



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

ADRIANA RAQUEL PERSSON DA SILVA

Ocratoxina A e aflatoxinas em pimenta preta (*Piper nigrum* L.) – ocorrência durante pré e pós-colheita e identificação de espécies fúngicas toxigênicas

CAMPINAS

2024

ADRIANA RAQUEL PERSSON DA SILVA

Ocratoxina A e aflatoxinas em pimenta preta (*Piper nigrum* L.) – ocorrência durante pré e pós-colheita e identificação de espécies fúngicas toxigênicas

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Liliana de Oliveira Rocha

Coorientadora: Dr^ª. Beatriz Thie Iamanaka

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA
ADRIANA RAQUEL PERSSON DA SILVA, E ORIENTADA PELA
PROFA. DRA. LILIANA DE OLIVEIRA ROCHA

CAMPINAS

2024

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

P432o Persson da Silva, Adriana Raquel, 1987-
Ocratoxina A e aflatoxinas em pimenta preta (*Piper nigrum* L.) - ocorrência durante pré e pós-colheita e identificação de espécies fúngicas toxigênicas / Adriana Raquel Persson da Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Liliana de Oliveira Rocha.
Coorientador: Beatriz Thie Iamanaka.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. *Aspergillus*. 2. Especiarias. 3. Pimenta-do-reino. 4. Micotoxinas. I. Rocha, Liliana de Oliveira. II. Iamanaka, Beatriz Thie. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Ochratoxin A and aflatoxins in black pepper (*Piper nigrum* L.) - occurrence during pre- and post-harvest and identification of toxigenic fungal species

Palavras-chave em inglês:

Aspergillus

Spices

Black pepper

Mycotoxins

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Doutora em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Liliana de Oliveira Rocha [Orientador]

Benedito Correa

Maria Antonia Calori

Maria Helena Pelegrinelli Fungaro

Josué José da Silva

Data de defesa: 19-12-2023

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-0688-7680>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7851370454025238>

FOLHA DE APROVAÇÃO

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Líliliana de Oliveira Rocha (Orientadora)
Presidente
Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Benedito Correa
Membro Titular
Universidade de São Paulo

Dra. Maria Antonia Calori
Membro Titular
Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Maria Helena Pelegrinelli Fungaro
Membro Titular
Universidade Estadual de Londrina

Dr. Josué José da Silva
Membro Titular
Instituto de Tecnologia de Alimentos

A Ata de Defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertações/Teses e na Secretaria do Programa de Pós-Graduação

DEDICATÓRIA

“Em tudo somos atribulados, mas não angustiados;
perplexos, mas não desanimados.
Perseguidos, mas não desamparados;
abatidos, mas não destruídos;

Porque a nossa leve e momentânea tribulação produz para nós um peso eterno de glória mui
excelente (...)

Não atentando nós nas coisas que se veem, mas nas que se não veem;
porque as que se veem são temporais, e as que se não veem são eternas”.

II Coríntios 4: 8-9; 17-18

Dedico ao meu pai Elias (*in memoriam*), que sempre incentivou meus estudos e meu aprimoramento profissional sem medir esforços, e ficaria muitíssimo orgulhoso com a conclusão deste trabalho e de ver sua filha se tornando Doutora.

Soli Deo Gloria

AGRADECIMENTOS

Ao meu zeloso Senhor, pois sem Ele eu não teria chegado até aqui. Agradeço também a Ele pela vida de todos que de alguma forma contribuíram com a realização deste trabalho. Que Deus os retribua de bênçãos.

À minha Família, minha base, meu porto seguro, minha alegria genuína.

À minha Orientadora Liliana O. Rocha pela disposição, atenção e auxílio.

À minha Coorientadora Beatriz T. Iamanaka, pela paciência, ensinamentos, apoio em tudo, disposição e atenção sempre que precisei.

À Maria Helena Fungaro pelos ensinamentos, ajuda e suporte na análise molecular.

Ao Josué J. Silva, pelos ensinamentos, suporte e contribuições.

A toda Equipe do laboratório de Microbiologia do Ital – entre funcionárias (incluindo Silvia Morelli) e alunos de Pós -, pelo companheirismo e ajuda. São profissionais admiráveis; verdadeiras joias raras.

À amiga Ligia M. Martins, que nos momentos alegres e nos difíceis pude contar com ela sempre.

À Josiane B. Rezende e Laís Ono, que, sem perceberem, me ensinaram a ver meu trabalho com mais leveza, sem tanta pressão e cobrança comigo mesma.

Às colegas Taynara Soto, Fernanda Rodrigues e Rafaela, pela companhia agradável e ajuda no dia a dia do laboratório.

Aos Produtores e Cooperativas de São Mateus/ES, especialmente ao Pedro Sacconi e Doriedson Magiero, que muito receptivos e hospitaleiros nos receberam e disponibilizaram as amostras para a pesquisa.

Aos Professores do Programa de Pós-graduação da FEA, pelo tempo despendido em ensinar com excelência.

A toda Equipe do Laboratório de Microbiologia de Alimentos I da FEA – entre funcionárias, alunos de Pós e estagiários -, pela ajuda e atenção quando precisei.

A toda equipe da ProVerde, em especial, Paula Speranza, Cristiane Andrade e Camila Ikari, pela compreensão e apoio financeiro.

À Banca Examinadora, pela atenção, disponibilidade e auxílio.

À FAPESP, pelo apoio financeiro à pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001

RESUMO

A pimenta-do-reino é considerada a “rainha das especiarias” e mundialmente apreciada, apresentando grande valor econômico, podendo ser utilizada de diversas formas na alimentação seja *in natura* ou processada. Como é uma especiaria usualmente seca ao sol, pode ser contaminada por fungos toxigênicos e consequentemente micotoxinas, podendo se tornar um risco à saúde de seus consumidores. A ocratoxina A (OTA), produzida principalmente por *Aspergillus westerdijkiae* e *A. carbonarius*; e as aflatoxinas (AFs), produzidas principalmente por *A. flavus* e *A. parasiticus*, têm sido relatadas em pimenta preta. Os objetivos deste trabalho foram isolar, quantificar e identificar as espécies fúngicas, toxigênicas e não toxigênicas, presentes em amostras de pimenta preta (*Piper nigrum* L.) de diferentes etapas da produção da região de São Mateus/ES, utilizando o método de plaqueamento direto dos grãos e de diluição; avaliar a produção de AFs e OTA pelos isolados; identificar espécies de *Aspergillus* section *Flavi*, *A.* section *Nigri* e *A.* section *Circumdati* através da análise molecular; e determinar os níveis de AFs e OTA presentes nas amostras utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detector de fluorescência. No total foram obtidos 923 isolados e os grupos/espécies mais abundantes encontrados nas pimentas foram: ser. *Nigri*, fungos dematiáceos, *Fusarium* sp., *A. flavus* Group, *A. tamarii*, ascomicetos, *A. chevalieri*, *A. carbonarius* e *A. pallidofulvus*; enquanto no solo a maior frequência foi de fungos dematiáceos (100%) e *Fusarium* spp. (90%). Seis por cento dos *A.* section *Nigri* e 23% dos *A.* section *Circumdati* produziram OTA e 26,1% dos *A.* section *Flavi* produziram AFs. Apesar disto, das 94 amostras de pimentas analisadas, apenas 6,4% estavam contaminadas com OTA (média de 9,4 µg/kg) e 2% com AFs (média de 1,2 µg/kg).

