efficiency in the characterization of isolates. Given this context, this study aimed, through molecular methods, to expand knowledge about the species of *Aspergillus* from section *Flavi* that contaminate with aflatoxins this important extractive product of the north region of Brazil. To this end, we performed an analysis of random amplified polymorphic DNA (RAPD) of 81 isolates of *Aspergillus* section *Flavi*, obtained from almond and shell in Brazil nuts from the states of Amazonas and Pará. From the fingerprints of DNA generated, the nut isolates were subdivided into six groups and the shell in 7 groups. The sequencing of portions of the genes coding for β -tubulin and calmodulin, representatives of each group obtained by RAPD, identified phylogenetically related species: *A. flavus*, *A. nomius*, *A. bombycis*, *A. arachidicola*, *A. tamaritii* and *A. caelatus*. The molecular data also suggested the existence, in both almonds and shells, a specie not yet described in literature. Furthermore, we investigated possible deletions in the gene cluster of aflatoxin in nonaflatoxigenic *A. flavus* isolates, using specific PCR. Were observed six deletion patterns in the aflatoxin gene cluster, showing that the deletions in the cluster of aflatoxin are not rare and the patterns appear to be diverse.

Keywords: Aflatoxins. Brazil nuts. Molecular identification. *Aspergillus* section *Flavi*.

LISTA DE FIGURAS

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Figura 1 – Genes e enzimas da via biossintética das aflatoxinas (A) e via da biossíntese das aflatoxinas (B). A linha vertical representa o *cluster* gênico de 82 kb em *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus flavus*. Os novos nomes dos genes estão à esquerda da linha vertical e os nomes antigos dos genes estão à direita. As setas ao longo da linha vertical indicam a direção da transcrição dos genes. A régua na extremidade indica o tamanho relativo dos genes em kilobases. As setas na figura B indicam as conexões dos genes para as enzimas que eles codificam, das enzimas para as etapas de bioconversão envolvidas, e de produtos intermediários nas etapas de bioconversão das aflatoxinas. Abreviaturas: NOR (ácido norsolorínico); AVN (averantina); HAVN (5'-hidroxiaverantina); AVNN (averufanina); OAVN (oxoaverantina); AVF (averufina); VHA (acetato versiconal hemiacetal); VAL (versiconal); VERB (versicolorina B); VERA (versicolorina A); DMST (dimetil-esterigmatocistina); DHDMST (dihidrodimetil-esterigmatocistina); ST (esterigmatocistina); DHST (dihidroesterigmatocistina); OMST (O-metil esterigmatocistina); DHOMST (dihidro-O-metil esterigmatocistina); AFB₁ (aflatoxina B₁); AFB₂ (aflatoxina B₂); AFG₁ (aflatoxina G₁); AFG₂ (aflatoxina G₂)21

ARTIGO

- Figura 1 –** Perfis de RAPD de isolados de *Aspergillus* seção *Flavi*, produtores e não produtores de aflatoxinas, obtidos o iniciador OP-X7: a) 41 isolados de amêndoas de castanha-do-brasil; b) 40 isolados obtidos de casca de castanha-do-brasil. MM: marcador de peso molecular 1 kb plus; CN, controle negativo60
- Figura 2 –** Árvore filogenética gerada a partir das sequências da porção BT2 do gene da β -tubulina de isolados de *Aspergillus* spp. alinhadas com as sequências de espécies tipos de *Aspergillus* seção *Flavi* depositadas no banco de dados61
- Figura 3 –** Árvore filogenética gerada a partir das sequências parciais do gene calmodulina de isolados de *Aspergillus* spp. alinhadas com as sequências de espécies tipos de *Aspergillus* seção *Flavi* depositadas no banco de dados62
- Figura 4 –** a) Alinhamento das sequências de nucleotídeos da porção BT2 do gene da β -tubulina dos isolados ITAL 116, ITAL 259, ITAL 262 com a sequência de nucleotídeos de *Aspergillus tamarii* (EF202123) e *A. caelatus* (EF203127); b) Alinhamento das sequências parciais de nucleotídeos do gene da calmodulina dos isolados ITAL 116, ITAL 259, ITAL 262 com a sequência de nucleotídeos de *Aspergillus tamarii* (EF202034) e *A. caelatus* (EF 202035)63
- Figura 5 –** Padrões de deleção no *cluster* gênico da aflatoxina em isolados de *A. flavus*. Os círculos sólidos indicam produtos de PCR positivos e os círculos abertos indicam não haver produtos de PCR. A região contendo *nadA-hexA-glcA-sugR* representa o *cluster* de utilização de açúcar. C1, C2, C3 e C4 são as regiões flanqueadoras do *cluster* gênico da aflatoxina e do *cluster* gênico de utilização de açúcar64

LISTA DE TABELAS

MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 1 – Conjunto de *primers* derivados de genes da biossíntese da aflatoxina e regiões flanqueadoras38

ARTIGO

Tabela 1 – Isolados de *Aspergillus* spp. obtidos de amêndoa e casca de castanha-do-brasil provenientes de diferentes regiões geográficas da região norte do Brasil.....56

Tabela 2 – F_{st} “par a par” entre os grupos de *Aspergillus* seção *Flavi* isolados de castanha-do-brasil obtidos através dos dados de RAPD: a) grupo de isolados de amêndoas; b) grupo de isolados de cascas.....58

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
2.1	CASTANHA-DO-BRASIL.....	14
2.2	MICOTOXINAS.....	16
2.3	AFLATOXINAS.....	19
2.4	FUNGOS PRODUTORES DE AFLATOXINAS.....	24
2.5	MÉTODOS MOLECULARES PARA ESTUDO DE FUNGOS PRODUTORES DE AFLATOXINAS.....	27
3	OBJETIVOS	31
4	MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1	LINHAGENS E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	32
4.2	PREPARO DO INOCULO PARA EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS.....	32
4.3	EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS	33
4.4	TRATAMENTO DOS ÁCIDOS NUCLÉICOS COM RNASE A	33
4.5	QUANTIFICAÇÃO DO DNA.....	34
4.6	ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA ATRAVÉS DE RAPD.....	34
4.7	ANÁLISE DOS DADOS DE RAPD.....	35
4.8	AMPLIFICAÇÃO DA PORÇÃO BT2 DO GENE DA B-TUBULINA E DE UMA PORÇÃO DO GENE DA CALMODULINA.....	35
4.9	PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO.....	36
4.10	Sequenciamento da Porção Bt2 do Gene da β -tubulina e de uma Porção do Gene da Calmodulina	37
4.11	Amplificação de Genes do <i>Cluster</i> da Aflatoxina	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1	ARTIGO	41
	REFERÊNCIAS	65

1 INTRODUÇÃO

A castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) tem grande importância para a economia de estados do norte do Brasil, sendo o principal produto extrativista comercializado. Entretanto, pesquisas alertam para o problema da presença de fungos e aflatoxinas na castanha-do-brasil (POHLAND, 1993; JECFA, 1998; FSA, 2004; MARKLINDER *et al.*, 2005; CAC, 2005; MELLO; SCUSSEL, 2009), o que tem ocasionado a diminuição das exportações devido às barreiras fitossanitárias impostas aos produtos contaminados por esta micotoxina.

As aflatoxinas são micotoxinas extremamente tóxicas produzidas, preponderantemente, por espécies de *Aspergillus* seção *Flavi*, os quais se desenvolvem sobre muitos produtos agrícolas e alimentos quando as condições de umidade do produto, umidade relativa do ar e temperatura ambiente são favoráveis. Esta seção contém os principais fungos produtores de aflatoxinas economicamente importantes, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. As espécies produtoras de aflatoxinas menos comuns presentes na seção são *Aspergillus nomius*, *Aspergillus pseudotamarii*, *Aspergillus bombycis*, *Aspergillus arachidicola*, *Aspergillus minisclerotigenes* e *Aspergillus parvisclerotigenus*. A seção *Flavi* inclui outras espécies economicamente importantes, como as espécies *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus sojae*, utilizadas na fermentação de alimentos. Ao nível molecular, essas duas espécies estão intimamente relacionadas com *A. flavus* e *A. parasiticus*, respectivamente. Apesar disso, ainda hoje, estes fungos são mantidos como espécies distintas apenas para evitar problemas de regulamentação em indústrias de alimentos (GEISER, PITT, TAYLOR, 1998).

Ainda que muitos estudos relacionados à identificação de fungos da seção *Flavi* em produtos destinados à alimentação humana já estejam disponíveis na literatura científica, para castanha-do-brasil as tentativas de identificação das espécies presentes são restritas à identificação morfológica. Dada a complexidade taxonômica desta seção, as iniciativas de identificação das espécies fazendo-se uso exclusivo de dados morfológicos não têm proporcionado precisão na avaliação de risco. Diante deste contexto, este trabalho teve por objetivo, através de técnicas de biologia molecular, ampliar os conhecimentos acerca das espécies fúngicas

passíveis de infectarem e contaminarem com aflatoxinas este produto extrativista de extrema relevância para a economia da região norte do Brasil.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CASTANHA-DO-BRASIL

A castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) foi descrita pela primeira vez em 1808, por Humboldt e Bonpland (ALMEIDA, 1963). A espécie pertence à família Lecythidaceae, que inclui aproximadamente 200 espécies distribuídas do sul do México ao sul do Brasil (PRANCE; MORI, 1979).

A castanheira-do-brasil é uma árvore de grande porte, atingindo até 50 m de altura e 2 m de diâmetro na base. Apresenta caule cilíndrico, liso, desprovido de ramos até a fronde, casca escura e fendida, ramos encurvados nas extremidades. Possui folhas esparsas, alternadas, pecioladas (pecíolo cilíndrico-caniculado), oblongas ou ovado-oblongas, curto acuminadas, onduladas, verde-escuras na parte superior e pálida na inferior (ALMEIDA, 1963).

O fruto da castanheira é conhecido como ouriço, e consiste em duas camadas esféricas de substância lenhosa, sendo a externa mais fina e friável e a interna uma cápsula globosa deprimida, quase esférica, com 8 a 16 cm de diâmetro (ALMEIDA, 1963). Podem pesar de 0,5 a 5 kg e conter, em seu interior, cerca de 15 a 25 sementes dispostas em série na coluna placentária. As sementes representam cerca de 25% do peso dos frutos e as amêndoas (parte comestível), 13% (MÜLLER *et al.*, 1995).

A castanha é um alimento altamente nutritivo, rico em carboidratos e lipídios (fonte de energia e de ácidos graxos essenciais), proteínas (fonte de aminoácidos essenciais) além da presença do selênio (que possui ação antioxidante) dentre outros elementos (AMPE *et al.*, 1986; SECOR; LISK, 1989).

Devido seu alto valor nutritivo, a castanha-do-brasil é muito utilizada como ingrediente na culinária. O óleo de castanha é também utilizado na fabricação de doces finos e para consumo *in natura*, e também é utilizado como lubrificante na aviação e em componentes eletrônicos, devido as suas propriedades antioxidantes. Seu fruto, o ouriço, é utilizado pelas populações extrativistas como carvão vegetal em fornos para produção de farinha e pães (PACHECO; SCUSSEL, 2006).

É encontrada em estado nativo na Amazônia, sendo que as maiores concentrações localizam-se na porção brasileira, principalmente no planalto que separa a bacia formada pelos afluentes do baixo Amazonas, alto Tocantins e alto Moju, e em terras altas ao norte do rio Jarí, no estado do Pará e nos estados do Amazonas e Acre, até o alto Beni na Bolívia (ALMEIDA, 1963).

A castanheira-do-brasil é uma das mais importantes espécies de exploração extrativista da Amazônia e tem participação significativa na geração de divisas para a região, com as exportações de suas sementes para os mercados interno e externo (MÜLLER *et al.*, 1995).

Em 2008, na Amazônia brasileira foram produzidas mais de 30 mil toneladas de castanha-do-brasil, cujo valor de venda alcançou mais de R\$ 45,7 milhões (IBGE, 2008). Entre os principais países importadores de castanha sem casca estão os Estados Unidos, Alemanha, Inglaterra, Austrália e Espanha. No entanto, nas últimas quatro décadas houve uma queda nas exportações da castanha-do-brasil nos estados da Amazônia, sendo que uma das explicações para a crise foi o ingresso da Bolívia no mercado internacional e a alta incidência de aflatoxinas registrada nas castanhas (PACHECO; SCUSSEL, 2006). Entre as principais aflatoxinas encontradas, destacam-se B₁, B₂, G₁ e G₂, sendo a aflatoxina B₁ mais tóxica (BENNETT; KLICH, 2003). Desse modo, o setor produtivo da castanha sofre restrições por parte de autoridades sanitárias da União Européia e Estados Unidos em decorrência da contaminação das amêndoas de castanha por aflatoxinas, o que pode inclusive inviabilizar o fornecimento do produto para o mercado internacional.

Em 1998 a *European Commission* (EC), por meio do regulamento N° 53/1998/EC, estabeleceu diretrizes e exigências referentes aos métodos de colheita de amostras e os métodos de análises para o controle oficial de teores de certos contaminantes em alimentos, incluindo a castanha-do-brasil. Em 2001, por meio do regulamento N° 466/2001/EC, foi estabelecido o limite máximo de aflatoxinas para castanha-do-brasil destinada ao mercado europeu, com redação no regulamento N° 563/2002/EC, fixando os limites de aflatoxinas em 2 µg/kg (AFB₁) ou 4 µg/kg (AFB₁+AFB₂+AFG₁+AFG₂). Logo em seguida, em 2003, por meio do regulamento N° 494/2003/EC, foram estabelecidas condições especiais à importação de castanha-do-brasil com casca, provenientes do Brasil (EU, 2003). Em 2006, por meio do regulamento N° 1881/2006/EC, foram fixados os limites de aflatoxinas de 5 µg/kg

(AFB₁) ou 10 µg/kg (AFB₁+AFB₂+AFG₁+AFG₂) em castanhas-do-brasil para processamento posterior e em 2010 esse regulamento foi alterado, por meio do regulamento N° 165/2010/EC, onde foram estabelecidos os limites de aflatoxinas de 8 µg/kg (AFB₁) ou 15 µg/kg (AFB₁+AFB₂+AFG₁+AFG₂) em castanhas-do-brasil para processamento posterior (EU, 2010).

Estes fatos levaram o governo brasileiro a definir legislações com normas para a cadeia produtiva, envolvendo a amostragem (coleta, preparo e tamanho da amostra), método analítico e de preparo, bem como diretrizes para aplicação dos princípios das boas práticas de fabricação/manejo (BPF/BPM) e do sistema de análises e pontos críticos de controle (APPCC) pelos extrativistas e usinas de beneficiamento. Em 2011 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, por meio da resolução RDC N° 7, estabeleceu os limites máximos de aflatoxinas de 10 µg/kg (AFB₁+AFB₂+AFG₁+AFG₂) em castanhas-do-brasil sem casca para consumo direto e 15 µg/kg (AFB₁+AFB₂+AFG₁+AFG₂) em castanhas-do-brasil sem casca para processamento posterior (BRASIL, 2011).

Mesmo com regulamentos estabelecendo limites de aflatoxinas na castanha-do-brasil, diversos trabalhos relatam a ocorrência de fungos produtores destas toxinas no referido produto. Bayman, Baker e Mahoney (2002) identificaram *Aspergillus flavus* em castanha com casca adquirida no varejo, e Souza *et al.* (2004) em castanha de unidades de beneficiamento. Freire e Offord (2002) identificaram, além de *Aspergillus*, leveduras como *Pichia* sp. e *Rhodotorula* sp. em amostras de castanha-do-brasil procedentes de feiras de Belém-PA. Arrus *et al.* (2005) isolaram *Aspergillus flavus* de ouriços, retirados da castanha-do-brasil, e verificaram que todos os isolados obtidos eram produtores de aflatoxinas. Costa *et al.* (2009) encontraram elevada incidência de *Aspergillus flavus* em amostras de amêndoas de castanha-do-brasil provenientes de diferentes mercados de Fortaleza-CE.

2.2 MICOTOXINAS

As micotoxinas são substâncias químicas produzidas por fungos filamentosos e podem causar doenças e até morte nos animais, inclusive no homem, ao consumirem alimentos que as contenham em quantidades elevadas. São

produtos de baixa massa molecular, provenientes do metabolismo secundário, que contaminam alimentos no campo, no armazenamento ou após a manufatura. São substâncias estáveis, passíveis de serem transferidas para a cadeia alimentar, podendo aparecer nos alimentos que foram contaminados, mesmo após o seu processamento (MAGAN; OLSEN, 2004).

Alguns fatores intrínsecos, como a composição nutricional, o teor de umidade e atividade de água podem fornecer substratos para fungos produtores de micotoxinas. Outros fatores extrínsecos, como temperatura, umidade relativa do ar tempo de armazenagem, competição entre espécies de fungos, também necessitam ser controlados para a segurança do alimento (KLICH, 2007).

As micotoxinas são diversas na origem, estrutura química, propriedades toxicológicas e no modo de ação. Mas, foi a partir de 1960, durante um surto de mortes de aves na Inglaterra, onde mais de 100.000 perus e milhares de outras aves domésticas morreram em um curto espaço de tempo após a ingestão de farelo de amendoim contaminado com aflatoxina, que a atenção às micotoxinas ganhou importância definitiva. Este surto ficou conhecido como *Turkey 'X' Disease* (BLOUNT, 1961).

Os fungos micotoxigênicos associados com a cadeia alimentar abrangem basicamente três gêneros: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (PITT, 2000). Atualmente, mais de 500 micotoxinas são conhecidas. Contudo, as micotoxinas mais estudadas, que comprovadamente têm propriedades tóxicas acentuadas e estão largamente distribuídas nos alimentos, incluem as toxinas do Ergot, aflatoxinas, esterigmatocistina, ocratoxinas, zearalenona, tricotecenos, fumonisinas, patulina, rubratoxinas, esporodesminas, ácido ciclopiazônico e micotoxinas tremorgênicas (SCUSSEL, 1998). Essas micotoxinas afetam significativamente a saúde pública e a agroeconomia, sendo responsáveis por perdas de milhões de dólares/ano no mundo em saúde humana, saúde animal e em produtos agrícolas (VASANTHI; BHAT, 1998).

Cada uma das espécies toxigênicas é capaz de produzir um número considerável de micotoxinas, como *Aspergillus flavus*, que produz aflatoxinas, ácido aspergílico e ácido ciclopiazônico. Uma mesma toxina também pode ser produzida por uma variedade de fungos diferentes, como, por exemplo, ocratoxina A produzidas por *Petromyces alliaceus*, *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium verrucosum* (FRISVAD; THRANE, 1995).

O entendimento dos fatores que permitem o crescimento do fungo e a produção de micotoxinas é de grande importância para a definição de métodos de controle. Os fungos dependem de condições específicas, como atividade de água e temperatura máxima e mínima, para seu crescimento, sendo que estes valores podem diferir para a produção de toxina. Sendo assim, o simples isolamento e confirmação de fungos micotoxigênicos em alimentos não indicam a presença de micotoxinas (HUNSSEIN; BRASEL, 2001; GUITAKOU *et al.*, 2006).

Os fungos capazes de produzir toxinas em alimentos são divididos em dois grupos principais: fungos de campo, que infectam e produzem toxinas ainda no campo, como *Fusarium* e fungos de armazenagem, que, sob condições ideais, são capazes de crescer rapidamente durante o cultivo, colheita, secagem, transporte e estocagem, como *Aspergillus* e *Penicillium* (CHRISTENSEN, 1957).