Palavras-chave: *Aspergillus*, especiarias, pimenta-do-reino, micotoxinas

ABSTRACT

Black pepper is considered the "king of spices" and it is appreciated worldwide, presenting great economic value, and can be used in different ways in food, whether *in natura* or processed. As it is usually dried in the sun, it can be contaminated by toxigenic fungi and consequently mycotoxins, which can become a health risk to its consumers. Ochratoxin A (OTA), mainly produced by *Aspergillus westerdijkiae* and *A. carbonarius*; and aflatoxins (AFs), mainly produced by *A. flavus* and *A. parasiticus*, have been reported in black pepper. The objectives of this work were to isolate, quantify and identify the fungal species, toxigenic and non-toxigenic, present in samples of black pepper (*Piper nigrum* L.) from different stages of production in the region of São Mateus/ES, using the direct plating method for grains and dilution; to evaluate the production of AFs and OTA by the isolates; to identify representatives of *Aspergillus* section *Flavi*, *A.* section *Nigri* and *A.* section *Circumdati* species through molecular analysis; and to determine the levels of AFs and OTA present in the samples using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with fluorescence detector. A total of 923 isolates were obtained and the most abundant groups/species found in peppers were: ser. *Nigri*, demateaceous fungi, *Fusarium* sp., *A. flavus* Group, *A. tamarii*, Ascomycetes, *A. chevalieri*, *A. carbonarius* and *A. pallidofulvus*; while in the soil the highest frequency was dematiaceous fungi (100%) and *Fusarium* spp. (90%). Six percent of *A.* section *Nigri* and 23% of *A.* section *Circumdati* produced OTA and 26.1% of *A.* section *Flavi* produced AFs. Despite this, of the 94 pepper samples analyzed, only 6.4% were contaminated with OTA (average of 9.4 µg/kg) and 2% with AFs (average of 1.2 µg/kg).

Keywords: *Aspergillus*, spices, black pepper, mycotoxins

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produção de pimenta (<i>Piper</i> spp.) pelos maiores países produtores em 2021, em toneladas.....	20
Figura 2. A. Exemplar de um tutor vivo (Gliricídia). B. Preparação da área de plantação com tutores mortos.....	31
Figura 3. A. Cultivo de pimenta-do-reino (Pipericultura) em São Mateus (ES) com tutor morto. B. Espiga de pimenta-do-reino na maturidade ideal (início do amarelecimento) para colheita dos frutos destinados a produção de pimenta preta.....	32
Figura 4. A. Espigas após colheita. B. Debulhador manual.....	33
Figura 5. A. Secagem em terreiro. B. Secagem em estufa.....	35
Figura 6. Representação de secagem feita em jirau.....	36
Figura 7. A. Secador de fogo direto. B. Secador de fogo indireto, com escape de fumaça antes do tambor de secagem.....	37
Figura 8. Fluxograma das etapas de produção da pimenta-do-reino preta (<i>Piper nigrum</i> L.).....	38

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1. Dados (em toneladas) referentes aos principais países produtores e exportadores de pimenta preta em 2019.....	21
Quadro 1. Resumo dos principais trabalhos referentes à contaminação de pimenta preta por aflatoxinas totais (AFs) e aflatoxina B1.....	28
Quadro 2. Resumo das principais pesquisas referentes à contaminação de pimenta preta por OTA.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFs	Aflatoxinas totais
AFB1	Aflatoxina B ₁
AFB2	Aflatoxina B ₂
AFG1	Aflatoxina G ₁
AFG2	Aflatoxina G ₂
AFPA	<i>Aspergillus flavus-parasiticus</i> Agar
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
a _w	Atividade de água
BLASTn	<i>Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool</i>
CAC	<i>Codex Alimentarius Commission</i>
CCCF	<i>Codex Committee on Contaminants in Foods</i>
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CIA	Coluna de Imunoafinidade
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CNNPA	Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
CREA	<i>Creatine Sucrose Agar</i>
CY20S	<i>Czapek Yeast extract agar with 20% Sucrose</i>
CYA	<i>Czapek Yeast Extract Agar</i>
DG18	<i>Dichloran 18% Glycerol Agar</i>
DRBC	Ágar Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol
EC	<i>European Commission</i>
ES	Espírito Santo
ESA	<i>European Spice Association</i>
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INCAPER	Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural
IPC	<i>International Pepper Community</i>
JECFA	<i>The Joint WHO/FAO Expert Committee on Food Additives</i>
LOD	<i>Limit Of Detection</i>

LOQ	<i>Limit Of Quantification</i>
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MEA	<i>Malt Extract Agar</i>
MY50G	<i>Malt Yeast Extract 50% Glucose Agar</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OTA	Ocratoxina A
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PTWI	<i>Provisional Tolerable Weekly Intake</i>
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
t	Toneladas
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UR	Umidade Relativa
UV	Ultravioleta
WHO	<i>World Health Organization</i>
YESA	<i>Yeast Extrat Sucrose Agar</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	16
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. OBJETIVOS GERAIS.....	17
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1 Pimenta-do-reino preta	18
3.1.1 Origem.....	18
3.1.2 Aspectos gerais e variedades culturais	18
3.1.3 Propriedades da pimenta preta e seus derivados	19
3.2. Cenário econômico	20
3.3. Crescimento fúngico e produção de micotoxinas	22
3.4. Gênero <i>Aspergillus</i>	22
3.5. Micotoxinas	23
3.5.1. Aflatoxinas	23
3.5.2 Ocratoxina A	24
3.5.3. Regulamentação brasileira	25
3.5.4. Regulamentação internacional	26
3.6. Contaminantes fúngicos da pimenta preta	26
3.7. Contaminação da pimenta preta por Aflatoxinas e Ocratoxina A	27
3.8. Produção de pimenta-do-reino preta (<i>Piper nigrum</i> L.)	30
3.8.1. Cultivo (Pipericultura).....	30
3.8.2. Colheita.....	32
3.8.3. Processo de beneficiamento	33
3.8.4. Armazenamento.....	37
3.8.5. Classificação e parâmetros de qualidade	38
CAPÍTULO I - Micobiota da pimenta preta.....	41
Resumo	42
1. Introdução.....	43
2. Materiais e Métodos	44
3. Resultados e Discussão.....	49
4. Conclusão	59
5. Referências	60