A doença ou síndrome que resulta da ingestão de micotoxinas é denominada micotoxicose. A ingestão de micotoxinas pode levar a quadros de intoxicação aguda ou crônica. A toxicidade aguda geralmente tem um início rápido e é produzida quando altos índices de micotoxinas são ingeridos, enquanto a toxicidade crônica é caracterizada por baixa dose de exposição durante um longo período de tempo, resultando em câncer e outros efeitos irreversíveis.

Devido às diferenças nas estruturas moleculares das micotoxinas, seus efeitos sobre a saúde humana e dos animais variam de teratogênico, imunossupressivo, tremorgênico, nefrotóxico, hepatotóxico e carcinogênico (BENNETT; KLICH, 2003). A IARC, *International Agency for Research on Cancer*, classificou as micotoxinas de acordo com seu potencial carcinogênico onde, o grupo 1 representa compostos carcinogênicos para humanos, grupo 2A provavelmente carcinogênico para humanos, grupo 2B possivelmente carcinogênico para humanos, grupo 3 não classificável quanto à sua carcinogenicidade para humanos, grupo 4 provavelmente não carcinogênico para humanos. As aflatoxinas foram classificadas no grupo 1, as ocratoxinas e fumonisinas foram classificadas no grupo 2B, e tricotecenos e zearalenona no grupo 3 (WHO-IARC, 1993).

Em geral, a exposição à micotoxinas é mais provável de ocorrer em partes do mundo onde métodos de manipulação e armazenamento de alimentos são deficientes, onde a desnutrição é um problema e onde existem poucos regulamentos para proteger as populações expostas. No entanto, mesmo em países desenvolvidos, subgrupos específicos podem ser vulneráveis à exposição à

micotoxinas. Nos Estados Unidos, por exemplo, populações hispânicas consomem mais produtos derivados de milho do que o resto da população (BARRETT, 2000).

Os métodos para controlar micotoxinas são em grande parte preventivos, e incluem as boas práticas agrícolas e secagem da cultura após a colheita. Atualmente, praticamente todos os países com economia de mercado desenvolvida estabeleceram limites específicos e regulamentos para a presença de micotoxinas em alimentos. Inquéritos internacionais sobre legislação de micotoxinas em gêneros alimentícios têm sido realizados desde a década de 1980, rendendo mais detalhes sobre as tolerâncias, bases legais, as autoridades responsáveis e protocolos oficiais de amostragem e análise (MAGAN; OLSEN, 2004).

2.3 AFLATOXINAS

Em 1960 houve um surto de uma doença aparentemente nova em perus, na Inglaterra. Devido à etiologia da doença ter sido obscura, a doença foi chamada *Turkey 'X' Disease*. A perda de perus foi estimada em mais de 100 mil e a causa da morte foi devido à necrose hepática aguda (BLOUNT, 1961). Foi observado que a causa da doença era de origem nutricional e estava relacionada com a farinha de amendoim brasileira (BLOUNT, 1961; ARCHIBALD; SMITH; SMITH, 1962). Verificaram que as amostras mais tóxicas de farinha de amendoim estavam contaminadas com fungos. Culturas puras do fungo foram cultivadas e identificadas como *Aspergillus flavus* e a toxina isolada foi denominada aflatoxina (SARGEANT *et al.*, 1961; KULIK; HOLADAY, 1966).

Através de procedimentos cromatográficos, a aflatoxina é separada em dois componentes principais que se distinguem pelas suas propriedades fluorescentes. Estes componentes são caracterizados como aflatoxinas B (*blue*) e G (*green*) e apresentam fluorescência azulada e esverdeada, respectivamente, quando observadas sob luz ultravioleta em 365 nm (ASAO *et al.*, 1963). As aflatoxinas possuem uma estrutura policíclica que deriva de um núcleo cumarínico, ligado a um sistema reativo bifurânico de um lado, e do outro, a uma pentanona (forma B) ou uma lactona de seis membros (forma G) (ASAO *et al.*, 1965; OGA, 1996).

São conhecidos mais de 18 compostos similares designados como aflatoxina, porém os principais tipos de interesse médico-sanitário são identificados como B₁, B₂, G₁ e G₂. Destas, as que apresentam maior toxicidade são a B₁ e a G₁ (OLIVEIRA *et al.*, 2002). Por outro lado, as aflatoxinas M₁ e M₂ são substâncias biotransformadas das aflatoxinas B₁ e B₂, formadas através do processo de hidroxilação, que resulta em um derivado hidrossolúvel, o que possibilita a sua excreção por fluidos corporais. Estas podem ser encontradas em produtos lácteos obtidos a partir de animais que tenham ingerido alimentos contaminados (CREPPY, 2002).

A aflatoxina é um dos metabólitos secundários fúngicos mais bem caracterizados. Atualmente, sua biossíntese está praticamente entendida e tem sido descrita em inúmeros trabalhos (EHRlich, 2005; BHATNAGAR *et al.*, 2006; GEORGIANNA; PAYNE, 2009; SCHMIDT-HEYDT *et al.*, 2009).

Os genes para a biossíntese da aflatoxina, juntamente com a via específica dos genes reguladores *afR* e *afS*, encontram-se agrupados em um *cluster* de 82 kb com 29 genes (YU *et al.*, 2004). Pelo menos 23 reações enzimáticas estão envolvidas na formação das aflatoxinas (Figura 1). As aflatoxinas são sintetizadas a partir do malonil CoA, primeiro com a formação de hexanoil CoA, seguido pela formação de uma antraquinona (MINTO; TOWNSEND, 1997). Duas ácidos-graxos sintetases (FAS) e uma policetídeo sintase (PKS) estão envolvidas na síntese do policetídeo do acetil CoA (WATANABE; TOWNSEND, 2002). O ácido norsolorínico (NOR) é o primeiro intermediário estável da via das aflatoxinas (BENNETT, 1981). As aflatoxinas são formadas após uma série de reações de oxidação-redução. A via biossintética das aflatoxinas geralmente aceita é: precursor hexanoil CoA → NOR (ácido norsolorínico) → AVN (averantina) → HAVN (5'-hidroxiaverantina) → AVNN (averufanina) → OAVN (oxoaverantina) → AVF (averufina) → VHA (acetato versiconal hemiacetal) → VAL (versiconal) → VERB (versicolorina B) → VERA (versicolorina A) → DMST (dimetil-esterigmatocistina) → ST (esterigmatocistina) → OMST (O-metil esterigmatocistina) → aflatoxina B₁ e G₁. Após a etapa VERB, há um ponto de ramificação na via que leva a formação das aflatoxinas B₂ e G₂ (Figura 1) (TRAIL; MAHANTI; LINZ, 1995; YU; BHATNAGAR; EHRlich, 2002; YU, *et al.*, 2004; BHATNAGAR *et al.*, 2006; GUO, *et al.*, 2009).

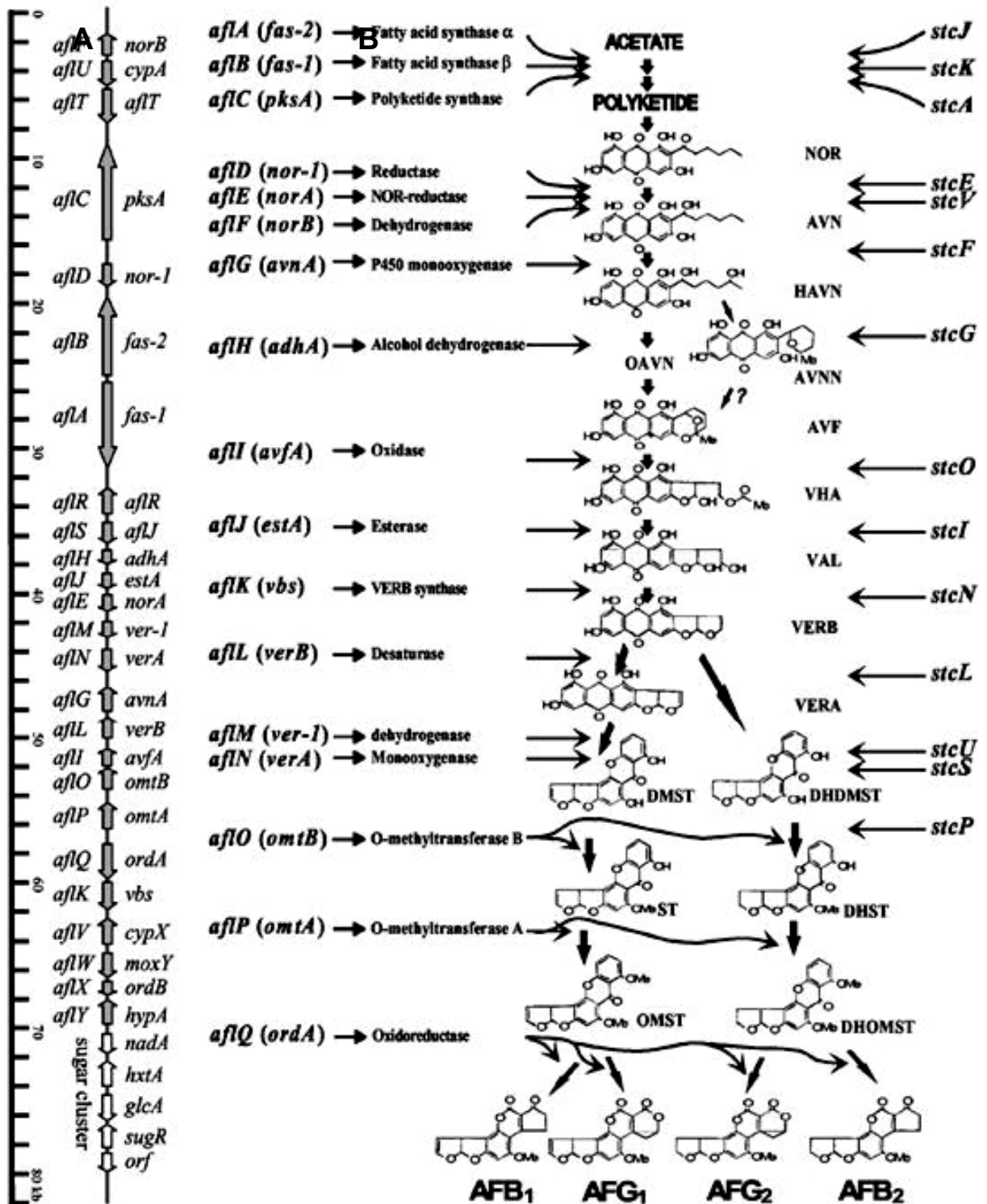


Figura 1 – Genes e enzimas da via biossintética das aflatoxinas (A) e via da biossíntese das aflatoxinas (B). A linha vertical representa o *cluster* gênico de 82 kb em *A. parasiticus* e *A. flavus*. Os novos nomes dos genes estão à esquerda da linha vertical e os nomes antigos dos genes estão à direita. As setas ao longo da linha vertical indicam a direção da transcrição dos genes. A régua na extremidade indica o tamanho relativo dos genes em kilobases. As setas na figura B indicam as conexões dos genes para as enzimas que eles codificam, das enzimas para as etapas de bioconversão envolvidas, e de produtos intermediários nas etapas de bioconversão das aflatoxinas. Abreviaturas:

NOR (ácido norsolorínico); AVN (averantina); HAVN (5'-hidroxiaverantina); AVNN (averufanina); OAVN (oxoaverantina); AVF (averufina); VHA (acetato versiconal hemiacetal); VAL (versiconal); VERB (versicolorina B); VERA (versicolorina A); DMST (dimetil-esterigmatocistina); DHDMST (dihidrodimetil-esterigmatocistina); ST (esterigmatocistina); DHST (dihidroesterigmatocistina); OMST (O-metil esterigmatocistina); DHOMST (dihidro-O-metil esterigmatocistina); AFB₁ (aflatoxina B₁); AFB₂ (aflatoxina B₂); AFG₁ (aflatoxina G₁); AFG₂ (aflatoxina G₂) (YU *et al.*, 2004).

Vários substratos são descritos como favoráveis ao crescimento e produção de aflatoxinas por fungos. Castanhas, amendoim, cereais, figos secos, nozes, tabaco e, em muitos outros produtos, é comum a ocorrência destas toxinas (SCUSSEL, 1998). A contaminação de culturas, com aflatoxinas, no campo antes da colheita são geralmente associadas a estresse hídrico. No armazenamento, geralmente as variáveis mais importantes são o índice de umidade do substrato e a umidade relativa do ambiente (WILSON; PAYNE, 1994).

Os efeitos toxicológicos ocasionados pela ingestão de aflatoxinas somente ocorrem após a ativação metabólica de suas moléculas pelas enzimas hepáticas (HUSSEIN; BRASEL, 2001). As aflatoxinas absorvidas pelo organismo são distribuídas na corrente sanguínea e seguem diretamente para o fígado, onde parte passa por biotransformações, podendo posteriormente ser encontrada no sangue, cabelo, tecidos e produtos de excreção. Na circulação sistêmica, são distribuídas no organismo, ligadas a componentes sanguíneos tais como eritrócitos e proteínas plasmáticas, de forma que produtos do metabolismo (principalmente leite e ovos) apresentarão invariavelmente teores significativos com risco para a população que os ingere (CAVALIERE *et al.*, 2006; JOLLY *et al.*, 2006).

A transformação da aflatoxina B₁ envolve ativação e detoxificação. A ativação da aflatoxina B₁ é feita pelo sistema citocromo P450 com a formação da aflatoxina B₁-8,9-epóxido ou aflatoxina B₁-8,9 dihidrodiol. A carcinogenicidade da aflatoxina B₁ surge da interação da aflatoxina B₁-8,9-epóxido com a guanina do DNA, formando a ligação aflatoxina-N7-guanina. A toxicidade aguda da aflatoxina B₁ parece ser função da interação da aflatoxina B₁-8,9-dihidrodiol com grupos amino de proteínas. A aflatoxina B₁-8,9-epóxido é também capaz de se ligar a resíduos de lisina da albumina do soro (AFB-albumina). Já a detoxificação da aflatoxina B₁ ocorre pela conversão em metabólitos menos ativos, tais como aflatoxina Q₁ e P₁, e através da conjugação da aflatoxina B₁-8,9-epóxido com glutathione, com a formação

de aflatoxina B₁-ácido mercaptúrico, altamente solúvel em água, em uma reação catalisada pela glutathione S-transferase (MINTO; TOWNSEND, 1997).

Os efeitos que as aflatoxinas podem causar no homem e animais dependem da dose, frequência de consumo, espécie/sexo, idade e do estado nutricional e podem ser agudo (letal ou não) ou subagudo. O efeito agudo é de percepção rápida e pode levar à morte por danos irreversíveis, devido à ingestão de doses geralmente elevadas. O efeito subagudo é resultado da ingestão de doses menores, e causa distúrbios nos órgãos, principalmente no fígado. As aflatoxinas podem provocar cirrose, necrose do fígado, Síndrome de Reye (encefalopatia com degeneração gordurosa do cérebro), hemorragias nos rins, lesões na pele, e podem interferir no sistema imunológico, diminuindo a resistência às doenças (MOSS, 2002; RASTOGI; DOGRA; KHANNA, 2006). Há, ainda, relação comprovada entre aflatoxinas e a incidência de hepatite B e “Kwashiorkor” (doença decorrente da falta de nutrientes associada à presença da toxina), bem como risco de desenvolvimento de câncer (ROSS *et al.*, 1992; SIBANDA; MAROVATSANGA; PESTKA, 1997; EGAL *et al.*, 2005).

Algumas aflatoxinas possuem efeito carcinogênico, sendo a aflatoxina B₁ considerada a mais tóxica. Estima-se que aproximadamente 35% dos casos de câncer humano estejam relacionados à dieta, e a presença de aflatoxinas em alimentos é considerada um fator importante no desenvolvimento de câncer hepático (CALDAS; SILVA; OLIVEIRA, 2002). Exposições agudas a aflatoxinas foram associadas com epidemias de hepatite em áreas da China e África, com taxas de mortalidade entre 10 e 60% (ROSS *et al.*, 1992; HUSSEIN; BRASEL, 2001).

A contaminação de alimentos por aflatoxina B₁ causa sérias perdas econômicas. Diversas tentativas de harmonização da legislação para micotoxinas em alimentos têm sido feitas em vários países. Diretrizes foram estabelecidas referentes aos métodos de amostragem, análises e limites de aceitabilidade para o controle oficial de contaminantes em alimentos, incluindo as nozes de árvores e a castanha-do-brasil (EU, 1998).

2.4 FUNGOS PRODUTORES DE AFLATOXINAS

O gênero *Aspergillus* é um dos mais envolvidos na contaminação de alimentos por micotoxinas. Existem mais de vinte espécies de *Aspergillus* que produzem micotoxinas, porém, as mais comuns são as da seção *Flavi* (VAAMONDE *et al.*, 2003; SALEEMULLAH; IQTIDAR; HAMIDULLAH, 2006). Esta seção contém os principais fungos produtores de aflatoxinas economicamente importantes, *A. flavus* e *A. parasiticus* (CODNER; SARGEANT; YEO, 1963; SCHROEDER, 1966). As outras espécies produtoras de aflatoxinas presentes na seção são: *A. nomius* (KURTZMAN; HORN; HESSELTINE, 1987), *A. pseudotamarii* (ITO *et al.*, 2001), *A. bombycis* (PETERSON *et al.*, 2001), *A. parvisclerotigenus* (SAITO; TSUROTA, 1993), *A. minisclerotigenes* e *A. arachidicola* (PILDAIN *et al.*, 2008).

A seção *Flavi* inclui outras espécies economicamente importantes, como as espécies *A. oryzae* e *A. sojae*, utilizadas na fermentação de alimentos. Ao nível molecular, essas duas espécies estão intimamente relacionadas com *A. flavus* e *A. parasiticus*, respectivamente, mas não produzem aflatoxina (KLICH, 2007).

A identificação dos fungos *Aspergillus* seção *Flavi* tem sido feita, tradicionalmente, com base na caracterização morfológica e bioquímica. *A. flavus* é caracterizado por apresentar um crescimento rápido e, em meio Czapek extrato de levedura (CYA), coloração da colônia verde-amarelo. Os conídios podem variar sua forma de esférica a elíptica, diâmetro de 3-6 μm , com paredes relativamente lisas. Produzem esclerócios com geralmente 400-700 μm de diâmetro (KLICH, 2002).

Diversas espécies são morfológicamente semelhantes a *A. flavus*. *A. oryzae* difere de *A. flavus* na produção de colônias que são mais cotonosas e se tornam marrom com a idade em meio CYA, e os conídios são maiores (4-8,5 μm). As colônias de *A. parasiticus* geralmente são verdes escuras, os esporos são esféricos e as paredes mais rugosas. *A. bombycis* cresce mais lentamente em meio CYA e seus esporos têm paredes lisas. *A. nomius* é mais facilmente distinguido de *A. flavus* pelo seu perfil de micotoxinas, sendo que, *A. flavus* produz apenas aflatoxinas B, enquanto *A. nomius* produz aflatoxinas B e G (KLICH, 2002). *A. parvisclerotigenus* tem esclerócios pequenos (<400 μm) e frequentemente produz aflatoxinas B e G (FRISVAD; SKOUBOE; SAMSON, 2005).

Entretanto, a utilização de métodos tradicionais para identificação dessas espécies, levando-se em consideração apenas os caracteres morfológicos, não tem se mostrado eficiente, devido à existência de divergências morfológicas entre isolados da mesma espécie. Além disso, a variabilidade intra-específica dificulta o discernimento da variabilidade interespecífica, de maneira que as espécies são às vezes confundidas. Neste sentido, a taxonomia molecular tem importância fundamental como auxiliar na identificação das espécies (YUAN; LIU; CHEN, 1995; HENRY; IWEN; HINRICHS, 2000; MIDORIKAWA *et al.*, 2008).

As análises filogenéticas de sequências multilocos de espécies de *Aspergillus* seção *Flavi* permitem identificar três clados principais. A identificação dos clados também pode ser distinguida pela coloração da colônia e pelo seu sistema ubiquinona (RIGÓ *et al.*, 2002).

O clado *A. flavus* inclui espécies caracterizadas com Q-10 (H₂) como seu principal sistema ubiquinona, coloração de conídios em tons de verde e esclerócios escuros. Podem produzir aflatoxinas B e G, e esclerócios grandes ou pequenos (GEISER *et al.*, 2000). Isolados com esclerócios pequenos são capazes de produzir tanto aflatoxina B quanto G (grupo II), e têm sido descritos como *A. minisclerotigenes*, assim como outros isolados obtidos de plantas de amendoim da Argentina e de solo da Austrália (PILDAIN *et al.*, 2008).

Frisvad, Skouboe, Samson (2005) descreveram outro isolado, que produz esclerócios pequenos e aflatoxinas B e G, como *A. parvisclerotigenus*. Outro grupo identificado por Geiser *et al.* (grupo I) inclui isolados produtores apenas de aflatoxina B e com esclerócios grandes ou pequenos. Este grupo também inclui isolados de *A. oryzae*, e tem sido descrito como tendo uma estrutura de população recombinante (GEISER; PITT; TAYLOR, 1998). Embora inúmeras evidências mostrem que *A. oryzae* e *A. sojae* sejam variantes morfológicas de *A. flavus* e *A. parasiticus*, respectivamente, estas duas espécies são mantidas com *status* de espécies para evitar problemas de natureza regulatória que seria gerado na indústria de alimentos (GEISER; PITT; TAYLOR, 1998). Sequências multilocos indicam que inúmeras espécies atribuídas à seção *Flavi* são sinônimas de *A. flavus*, incluindo *A. kambarensis*, *A. fasciculatus*, *A. thomii* e *A. subolivaceus*. Da mesma forma, *A. toxicarius* e *A. globosus* são sinônimas de *A. parasiticus*.

Outro grupo de isolados obtidos de plantas de amendoim da Argentina foi encontrado e caracterizado como produtor de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e

G₂, ácido kojic, crisogina e parasiticolida e tem sido recentemente descrito como *A. arachidicola* (PILDAIN *et al.*, 2008). Esta espécie é proximamente relacionada com *A. parasiticus*.

O clado *A. tamaritii* contém espécies com sistema ubiquinona Q-10 (H₂) e conídios em tons de oliva a marrom, enquanto o clado *A. alliaceus* consiste de espécies com sistema ubiquinona Q-10 e conídios em tons de ocre (KURAISHI *et al.*, 1990; RIGÓ *et al.*, 2002).

As espécies produtoras de aflatoxina, *A. pseudotamaritii* e *A. bombycis* são proximamente relacionadas à *A. caelatus* e *A. nomius* respectivamente (ITO *et al.*, 2001; PETERSON *et al.*, 2001). As propriedades fisiológicas e habilidade de produção de micotoxinas desses taxa justificam seus tratamentos como espécies separadas (ITO *et al.*, 2001; PETERSON *et al.*, 2001).

As espécies da seção *Flavi* apresentam distribuição cosmopolita, e são encontrados em uma variedade de substratos. Este resultado provavelmente é em decorrência da produção de numerosos conídios aéreos, que se dispersam pelo ar e, possivelmente, por insetos. (GIBSON *et al.*, 1994).

A contaminação de alimentos por *A. flavus* e *A. parasiticus* é considerado um problema mundial, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. *A. flavus* e *A. parasiticus* têm afinidade por castanha-do-brasil, amendoim, milho e semente de algodão, além do trigo, girassol, sorgo e pimenta preta. Geralmente as contaminações são primariamente em função de coletas e secagens inadequadas e/ou armazenagens impróprias, embora os fungos possam também infectar as culturas ainda no campo (COLE *et al.*, 1985).

Vargas *et al.* (2001), investigaram a ocorrência de micotoxinas em 214 amostras de milho colhidos em 1997-98, provenientes de diferentes regiões brasileiras. A ocorrência da aflatoxina B₁, zearalenona e fumonisina B₁ foi encontrada em 38,3, 30,4 e 99,1% das amostras, respectivamente. Os níveis de contaminação de aflatoxina B₁, zearalenona e fumonisina B₁ variaram de 0,2-129, 36,8-719, e 200-6.100 µg/kg, respectivamente.

Oliveira *et al.* (2002) avaliaram a ocorrência de micotoxinas em amendoim e seus derivados em cidades do estado de Minas Gerais. Entre as 120 amostras avaliadas, 56 apresentaram níveis de aflatoxinas totais acima do nível estabelecido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). A faixa de contaminação para aflatoxina total encontrada variou de 3 a 2.714 µg/kg.

Pacheco *et al.* (2010), analisaram 120 amostras de castanha-do-brasil, provenientes de diferentes etapas da cadeia produtiva do estado do Amazonas, quanto à presença de fungos produtores de aflatoxinas. Entre as amostras, 6,7% da área de recepção (n= 60) e 16,7% do varejo (n= 30), apresentaram aflatoxinas acima dos limites aceitos pela União Européia (4 µg/kg) e pelo Brasil (30 µg/kg). Além disso, todos os isolados de *A. flavus* detectados eram produtores de aflatoxinas.

Esses trabalhos demonstram que é necessária uma ação eficiente da vigilância sanitária com o intuito de monitorar os níveis de aflatoxinas presentes nestes alimentos a fim de reduzir os riscos à saúde da população.

2.5 MÉTODOS MOLECULARES PARA ESTUDO DE FUNGOS PRODUTORES DE AFLATOXINAS

As características morfológicas dos fungos frequentemente não são suficientes para a sua identificação, devido à grande diversidade genética existente, sendo necessárias provas fisiológicas e bioquímicas adicionais. Esses métodos consomem bastante tempo e estão sujeitos a variações, fornecendo uma resolução taxonômica insuficiente. E, devido à toxicidade e carcinogenicidade das aflatoxinas, existe uma demanda por métodos de detecção que sejam relativamente rápidos, fáceis e altamente específicos. Atualmente, a taxonomia polifásica tem sido utilizada para identificação e classificação das espécies de *Aspergillus*, unindo dados da morfologia com dados biomoleculares (HONG *et al.*, 2005).

Várias técnicas moleculares vêm sendo utilizadas no estudo do gênero *Aspergillus*. Dentre as estratégias moleculares, destaca-se a reação da polimerase em cadeia (PCR) (MULLIS; FALOONA, 1987). A PCR é uma técnica simples, rápida, altamente sensível, e produz um grande número de cópias de moléculas de DNA a partir de pequenas quantidades de DNA.

Para utilizar a PCR na detecção de fungos produtores de aflatoxinas é necessário que sejam conhecidas sequências de nucleotídeos que são específicas para estes fungos. Os alvos específicos são sequências pertencentes a genes que codificam as enzimas que participam da via biossintética das micotoxinas. E apesar

de a via biossintética da aflatoxina ser bem caracterizada, estudos relacionados ao diagnóstico de fungos produtores de aflatoxinas ainda são bastante escassos.

Shapira *et al.* (1996), utilizando a técnica de PCR, avaliaram a especificidade e sensibilidade da técnica para a detecção de fungos produtores de aflatoxinas em farinha de milho, utilizando genes envolvidos na via biossintética da aflatoxina. Verificaram que a técnica foi eficaz na detecção de *A. flavus* e *A. parasiticus*, sendo um excelente sistema para detecção destes fungos em grãos e alimentos.

Zachová *et al.* (2003) verificaram a possibilidade de acelerar a detecção de fungos produtores de aflatoxinas em alimentos utilizando a PCR. Aplicaram a técnica a dois genes codificadores que participam da biossintese da aflatoxina e comprovaram a especificidade da técnica. Assim como Manonmani *et al.* (2005), que analisaram a eficiência da técnica de PCR utilizando o gene regulador *afR* da biossintese da aflatoxina, para a detecção de fungos produtores de aflatoxinas em alimentos. Concluíram que a técnica é rápida e eficiente na detecção de fungos produtores de aflatoxinas.

Outra técnica utilizada para caracterizar espécies de *Aspergillus* é a de RAPD (polimorfismos de DNA amplificados ao acaso) (WILLIAMS *et al.*, 1990). Essa técnica utiliza oligonucleotídeos de sequências arbitrárias para a amplificação de regiões do genoma buscando a detecção de polimorfismo entre os indivíduos estudados. Os polimorfismos gerados são reconhecidos pela presença de um fragmento amplificado, em um dos genótipos, quando comparado à ausência deste mesmo fragmento em outro. Desta forma, polimorfismos podem ser detectados tanto em regiões repetitivas quanto em não-repetitivas do genoma (WILLIAMS; RAFALSKI; TINGSEY, 1993).

Yuan, Liu e Chen (1995), empregando o marcador RAPD para diferenciar linhagens de *A. parasiticus* e *A. sojae*, discriminaram as linhagens, duas espécies morfológicamente similares, através da utilização dos *primers* OPA-04, OPB-10 e OPR-01.

Rath (2001) testou métodos fenotípicos e genotípicos (biotipagem, SDS-PAGE, Immunoblot e RAPD) para identificar amostras oriundas de 25 coleções de 4 espécies de *Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* e *A. nidulans*). O autor concluiu que a técnica de RAPD, utilizando oito *primers* arbitrários, apresentou maior

poder de discriminação entre as espécies de *Aspergillus* estudadas, quando comparada as outras técnicas testadas.

Em estudo realizado por Lourenço *et al.* (2007), foram analisadas linhagens de *A. flavus* produtoras e não-produtoras de aflatoxinas, isoladas de milho e solo, provenientes de duas regiões do sudeste do Brasil. Utilizaram a técnica de RAPD com cinco *primers* arbitrários e concluíram que esta não discrimina linhagens produtoras de não-produtoras.

Batista *et al.* (2008) utilizaram as técnicas de RAPD e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) para identificar linhagens de *A. flavus* e outras espécies desse grupo. Com o perfil obtido pelas técnicas ISSR e RAPD, observaram que entre as linhagens previamente identificadas como *A. flavus*, uma era *A. oryzae*, uma *A. parasiticus* e duas *A. tamaritii* e, a linhagem previamente identificada como *A. parasiticus*, era *A. flavus*. Através destes resultados, demonstraram a necessidade de usar marcadores moleculares como ferramenta auxiliar na diferenciação de espécies e linhagens de fungos.

Nos últimos anos várias pesquisas têm sido conduzidas utilizando informações de sequências de DNA para testar hipóteses taxonômicas baseadas nas análises fenotípicas de *Aspergillus*. As regiões do DNA mais amplamente utilizadas para discriminar espécies de *Aspergillus* são do DNAr, principalmente as regiões interno transcrito 1 e 2 (ITS1 e ITS2) e as regiões variáveis no final 5' do gene 28S do RNAr (região D2-D1) (KUMEDA; ASAO, 1996; FERRER *et al.*, 2001).

Henry, Iwen e Hinrichs (2000) utilizaram *primers* com sítios de ligação nos genes 18S e 28S do DNAr para identificar *Aspergillus* ao nível de espécie e diferenciá-lo de outros fungos patogênicos verdadeiros e oportunistas. Amplificaram a região ITS1-5.8S-ITS2, sequenciaram e compararam com sequências depositadas no *GenBank*. A comparação das linhagens de referência e sequências do *GenBank* demonstraram que ambas as regiões ITS1 e ITS2 foram necessárias para a identificação precisa de *Aspergillus* ao nível de espécie.

Utilizando os domínios D1-D2 da subunidade ribossomal maior e as regiões ITS1 e ITS2 como alvo para a identificação molecular de espécies de *Aspergillus* clinicamente importantes, Hinrikson *et al.* (2005) verificaram que a identificação dessas espécies através da análise da região ITS é mais segura que as sequências D1-D2, principalmente para a identificação de espécies intimamente relacionadas.

Genes conservados de cópias únicas também podem ser usados como alvos para estudos taxonômicos em *Aspergillus*, quando falta variabilidade dentro dos segmentos do DNAr de múltiplas cópias. Sequências de β -tubulina, calmodulina e topoisomerase II têm sido utilizadas na identificação das espécies de fungos (KANBE, YAMAKI, KIKUCHI, 2002).

Devido a um relatório reportando isolados de *Aspergillus tamaraii* produtores de aflatoxinas, foi realizada uma reavaliação taxonômica de isolados produtores e não-produtores de aflatoxinas identificados como *A. tamaraii* bem como a espécies proximamente relacionadas à *A. tamaraii*. Ito *et al.* (2001), compararam representantes de cada espécie quanto às características morfológicas, produção de micotoxinas e divergência nas sequências de ITS, 28S, β -tubulina e calmodulina. Devido às diferenças genéticas, morfológicas e a habilidade de produzir micotoxinas, os isolados de *A. tamaraii* produtores de aflatoxina foram classificados como *Aspergillus pseudotamaraii* sp. nov.

Pildain *et al.* (2008) descreveram duas novas espécies de *Aspergillus* seção *Flavi* (*A. arachidicola* e *A. minisclerotigenes*) utilizando uma abordagem taxonômica através de análise fenotípica (morfologia e perfil de extrólitos) e molecular (sequências dos genes de β -tubulina e calmodulina).

Genes envolvidos no metabolismo secundário são considerados variáveis dentro de espécies proximamente relacionadas (GEISER, HARBINSKI, TAYLOR, 2000) e também vem sendo utilizados no estudo taxonômico em *Aspergillus*. Vários genes envolvidos na biossíntese das aflatoxinas foram identificados, clonados e estudados. Eles incluem um gene regulador *afIR* de *A. flavus* e *A. parasiticus*, e vários genes estruturais, como *pksA*, *nor-1*, *ver-1*, *uvm1* e *omtA* (YU *et al.*, 1995; BHATNAGAR *et al.*, 2006).

Dessa forma, a identificação e caracterização dos isolados através de RAPD, e sequenciamento da porção Bt2 do gene que codifica para β -tubulina e de uma porção do gene da calmodulina podem contribuir para o estabelecimento de relações filogenéticas de isolados de *Aspergillus* obtidos de castanha-do-brasil.

3 OBJETIVOS

Contribuir para a identificação de 81 isolados de *Aspergillus* da seção *Flavi* obtidos de castanha-do-brasil (casca e amêndoa) provenientes dos Estados do Amazonas e Pará e depositados na coleção de culturas do Instituto de Tecnologia de Alimentos, ITAL – Campinas, através do uso de sequências de nucleotídeos dos genes que codificam para β -tubulina e calmodulina.

Investigar e caracterizar deleções no *cluster* gênico da aflatoxina de isolados identificados como *Aspergillus flavus* não produtores de aflatoxinas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LINHAGENS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Foram analisados 81 isolados de *Aspergillus* spp. obtidos de castanha-do-brasil e provenientes dos estados do Amazonas e Pará. Estes isolados pertencem à coleção de fungos do Instituto de Tecnologia de Alimentos em Campinas (ITAL) e foram fornecidos pela Dra. Marta Taniwaki. Os isolados foram previamente analisados com relação às características morfológicas e capacidade de produção de aflatoxinas. Apesar do esforço destinado à identificação de todos os isolados, vários deles não foram passíveis de identificação ao nível de espécie utilizando-se dos fenótipos mencionados acima. Os isolados não passíveis de identificação, pelos referidos autores, foram denominados como pertencentes ao Grupo *Flavi*.

Os isolados foram cultivados em meio de cultura YEL (5% lactose, 2% extrato de levedura, pH 7,0) (PRICE *et al.*, 2005), a 28 °C durante 8 dias, para obtenção da cultura monoespórica e armazenamento.

4.2 PREPARO DO INÓCULO PARA EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

Os isolados foram cultivados em meio de cultura YEL sólido durante oito dias e, a partir desta cultura, foi realizada uma suspensão de aproximadamente 10^7 conídios em 2,5 mL de Tween 80. A suspensão foi inoculada em frascos contendo 50 mL de YEL líquido e incubada em agitador (180 rpm), a 28 °C durante 16 a 24 horas. Após incubação, o micélio foi coletado por filtração a vácuo e lavado em água destilada esterilizada.

4.3 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

Os ácidos nucleicos foram extraídos conforme protocolo descrito por Azevedo *et al.* (2000). O micélio obtido foi macerado em nitrogênio líquido e transferido para microtubos, adicionando 800 μL de tampão de extração (Tris-HCl 200 mM, pH 8,0; EDTA 25 mM, pH 8,0; SDS 1% p/v; NaCl 250 mM). Os microtubos foram homogeneizados e incubados em banho-Maria a 65 °C por 15 minutos. Foram adicionados 800 μL de fenol (Invitrogen®), homogeneizando levemente. Os microtubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 15 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo sendo adicionado um volume de clorofane (fenol, clorofórmio e álcool isoamílico, na proporção 25:24:1, respectivamente). A solução obtida foi homogeneizada e centrifugada a 12.000 rpm por 15 minutos. Em seguida, a fase aquosa foi transferida para novo microtubo e foi adicionado um volume de clorofil (clorofórmio e álcool isoamílico, na proporção de 24:1, respectivamente). A solução foi novamente homogeneizada e centrifugada a 12.000 rpm por 15 minutos. A fase aquosa foi transferida para novos microtubos (400 μL) e foram acrescentados 1/10 do volume de NaCl 3 M e 2 volumes de etanol absoluto gelado para a precipitação do DNA. Os microtubos foram homogeneizados e mantidos a -20 °C durante 1 hora. O DNA foi recuperado por centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos, lavado com etanol 70% e novamente centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos. Após seco, o *pellet* foi ressuscitado em 100 μL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM, pH 8,0).

4.4 TRATAMENTO DOS ÁCIDOS NUCLÉICOS COM RNASE A

Para eliminação dos RNAs presentes nas amostras, os ácidos nucleicos foram submetidos a um tratamento com RNase A. Foram adicionados 70 μL de água ultrapura e 1 μL de RNase A (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) aos microtubos contendo os ácidos nucleicos extraídos conforme descrito no item anterior. Os microtubos foram incubados a 37 °C durante 30 minutos. Para a inativação da enzima, os microtubos foram incubados em banho-Maria a 65 °C por 5 minutos. Em seguida, o DNA foi

precipitado adicionando 0,1 volume de NaCl 3 M e 2,5 volumes de álcool absoluto. Os microtubos foram mantidos a -20 °C durante 30 minutos e foram centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 100 µL de álcool 70%. Os microtubos foram centrifugados novamente a 12.000 rpm durante 5 minutos e o sobrenadante descartado. Após seco, o *pellet* foi ressuspensionado em 50 µL de tampão TE.

4.5 QUANTIFICAÇÃO DO DNA

A quantificação do DNA foi determinada por leitura da intensidade de fluorescência de brometo de etídio (0,5 µg/mL) após migração eletroforética em gel de agarose 0,8% (p/v). Para a quantificação foi comparada a fluorescência das amostras com a fluorescência de amostras padrão conhecidas de DNA de fago *lambda* (Invitrogen®), nas concentrações de 10, 50, 100 e 200 ng. Baseando-se no resultado da quantificação, as soluções contendo o DNA extraído foram padronizadas, por diluição, para concentrações em torno de 5 ng/µL, divididas em alíquotas e armazenadas a -20 °C.