CAPÍTULO II Ocorrência de fungos ocratoxigênicos e de ocratoxina A em pimenta preta...	65
Resumo	66
1. Introdução.....	67
2. Materiais e Métodos	68
3. Resultados e Discussão.....	74
4. Conclusão	87
5. Referências.....	87
CAPÍTULO III Ocorrência de fungos aflatoxigênicos e aflatoxinas em pimenta preta	93
Resumo	94
1. Introdução.....	95
2. Materiais e Métodos	97
3. Resultados e Discussão.....	103
4. Conclusão	114
5. Referências	115
7. DISCUSSÃO GERAL.....	120
8. CONCLUSÃO GERAL	121
9. REFERÊNCIAS	122

1. INTRODUÇÃO GERAL

A presença de fungos em alimentos e grãos armazenados gera uma insegurança quanto à saúde da população como acontece com a pimenta-do-reino preta, que tem baixa atividade de água e é habitualmente seca ao sol, logo tem grande propensão à infecção por fungos xerofílicos toxigênicos. Tais espécies e outros fungos são capazes de produzir metabólitos secundários que podem ser extremamente tóxicos e nocivos à saúde humana e de outros animais, muitas vezes com efeitos mutagênicos, teratogênicos e carcinogênicos (JAYASHREE; SUBRASMANYAM, 2000; PITT, 2000; SCHATZKI; ONG, 2001; BAYMAN; BAKER; MAHONEY, 2002).

Dadas estas características da pimenta preta, em 2016, o *Codex Committee on Contaminants in Foods* (CCCF), a introduziu no grupo 1 da lista das especiarias preferenciais (juntamente com *chilli*/páprica, gengibre, noz-moscada e cúrcuma) para detecção de ocratoxina A, aflatoxina B₁ e aflatoxinas totais; objetivando estabelecer níveis máximos (MLs) para tais micotoxinas em especiarias, a fim de facilitar o comércio justo e também proteger a saúde do consumidor. Isso porque os níveis máximos para várias micotoxinas em especiarias variam amplamente em todo o mundo e a falta de harmonização afeta o comércio global destes produtos (CCCF, 2016).

Com isso, todos os estágios da produção de pimenta incluindo colheita, secagem e armazenamento, necessitam ser controlados adequadamente a fim de diminuir a contaminações por micro-organismos, pois conforme fatores como temperatura, teor de umidade do alimento e umidade relativa do ar, há o favorecimento do desenvolvimento de fungos potencialmente toxigênicos, que podem infectar a matriz e produzir micotoxinas (PITT; HOCKING, 2009).

Devido à pimenta-do-reino ser uma especiaria amplamente utilizada na alimentação e pelo fato dos estudos sobre o tema serem escassos no país, apesar de ser um dos principais produtores mundiais de pimenta preta, é de imensa importância um estudo mais aprofundado rastreando as possíveis e principais fontes de contaminação, para analisar a qualidade destes produtos consumidos no Brasil e destinados à exportação. Sendo assim, o presente estudo avaliou a presença de fungos toxigênicos, identificou as espécies por técnicas moleculares, e determinou níveis ocratoxina A e aflatoxinas em amostras de pimenta-do-reino preta nas diferentes etapas de processamento e diferentes técnicas de secagem; diferentemente da maioria dos trabalhos em que as amostras de análise são pimentas prontas para consumo provenientes de mercados.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a contaminação por fungos e micotoxinas (aflatoxinas e ocratoxina A) em amostras de pimenta preta de diferentes etapas do processamento, do campo até o armazenamento.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Medir a atividade de água das matrizes;
- Isolar, quantificar e identificar (morfologicamente) fungos filamentosos das amostras;
- Realizar a identificação molecular de representantes dos grupos morfológicos isolados da pimenta preta;
- Analisar o potencial para produção de aflatoxinas pelos isolados de *Aspergillus* section *Flavi* e ocratoxina A pelos isolados de *A.* section *Circumdati* e *A.* section *Nigri*;
- Detectar e quantificar os níveis de ocratoxina A e aflatoxinas nas amostras e se cumprem com os limites das resoluções e regulamentações nacionais e internacionais (produto final – seco e armazenado);
- Otimizar os métodos de Detecção e Quantificação de aflatoxinas (com derivatização pós-coluna) e ocratoxina A nas amostras utilizando *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Pimenta-do-reino preta

3.1.1 Origem

A pimenta-do-reino, conhecida no mundo todo como pimenta preta, é nativa da Índia, sendo produzida na costa ocidental da Índia, de onde seu cultivo se espalhou por outras regiões. A pimenta preta foi a primeira especiaria oriental introduzida no mundo ocidental e era bem conhecida pelos romanos e gregos. Na idade média a pimenta preta assumiu grande importância na Europa (BONTEMPO, 2007; RAVINDRAN; KALLUPURACKAL, 2012). Introduzida no Brasil pelos portugueses no século XVII, primeiramente na Bahia, só se estabeleceu como cultivo agrícola a partir de 1933 no estado do Pará, com a introdução do cultivar Cingapura por imigrantes japoneses em Tomé Açu e em 1950 o Brasil alcançou a autossuficiência (CONAB, 2015).

Atualmente, entre os tipos produzidos de pimenta, a pimenta-do-reino é considerada como “*King of peppers*” (“rei das pimentas”), a mais popular e mais usada no mundo (BONTEMPO, 2007; RAVINDRAN; KALLUPURACKAL, 2012).

3.1.2 Aspectos gerais e variedades culturais

A pimenta preta é o fruto maduro de *Piper nigrum* L., uma espécie trepadeira, perene, de região tropical, pertencente à família Piperaceae, ordem Piperales e classe das Dicotiledôneas (EMBRAPA, 2004). Na floração a pimenteira produz amentilhos/inflorescência do tipo espiga, o fruto é uma drupa de semente única, mas é frequentemente chamada de baga; é séssil, pequeno, geralmente globular (medindo de 4 a 6 mm de diâmetro), com pericarpo carnoso e endocarpo duro (RAVINDRAN; KALLUPURACKAL, 2012).

As pimenteiras são consideradas resistentes às pragas, porém podem sofrer doenças como podridões causadas por fungos como *Fusarium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia* e *Sclerotium*; por conta disso, a rotação de cultura é recomendável para evitar a uniformidade genética com o uso de apenas um cultivar. No Brasil, os principais cultivares utilizados na produção são: Bragantina, Kottanadan-1, Cingapura, APRA, Guajarina, Iaçará-1 e Kuthiravally (IAC, 2014; LEMOS; TREMACOLDI; POLTRONIERI, 2014). O principal cultivar plantado no Espírito Santo é o Bragantina correspondendo a mais de 90% da área cultivada no estado, e pelo fato

de não existirem variedades adaptadas a climas mais amenos há uma concentração dos cultivos no norte capixaba (região mais quente) (SILVA; SECUNDINO, 2016).