4.6 ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA ATRAVÉS DE RAPD

Para a análise de RAPD foram utilizados os *primers* OPX 3, OPX 7 e OPX 11 (Invitrogen®). As condições de amplificação foram realizadas de acordo com FUNGARO *et al.* (1996). As reações de amplificação foram feitas em um volume final de 25 µL contendo 2,5 µL de tampão (Invitrogen®, 200 mM Tris-HCl, pH 8,4; 500 mM KCl, 10x concentrado), 0,25 mM de dNTP, 0,25 µM de *primer*, 3,0 mM de MgCl₂, 0,2 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®) e 10 ng da amostra de DNA. Para as reações controle foi omitido o DNA genômico. A amplificação foi realizada em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.) previamente programado com um ciclo inicial de desnaturação a 94 °C por 5 minutos; 39 ciclos constituídos de desnaturação a 92 °C por 40 segundos, pareamento a 40 °C por 1 minuto e 30

segundos e extensão a 72 °C por 2 minutos, com um ciclo final de extensão a 72 °C por 5 minutos. Após a amplificação, as amostras foram separadas por eletroforese em gel de agarose 1,4% em tampão TBE 1x (Tris 0,45 mM; ácido bórico 45 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0). Os géis foram corados com brometo de etídio e fotodocumentados em sistema de imagem digital LPIX (Loccus®).

4.7 ANÁLISE DOS DADOS DE RAPD

A genotipagem dos isolados foi realizada com base nos locos polimórficos dos perfis gerados pelo RAPD. Foi construída uma matriz binária, considerando presença (1) e ausência (0) de bandas. A análise de agrupamento foi realizada através do programa computacional NTSYS-PC (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*) (ROHLF, 2000), usando o critério SAHN (*Sequential, Agglomerative, Hierarchic, Nonoverlapping clustering methods*), com médias aritméticas, conforme o método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetical Mean*), utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard.

Uma análise de variância molecular (AMOVA) foi conduzida usando o software *Arlequin* 3.0 (EXCOFFIER *et al.*, 2005) para examinar os níveis de divergência entre os grupos evidenciados pelo RAPD.

4.8 AMPLIFICAÇÃO DA PORÇÃO BT2 DO GENE DA B-TUBULINA E DE UMA PORÇÃO DO GENE DA CALMODULINA

Os fragmentos de DNA da porção Bt2 do gene da beta-tubulina e de uma porção do gene calmodulina de 22 representantes de grupos formados a partir das análises de RAPD foram amplificados e sequenciados buscando confirmar a posição taxonômica de isolados representantes de cada grupo.

Foram utilizados os *primers* Bt2a (5' GGT AAC CAA ATC GGT GCT TTC 3') e Bt2b (5' ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC 3') para amplificação da porção Bt2 do gene da beta-tubulina (GLASS; DONALDSON, 1995), e cmd5 (5'

CCG AGT ACA AGG AGG CCT TC 3') e cmd6 (5' CCG ATA GAG GTC ATA ACG TGG 3') para amplificação do gene calmodulina (HONG *et al.*, 2006). As reações de amplificação foram preparadas em um volume final de 50 µL contendo 5,0 µL de tampão (Invitrogen[®]), 0,25 mM de dNTP, 0,4 µM de cada *primer* (Bt2a e Bt2b; cmd5 e cmd6), 2 mM de MgCl₂, 0,2 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen[®]) e 20 ng de DNA. As reações foram submetidas ao termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.) previamente programado com um ciclo inicial de desnaturação a 94 °C por 5 minutos; 35 ciclos constituídos de desnaturação a 94 °C por 45 segundos, pareamento a 62 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto. Ao final dos 35 ciclos, uma extensão de 5 minutos a 72 °C foi realizada. Após a amplificação, uma alíquota foi utilizada para a separação dos fragmentos através de eletroforese (3 V/cm) em gel de agarose 1,0%, corados com brometo de etídio, visualizados sob luz ultravioleta e fotodocumentados em sistema de imagem digital LPIX Loccus[®].

4.9 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO

Os produtos obtidos pela amplificação da porção Bt2 do gene da beta-tubulina e de uma porção do gene da calmodulina foram purificados para a realização da etapa de sequenciamento direto. Foram adicionados 0,1 volume de acetato de amônio 7,5 M e 3 volumes de etanol 96%, mantidos a temperatura ambiente por 15 minutos. Os microtubos foram centrifugados durante 10 minutos a 12.000 rpm e 25 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado duas vezes pela adição de 140 µL de etanol 70%, seguido por centrifugação por 5 minutos a 12.000 rpm e 25 °C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e os microtubos mantidos a 37 °C por 15 minutos até a completa secagem. O DNA foi ressuspendido em 10 µL de água ultrapura.

4.10 SEQUENCIAMENTO DA PORÇÃO BT2 DO GENE DA BETA-TUBULINA E DO GENE DA CALMODULINA

A etapa de sequenciamento foi realizada utilizando o método de Sanger *et al.* (1977). As reações de sequenciamento da porção Bt2 do gene da beta-tubulina e do gene calmodulina foram feitas utilizando os mesmos *primers* já descritos para a obtenção dos fragmentos. As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 10 μ L, contendo 200 ng de DNA da amostra, 0,6 μ M de *primer* (*forward* ou *reverse*) e 4,0 μ L do Kit DYEnamic ET dye terminator Cycle Sequencing (Amersham Pharmacia Biotech) e água ultrapura para completar o volume final. Esta reação foi submetida ao termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf®) previamente programado para um ciclo inicial de 95 °C por 1 minuto, seguido de 35 ciclos constituídos de desnaturação a 95 °C por 20 segundos, pareamento a 55 °C por 15 segundos e extensão a 60 °C por 1 minuto.

Após a amplificação, foi realizada a purificação da reação de sequenciamento. Foram adicionados 65 μ L de etanol 96% e 2 μ L de acetato de amônio 7,5 M, mantendo a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, foi centrifugado durante 45 minutos a 4.000 rpm e 25 °C. O sobrenadante foi descartado e, com a placa invertida sobre papel toalha, foi dado um pulso a 300 rpm por 5 segundos. Em seguida, foram adicionados 140 μ L de etanol 70% e centrifugado por 10 minutos a 4.000 rpm e 25 °C. O sobrenadante foi descartado e a placa mantida a 37 °C por 15 minutos até a completa secagem. O DNA foi ressuspendido em 10 μ L de água ultrapura e submetido à leitura em sequenciador do tipo MegaBace™ 1000 Molecular Dynamics (Amersham, Pharmacia Biotech). A condição de injeção das amostras foi de 2 Kv por 60 segundos. A condição de eletroforese foi de 6 Kv por 230 minutos.

A qualidade das sequências foi examinada através do pacote computacional Phred/Phrap/Consed. As sequências obtidas foram alinhadas com sequências de espécies tipo de *Aspergillus* pertencentes à seção *Flavi* e depositadas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). A edição e o alinhamento das sequências foram conduzidos através do programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (HALL, 1999) e *ClustalW* (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994). As estimativas de distância genética e a construção das

árvores filogenéticas pelo método de *Neighbor-Joining* foram conduzidas pelo programa *Mega* (TAMURA *et al.*, 2007).

4.11 AMPLIFICAÇÃO DOS GENES DO CLUSTER DA AFLATOXINA

Para investigar e caracterizar deleções no *cluster* gênico da aflatoxina dos isolados de *Aspergillus flavus* não produtores de aflatoxinas, fragmentos de DNA de sete isolados não-produtores de aflatoxinas (ITAL 20, ITAL 24, ITAL 74, ITAL 336, ITAL 261, ITAL 263, ITAL 375) foram amplificados com iniciadores específicos para genes da via biossintética da aflatoxina descritos por Chang, Horn e Dorner (2005). Um isolado produtor de aflatoxina (ITAL 371) foi utilizado como controle positivo. As sequências dos pares de *primers* que amplificaram produtos de PCR de 0,5 a 1,0 kb estão apresentadas na Tabela 2.

As reações de amplificação foram preparadas em um volume final de 25 µL contendo 2,5 µL de tampão (Invitrogen[®]), 0,25 mM de dNTP, 0,4 µM de cada *primer*, 2 mM de MgCl₂, 0,2 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen[®]) e 20 ng de DNA. As reações foram submetidas ao termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.) e, para cada par de *primer*, foi otimizada a temperatura de anelamento. Após a amplificação, os fragmentos foram separados através de eletroforese (3 V/cm) em gel de agarose 1,0%, corados com brometo de etídio, visualizados sob luz ultravioleta e fotodocumentados em sistema de imagem digital LPIX Loccus[®].

Tabela 1 – Conjunto de *primers* derivados de genes da biossíntese da aflatoxina e regiões flanqueadoras (CHANG; HORN; DORNER, 2005).

Descrição	<i>Primer Forward (5'–3')</i>	<i>Primer Reverse (5'–3')</i>
C1	CGTTCCAGTAGTTCGTATCG	CATCGTAAACGTTGACACAG
C2	TCGCCTTGTTCTCGCTATAC	ACACCTGATAGCGAGAGTTC
C3	GCGATCTGTAACACTACACA	GCGATCTGTAACACTACACA
norB-cypA	GTGCCCAGCATCTTGGTCCA	AGGACTTGATGATTCCTCGTC
afIT	ATGACATGCTAATCGACGAG	AGGCGCATGCTACGGATC
pksA(pksL)	ACTTTGAGGGCGTTCTGTGC	CTTTCGGTGGTCGGTGATTC
nor1	AGCACGATCAAGAGAGGCTC	GATCTCAACTCCCCTGGTAG

Descrição	Primer Forward (5'–3')	Primer Reverse (5'–3')
fasA(hexA)	TCCTATCCAGTCCACCTCGTA	CACATCTTTGTCTTGCCCCGC
fasB(hexB)	ACAATCGAATGACAACACTGC	CCACCGAATCCACTACCTACA
aflR	ATGGTCGTCCTTATCGTTCTC	CCATGACAAAGACGGATCC
aflJ	CTTCAACAACGACCCAAGGTT	AGATGAGATACTACTGCCGCA
adhA	CCTCGTGGGAGAGCCAAATC	GGAGCAAGAAGGTTACAGCG
estA	CGATGGGACTGACGGTGATT	ACCACGCCGCTGACTTTAT
norA	GTGTTTCGTGTGTCGCCCTTA	GTCGGTGCTTCTCATCCTGA
ver1	CATCGGTGCTGCCATCGC	CCTCGTCTACCTGCTCATCG
verA	CCGCAACACCACAAGTAGCA	AAACGCTCTCCAGGCACCTT
avnA	GCGATAGAACTGACAAAGGCA	GAATGAGTCTCCAAAGGCGAG
verB	TTCAGTGACAAAGGTCTTCGC	GGCAGCGTTATTGAGCATCT
avfA	ATTCAAATCCTCGTTCGGTTCG	TAGCCCGTTGGTTGTGTTCC
omtB	ACAGACGATGTGGGCAAACG	ACGCAGTCCTTGTTAGAGGTG
omtA	CAGGATATCATTGTGGACGG	CTCCTCTACCAGTGGCTTCG
ordA	AAGGCAGCGGAATACAAGCG	ACAAGGGCGTCAATAAAGGGT
vbs	AACGAGCAGCGTAAGGGTCT	TCAGCCAGAGCATAACAGTG
cypX	GGAGCCTACCATTCGCAACA	GGCTTTGACGAACAGATTCCG
moxY	TGCTACTGGAACGAAGACCG	CGACGACAACCAAACGCAA
ordB	GCTGCTACTGGAATGAAGACC	ATGCGACGACAACCAAACG
hypA	CGCAAGACGGCAGAGATACT	GCTCCTTCAGTTCCACACCA
nadA	TGACGAGGCCTGCGAGCTGT	AAGCCTCTTCAGAACGGTCA
hexA	TGTCCTCACCTCTGGCGTAT	AGACCAACCACTCTTATGGGC
glcA	AGACACAGTCATCGCCTGTT	GGTGCGAATAGGTGCAGGTA
sugR	TCAGCTGAAGCGCTCGAGAG	GTATTGCCGCACTATGTATG
C4	ATCGTGACAGACAGGAACAC	GGTGCCCTTGGCCTATGCGCT

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para a análise molecular de fungos da seção *Flavi* isolados de castanha-do-brasil serão apresentados em artigo, nas normas de publicação do periódico *Food Control*.

5.1 ARTIGO

**Análise Molecular de Fungos da Seção *Flavi* Isolados de
Castanha-do-Brasil**

ANÁLISE MOLECULAR DE FUNGOS DA SEÇÃO *FLAVI* ISOLADOS DE CASTANHA-DO-BRASIL

RESUMO

Foram isolados e identificados, através de dados morfológicos e moleculares, fungos que infectam a castanha-do-brasil com vistas à ampliação dos conhecimentos acerca das espécies de *Aspergillus* da seção *Flavi* que contaminam com aflatoxinas este importante produto extrativista de estados do norte do Brasil. Foram avaliadas 20 amostras de castanhas, provenientes da região Amazônica, e obtidos 241 isolados pertencentes à seção *Flavi*. Dentre estes, 41% foram positivos para a produção de aflatoxinas. Do total de isolados da seção *Flavi*, 81 foram selecionados para serem investigados através de dados moleculares (RAPD e sequências de nucleotídeos). As seguintes espécies foram identificadas: *A. flavus*, *A. caelatus*, *A. nomius*, *A. tamaritii*, *A. bombycis* e *A. arachidicola*. Além disso, os dados moleculares indicaram a existência de uma espécie ainda não descrita na literatura.

Palavras-chave: Aflatoxinas. Castanha-do-brasil. Identificação molecular. *Aspergillus* seção *Flavi*.

MOLECULAR ANALYSIS OF FUNGI FROM SECTION *FLAVI* ISOLATED OF BRAZIL NUT

ABSTRACT

Were isolated and identified by morphological and molecular data, fungi that infect the Brazil nut in order to expand knowledge about the species of *Aspergillus* from section *Flavi* that contaminate with aflatoxins this important extractive product from the Northern states of Brazil. We evaluated 20 samples of nuts, from the Amazon region, and obtained 241 isolates belonging to the section *Flavi*. Among these 41% were positive for aflatoxins production. From the total isolates of section *Flavi*, 81 were selected to be investigated by molecular data (RAPD and nucleotide sequences). The following species were identified: *A. flavus*, *A. caelatus*, *A. nomius*, *A. tamaritii*, *A. bombycis* and *A. arachidicola*. Furthermore, molecular data suggested the existence of a species not yet described in literature.

Keywords: Aflatoxins. Brazil nuts. Molecular identification. *Aspergillus* section *Flavi*.

1 INTRODUÇÃO

A castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) é uma espécie típica da Floresta Amazônica, cuja exploração extrativista tem um papel sócio-econômico e ambiental importante para a região. A atividade gera emprego e renda para a população local ao mesmo tempo em que inibe o desmatamento da floresta.

A castanheira é uma árvore de grande porte que chega a atingir mais de 50 metros de altura. O fruto, conhecido como ouriço, é uma cápsula esférica de mesocarpo lenhoso, extremamente duro. Dentro do fruto são encontradas as sementes, em número de 15 a 25, com casca também lenhosa e rugosa, cuja amêndoa é reconhecida pelo elevado valor nutricional. O grande porte da planta impossibilita a colheita dos frutos (ouriços) na árvore. Os ouriços são coletados após caírem no chão e, por esta razão, ficam em contato com o solo por um período que pode variar de poucos dias a até alguns meses, constituindo, assim, uma importante fonte de contaminação das castanhas (Souza *et al.*, 2004).

Dentre os principais problemas identificados na produção da castanha-do-brasil está a contaminação por fungos produtores de aflatoxinas. As aflatoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos, preponderantemente, por espécies de *Aspergillus* seção *Flavi*, as quais se desenvolvem quando as condições de umidade do produto, umidade relativa do ar e temperatura ambiente são favoráveis. A ocorrência de aflatoxinas em castanha-do-brasil vem sendo objeto de investigação em vários países (Pohland, 1993; JECFA, 1998; FSA, 2004; Marklinder *et al.*, 2005; CAC, 2005; Mello & Scussel, 2009) e tem se constituído no maior obstáculo à sua comercialização.

Uma série de ações já foi implementada pelos países produtores da castanha (Bolívia, Peru e Brasil) na tentativa de evitar a contaminação com aflatoxinas visando atingir os padrões sanitários internacionais e consolidar os mercados de exportação. A título de exemplo, um projeto denominado “Safenut” coordenado pela União Européia (CIRAD e NFA) teve como principais objetivos validar e transferir aos agentes da cadeia produtiva um sistema eficiente e sustentável para reduzir e controlar a contaminação da castanha por aflatoxinas. Com a conclusão do projeto, em 2008, várias recomendações foram feitas e dentre elas, a necessidade de estudar amplamente a microbiota para melhor compreensão do mecanismo de contaminação e da produção das aflatoxinas (STDF, 2008).

Aspergillus seção *Flavi* contém os principais fungos produtores de aflatoxinas economicamente importantes, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* (Codner *et al.*, 1963). As espécies produtoras de aflatoxinas menos comuns presentes na seção são *Aspergillus nomius* (Kurtzman *et al.*, 1987), *Aspergillus pseudotamarii* (Ito *et al.*, 2001), *Aspergillus bombycis* (Peterson *et al.*, 2001), *Aspergillus parvisclerotigenus* (Saito & Tsurota,

1993), *Aspergillus arachidicola* e *Aspergillus minisclerotigenes* (Pildain *et al.*, 2008). A seção *Flavi* inclui também espécies economicamente importantes, *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus sojae*, utilizadas na fermentação de alimentos. Ao nível molecular, essas duas espécies estão intimamente relacionadas com *A. flavus* e *A. parasiticus*, respectivamente, mas são mantidas como espécies distintas para evitar problemas de regulamentação em indústrias de alimentos (Geiser *et al.*, 1993).

Devido à divergência intra e interespecífica de caracteres morfológicos e bioquímicos, a identificação e/ou reconhecimento de novas espécies dos fungos da seção *Flavi* é uma tarefa difícil. Para tais objetivos, nos anos recentes, a união de dados morfológicos e biomoleculares tem sido recomendada (Geiser *et al.*, 2007).

Este trabalho teve por objetivo isolar e identificar, através de dados morfológicos e moleculares, isolados fúngicos de castanha-do-brasil com vistas à ampliação dos conhecimentos acerca das espécies da seção *Flavi* que contaminam com aflatoxinas este importante produto extrativista de estados do norte do Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS POR ANÁLISE MORFOLÓGICA

Um total de 20 amostras de aproximadamente 2 kg de castanha-do-brasil foram coletadas na região Amazônica do Brasil. De cada amostra, aproximadamente 100 g de castanhas e 100 g de cascas foram desinfetadas separadamente pela imersão em solução de hipoclorito 0,4% durante 1 minuto. A seguir 50 pedaços de sementes ou cascas foram plaqueadas no meio agar Dicloran 18% glicerol (DG18) com cloranfenicol. A incubação foi feita a 25 °C por 5 dias. Os *Aspergillus* pertencentes à seção *Flavi* foram isolados em ágar Czapek extrato de levedura (CYA) e incubados nas temperaturas de 25°C, 37°C e 42°C por 7 dias e a identificação foi realizada de acordo com a chave de Klich e Pitt (1988) e Pitt e Hocking (2009).