3.1.3 Propriedades da pimenta preta e seus derivados

Os condimentos são utilizados pelo mundo todo primordialmente para acrescentar ou intensificar o sabor aos alimentos, podendo ou não ter benefício nutricional e, também, servindo como conservantes, em virtude de suas propriedades antioxidantes, pois a degradação oxidativa dos lipídios é a principal razão para a rápida deterioração dos produtos alimentícios (CNNPA, 1978; RAVINDRAN; KALLUPURACKAL, 2012). Através do processamento industrial da pimenta preta, três produtos são comumente produzidos: oleorresina, piperina e óleo de pimenta. A oleorresina contém os fatores de sabor (óleos voláteis) e pungência (principalmente atribuída ao alcaloide piperina), e é um dos maiores produtos comercializados de pimenta (SRINIVASAN, 2007).

Sendo assim, a pimenta é utilizada na culinária e na indústria de alimentos para os seguintes fins: aromatizante, mascaramento/desodorização, pungência, corante e antioxidante/conservante. Tanto especiarias moídas quanto óleos e oleorresinas são utilizados na indústria de alimentos processados, dependendo da conveniência (RAVINDRAN; KALLUPURACKAL, 2012).

Sasidharan e Menon (2010) demonstraram a atividade antimicrobiana dos óleos de pimenta-do-reino fresca e seca e óleo de suas folhas contra *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Trichoderma* spp., *Aspergillus niger*, *Pencillium* spp. e *Saccharomyces cerevisiae*. Além disso, Annis et al. (2000) evidenciaram que um composto bioativo (cp2) do extrato da pimenta preta foi capaz de inibir a síntese de aflatoxina B1 por *Aspergillus parasiticus*.

Outro aspecto interessante é que a pimenta preta proporciona propriedades funcionais sendo largamente utilizada na medicina indiana. Tais propriedades incluem: propriedades analgésicas, antipiréticas, anti-inflamatórias, termogênicas, afrodisíacas, digestivas, diuréticas, antissépticas, além de atividades quimiopreventiva e antioxidante. Também pode ser usada para diferentes problemas gástricos, além de problemas respiratórios incluindo resfriado e asma (SRINIVASAN, 2007; AHMAD 2012).

Ademais a pimenta e a piperina aumentam a biodisponibilidade de medicamentos, incluindo ampicilina e drogas sintéticas, além de aumentar a captação de aminoácidos dos alimentos (JOHRI et al., 1992).

3.2. Cenário econômico

Entre os anos de 1980 a 1983 o Brasil se tornou o maior produtor de pimenta-do-reino do mundo e nos anos de 1980 a 1982 e em 1984 o Brasil também liderou a exportação mundial (HOMMA, 2008).

Atualmente, a pimenta preta é cultivada em regiões tropicais principalmente Índia, Indonésia, Malásia, Sri Lanka, Tailândia, Vietnã e Camboja. Além desses países asiáticos, existe também a produção em outros países incluindo o Brasil, México e Equador. O líder do ranking em produção de pimenta preta no mundo é o Vietnã, o Brasil fica em segundo lugar e a Índia na terceira posição. A Índia também é o maior consumidor, porém, o grande consumo se dá principalmente pelo setor medicinal mais do que na alimentação. A pimenta preta é uma das principais *commodities* de exportação em todos os países produtores e é a especiaria mais difundida (FAO, 2021). O consumo aumentou ao longo das décadas, crescimento atribuído ao aumento de restaurantes no mundo e de *fast food*. A Alemanha, EUA, Marrocos e Vietnã são os maiores importadores de pimenta preta brasileira (IPC, 2020).

Em 2022 o Brasil produziu 128.331 toneladas de pimenta (*Piper* spp.). O mundo teve uma área colhida de 689.336 hectares e uma produção mundial de 812.673 toneladas. A Ásia correspondeu à 69,3% da produção mundial, seguida das Américas (18%) e depois pela África (12,7%). Os 5 maiores produtores mundiais em 2022 foram Vietnã (272.234 t), Brasil (128.331 t), Indonésia (81.962 t), Burkina Faso (76.855 t) e Índia (64.204 t), nesta ordem, conforme figura 1 (FAO, 2023).

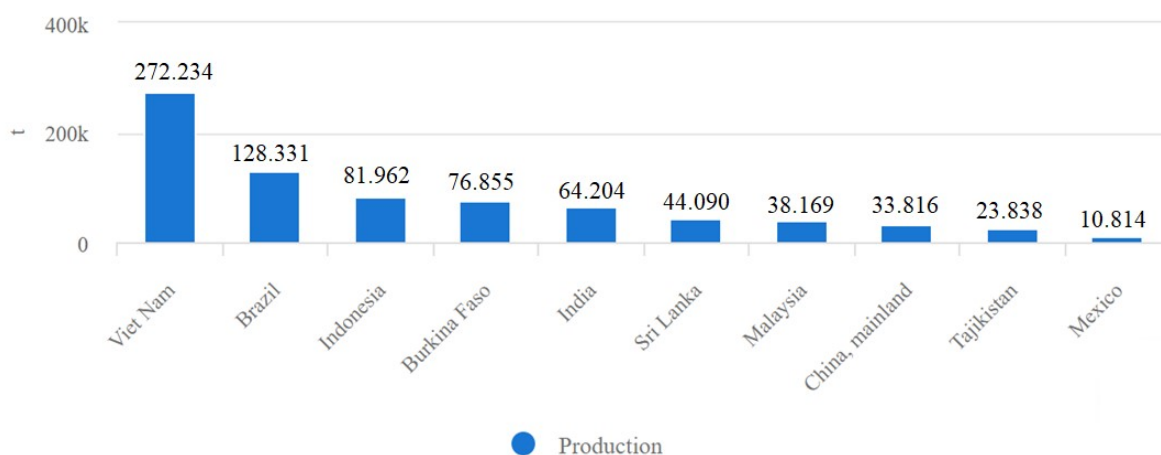


Figura 1. Produção de pimenta (*Piper* spp.) pelos maiores países produtores em 2022, em toneladas (FAO, 2023).

Tais dados da FAO divergem um pouco se comparados com os dados apresentados pelo *International Pepper Community* - IPC (2020) em 2019, segundo tabela 1, provavelmente devido a este considerar apenas a pimenta-do-reino preta e aquele considerar todas as espécies de *Piper* spp. (incluindo a pimenta-do-reino branca).

Tabela 1. Dados (em toneladas) referentes aos principais países produtores e exportadores de pimenta preta em 2019 (IPC, 2020).

País	Estoque inicial (t)	Produção (t)	Importação (t)	Consumo interno (t)	Exportação (t)
Vietnã	38.334	239.200	29.396	7.565	258.303
Brasil	12.939	76.000	230	6.720	81.289
Índia	21.679	46.500	21.457	56.260	12.080
Indonésia	5.599	30.000	585	15.250	18.169
Malásia	21.187	25.116	1.500	6.690	7.856
Sri Lanka	6.880	21.934	153	11.500	7.657
Camboja	4.502	16.586	0	1.000	17.000
Tailândia	705	5.000	3.700	8.500	200
Equador	1.001	5.000	100	1.000	4.000
Madagascar	252	4.000	0	1.500	2.000
China	320	1.980	39.150	39.750	0

No Brasil, entre os anos de 2017 e 2018 o estado do Espírito Santo ultrapassou o Pará e se tornou o maior produtor nacional de pimenta-do-reino. Ademais, São Mateus (ES) é o município que sozinho concentra a maior produção de pimenta-do-reino no Brasil (estimativamente 28% da produção nacional), com produção de 21.285 toneladas em 2019 (IBGE, 2019).

A cadeia produtiva envolve pequenos e grandes produtores que cultivam e beneficiam a pimenta, que é vendida para atravessadores ou exportadores. A maior parte da pimenta produzida no Brasil tem como destino o mercado externo, e 99% da pimenta exportada são do tipo preta (SILVA; SECUNDINO, 2016). A competitividade no mercado internacional está diretamente relacionada à qualidade e à inocuidade da pimenta; portanto, alterações nas propriedades sensoriais e contaminações afetam diretamente sobre o seu valor de mercado (GRACIANO; ATUI; DIMOV, 2006). O não atendimento às exigências do mercado internacional resulta em prejuízos econômicos que incluem desde a redução do valor pago pelo produto até a rejeição e devolução de lotes (BOVAY, 2016).

Com este objetivo e procurando o progresso do comércio e da qualidade desta especiaria, está vigente no estado do ES, a lei nº 10.582, de 11 de outubro de 2016, que incentiva a

produção de pimentas de qualidade, comprometendo-se com uma maior segurança deste alimento para comercialização interna e exportação (ESPÍRITO SANTO, 2016).

3.3. Crescimento fúngico e produção de micotoxinas

Os fungos estão amplamente disseminados no ar, solo, água, plantas, poeira e matéria orgânica; pois apresentam grande versatilidade para crescer em substratos e condições que outros microrganismos não são capazes de utilizar. Com isso, alimentos de origem vegetal e animal podem vir a contaminar-se com variados fungos (PRADO et al., 2008).

Múltiplos fatores influenciam o crescimento fúngico e a possível produção de micotoxinas (pelos fungos toxigênicos) em muitos produtos alimentícios, como, por exemplo, fatores intrínsecos (a_w , pH, composição química, potencial de oxido-redução, interações entre os microrganismos e presença de fatores antimicrobianos naturais) e fatores extrínsecos (temperatura do ambiente, atmosfera que envolve o alimento e umidade relativa do ar), sendo que estes fatores atuam de forma combinada e não isoladamente. Assim, a atividade de água e a temperatura são os dois fatores fundamentais neste processo (PITT; HOCKING, 2009). Isto pode ocorrer com muitas especiarias que são produzidas em regiões tropicais, pois apresentam altas temperaturas, precipitação e UR do ar. Ademais, as especiarias habitualmente ficam no solo para secagem a céu aberto, onde os aspectos climatológicos podem contribuir com o desenvolvimento de fungos toxigênicos e a produção de micotoxinas (PRADO et al., 2008).

Lembrando que a presença do fungo no alimento não necessariamente indica também a presença de micotoxinas, devido a todos os fatores mencionados anteriormente; e o inverso também é verdadeiro, pois as micotoxinas podem ser detectadas no alimento mesmo após a destruição dos fungos que as produziram (IAMANAKA; OLIVEIRA; TANIWAKI, 2010).

3.4. Gênero *Aspergillus*

As espécies de *Aspergillus* são os fungos que apresentam maior abrangência em todo o mundo, possivelmente pelo fato de não serem muito seletivos perante as condições de crescimento abióticas. Isto porque podem sobreviver e crescer em baixa atividade de água ($a_w < 0,85$) (xerofílicos) e em uma extensa faixa de temperatura (6 a 55 °C) (WILLIAMS; HALLSWORTH, 2009). A propagação de espécies deste gênero pode ainda ser explicada por se disseminar de forma muito eficiente. Os esporos dos *Aspergillus* estão entre as estruturas fúngicas mais abundantes no ar, permitindo dispersões longínquas (BENNETT, 2010).

As colônias de *Aspergillus* frequentemente crescem rápido, possuem uma grande variedade de cores (rosas, brancas, amarelas, verdes, pretas e castanhas), e geralmente possuem inúmeros conidióforos com vesícula na terminação. As fiálides nascem das métulas (biseriados) ou das vesículas (uniseriados). Sendo assim, a métula (se presente), as fiálides, a vesícula e os conídios compõem a cabeça conidial. Os conídios ou esporos assexuais podem exibir ornamentos e variados formatos podendo ser pigmentados ou hialinos. Tais particularidades ajudam a identificar cada espécie (SAMSON, et al., 2010).

A taxonomia de *Aspergillus* é primariamente baseada em critérios morfológicos e dados de sequência de DNA, incluindo o uso dos marcadores de DNA recomendados como a calmodulina (CaM) para *Aspergillus*. De acordo com Houbroken et al. (2020), *Aspergillus* foi subdividida em seis subgêneros, 27 seções e 75 séries, totalizando 446 espécies. As seções *Circumdati* e *Nigri* são compostas atualmente por 28 espécies cada, e a seção *Flavi* por 35.

Algumas espécies são reconhecidas e notáveis por possuírem a capacidade de produzir micotoxinas em alimentos, entre elas, ocratoxina A e aflatoxinas.

3.5. Micotoxinas

As micotoxinas são comumente produzidas no fim da fase de crescimento exponencial de alguns fungos, ou seja, são metabólitos secundários de alta toxicidade, podendo ter ação teratogênica, mutagênica e carcinogênica (IARC, 2002).

Elas têm a capacidade de contaminar diversos alimentos e seus derivados, aumentando a taxa de exposição dos consumidores ao risco (BENNETT; KLICH, 2003).

3.5.1. Aflatoxinas

As aflatoxinas foram as primeiras micotoxinas conhecidas e se destacam entre elas, pois são os elementos mais teratogênicos, mutagênicos e carcinogênicos encontrados naturalmente em alimentos e rações (IARC, 2002).