2.2 TESTE DE PRODUÇÃO DE AFLATOXINAS

As espécies isoladas foram avaliadas com relação à produção de aflatoxinas conforme metodologia proposta por Filtenborg *et al.* (1983). Os isolados foram inoculados em meio ágar extrato de levedura sacarose (YESA) e incubados a 25 °C por 7 dias. Pequenos pedaços do micélio fúngico foram cortados da parte central e, com auxílio de um bisturi e 3 gotas da solução clorofórmio:metanol (1:1), foram utilizados para a extração da toxina. Os plugs foram aplicados nas placas de Cromatografia de Camada Delgada (TLC) sílica gel-G de 500 µm de espessura, juntamente com 2 µL do padrão de aflatoxinas. A placa foi colocada em uma cuba com a fase móvel, constituída dos seguintes solventes: Tolueno, Acetato de Etila, Ácido Fórmico 90% e Clorofórmio (7:5:2:5 v/v/v/v). Após o desenvolvimento das placas e secagem dos solventes, foram colocadas em câmara UV e observadas sob dois diferentes comprimentos de ondas, 356 nm e 254 nm. O tempo de retenção e as fluorescências foram comparadas qualitativamente com os padrões de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ e ocratoxina A para avaliação da presença das mesmas nas cepas testadas.

2.3 EXTRAÇÃO DE DNA

Os isolados foram cultivados em meio de cultura Extrato de Levedura e Lactose (YEL) sólido durante sete dias e, a partir desta cultura, foi realizada uma suspensão de aproximadamente 10^7 conídios em 2,5 mL de Tween 80. A suspensão foi inoculada em frascos contendo 50 mL de YEL líquido e incubada em agitador (180 rpm), a 28 °C durante 16 a 24 horas. Após incubação, o micélio foi coletado por filtração a vácuo e lavado em água destilada esterilizada. Os ácidos nucleicos foram extraídos conforme protocolo descrito por Azevedo *et al.* (2000) e tratados com ribonuclease A (20 ug/mL).

2.4 ANÁLISE DE RAPD

A amplificação do DNA foi feita utilizando-se dos iniciadores arbitrários OPX 3, OPX 7 e OPX 11 (Invitrogen®) em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.) de acordo com Fungaro *et al.* (1996). A genotipagem dos isolados foi realizada com base nos locos polimórficos dos perfis gerados pelo RAPD. Foi construída uma matriz de similaridade utilizando o coeficiente de Jaccard. A análise de agrupamento foi realizada através do programa computacional NTSYS-PC (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) (Rohlf, 2000), usando o critério SAHN (Sequential, Agglomerative, Hierarchic, Nonoverlapping Clustering Methods), com médias aritméticas, conforme o método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetical Mean). Uma análise de variância (AMOVA) foi conduzida usando o software Arlequin 3.0 (Excoffier *et al.*, 2005) para examinar os níveis de divergência entre os grupos evidenciados pelo RAPD.

2.5 AMPLIFICAÇÃO DE PORÇÕES DOS GENES QUE CODIFICAM PARA β -TUBULINA E CALMODULINA

A amplificação da porção Bt2 do gene da β -tubulina foi feita utilizando os iniciadores Bt2a (5' GGT AAC CAA ATC GGT GCT TTC 3') e Bt2b (5' ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC 3') conforme descrito por Glass e Donaldson (1995). A amplificação de uma porção do gene da calmodulina foi feita utilizando os iniciadores cmd5 (5' CCG AGT ACA AGG AGG CCT TC 3') e cmd6 (5' CCG ATA GAG GTC ATA ACG TGG 3') descritos por Hong *et al.* (2006). As reações de amplificação foram preparadas em um volume final de 50 μ L e submetidas ao termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.). Os produtos de PCR foram

purificados e submetidos ao sequenciamento direto em ambas as direções (“forward e reverse”) em sequenciador do tipo MegaBace™ 1000 Molecular Dynamics (Amersham, Pharmacia Biotech). A condição de injeção das amostras foi de 2 Kv por 60 segundos. A condição de eletroforese foi de 6 Kv por 230 minutos. A qualidade das sequências foi examinada através do pacote computacional Phred/Phrap/Consed. As sequências obtidas no presente trabalho foram alinhadas com sequências de espécies tipo *Aspergillus* pertencentes à seção *Flavi* depositas no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e MycoBank (<http://www.mycobank.org>).

A edição e o alinhamento das sequências foram conduzidos através do programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999) e ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). As estimativas de distância genética e a construção das árvores filogenéticas pelo método de Neighbor-Joining foram conduzidas pelo programa Mega (Tamura *et al.*, 2007).

2.6 AMPLIFICAÇÃO DO “CLUSTER” GÊNICO DA AFLATOXINA

Para investigar e caracterizar deleções no “cluster” gênico da aflatoxina dos isolados de *Aspergillus flavus* não produtores de aflatoxinas, fragmentos de DNA de 7 isolados não-produtores de aflatoxinas (ITAL 20, ITAL 24, ITAL 74, ITAL 336, ITAL 261, ITAL 263, ITAL 375) foram amplificados com iniciadores específicos para genes da via biossintética da aflatoxina descritos por Chang *et al.* (2005). Um isolado produtor de aflatoxina (ITAL 371) foi utilizado como controle positivo. Após a amplificação, os fragmentos foram separados através de eletroforese (3 V/cm) em gel de agarose 1,0%, corados com brometo de etídio, visualizados sob luz ultravioleta e fotodocumentados em sistema de imagem digital LPIX Loccus®.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em países de clima tropical o gênero *Aspergillus* é um dos mais envolvidos na contaminação de alimentos por micotoxinas. Apesar disso, pouco se conhece sobre a diversidade deste grupo de organismos responsável por contaminar produtos extrativistas destinados à alimentação humana, tais como a castanha-do-brasil.

Dos 241 isolados pertencentes à seção *Flavi*, 99 (41%) foram positivos para a produção de aflatoxinas, sendo 72 isolados (29,8%) produtores de aflatoxina do grupo B e 27 isolados (11,2%) produtores de aflatoxinas dos grupos B e G.

Cerca de 30% dos isolados não haviam sido identificados por taxonomia clássica e foram designados apenas como pertencentes à seção *Flavi*, grupo *tamarii* ou grupo *flavus*. Dentre o total de isolados de *Aspergillus* seção *Flavi*, 81 foram selecionados para serem analisados através de caracteres moleculares com vistas à identificação e/ou confirmação taxonômica ao nível de espécie (Tabela 1). A Figura 1 mostra os perfis de RAPD obtidos, com um dos iniciadores utilizados neste trabalho, para os 41 isolados de amêndoas (a) e os 40 isolados de cascas (b). Para os isolados de amêndoas, os três iniciadores arbitrários permitiram a geração de 102 locos de RAPD. Com altos valores de confiança (bootstrap \geq 99%) o dendrograma gerado a partir de dados de similaridade genética, estimados pelo coeficiente de Jaccard, permitiu a subdivisão dos isolados provenientes de amêndoas em seis grupos. Dentre estes grupos, três são constituídos exclusivamente por isolados não-produtores de aflatoxinas, outros dois grupos são constituídos apenas por isolados produtores de aflatoxinas e o outro grupo é constituído por isolados produtores e não-produtores de aflatoxinas.

Para os isolados de cascas os três iniciadores arbitrários permitiram a detecção de 143 locos de RAPD. Com altos valores de confiança (bootstrap \geq 99%) o dendrograma gerado a partir de dados de similaridade genética permitiu a subdivisão destes em sete grupos. Tal como para os materiais provenientes de amêndoas, três grupos são constituídos exclusivamente por isolados produtores de aflatoxinas, outros três por isolados não-produtores de aflatoxinas e um outro grupo é constituído por isolados produtores e não-produtores de aflatoxinas.

A Análise de Variância de Marcadores Moleculares (AMOVA), realizada com dados de RAPD obtidos dos isolados de amêndoas indicou que a maior fonte de variação está entre os grupos de isolados ($F_{ST} = 0,81$) e não dentro dos grupos ($F_{ST} = 0,19$). Os valores de F_{ST} "par a par" variaram de 0,77 a 1,0. A maior diferenciação foi detectada entre o grupo V, representado pelo isolado ITAL 116, e o grupo VI, representado pelo isolados ITAL 89 ($F_{ST} = 1$) (Tabela 2a). Também para os isolados de cascas, a maior fonte de variação está entre

os grupos de isolados ($F_{ST} = 0,83$). Similarmente aos dados de amêndoas os valores de F_{ST} “par a par” variaram de 0,79 a 1,0. A maior divergência ocorreu entre o grupo VI, representado pelo isolado ITAL 189, e o grupo VII, representado pelo isolado ITAL 246 ($F_{ST} = 1$), seguido do grupo V, representado pelos isolados ITAL 259 e ITAL 262, e o grupo VI, representado pelo isolado ITAL 246 (Tabela 2b). A alta divergência genética entre os grupos sugere que estes contemplam isolados de diferentes espécies da seção *Flavi*.

Um a três representantes de cada grupo foi submetido à análise de sequências de nucleotídeos de porções dos genes que codificam para β -tubulina e calmodulina. Usando o algoritmo BlastN (Altschul *et al.*, 1997), as sequências obtidas foram comparadas com a base de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e MycoBank (<http://www.mycobank.org>). As sequências de nucleotídeos obtidas no presente trabalho apresentaram “E-value” próximo de zero e um percentual de identidade superior a 99% com as de espécies já descritas na literatura, com exceção do isolado ITAL 116, que representa o grupo V de amêndoas, e dos isolados ITAL 262 e ITAL 259, que representam o grupo V de cascas. Para estes isolados, a sequência de nucleotídeos da porção Bt2 do gene da β -tubulina mostrou identidade máxima de apenas 89% com sequências depositadas em banco de dados (*A. tamaris* e *A. caelatus*). Para a sequência parcial do gene da calmodulina, a análise relevou identidade máxima de apenas 91% com sequências de *A. caelatus*.

A averiguação da identidade taxonômica dos isolados quando comparados às amostras já presentes no banco de dados através da ferramenta BlastN não é soberana, especialmente para grupos que apresentam conflito taxonômico. Em função disso, análises filogenéticas foram realizadas fazendo-se uso de sequências de nucleotídeos dos isolados estudados no presente trabalho e daquelas de representantes de espécie-tipo de *Aspergillus* da seção *Flavi* depositadas em banco de dados (Figuras 2 e 3).

Segundo um trabalho recente de Godet e Munaut (2010), os fungos da seção *Flavi* são frequentemente subdivididos em dois grupos baseando-se em seu impacto para produtos destinados à alimentação e à saúde humana. O primeiro grupo consiste nas espécies que produzem as aflatoxinas, e no segundo grupo se colocam as espécies não-produtoras da referida classe de toxinas. Dentre as espécies do primeiro grupo estão: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. pseudotamaris*, *A. bombycis*, *A. arachidicola* e *A. parvisclerotigenus*, sendo que as três primeiras são as que causam maiores danos em produtos alimentares, tais como arroz, trigo, castanhas, amendoim e pimenta. No segundo grupo, encontram-se as espécies *A. minisclerotigenes*, *A. tamaris*, *A. oryzae* e *A. sojae*. Sabe-se atualmente, que *A. oryzae* e *A. sojae* são variantes morfológicas de *A. flavus* e *A. parasiticus*, respectivamente. Estas duas espécies são mantidas com “status” de espécies apenas para evitar problemas de natureza regulatória que seria gerado na indústria de alimentos (Samson & Varga, 2010). Além destas, muitas outras espécies encontram-se

descritas na literatura, mas trabalhos recentes mostram que são sinônimos de outras. Frente ao exposto, neste trabalho foram consideradas para as análises filogenéticas as espécies, tal como o trabalho de Godet e Munaut (2010), exceto que será reconhecida adicionalmente *A. caelatus* como integrante do grupo não-produtor de aflatoxinas em função que, após ampla pesquisa na literatura, não foram encontrados relatos que permitam desconsiderar seu *status* de espécie. A espécie *A. leporis*, ainda que se inclua na seção *Flavi*, tem sido utilizada como grupo externo em análises filogenéticas devido ser pouco relacionada aos clados principais de *A. flavus*.

Dentre os 41 isolados de amêndoas foram identificadas as seguintes espécies: *A. flavus* (grupo I de RAPD), *A. caelatus* (grupo II de RAPD), *A. nomius* (grupo III de RAPD), *A. tamaritii* (grupo IV de RAPD) e *A. bombycis* (grupo VI de RAPD). Dentre os 40 isolados de casca foram identificadas as espécies *A. flavus* (grupo I de RAPD), *A. caelatus* (grupo II de RAPD), *A. nomius* (grupo III de RAPD), *A. tamaritii* (grupo IV de RAPD), *A. bombycis* (grupo VI de RAPD) e *A. arachidicola* (grupo VII de RAPD) (Tabela 1).

Dentre as espécies capazes de produzir aflatoxinas, encontradas neste trabalho, *A. flavus*, *A. bombycis*, *A. arachidicola* e *A. nomius*, esta última desperta grande preocupação. *A. nomius* se mostrou frequente em castanha-do-brasil (23% dos isolados analisados molecularmente) e diferentemente de *A. flavus*, 100% dos isolados foram produtores de aflatoxinas B₁ e G₁. Trata-se de uma espécie isolada originalmente de insetos (Kurtzman *et al.*, 1987) que muito recentemente teve a reprodução sexual descrita por Horn *et al.* (2010). A possibilidade de que as abelhas polinizadoras da castanha-do-brasil sejam as responsáveis pela transmissão de *A. nomius* necessita de investigação.

Os isolados denominados ITAL 116 (grupo V de RAPD), proveniente de amêndoas, e os isolados ITAL 262 e ITAL 259 (grupo V de RAPD), provenientes de casca, formaram um grupo filogeneticamente distante de qualquer outra espécie conhecida. A partir do alinhamento de sequências de nucleotídeos da porção Bt2 do gene da β -tubulina destes isolados com as espécies-tipo mais próximas (*A. tamaritii* e *A. caelatus*) foram observadas substituições e inserções de nucleotídeos. A comparação com *A. tamaritii* revelou 50 substituições e 3 inserções. A comparação destes mesmos isolados com a espécie-tipo *A. caelatus* revelou 51 substituições e 2 inserções (Figura 4a). Da mesma forma, a análise das sequências parciais do gene da calmodulina revelou 48 substituições e uma deleção com *A. tamaritii*. A comparação com *A. caelatus* revelou 38 substituições (Figura 4b). Nenhum destes isolados apresentou polimorfismo de base única (SNP) para as sequências parciais dos genes de β -tubulina (Figura 4a) e de calmodulina (Figura 4b). Esta observação está em concordância com os baixos valores de similaridade encontrados através da ferramenta BlastN.

A baixa identidade entre as sequências parciais de nucleotídeos dos genes da β -tubulina e calmodulina, dos isolados ITAL 116, ITAL 262 e ITAL 259 com as sequências de espécies-tipo depositadas em banco de dados, associada à alta divergência genética obtida através de dados de RAPD, sugere que estes isolados representam uma espécie ainda não descrita na literatura.

Dentre os 24 isolados de *A. flavus* identificados no presente trabalho, 7 foram caracterizados como não-produtores de aflatoxina. Estes dados estão de acordo com a literatura que demonstra que os isolados desta espécie variam quanto à capacidade de produzir a referida toxina. Alguns países têm feito uso de linhagens de *A. flavus* não-produtoras de aflatoxinas para competitivamente excluírem linhagens produtoras e permitirem a redução do conteúdo de aflatoxina em determinadas culturas agrícolas. O isolado de *Aspergillus flavus* NRRL 21882 é um exemplo desta situação. Foi registrado como Biopesticida (afla-Guard™) em 2004, nos Estados Unidos (US Environmental Protection Agency – Office of Pesticide Programs – Biopesticide Registration Action Document *Aspergillus flavus* (NRRL 21882) (PC Code 006500). A utilização deste produto em culturas de amendoim tem permitido a redução de até 90% dos níveis de aflatoxina no produto. Conhecimentos acumulados no decorrer das pesquisas demonstram que os genes que codificam enzimas envolvidas na biossíntese de aflatoxinas estão organizados em “clusters” (Ehrlich *et al.*, 2006). Considerando que deleções de genes do “cluster” de aflatoxina têm sido atribuídas como causa da incapacidade de alguns isolados de *A. flavus* produzirem a aflatoxina (Chang *et al.*, 2005), os isolados ITAL 261, ITAL 375, ITAL 263, ITAL 74, ITAL 336, ITAL 20 e ITAL 24, todos não-produtores de aflatoxinas, foram investigados para possíveis deleções através de PCR específica. Interessantemente, seis padrões de deleção foram detectados para o conjunto de 7 isolados (Figura 5). Estes dados obtidos concordam com resultados obtidos por Chang *et al.* (2009) que, ao investigarem 38 linhagens não-produtoras de aflatoxinas obtidas de diferentes produtos agrícolas detectaram que as deleções não são raras e o padrão é variado.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES pela concessão da bolsa de mestrado a JS Gonçalves e ao CNPq pela concessão de bolsa de produtividade em pesquisa a MH Taniwaki e MHP Fungaro.

REFERÊNCIAS

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, *25*, 3389-3402.
- Azevedo, A. C. S., Furlaneto, M. C., Soza-Gomez, D. R., & Fungaro, M. H. P. (2000). Molecular characterization of *Paecilomyces fumosoroseus* (*Deuteromycotina Hyphomycetes*) isolates. *Scientia Agricola*, *57*, 729-732.
- CAC. Codex Alimentarius Commission. (2006). *Code of practice for the prevention and reduction of aflatoxin contamination in tree nuts*. Netherlands. (CAC/RCP 59-2005).
- Chang, P. -K., Horn, B. W., & Dorner, J. W. (2005). Sequence breakpoints in the aflatoxin biosynthesis gene cluster and flanking regions in nonaflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates. *Fungal Genetics and Biology*, *42*, 914-923.
- Codner, R. C., Sargeant, K., & Yeo, R. (1963). Production of aflatoxin by the culture of strains of *Aspergillus flavus-oryzae* on sterilized peanuts. *Biotechnology and Bioengineering*, *5*, 185-192.
- Ehrlich, K. C. (2009). Predicted roles of the uncharacterized clustered genes in aflatoxin biosynthesis. *Toxins*, *1*, 37-58.
- Excoffier, L., Laval, G., & Schneider, S. (2005). Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, *1*, 47-50.
- Filtborg, O., Frisvad, J. C., & Svendensen, J. A. (1983). Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, *45*, 581-585.
- FSA, Food Standards Agency. (2004). Survey of edible nuts for aflatoxinas. Food Standards Agency. Disponível em:
<<http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/summarynuts.pdf>> Acesso em: 09 fev. 2011.
- Fungaro, M. H. P., Vieira, M. L. C., Pizzirani-Kleiner, A. A., & Azevedo, J. L. (1996). Diversity among soil and insect isolates of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* detected by RAPD. *Letters in Applied Microbiology*, *22*, 389-392.
- Geiser, D. M., Klich, M. A., Frisvad, J. C., Peterson, S. W., Varga, J., & Samson, R. A. (2007). The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, *59*, 1-10.
- Geiser, D. M., Pitt, J. I., & Taylor, J. W. (1998). Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*, 388-393.
- Glass, N. L., & Donaldson, G. C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. *Applied Environmental Microbiology*, *61*, 1323-1330.
- Godet, M., & Munaut, F. (2010). Molecular strategy for identification in *Aspergillus* section *Flavi*. *FEMS Microbiology Letters*, *304*, 157-168.

- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium*, 41, 95-98.
- Hong, S. B., Cho, H. S., Shin, H. D., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2006). Novel *Neosartorya* species isolated from soil in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 477-486.
- Horn, B., Moore, G. G., & Carbone, I. (2010). Sexual reproduction in aflatoxin-producing *Aspergillus nomius*. *Mycologia*, 103, 174-183.
- Ito, Y., Peterson, S. W., Wicklow, D. T., & Goto, T. (2001). *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*. *Mycological Research*, 105, 233-239.
- JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. (1998). *Safety evaluation of certain food additives and contaminants*. Geneva: World Health Organisation, Forty-ninth meeting of the JECFA. WHO Food Additives series Report Series, 40.
- Klich, M. A., & Pitt, J. I. (1988). *A laboratory guide to common Aspergillus species and their teleomorphs*. Sydney: Commonwealth scientific and Industrial research Organization, 115p.
- Kurtzman, C. P., Horn, B. W., & Hesseltine, C. W. (1987). *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamari*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 53, 147-158.
- Marklinder, I., Lindblad, M., Gidlund, A., & Olsen, M. (2005). Consumers' ability to discriminate aflatoxin contaminated Brazil nuts. *Food Additives & Contaminants*, 22, 56-64.
- Mello, F. R., & Scussel, V. M. (2009). Development of physical and optical methods for In-shell Brazil nuts sorting and aflatoxin reduction. *Journal of Agricultural Science*, 1, 3-14.
- Peterson, S. W., Ito, Y., Horn, B. W., & Goto, T. (2001). *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. *Mycologia*, 93, 689-703.
- Pildain, M. B., Frisvad, J. C., Vaamonde, G., Cabral, D., Varga, J., & Samson, R. A. (2008). Two new aflatoxin producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 725-735.
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). *Fungi and food spoilage*. London: Springer Dordrecht Heidelberg, 540p.
- Pohland, A. E. (1993). Mycotoxins in review. *Food Additives & Contaminants*, 10, 17-28.
- Rohlf, F. J. (2000). *NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1*. Exeter Software, New York, 98p.
- Saito, M., & Tsuruta, O. (1993). A new variety of *Aspergillus flavus* from tropical soil in Thailand and its aflatoxin productivity. *Proceedings of the Japanese Association of Mycotoxicology*, 37, 31-36.
- Samson, R. A., & Varga, J. (2010). Molecular systematics of *Aspergillus* and its teleomorphs. In M. Machida, & K. Gomi (Eds.), *Aspergillus: molecular biology and genomics* (pp. 19-40). United Kingdom: Caister Academic Press.

Souza, J. M. L., Cartaxo, C. B. C., Leite, F. M. N., & Souza, L. M. (2004). *Manual de Segurança e Qualidade para a cultura da castanha-do-brasil*. Série Qualidade e Segurança dos Alimentos. Brasília: CampoPAS. Convênio CNI/SENAI/SEBRAE/EMBRAPA. 60p.

STDF Project 114 - *Validation and transfer to the key stakeholders of a sustainable and effective aflatoxin management system in the Brazil nut production chain for recovering and consolidating export markets, particularly in Europe*. FINAL REPORT Covering Period from 1 June 2006 to 30 November 2008. Project coordinators: Catherine BRABET, CIRAD, France – General Coordinator, Monica OLSEN, NFA, Sweden - Scientific Coordinator. Last version: May 2009. Disponível em: <<http://www.stdf-safenutproject.com>>

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 1596-1599.

Thompson, J. D., Higgins, D. G.; Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673-4680.

Tabela 1 – Isolados de *Aspergillus* spp. obtidos de amêndoa e casca de castanha-do-brasil provenientes de diferentes regiões geográficas da Região Norte do Brasil.

Grupo RAPD	Código	Identificação molecular	Aflatoxinas	Substrato	Origem Geográfica
I	ITAL 20	<i>A. flavus</i>	-	Amêndoa	Pará
I	ITAL 24	<i>A. flavus</i>	-	Amêndoa	Pará
I	ITAL 26	<i>A. flavus</i>	AFB ₁ /B ₂	Casca	Pará
I	ITAL 31	<i>A. flavus</i>	AFB ₁ /B ₂	Casca	Pará
I	ITAL 35	<i>A. flavus</i>	AFB ₁ /B ₂	Casca	Pará
I	ITAL 40	<i>A. flavus</i>	AFB ₁ /B ₂	Casca	Pará
I	ITAL 48	<i>A. flavus</i>	AFB ₁ /B ₂	Amêndoa	Pará
I	ITAL 49	<i>A. flavus</i>	AFB ₁ /B ₂	Amêndoa	Pará
I	ITAL 57	<i>A. flavus</i>	AFB ₁	Amêndoa	Amazonas (Humaitá)
I	ITAL 58	<i>A. flavus</i>	AFB ₁	Amêndoa	Amazonas (Humaitá)
I	ITAL 60	<i>A. flavus</i>	AFB ₁	Amêndoa	Amazonas (Humaitá)
I	ITAL 62	<i>A. flavus</i>	AFB ₁	Amêndoa	Amazonas (Humaitá)
I	ITAL 67	<i>A. flavus</i>	AFB ₁ /B ₂	Amêndoa	Amazonas (Coari)
I	ITAL 70	<i>A. flavus</i>	AFB ₁	Amêndoa	Amazonas (Coari)
I	ITAL 72	<i>A. flavus</i>	AFB ₁ /B ₂	Amêndoa	Amazonas (Coari)
I	ITAL 74	<i>A. flavus</i>	-	Amêndoa	Amazonas (Coari)
I	ITAL 113	<i>A. flavus</i>	AFB ₁	Amêndoa	Amazonas
I	ITAL 205	<i>A. flavus</i>	AFB ₁	Casca	Amazonas (Coari)
I	ITAL 254	<i>A. flavus</i>	AFB ₁	Casca	Amazonas
I	ITAL 261	<i>A. flavus</i>	-	Casca	Amazonas
I	ITAL 263	<i>A. flavus</i>	-	Casca	Amazonas
I	ITAL 336	<i>A. flavus</i>	-	Amêndoa	Belém
I	ITAL 371	<i>A. flavus</i>	AFB ₁ /B ₂	Casca	Belém
I	ITAL 375	<i>A. flavus</i>	-	Casca	Belém
II	ITAL 50	<i>A. caelatus</i>	-	Amêndoa	Pará
II	ITAL 79	<i>A. caelatus</i>	-	Amêndoa	Amazonas (Coari)
II	ITAL 87	<i>A. caelatus</i>	-	Amêndoa	Amazonas (Jarí)
II	ITAL 91	<i>A. caelatus</i>	-	Amêndoa	Amazonas (Jarí)
II	ITAL 95	<i>A. caelatus</i>	-	Amêndoa	Amazonas (Jarí)
II	ITAL 96	<i>A. caelatus</i>	-	Amêndoa	Amazonas (Jarí)
II	ITAL 121	<i>A. caelatus</i>	-	Amêndoa	Amazonas
II	ITAL 140	<i>A. caelatus</i>	-	Amêndoa	Amazonas
II	ITAL 201	<i>A. caelatus</i>	-	Casca	Amazonas (Coari)
II	ITAL 212	<i>A. caelatus</i>	-	Casca	Amazonas (Coari)
II	ITAL 216	<i>A. caelatus</i>	-	Casca	Amazonas (Coari)
II	ITAL 225	<i>A. caelatus</i>	-	Casca	Amazonas (Coari)
II	ITAL 243	<i>A. caelatus</i>	-	Casca	Amazonas (Jarí)
II	ITAL 301	<i>A. caelatus</i>	-	Casca	Pará
II	ITAL 330	<i>A. caelatus</i>	-	Amêndoa	Belém
III	ITAL 94	<i>A. nomius</i>	AFB ₁ /G ₁	Amêndoa	Amazonas (Jarí)
III	ITAL 98	<i>A. nomius</i>	AFB ₁ /G ₁	Amêndoa	Amazonas (Jarí)
III	ITAL 114	<i>A. nomius</i>	AFB ₁ /G ₁	Amêndoa	Amazonas
III	ITAL 120	<i>A. nomius</i>	AFB ₁ /G ₁	Amêndoa	Amazonas
III	ITAL 122	<i>A. nomius</i>	AFB ₁ /G ₁	Amêndoa	Amazonas
III	ITAL 139	<i>A. nomius</i>	AFB ₁ /G ₁	Amêndoa	Amazonas
III	ITAL 144	<i>A. nomius</i>	AFB ₁ /G ₁	Amêndoa	Amazonas
III	ITAL 148	<i>A. nomius</i>	AFB ₁ /G ₁	Amêndoa	Amazonas
III	ITAL 192	<i>A. nomius</i>	AFB ₁ /G ₁	Casca	Amazonas (Humaitá)
III	ITAL 193	<i>A. nomius</i>	AFB ₁ /G ₁	Casca	Amazonas (Humaitá)
III	ITAL 206	<i>A. nomius</i>	AFB ₁ /G ₁	Casca	Amazonas (Coari)
III	ITAL 213	<i>A. nomius</i>	AFB ₁ /G ₁	Casca	Amazonas (Coari)
III	ITAL 215	<i>A. nomius</i>	AFB ₁ /G ₁	Casca	Amazonas (Coari)
III	ITAL 217	<i>A. nomius</i>	AFB ₁ /G ₁	Casca	Amazonas (Coari)
III	ITAL 223	<i>A. nomius</i>	AFB ₁ /G ₁	Casca	Amazonas (Coari)
III	ITAL 244	<i>A. nomius</i>	AFB ₁ /G ₁	Casca	Amazonas (Jarí)
III	ITAL 255	<i>A. nomius</i>	AFB ₁ /G ₁	Casca	Amazonas
III	ITAL 256	<i>A. nomius</i>	AFB ₁ /G ₁	Casca	Amazonas
III	ITAL 333	<i>A. nomius</i>	AFB ₁ /G ₁	Amêndoa	Belém
IV	ITAL 76	<i>A. tamarii</i>	-	Amêndoa	Amazonas (Coari)
IV	ITAL 80	<i>A. tamarii</i>	-	Amêndoa	Amazonas (Coari)
IV	ITAL 81	<i>A. tamarii</i>	-	Amêndoa	Amazonas (Coari)
IV	ITAL 119	<i>A. tamarii</i>	-	Amêndoa	Amazonas
IV	ITAL 123	<i>A. tamarii</i>	-	Amêndoa	Amazonas
IV	ITAL 129	<i>A. tamarii</i>	-	Amêndoa	Amazonas

Continuação Tabela 1.

Grupo	Código	Identificação molecular	Aflatoxinas	Substrato	Origem Geográfica
IV	ITAL 142	<i>A. tamarii</i>	-	Amêndoa	Amazonas
IV	ITAL 198	<i>A. tamarii</i>	-	Casca	Amazonas (Humaitá)
IV	ITAL 207	<i>A. tamarii</i>	-	Casca	Amazonas (Coari)
IV	ITAL 219	<i>A. tamarii</i>	-	Casca	Amazonas (Coari)
IV	ITAL 226	<i>A. tamarii</i>	-	Casca	Amazonas (Coari)
IV	ITAL 227	<i>A. tamarii</i>	-	Casca	Amazonas (Coari)
IV	ITAL 248	<i>A. tamarii</i>	-	Casca	Amazonas
IV	ITAL 249	<i>A. tamarii</i>	-	Casca	Amazonas
IV	ITAL 250	<i>A. tamarii</i>	-	Casca	Amazonas
IV	ITAL 251	<i>A. tamarii</i>	-	Casca	Amazonas
IV	ITAL 252	<i>A. tamarii</i>	-	Casca	Amazonas
V	ITAL 116	<i>Aspergillus</i> sp	-	Amêndoa	Amazonas
V	ITAL 259	<i>Aspergillus</i> sp	-	Casca	Amazonas
V	ITAL 262	<i>Aspergillus</i> sp	-	Casca	Amazonas
VI	ITAL 89	<i>A. bombycis</i>	AFB ₁ /G ₁	Amêndoa	Amazonas (Jarí)
VI	ITAL 246	<i>A. bombycis</i>	AFB ₁ /G ₁	Casca	Amazonas (Jarí)
VII	ITAL 189	<i>A. arachidicola</i>	AFB ₁	Casca	Amazonas (Humaitá)

Tabela 2 – F_{ST} “par a par” entre os grupos de *Aspergillus* seção *Flavi* isolados de castanha-do-brasil obtidos através dos dados de RAPD: a) grupo de isolados de amêndoas; b) grupo de isolados de cascas.

	I	II	III	IV	V	VI
I						
II	0.78					
III	0.80	0.82				
IV	0.81	0.81	0.81			
V	0.80	0.85	0.75	0.85		
VI	0.80	0.84	0.77	0.87	1.00	

	I	II	III	IV	V	VI	VII
I							
II	0.83						
III	0.81	0.82					
IV	0.86	0.85	0.81				
V	0.86	0.84	0.81	0.86			
VI	0.86	0.86	0.79	0.86	0.87		
VII	0.84	0.85	0.79	0.84	0.88	1.00	

LEGENDAS DAS FIGURAS

- Figura 1** – Perfis de RAPD de isolados de *Aspergillus* seção *Flavi*, produtores e não produtores de aflatoxinas, obtidos com o iniciador OP-X7: a) 41 isolados de amêndoas de castanha-do-brasil; b) 40 isolados obtidos de casca de castanha-do-brasil. MM: marcador de peso molecular 1 kb plus; CN, controle negativo.
- Figura 2** – Árvore filogenética gerada a partir das sequências da porção BT2 do gene da β -tubulina de isolados de *Aspergillus* spp. alinhadas com as sequências de espécies tipos de *Aspergillus* seção *Flavi* depositadas no banco de dados.
- Figura 3** – Árvore filogenética gerada a partir das sequências parciais do gene calmodulina de isolados de *Aspergillus* spp. alinhadas com as sequências de espécies tipos de *Aspergillus* seção *Flavi* depositadas no banco de dados.
- Figura 4** – a) Alinhamento das sequências de nucleotídeos da porção BT2 do gene da β -tubulina dos isolados ITAL 116, ITAL 259, ITAL 262 com a sequência de nucleotídeos de *Aspergillus tamarisii* (EF 203123) e *A. caelatus* (EF 203127); b) alinhamento das sequências parciais de nucleotídeos do gene da calmodulina dos isolados ITAL 116, ITAL 259, ITAL 262 com a sequência de nucleotídeos de *Aspergillus tamarisii* (EF 202034) e *A. caelatus* (EF 202035).
- Figura 5** – Padrões de deleção no “cluster” gênico da aflatoxina em isolados de *A. flavus*. Os círculos sólidos indicam produtos de PCR positivos e os círculos abertos indicam não haver produtos de PCR. A região contendo *nadA-hexA-glcA-sugR* representa o “cluster” de utilização de açúcar. C1, C2, C3 e C4 são as regiões flanqueadoras do “cluster” gênico da aflatoxina e do “cluster” gênico de utilização de açúcar.