As aflatoxinas podem ser produzidas por 21 espécies pertencentes aos *Aspergillus* section *Flavi* dentre elas *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* (FRISVAD et al., 2019; SINGH et al., 2020; SILVA et al., 2022); 3 espécies pertencentes aos *Aspergillus* section *Nidulantes*: *Aspergillus stellata* (FRISVAD; SAMSON; SMEDSGAARD, 2004), *A. venezuelensis* (FRISVAD; SAMSON, 2004) e *A. olivicola* (ZALAR et al., 2008); e 2 espécies

pertencentes aos *Aspergillus* section *Ochraceorosei*: *Aspergillus ochraceoroseus* e *A. rambellii* (FRISVAD; SKOUBOE; SAMSON, 2005).

As principais aflatoxinas são denominadas AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂; siglas dadas em referência às cores das micotoxinas emitidas sob luz UV a 365 nm (B para *blue* e G para *green*) e mobilidade no decorrer da cromatografia. A AFB₁ é a mais tóxica de todas, considerada um dos carcinógenos naturais mais potentes que existem (PITT, 2000; BENNETT; KLICH, 2003; FREIRE et al., 2007); e as aflatoxinas são classificadas no grupo 1 pela IARC - *International Agency for Research on Cancer* (2002) ou seja, são compostos carcinógenos para humanos. Além disso, outro tipo de aflatoxina é conhecido como M1, sendo a forma hidroxilada e menos tóxica da AFB₁. Ela está associada ao leite e seus derivados, através da contaminação das rações animais (EATON; GROOPMAN, 1994; IARC, 2002).

As aflatoxinas foram encontradas em diversos alimentos como trigo, milho, amendoim, pimentas e pimentões, cereais, rações animais, cevada e cerveja (HOLLINGER; EKPERIGIN, 1999; JAIMEZ et al., 2000; STROKA; van OTTERDIJK; ANKLAM, 2000; CHIAVARO et al., 2001; ZINEDINE et al., 2006; JESWAL; KUMAR, 2015).

3.5.2 Ocratoxina A

Outra classe de micotoxina de grande importância quanto à segurança do alimento é a ocratoxina A. Segundo a IARC, é classificada no grupo 2B – possível carcinógeno humano (IARC, 1993). Vinte espécies de *Aspergillus* section *Circumdati*, entre elas *Aspergillus ochraceus*, *A. steynii* e *A. westerdijkiae* (VISAGIE et al., 2014) e 4 espécies de *Aspergillus* section *Nigri* (*Aspergillus niger*, *A. welwitschiae*, *A. carbonarius*, *A. sclerotioniger*) são ocratoxigênicas (SAMSON et al., 2007), como também algumas espécies de *Penicillium* (*P. verrucosum* e *P. nordicum*) (LARSEN; SVENDSEN; SMEDSGAARD, 2001) e *Aspergillus* section *Flavi* (*Aspergillus alliaceus*, *A. neoalliaceus*, *A. vandermerwei* e *A. magaliesburgensis* (FRISVAD et al., 2019; VISAGIE; HOUBRAKEN, 2020). Considerando que no geral as espécies de *Penicillium* são capazes de produzir OTA em climas frios/temperados e as espécies de *Aspergillus* estão mais associadas a climas tropicais.

A OTA foi originalmente isolada em 1965 partindo de uma cepa de *Aspergillus ochraceus*, todavia nem todos os isolados da espécie são produtores (PITT, 1987; ABARCA et al., 1994; PITT, 2000; LARSEN; SVENDSEN; SMEDSGAARD, 2001; FRISVAD et al., 2004; SAMSON et al., 2010).

A ocratoxina A é um metabólito nefrocarcinógeno e nefrotóxico (LARSEN; SVENDSEN; SMEDSGAARD, 2001), considerada um potente cancerígeno em camundongos e ratos (POHLAND, 1993). Ela pode ser encontrada em múltiplos produtos vegetais e animais como cereais armazenados (aveia, cevada, centeio e trigo), além de uvas, cebolas, pimentas pretas e vermelhas, páprica e em outros diversos alimentos (MARQUARDT; FROHLICH, 1992; VAN EGMOND; DEKKER, 1995; PITT, 2000; ALMELA et al., 2007; JALILI, 2010; OZBEY; KABAK, 2012; RAMESH; JAYAGUDAR, 2014; JALILI, 2016; KABAK; DOBSON, 2017).

Ela tem sido crucial para as indústrias suína e avícola; pois, os vestígios de OTA podem atingir o organismo humano pela cadeia alimentar por meio de produtos cárneos e sangue (HOLMBERG et al., 1991; ABARCA et al., 1994). A ocratoxina A pode estar presente no leite de mamíferos (incluindo humanos) e em amostras de sangue (BREITHOLTZ-EMANUELSSON et al., 1993), e sua eliminação do organismo humano é extremamente lenta (PETZINGER; WEIDENBACH, 2002).

O JECFA (*The Joint WHO/FAO Expert Committee on Food Additives*) estabeleceu a Ingestão Semanal Tolerável Provisória (PTWI) de 100 ng/kg peso corpóreo para essa micotoxina, correspondendo a 14 ng/kg de peso corpóreo ao dia. Após uma reavaliação da Comissão Europeia *Scientific Committee for Food* (SCF) concluiu-se que o ideal é diminuir a exposição à OTA o máximo possível, assegurando que a exposição fique na extremidade mais baixa do intervalo de doses diárias admissíveis de 1,2 a 14 ng/kg pc (CAC, 1998).

Por causa dos riscos a União Europeia estabeleceu limites máximos toleráveis destas micotoxinas em diversos condimentos, para que o alimento seja considerado seguro à saúde do consumidor final.

3.5.3. Regulamentação brasileira

A Resolução RDC N° 722 e IN N° 160, Anexo II de 01 de Julho de 2022 da ANVISA dispõem sobre os limites máximos tolerados (LMT) de contaminantes (incluindo micotoxinas) em alimentos. Os limites para pimentas pretas e brancas (além de outras especiarias) são de 30 µg/Kg para ocratoxina A e 20 µg/Kg para aflatoxinas totais (BRASIL, 2021b; BRASIL, 2021a).

A Resolução também recomenda que os níveis de micotoxinas devem ser os menores possíveis, devendo ser utilizadas tecnologias e boas práticas na produção, de maneira a impedir que um produto contaminado seja liberado para o comércio.

3.5.4. Regulamentação internacional

A União Europeia estabeleceu o limite de 20 µg/Kg tanto para aflatoxinas totais quanto para OTA em pimentas pretas (CAC, 2017).

O Vietnã, maior país produtor, adota o limite de 10µg/Kg para aflatoxinas totais e AFB₁, porém para OTA segue o limite de 30µg/Kg, igual no Brasil (USDA, 2013).

3.6. Contaminantes fúngicos da pimenta preta

Pesquisas descrevem como contaminantes de pimentas pretas os gêneros *Aspergillus*, *Eurotium* (*Aspergillus* teleomorfos), *Rhizopus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Chaetomium*, *Emmericella*, *Fusarium*, *Scopulariopsis*, *Phoma*, *Trichoderma*, *Alternaria*, *Wallemia*, entre outros; sendo que as espécies *Aspergillus niger* e *A. flavus* são predominantes na maioria dos relatos (FLANNIGAN; HUI, 1976; FREIRE; KOZAKIEWICZ; PATERSON, 2000; BOKHARI, 2007; HASHEM; ALAMRI, 2010; EZEKIEL et al., 2013; RUADREW; CRAFT; AIDOO, 2013; TOMA; ABDULLA, 2013; AZZOUNE et al., 2015; JESWAL; KUMAR, 2015; JACXSENS; YOGENDRARAJAHA; MEULENAER, 2016; GARCIA; MALLMANN; COPETTI, 2018; MOTEVALIBASHI et al., 2018; PERSSON DA SILVA et al., 2021).

Muitos dos trabalhos costumam analisar vários tipos de condimentos diferentes com um número reduzido por tipo de amostra, ou seja, poucas amostras de pimenta preta. Por exemplo, Nurtjahja et al. (2019) analisaram entre outras especiarias, uma amostra de pimenta preta da Indonésia e identificaram as seguintes espécies: *Aspergillus candidus*, *A. flavus* (25% produtores de aflatoxinas), *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. sydowii*, *A. tamarii*, *A. terreus*, *Aspergillus chevalieri*, *Fusarium* sp., *Mucor* sp. e *Penicillium* sp.

Vyhnánek et al. (2018) também analisaram entre outras especiarias, 2 amostras de pimenta preta originárias do Vietnã e Índia, para detecção de DNA fúngico viável de *Aspergillus* e/ou *Penicillium*. Foram encontrados *Aspergillus penicillioides*, *Penicillium olsonii*, *Wallemia*, *Colletotrichum*, *Eurotium*, *Cyberlindnera* entre outras leveduras.

3.7. Contaminação da pimenta preta por Aflatoxinas e Ocratoxina A

A maior parte das pesquisas sobre contaminação de pimenta-do-reino preta por aflatoxinas exhibe índices de amostras positivas para aflatoxinas totais variando de 12,5% a 93%, com níveis de 0,1 a 25,2µg/Kg de contaminação (FERREIRA; MENDES; OLIVEIRA, 2004; BIRCAN, 2005; FAZEKAS; TAR; KOVÁČZ, 2005; COLAK et al., 2006; ZINEDINE et al., 2006; KURSUN; MUTLU, 2010; OZBEY; KABAK, 2012; YOGENDRARAJAH et al., 2014; BARANI; NASIRI; JARRAH, 2016; KHAZAELI et al., 2017; ZARESHAHRABADI et al., 2020), conforme Quadro 1. Duas exceções foram encontradas na literatura chegando à 84,09 µg/kg (HAMMAMI et al., 2014) e 320 µg/kg de contaminação por aflatoxinas totais (JESWAL; KUMAR, 2015).

Pesquisas também foram conduzidas sobre a ocorrência de OTA em condimentos e a maioria dos estudos encontra-se restrita a alguns países asiáticos como Sri Lanka, Índia, Turquia e Malásia. A maior parte destes trabalhos com pimenta-do-reino preta retrata porcentagens de amostras contaminadas com OTA de 17,4% a 100% e níveis de contaminação variando de 0,05-100µg/Kg (THIRUMALA-DEVI et al., 2001; JALILI; JINAP; RADU, 2010; OZBEY; KABAK, 2012; WASKIEWICZ et al., 2013; RAMESH; JAYAGOUDAR, 2014; YOGENDRARAJAH et al., 2014; JALILI, 2016; ZARESHAHRABADI et al., 2020; PERSSON DA SILVA et al., 2021), conforme quadro 2. Dois estudos encontraram níveis maiores de contaminação por OTA, um com 155 µg/kg (JESWAL; KUMAR, 2015) e outro com 197,64 µg/kg (ZARESHAHRABADI et al., 2020). Em contrapartida, Garcia, Mallmann e Copetti (2018) analisaram 15 amostras de pimentas pretas do Brasil e não detectaram contaminação por AFs nem por OTA.

Quadro 1. Resumo dos principais trabalhos referentes à contaminação de pimenta preta por aflatoxinas totais (AFs) e aflatoxina B1.

Nº amostras totais	Nº amostras com AFs	% amostras com AFs	Média (ug/Kg)	Varição (ug/Kg)	Método	Origem das amostras/ País de estudo	Referência
10	0	0 AFs	ND	ND	HPLC/FLD	Brasil/Inglaterra	Freire; Kozakiewicz; Paterson, 2000
4	3	75 B1	1,83 B1	0,20-4,2 B1	HPLC/FLD	Portugal/Portugal	Ferreira; Mendes; Oliveira, 2004
	3	75 AFs	2,76 AFs	0,35-6,6 AFs			
6	1	16,6 B1	NI	0,46 B1	HPLC/FLD	Hungria/Hungria	Fazekas; Tar; Kovács, 2005
15	4	27 AFs	NI	0,3-1,2 B1	HPLC/FLD	Turquia/Turquia	Bircan, 2005
	4			0,3-2,3 AFs			
15	14	93 AFs	0,21 AFs	Máx 0,55 AFs	HPLC/FLD	Marrocos/Itália	Zinedine et al., 2006
	7	47 B1	0,09 B1	Máx 0,30 B1			
24	8	33,3 AFs	NI	0,1-15,3 AFs	HPLC/FLD	Turquia/Turquia	Colak et al., 2006
	2	8,33 B1	NI	8,6-9,5 B1			
2	0	0 B1 e AFs	ND	ND	HPLC/FLD	Coreia do Sul/ Coreia do Sul	Cho et al., 2008
34	NI	NI	3,44 AFs	0,67-6,15 AFs	ELISA	Turquia/Turquia	Kursun; Mutlu, 2010
23	7	30,4 B1	0,20 B1	0,13-0,42 B1	HPLC/FLD	Turquia/Turquia	Ozbey; Kabak, 2012
	7	30,4 AFs	0,24 AFs	0,13-0,46 AFs			
NI	0	0 AFs	ND	ND	HPLC/FLD	Países asiáticos/Escócia	Ruadrew; Aidoo, 2013
1	1	100 AFs	NI	84,09 AFs	HPLC/FLD	Catar/Catar	Hammami et al., 2014
82	16	20 AFs	10,3 AFs	<LOQ-25,2 AFs	UPLC-MS/MS	Sri Lanka/Bélgica	Yogendrarajah et al., 2014
	8	10 B1	9,1 B1	<LOQ-17,3 B1			
55	43	78,1 AFs	320 AFs	NI	ELISA	Índia/Índia	Jeswal; Kumar, 2015
40	5	10 B1	1,09 B1	0,88-1,45 B1	HPLC/FLD	Irã/Irã	Barani; Nasiri; Jarrah, 2016
	5	12,5 AFs	2,01 AFs	1,44-3,21 AFs			
7	5	71 B1	NI	0,7-8,4 B1	HPLC/FLD	Irã/Irã	Khazaeli et al., 2017
15	0	0 B1 e AFs	ND	ND	HPLC/FLD	Brasil/Brasil	Garcia; Mallmann; Copetti, 2018
4	0	0 B1 e AFs	ND	ND	HPLC/FLD	Argélia/Argélia	Azzounne et al., 2019
20	4	20 AFs	1,53	1,17-2,47	HPLC/FLD	Irã/Irã	Zareshahrabadi et al., 2020