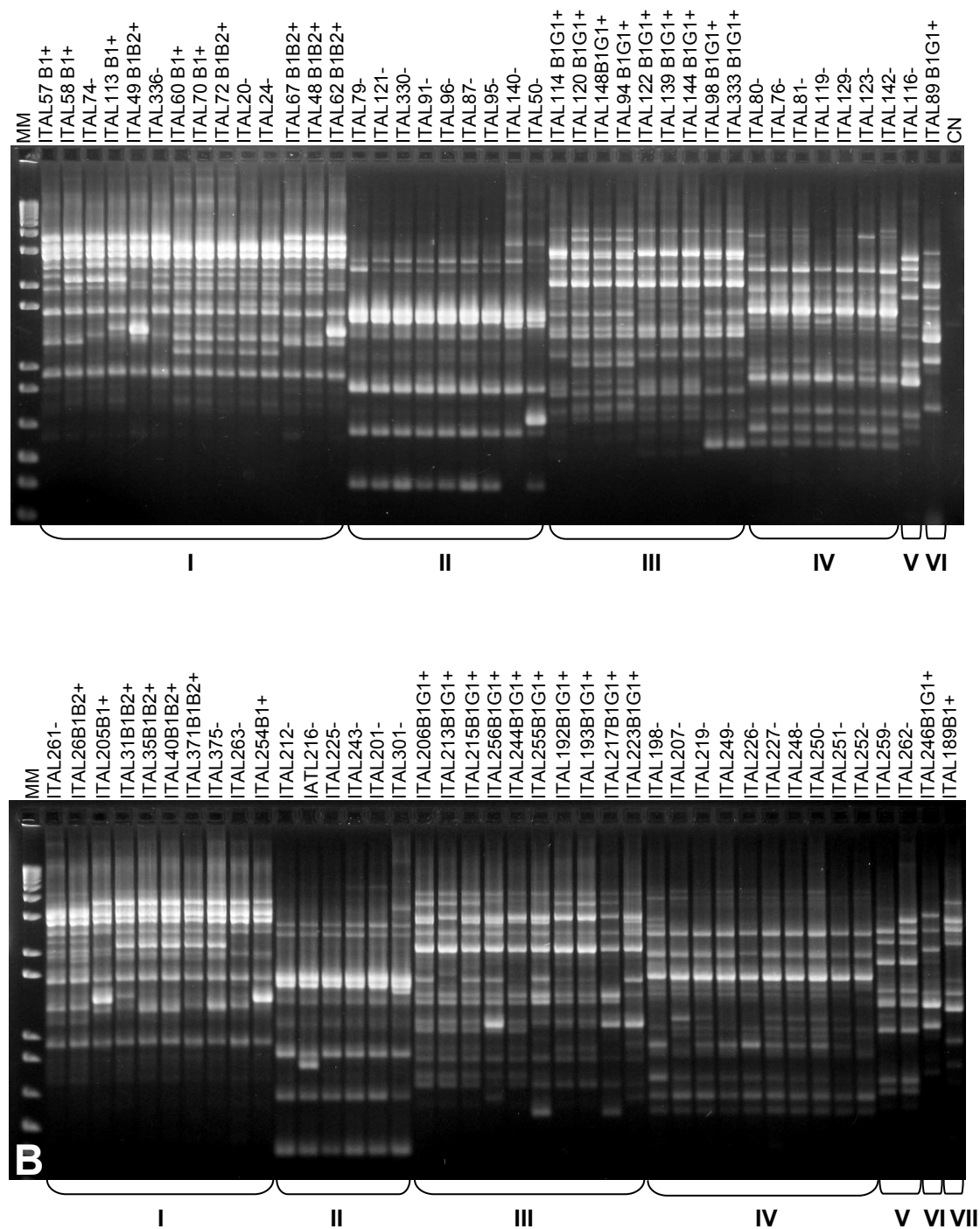


Fig 1

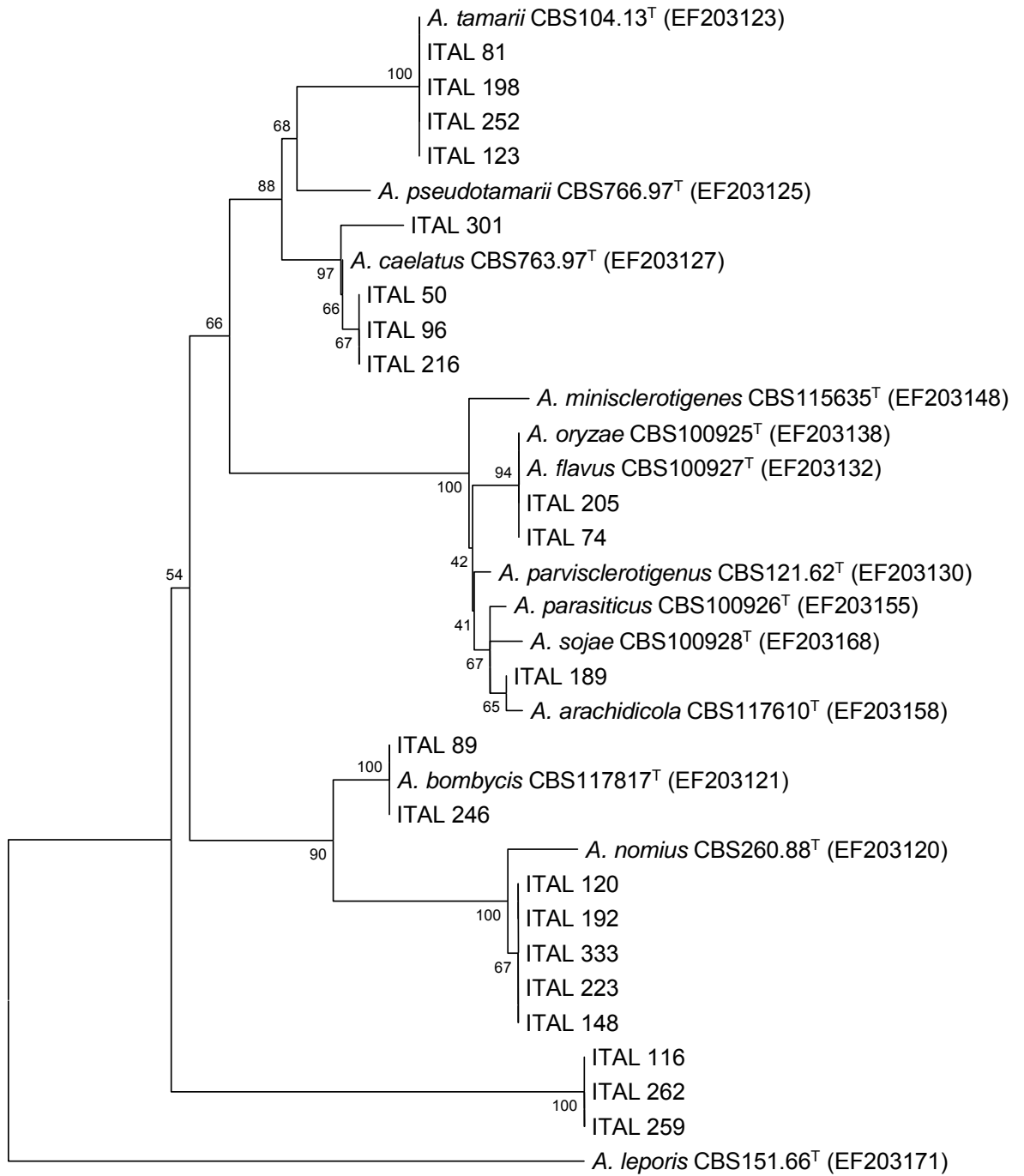


Fig 2

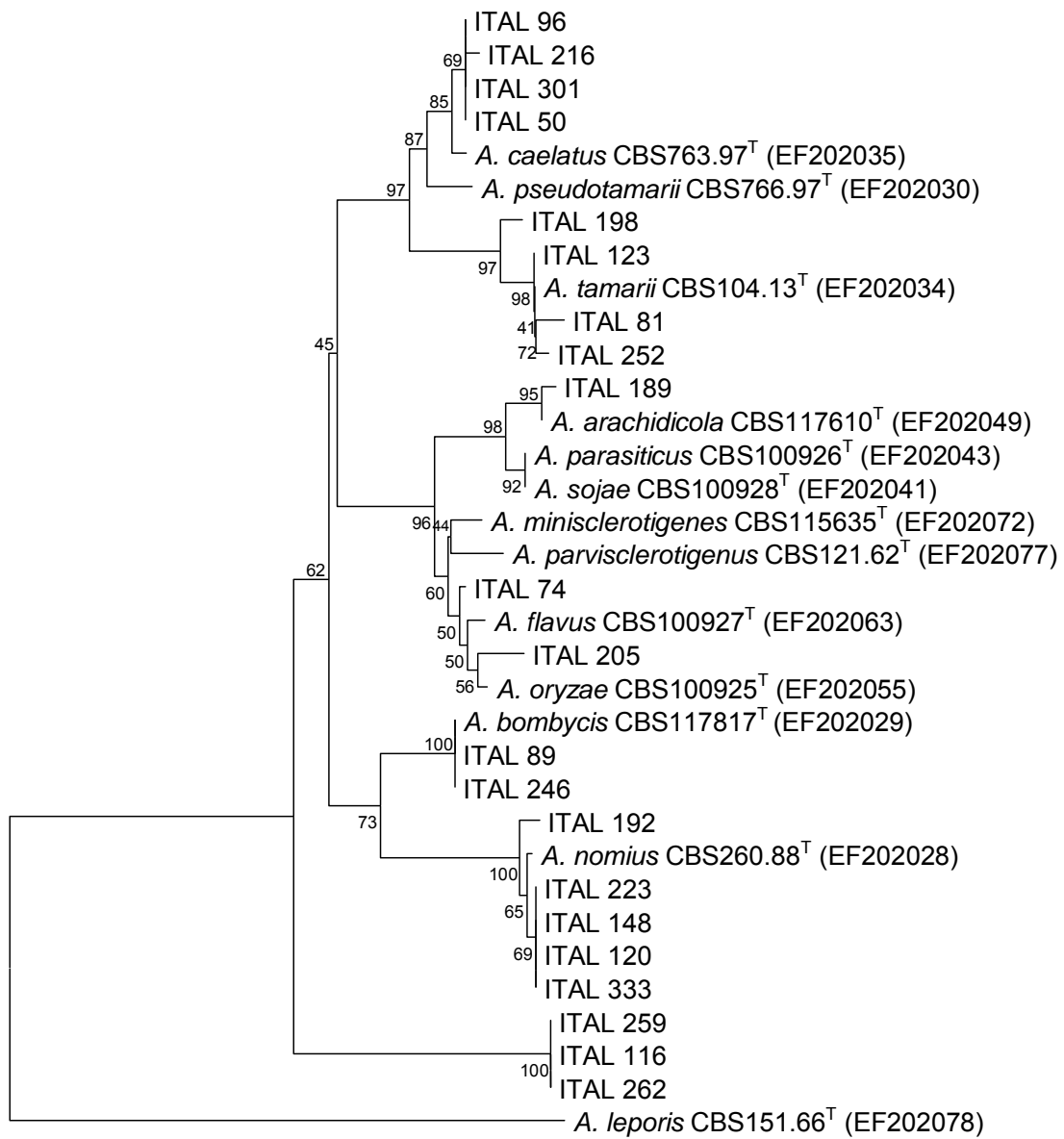


Fig 3

ITAL 116 AACAGGCTCATGAGCTCCGAGATGTCCTATTGTACCTGCCACATTTTGTCTAACACCTTG
 ITAL 259 AACAGGCTCATGAGCTCCGAGATGTCCTATTGTACCTGCCACATTTTGTCTAACACCTTG
 ITAL 262 AACAGGCTCATGAGCTCCGAGATGTCCTATTGTACCTGCCACATTTTGTCTAACACCTTG
 A. tamaritii CACAGACCATGAACTCAGATTGCCCCTATTGCTCTGCCACCTGTTTGTCTAACACTTT
 A. caelatus CACAGACCATGAACTCAGATTGCCCCTATTGCTCTGCCACCTGTTTGTCTAACACTTT

ITAL 116 ACAGGCAGACCATCTCTGGGGAGCACGGCCCTTACGGGCTCTGGTGTGTAAGTACAAACCG
 ITAL 259 ACAGGCAGACCATCTCTGGGGAGCACGGCCCTTACGGGCTCTGGTGTGTAAGTACAAACCG
 ITAL 262 ACAGGCAGACCATCTCTGGGGAGCACGGCCCTTACGGGCTCTGGTGTGTAAGTACAAACCG
 A. tamaritii ACAGGCAGACCATCTCTGGGGAGCACGGCCCTTACGGGCTCTGGTGTGTAAGTACAAACCG
 A. caelatus ACAGGCAGACCATCTCTGGGGAGCACGGCCCTTACGGGCTCTGGTGTGTAAGTACAAACCG

ITAL 116 TGTAACCTCGAACGAATCGACATCTCGATGCTATGGGAAAGTTTGGACGGTCTGACG
 ITAL 259 TGTAACCTCGAACGAATCGACATCTCGATGCTATGGGAAAGTTTGGACGGTCTGACG
 ITAL 262 TGTAACCTCGAACGAATCGACATCTCGATGCTATGGGAAAGTTTGGACGGTCTGACG
 A. tamaritii TGTAACCTCGAACGAATCGACATCTCGATGCTATGGGAAAGTTTGGACGGTCTGACG
 A. caelatus TGTAACCTCGAACGAATCGACATCTCGATGCTATGGGAAAGTTTGGACGGTCTGACG

ITAL 116 GCAAGGATAGTTACAAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGCTCTACTTCA
 ITAL 259 GCAAGGATAGTTACAAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGCTCTACTTCA
 ITAL 262 GCAAGGATAGTTACAAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGCTCTACTTCA
 A. tamaritii GCAAGGATAGTTACAAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGCTCTACTTCA
 A. caelatus GCAAGGATAGTTACAAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGCTCTACTTCA

ITAL 116 ACAGGTCGCTACCTCAGATTTTTCGGGCTCCATGAAAACGCTTTTGC AAATCCTGA CTGG
 ITAL 259 ACAGGTCGCTACCTCAGATTTTTCGGGCTCCATGAAAACGCTTTTGC AAATCCTGA CTGG
 ITAL 262 ACAGGTCGCTACCTCAGATTTTTCGGGCTCCATGAAAACGCTTTTGC AAATCCTGA CTGG
 A. tamaritii ACAGGTCGCTACCTCAGATTTTTCGGGCTCCATGAAAACGCTTTTGC AAATCCTGA CTGG
 A. caelatus ACAGGTCGCTACCTCAGATTTTTCGGGCTCCATGAAAACGCTTTTGC AAATCCTGA CTGG

ITAL 116 TTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCTCGTGCCTGCTCCTGTCGATCTTGAGCCCG
 ITAL 259 TTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCTCGTGCCTGCTCCTGTCGATCTTGAGCCCG
 ITAL 262 TTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCTCGTGCCTGCTCCTGTCGATCTTGAGCCCG
 A. tamaritii TTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCTCGTGCCTGCTCCTGTCGATCTTGAGCCCG
 A. caelatus TTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCTCGTGCCTGCTCCTGTCGATCTTGAGCCCG

ITAL 116 ETACCATGGATGCTGTCCGTGCCGGTCCCTTTCGGTCAAGCTGTTCCGTCCCGACAACCTCG
 ITAL 259 ETACCATGGATGCTGTCCGTGCCGGTCCCTTTCGGTCAAGCTGTTCCGTCCCGACAACCTCG
 ITAL 262 ETACCATGGATGCTGTCCGTGCCGGTCCCTTTCGGTCAAGCTGTTCCGTCCCGACAACCTCG
 A. tamaritii ETACCATGGATGCTGTCCGTGCCGGTCCCTTTCGGTCAAGCTGTTCCGTCCCGACAACCTCG
 A. caelatus ETACCATGGATGCTGTCCGTGCCGGTCCCTTTCGGTCAAGCTGTTCCGTCCCGACAACCTCG

A

CGACAGGACAAAGGACGGTGTGATGTTAGTACGGGCTATTTTATTC AATCTCTCTCCAAAGT
 CGACAGGACAAAGGACGGTGTGATGTTAGTACGGGCTATTTTATTC AATCTCTCTCCAAAGT
 CGACAGGACAAAGGACGGTGTGATGTTAGTACGGGCTATTTTATTC AATCTCTCTCCAAAGT
 CGACAGGACAAAGGACGGTGTGATGTTAGTACGGGCTATTTTATTC AATCTCTCTCCAAAGT

CGACCGATATGTTTTGCCCCATTAAATTTATCCATTTTTGTTGATCGGCTGAAGTCT
 CGACCGATATGTTTTGCCCCATTAAATTTATCCATTTTTGTTGTTGATCGGCTGAAGTCT
 CGACCGATATGTTTTGCCCCATTAAATTTATCCATTTTTGTTGTTGATCGGCTGAAGTCT
 CGACCGATATGTTTTGCCCCATTAAATTTATCCATTTTTGTTGTTGATCGGCTGAAGTCT
 CGACCGATATGTTTTGCCCCATTAAATTTATCCATTTTTGTTGTTGATCGGCTGAAGTCT

TGGCATTGATCAATTGATTGATATGCAGGCAGATCACTACCAAGGAGTTGGCACTG
 TGGCATTGATCAATTGATTGATATGCAGGCAGATCACTACCAAGGAGTTGGCACTG
 TGGCATTGATCAATTGATTGATATGCAGGCAGATCACTACCAAGGAGTTGGCACTG
 TGGCATTGATCAATTGATTGATATGCAGGCAGATCACTACCAAGGAGTTGGCACTG

TCATGCGCTCTCTGGGCCAAAAA CCCCCTCCGAGTCGGA GCTC CAGGACATGATTAACGAGG
 TCATGCGCTCTCTGGGCCAAAAA CCCCCTCCGAGTCGGA GCTC CAGGACATGATTAACGAGG
 TCATGCGCTCTCTGGGCCAAAAA CCCCCTCCGAGTCGGA GCTC CAGGACATGATTAACGAGG
 TCATGCGCTCTCTGGGCCAAAAA CCCCCTCCGAGTCGGA GCTC CAGGACATGATTAACGAGG

TTGACGCCGATACAAATGGCACATTGACTTCCCTGGTACGAGAGGGCTTCCATACGATT
 TTGACGCCGATACAAATGGCACATTGACTTCCCTGGTACGAGAGGGCTTCCATACGATT
 TTGACGCCGATACAAATGGCACATTGACTTCCCTGGTACGAGAGGGCTTCCATACGATT
 TTGACGCCGATACAAATGGCACATTGACTTCCCTGGTACGAGAGGGCTTCCATACGATT

CATACATAAAAATAGTTGTTAATGTTCCAGCAGATTCTTACCGATGATGGCGAGAAAGAT
 CATACATAAAAATAGTTGTTAATGTTCCAGCAGATTCTTACCGATGATGGCGAGAAAGAT
 CATACATAAAAATAGTTGTTAATGTTCCAGCAGATTCTTACCGATGATGGCGAGAAAGAT
 CATACATAAAAATAGTTGTTAATGTTCCAGCAGATTCTTACCGATGATGGCGAGAAAGAT

GAAGGATACCGACTCTGAGGAGGAGATCCGGGAAGC
 GAAGGATACCGACTCTGAGGAGGAGATCCGGGAAGC
 GAAGGATACCGACTCTGAGGAGGAGATCCGGGAAGC
 GAAGGATACCGACTCTGAGGAGGAGATCCGGGAAGC

B

Fig 4

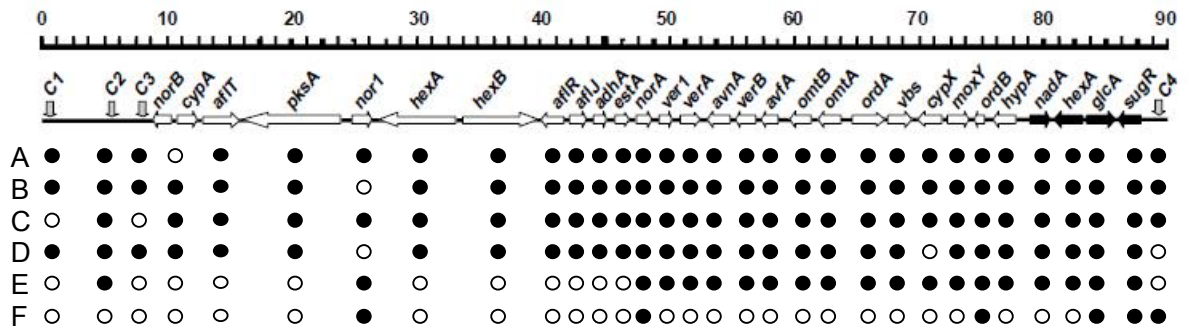


Fig 5

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, C. P. **Castanha do Pará: Sua exportação e importância na economia amazônica.** Rio de Janeiro, RJ.: Edições SIA, 1963. 86 p.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- AMPE, C.; VAN DAMME, J.; De CASTRO, L. A. B.; SAMPAIO, M. J. A. M.; VAN MONTAGU, M.; VANDEKERCKHOVE, J. The amino acid sequence of the 2S sulphur-rich proteins from seeds of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K). **European Journal of Biochemistry**, v. 159, p. 597-604, 1986.
- ARCHIBALD, R. McG.; SMITH, H. J.; SMITH, J. D. Brazilian groundnut toxicosis in Canadian broiler chicken. **Canadian Veterinary Journal**, v. 13, n. 10, p. 322-325, 1962.
- ARRUS, K.; BLANKA, G.; ABRAMSONB, D.; CLEARC, R.; HOLLEYA, R. A. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. **Journal of Stored Products Research**, v. 41, p. 513-527, 2005.
- ASAO, T.; BÜCHI, G.; ABDEL-KADER, M. M.; CHANG, S. B.; WICK, E. L.; WOGAN, G. N. The structures of aflatoxins B and G₁. **Journal of the American Chemical Society**, v. 87, p. 882-886, 1965.
- ASAO, T.; BÜCHI, G.; ABDEL-KADER, M. M.; CHANG, S. B.; WICK, E. L.; WOGAN, G. N. Aflatoxins B and G. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, p. 1706-1707, 1963.
- AZEVEDO, A. C. S.; FURLANETO, M. C.; SOZA-GOMEZ, D. R.; FUNGARO, M. H. P. Molecular characterization of *Paecilomyces fumosoroseus* (*Deuteromycotina Hyphomycetes*) isolates. **Scientia Agrícola**, v. 57, p. 729-732, 2000.
- BARRETT, J. Mycotoxins: of molds and maladies. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, p. A20-A23, 2000.
- BATISTA, P. P.; SANTOS, J. F.; OLIVEIRA, N. T.; PIRES, A. P. D.; MOTTA, C. M. S.; LIMA, E. A. L. Genetic characterization of Brazilian strains of *Aspergillus flavus* using DNA markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 3, p. 706-717, 2008.
- BAYMAN, P.; BAKER, J.; MAHONEY, N. *Aspergillus* on tree nuts. **Mycopathologia**, v.155, p.161-169, 2002.
- BENNETT, J. W. Loss of norsolorinic acid and aflatoxin production by mutant of *Aspergillus parasiticus*. **Journal of General Microbiology**, v. 124, p. 429- 432, 1981.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, p. 497-516, 2003.

BHATNAGAR, D.; CARY, J. W.; EHRLICH, K.; YU, J.; CLEVELAND, T. E. Understanding the genetics of regulation of aflatoxin production and *Aspergillus flavus* development. **Mycopathologia**, v. 162, n. 3, 2006.

BLOUNT, W. P. Turkey "X" disease. **Turkey**, v. 9, p. 55-58, 1961.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC N° 7, de 18 de fevereiro de 2011. **Diário Oficial da União**. Brasília/DF: Seção 1, 2011.

CAC. Codex Alimentarius Commission. **Code of practice for the prevention and reduction of aflatoxin contamination in tree nuts**. Netherlands, 2006. (CAC/RCP 59-2005).

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

CAVALIERE, C.; FOGLIA, P.; GUARINO, C.; MARZIONI, F.; NAZZARI, M.; SAMPERI, R.; LAGANA, A. Aflatoxin M₁ determination in cheese by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1135, p. 135-141, 2006.

CHANG, P. -K.; HORN, B. W.; DORNER, J. W. Sequence breakpoints in the aflatoxin biosynthesis gene cluster and flanking regions in nonaflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, p. 914-923, 2005.

CHRISTENSEN, C. M. Deterioration of stored grains by fungi. **The Botanical Review**, v. 23, n. 2, p. 108-134, 1957.

CODNER, R.C.; SARGEANT, K.; YEO, R. Production of aflatoxin by the culture of strains of *Aspergillus flavus-oryzae* on sterilized peanuts. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 5, p. 185-192, 1963.

COLE, R. J.; SANDERS, T. H.; HILL, R. A.; BLANKENSHIP, P. D. Mean geocarposphere temperatures that induce preharvest aflatoxin contamination of peanuts and drought stress. **Mycopathologia**, v. 91, n. 1, p. 41-46, 1985.

COSTA, A. K. F.; FREIRE, F. C. O.; VIEIRA, I. G. P.; ANDRADE, J. A.; MENDES, F. N. P. Fungos associados à castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* Hum. & Bompl) e ao amendoim (*Arachis hypogaea* L.) comercializados em Fortaleza (Ceará). **Revista Ciência Agrônômica**, v. 40, p. 455-460, 2009.

CREPPY, E. E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicology Letters**, v. 127, p. 19-28, 2002.

EGAL, S.; HOUNSA, A.; GONG, Y. Y.; TURNER, P. C.; WILD, C. P.; HALL, A. J.; HELL, K.; CARDWELL, K. F. Dietary exposure to aflatoxin from maize and groundnut in young children from Benin and Togo, West Africa. **International Journal of Food Microbiology**, v. 104, p. 215-224, 2005.

EHRlich, K. C. Predicted roles of the uncharacterized clustered genes in aflatoxin biosynthesis. **Toxins**, v. 1, p. 37-58, 2009.

EHRlich, K. C.; YU, J.; COTTY, P. J. Aflatoxin biosynthesis gene clusters and flanking regions. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 518–527, 2005.

EUROPEAN UNION - EU. Commission Decision of 4 July 2003, imposing special conditions on the import of Brazil nuts in shell originating in or consigned from Brazil (2003/493/EC). **Official Journal of the European Union**. 5.7.2003, L 168/33, 2003.

EUROPEAN UNION - EU. Commission Regulation N° 1525/98 of 16 July 1998, amending regulation (EC) N° 194/97 of January 1997 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuff. **Official Journal of the European Communities**, 1998.

EUROPEAN UNION - EU. Commission Regulation N° 165/2010 of 26 February 2010, amending regulation (EC) N° 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuff as regards aflatoxins. **Official Journal of the European Union**, 2010.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v. 1, p. 47-50, 2005.

FERRER, C.; COLOM, F.; FRASÉS, S.; MULET, E.; ABAD, J. L.; ALIÓ, J. L. Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 2873-2879, 2001.

FILTENBORG, O.; FRISVAD, J. C.; SVENDENSEN, J. A. Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 45, p. 581-585, 1983.

FREIRE, F.; OFFORD, L. Bacterial and yeast counts in Brazilian commodities and spices. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 2, 2002.

FRISVAD, J. C.; SKOUBOE, P.; SAMSON, R. A. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B₁, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, p. 442-453, 2005.

FRISVAD, J. C.; THRANE, U. Mycotoxin production by food-borne fungi. In: SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. (Eds.). **Introduction to food-borne fungi**. 4 ed. Baarn : Centralalbureau voor Schimmelcultures, 1995. p. 251-260.

FSA, Food Standards Agency. Survey of edible nuts for aflatoxinas. Food Standards Agency, 2004. Disponível em:
<<http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/summarynuts.pdf>> Acesso em: 09 fev. 2011.

FUNGARO, M. H. P.; VIEIRA, M. L. C.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Diversity among soil and insect isolates of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* detected by RAPD. **Letters in Applied Microbiology**, v. 22, p. 389-392, 1996.

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

GEISER, D. M.; HARBINSKI, F. M.; TAYLOR, J. W. Molecular and analytical tools for characterizing *Aspergillus* and *Penicillium* species at the intra- and interspecific levels. In: SAMSON, R. A.; PITT, J. I. (Eds.) **Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification**, Hardwood Academic Publishers, Reading, UK, 2000. P. 179-188.

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

GEISER, D. M.; PITT, J. I.; TAYLOR, J. W. Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 388-393, 1998.

GEORGIANNA, D. R.; PAYNE, G. A. Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: From gene to genome. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, p. 113-125, 2009.

GIBSON, A. M.; BARANYI, J.; PITT, M. J.; EYLES, M. J.; ROBERTS, T. A. Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, p. 419-431, 1994.

GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. **Applied Environmental Microbiology**, v. 61, p. 1323-1330, 1995.

GODET, M.; MUNAUT, F. Molecular strategy for identification in *Aspergillus* section *Flavi*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 304, p. 157-168, 2010.

GUI TAKOU, S.; KOUTRAS, K.; KANELLOU, E.; MARKAKI, P. Study of aflatoxin B₁ and ochratoxin A production by natural microflora and *Aspergillus parasiticus* in black and green olives of Greek origin. **Food Microbiology**, v. 23, p. 612-621, 2006.

GUO, B.; YU, J.; HOLBROOK, C. C.; CLEVELAND, T. E.; NIERMAN, C.; SCULLY, B. T. Strategies in prevention of preharvest aflatoxin contamination in peanuts: Aflatoxin biosynthesis, genetics and genomics. **Peanut Science**, v. 36, p. 11-20, 2009.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HENRY, T.; IWEN, P. C.; HINRICHS, S. H. Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 1510-1515, 2000.

HINRIKSON, H. P.; HURST, S. F.; LOTT, T. J.; WARNOCK, D. W.; MORRISON, C. J. Assessment of ribosomal large-subunit D1-D2, internal transcribed spacer 1, and internal transcriber spacer 2 regions as targets for molecular identification of medically important *Aspergillus* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 2092-2103, 2005.

HONG, S. B.; CHO, H. S.; SHIN, H. D.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Novel *Neosartorya* species isolated from soil in Korea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 477-486, 2006.

HONG, S. B.; GO, S. J.; SHIN, H. D.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. **Mycologia**, v. 97, p. 1316-1329, 2005.

HORN, B.; MOORE, G. G.; CARBONE, I. Sexual reproduction in aflatoxin-producing *Aspergillus nomius*. **Mycologia**, v. 103, p. 174-183, 2010.

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

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da extração vegetal e silvicultura**. Comunicação social, 2008. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/>. Acesso em 20/08/2010.

ITO, Y.; PETERSON, S.W.; WICKLOW, D.T.; GOTO, T. *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*. **Mycological Research**, v. 105, p. 233-239, 2001.

JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. **Safety evaluation of certain food additives and contaminants**. Geneva: World Health Organisation, Forty-ninth meeting of the JECFA. WHO Food Additives series Report Series, 40,1998.

JOLLY, P.; JIANG, Y.; ELLIS, W.; AWUAH, R.; NNEDU, O.; PHILLIPS, T.; WANG, J. S.; AFRIYIE-GYAWU, E.; TANG, L.; PERSON, S.; WILLIAMS, J.; JOLLY, C. Determinants of aflatoxin levels in Ghanaians: Socio demographic factors, knowledge of aflatoxin and food handling and consumption practices. **International Journal Hygiene and Environmental Health**, v. 209, p. 345-358, 2006.

KANBE, T.; YAMAKI, K.; KIKUCHI, A. Identification of the pathogenic *Aspergillus* species by nested PCR using a mixture of specific primers to DNA topoisomerase II gene. **Microbiology and Immunology**, v. 46, p. 841-848, 2002.

KLICH, M. A. Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Mycoscience**, v. 48, p. 71-80, 2007.

KLICH, M. A. **Identification of common *Aspergillus* species**. Utrecht, Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002, 116p.

KLICK, M. A., PITT, J. I. **A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs**. Sydney: Commonwealth scientific and Industrial research Organization, 115p. 1988.

KULIK, M. M.; HOLADAY, C. E. Aflatoxin: a metabolic product of several fungi. **Mycopathologia**, v. 30, n. 2, p. 137-140, 1966.

KUMEDA, Y.; ASAO, T. Single-Strand conformation polymorphism analysis of PCR-amplified ribosomal DNA internal transcribed spacers to differentiate species of *Aspergillus* section *Flavi*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 8, p. 2947-2952, 1996.

KURAIISHI, H.; ITOH, M.; TSUZAKI, N.; KATAYAMA, Y.; YOKOYAMA, T.; SUGIYAMA, J. The ubiquinone system as a taxonomic aid in *Aspergillus* and its teleomorphs. In: SAMSON, R.A.; PITT, J.I. (eds.). **Modern concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* classification**. New York: Plenum Press, 1990, p. 407-421.

KURTZMAN, C. P.; HORN, B. W.; HESSELTINE, C. W. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamari*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 53, p. 147-158, 1987.

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

MAGAN, N.; OLSEN, M. **Mycotoxins in Food: Detection and Control**. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Ltd. 2004. 471p.

MANONMANI, H. K.; ANAND, S.; CHANDRASHEKAR, A.; RATI, E. R. Detection of aflatoxigenic fungi in selected food commodities by PCR. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2859-2864, 2005.

MARKLINDER, I.; LINDBLAD, M.; GIDLUND, A.; OLSEN, M. Consumers' ability to discriminate aflatoxin contaminated Brazil nuts. **Food Additives & Contaminants**, v. 22, p. 56-64, 2005.

MELLO, F. R.; SCUSSEL, V. M. Development of physical and optical methods for In-shell Brasil nuts sorting and aflatoxin reduction. **Journal of Agricultural Science**, v. 1, p. 3-14, 2009.

MIDORIKAWA, G. E. O.; PINHEIRO, M. R. R.; VIDIGAL, B. S.; ARRUDA, M. C.; COSTA, F. F.; PAPPAS JR, G. J.; RIBEIRO, S. G.; FREIRE, F.; MILLER, R. N. G. Characterization of *Aspergillus flavus* strains from Brazilian Brazil nuts and cashew by RAPD and ribosomal DNA analysis. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, p. 12-18, 2008.

MINTO, R. E.; TOWNSEND, C. A. Enzymology and molecular biology of aflatoxin biosynthesis. **Chemical Reviews**, v. 97, n. 7, p. 2537-2555, 1997.

MOSS, M. Mycotoxin review: *Aspergillus* e *Penicillium*. **Mycologist**, v. 16, n. 3, 2002.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v. 155, p. 335-335, 1987.

MÜLLER, C. H.; FIGUEIREDO, F. J. C.; KATO, A. K.; CARVALHO, J. E. U.; STEIN, R. L. B.; SILVA, A. B. **A cultura da castanha-do-Brasil**. Brasília, DF.: Embrapa-SPI, 1995. 65p.

OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 1996. 474p.

OLIVEIRA, M. S.; PRADO, G.; ABRANTES, F. M.; SANTOS, L. G.; VELOSO, T. Incidência de aflatoxinas, desoxinivalenol e zearalenona em produtos comercializados em cidades do Estado de Minas Gerais no período de 1998-2000. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 61, n. 1, p. 1-6, 2002.

PACHECO, A. M.; SCUSSEL, V. M. **Castanha-do-Brasil: da floresta tropical ao consumidor**. Florianópolis, SC.: Editograf, 2006. 176p.

PACHECO, A. M.; LUCAS, A.; PARENTE, R.; PACHECO, N. Association between aflatoxin and aflatoxigenic fungi in Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 2, p. 330-334, 2010.

PERTERSON, S.W.; ITO, Y.; HORN, B.W.; GOTO, T. *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. **Mycologia**, v. 93, p. 689-703, 2001.

PILDAIN, M.B.; FRISVAD, J.C.; VAAMONDE, G.; CABRAL, D.; VARGA, J.; SAMSON, R.A. Two new aflatoxin producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 725-735, 2008.

PITT, J. I. Toxigenic fungi: which are important? **Medical Mycology**, v. 38, p. 17-22, 2000.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. London: Springer Dordrecht Heidelberg, 540p. 2009.

POHLAND, A. E. Mycotoxins in review. **Food Additives & Contaminants**, v. 10, p. 17-28, 1993.

PRANCE, G. T.; MORI, S. A. Lecythidaceae-Part I. The actinomorph-flowered new world Lecythidaceae (Asteranthos, Gustavia, Grias, Allantoma, and Cariniana). **Flora Neotropica Monograph**, v. 21, p. 1-270, 1979.

RASTOGI, S.; DOGRA, R. K. S.; KHANNA, S. K.; DAS, M. Skin tumorigenic potential of aflatoxin B₁ in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 670-677, 2006.

RATH, P. M. Phenotypic and genotypic characterization of reference strains of the genus *Aspergillus*. **Mycoses**, v. 44, n. 3-4, p. 65-72, 2001.

RIGÓ, K.; VARGA, J.; TÓTH, B.; TÉREN, J.; MESTERHÁZY, A. KOZAKIEWICZ, Z. Evolutionary relationships within *Aspergillus* section *Flavi* based on sequences of the intergenic transcribed spacer regions and the 5.8S rRNA gene. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 9-16, 2002.

ROHLF, F. J. **NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1**. Exeter Software, New York, 2000. 98p.

ROSS, R. K.; YUAN, J. M.; YU, M. C.; WOGAN, G. N.; QIAN, G. S.; TU, J. T.; GROOPMAN, J.; GAO, Y. T.; HENDERSON, B. E. Urinary aflatoxin biomarkers and risk of hepatocellular carcinoma. **Lancet**, v. 339, p. 1413-1414, 1992.

SAITO, M.; TSURUTA, O. A new variety of *Aspergillus flavus* from tropical soil in Thailand and its aflatoxin productivity. **Proceedings of the Japanese Association of Mycotoxicology**, v. 37, p. 31-36, 1993.

SALEEMULLAH, A. I.; IQTIDAR, A. K.; HAMIDULLAH, S. Aflatoxin contents of stored and artificially inoculated cereals and nuts. **Food Chemistry**, v. 98, p. 699-703, 2006.

SAMSON, R. A.; VARGA, J. Molecular systematics of *Aspergillus* and its teleomorphs. In M. Machida, K. Gomi (Eds.), *Aspergillus: molecular biology and genomics*. United Kingdom: Caister Academic Press, pp. 19-40, 2010.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

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

SCHMIDT-HEYDT, M.; ABDEL-HADI, A.; MAGAN, N.; GEISEN, R. Complex regulation of the aflatoxin biosynthesis gene cluster of *Aspergillus flavus* in relation to various combinations of water activity and temperature. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, p. 231-237, 2009.

SCHROEDER, H.W. Effect of corn steep liquor on mycelial growth and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus*. **Applied Microbiology**, v. 14, p. 381-385, 1966.

SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998. 144p.

SECOR, C. L.; LISK, D. J. Variation in the selenium content of individual Brazil nuts. **Journal of Food Safety**, v. 9, p. 279-281, 1989.

SHAPIRA, R.; PASTER, N.; EYAL, O.; MENASHEROV, M.; METT, A.; SALOMON, R. Detection of aflatoxigenic molds in grains by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 3270-3273, 1996.

SIBANDA, L.; MAROVATSANGA, L. T.; PESTKA, J. J. Review of mycotoxin work in sub-Saharan Africa. **Food Control**, n. 8, p. 21-29, 1997.

SOUZA, J. M. L. de; CARTAXO, C. B. da C.; LEITE, F.; CORRÊA, T.; FREITAS-SILVA, O.; FARIAS, A.; REIS, F. Hongos filamentosos associados a la almendra de castana-de-brasil em Unidades de Procesamiento en el Estado de Acre. Seminario Cientifico Internacional de Salud Animal, Havana: 2004, B56, **Abstracts**.

SOUZA, J. M. L.; CARTAXO, C. B. C.; LEITE, F. M. N.; SOUZA, L. M. **Manual de Segurança e Qualidade para a cultura da castanha-do-brasil**. Série Qualidade e Segurança dos Alimentos. Brasília: CampoPAS. Convênio CNI/SENAI/SEBRAE/EMBRAPA. 60p., 2004.

STDF Project 114 - **Validation and transfer to the key stakeholders of a sustainable and effective aflatoxin management system in the Brazil nut production chain for recovering and consolidating export markets, particularly in Europe**. FINAL REPORT Covering Period from 1 June 2006 to 30 November 2008. Project coordinators: Catherine BRABET, CIRAD, France – General Coordinator, Monica OLSEN, NFA, Sweden - Scientific Coordinator. Last version: May 2009. Disponível em: <<http://www.stdf-safenutproject.com>>

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TRAIL, F.; MAHANTI, N.; LINZ, J. Molecular biology of aflatoxin biosynthesis. **Microbiology**, v. 141, p. 755-765, 1995.

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 of Food Microbiology**, v. 88, p. 79-84, 2003.

VARGAS, E. A.; PREIS, R. A.; CASTRO, L.; SILVA, C. M. G. Co-occurrence of aflatoxins B₁, B₂, G₁ e G₂, zearalenone and fumonisin in Brazilian corn. **Food Additives and Contaminants**, v. 18, p. 981-986, 2001.

VASANTHI, S.; BHAT, R. V. Mycotoxins in foods-occurrence, health & economic significance & food control measures. **Indian Journal of Medical Research**, v. 108, p. 212-224, 1998.

WATANABE, C. M.; TOWNSEND, C. A. Initial characterization of a type I fatty acid synthase and polyketide synthase multienzyme complex NorS in the biosynthesis of aflatoxin B₁. **Chemistry & Biology**, v. 9, p. 981-988, 2002.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, A. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

WILLIAMS, J. G. K.; RAFALSKI, J. A.; TINGSEY, S. V. Genetic analysis using RAPD markers. **Methods in Enzymology**, v. 218, p. 704-740, 1993.

WILSON, D. M.; PAYNE, G. A. Factors affecting *Aspergillus flavus* group infection and aflatoxin contamination of crops. In: **The toxicology of aflatoxins**. Human health, veterinary and agricultural significance. EATON, D. L.; GROOPMAN, J. D. (ed.). Academic Press, San Diego, p. 309-325, 1994.

WHO-IARC. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**, v. 56, p. 245-445, 1993.

YU, J.; BHATNAGAR, D.; EHRLICH, K. C. Aflatoxin biosynthesis. **Revista Iberoamericana de Micología**, Barcelona, v. 19, p. 191-200, 2002.

YU, J.; CHANG, P.; CARY, J. W.; WRIGHT, M.; BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T. E.; PAYNE, G. A.; LINZ, J. E. Comparative mapping of aflatoxin pathway gene clusters in *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 6, p. 2365-2371, 1995.

YU, J.; CHANG, P.; EHRLICH, K. C.; CARY, J. W.; BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T. E.; PAYNE, G. A.; LINZ, J. E.; WOLOSHUK, C. P.; BENNETT, J. W. Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 1253-1262, 2004.

YUAN, G. F.; LIU, C. S.; CHEN, C. C. Differentiation of *Aspergillus parasiticus* from *Aspergillus sojae* by random amplification of polymorphic DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 2384-2387, 1995.

ZACHOVÁ, I.; VYTRASOVÁ, J.; PEJCHALOVÁ, M.; CERVENKA, L.; TAVCAR-KALCHER, G. Detection of aflatoxigenic fungi in feeds using the PCR method. **Folia Microbiologica**, v. 48, p. 817-821, 2003.