NI = Não informado. ND = Não detectado. <LOQ = Abaixo do Limite de Quantificação do método.

Quadro 2. Resumo das principais pesquisas referentes à contaminação de pimenta preta por OTA.

Nº amostras	Nº amostras com OTA	% Amostras com OTA	Média (ug/Kg)	Varição (ug/Kg)	Método	Origem das amostras/ País de estudo	Referência
8	0	0	ND	ND	TLC	Índia/Índia	Saxena; Mehrotra, 1989
26	14	54	NI	10-100	ELISA	Índia/Índia	Thirumala-Devi et al., 2001
6	0	0	ND	ND	HPLC/FLD	Hungria/Hungria	Fazekas; Tar; Kovács, 2005
20	15	75	2,79	0,07-13,58	HPLC/FLD	Malásia e Austrália/Austrália	Jalili; Jinap; Radu, 2010
23	4	17,4	0,34	0,87-3,48	HPLC/FLD	Turquia/Turquia	Ozbey; Kabak, 2012
9	8	88,8	16,51	NI	UPLC-MS/MS	Polônia/Polônia	Waśkiewicz et al., 2013
4	4	100	NI	<5,0-5,9	HPLC/FLD	Índia/Índia	Ramesh; Jayagoudar, 2014
82	NI	NI	30,9	<LOQ-79,0	UPLC-MS/MS	Sri Lanka/Sri Lanka	Yogendrarajah et al., 2014
55	31	56,3	155	NI	ELISA	Índia/Índia	Jeswal; Kumar, 2015
30	0	0	<LOD	<LOD	HPLC/FLD	Costa do Marfim/ Costa do Marfim	Manda et al., 2016
23	10	43,5	3,31	0,70-7,64	HPLC/FLD	Irã/Irã	Jalili, 2016
15	0	0	ND	ND	HPLC/FLD	Brasil/Brasil	Garcia; Mallmann; Copetti, 2018
20	20	100	49,29	15,91 - 197,64	HPLC/FLD	Irã/Irã	Zareshahrabadi et al., 2020
60	33	55	0,79	0,05 – 13,15	HPLC/FLD	Brasil/Brasil	Persson da Silva et al., 2021

NI = Não informado

ND = Não detectado

<LOQ = Abaixo do Limite de Quantificação do método.

<LOD = Abaixo do Limite de Detecção do método.

3.8. Produção de pimenta-do-reino preta (*Piper nigrum* L.)

3.8.1. Cultivo (Pipericultura)

A pimenteira é uma planta trepadeira e exige suportes/tutores para possibilitar que ela cresça e se desenvolva. Tais tutores podem ser vivos (cultivo extensivo) (figura 2A) ou mortos (cultivo intensivo) (figura 2B). Normalmente estacas de concreto ou madeira são utilizadas como tutores mortos. Estas estacas são usualmente de madeira de lei (espécies lenhosas), que apresentam resistência ao apodrecimento, podendo ser substituídas por eucalipto tratado (EMBRAPA, 2004).

A gliricídia (*Gliricidia sepium*) vem sendo utilizada como tutor vivo viabilizando maior sustentabilidade ecológica e econômica, restringindo o uso de tutor de madeira, e, por conseguinte reduzindo o desmatamento das florestas (LEMOS; TREMACOLDI; POLTRONIERI, 2014), além da redução da evapotranspiração (otimizando o uso da água) e da necessidade de adubação e do uso de agroquímicos. Assim, há um aumento da biodiversidade promovendo o controle biológico e diminuindo a incidência de pragas e doenças, aumentando a vida útil do pimental, que pode chegar até 20 a 25 anos. Como desvantagens, há aumento dos custos de manutenção com a poda dos tutores, atraso no início de floração e redução da produtividade. Esta prática de cultivo é muito difundida na Indonésia, Índia, República Dominicana e Madagascar, porém pouco utilizada no Brasil (MENEZES et al., 2013).

No cultivo, além de um tutor, a planta necessita também de precipitação pluviométrica de 1.800 a 3.000 mm/ano, temperatura entre 23 °C e 28 °C e 80% de umidade relativa do ar (DUARTE et al., 2006; IAC, 2014).



Figura 2. A. Exemplar de um tutor vivo (Gliricídia). B. Preparação da área de plantação com tutores mortos (Próprio autor, 2019).

3.8.1.1. Fusariose em pimenta preta

Dentre as doenças fitossanitárias que acometem os pimentais (e.g., murcha-amarela, queima-do-fio e antracnose), a fusariose, ou podridão-das-raízes, é a principal delas nos pimentais do nosso país. É ocasionada por *Fusarium solani* (fase anamórfica) e *Nectria haematococca* (fase teleomórfica) (SILVA; NETO; SILVA, 2011).

Esta doença pode encurtar o tempo de vida da planta de 12 para 7 ou 6 anos em média, reduzindo a produtividade e elevando a mortandade de todas as pimenteiras em um curto espaço de tempo, pois propaga-se rapidamente entre as plantas, e não existem cultivares resistentes (LE MOS; TREMACOLDI; POLTRONIERI, 2014). Portanto, ao detectar os sintomas na lavoura devem-se arrancar as plantas infectadas e queimá-las, além da desinfecção das estacas com hipoclorito de sódio (VENTURA; COSTA, 2004; IAC, 2014).

Recomenda-se o controle preventivo como: evitar áreas próximas a pimentais doentes e fazer tratamento químico das estacas, como a utilização de fungicidas registrados para a cultura (VENTURA; COSTA, 2004; COSTA; MEDEIROS, 2011). A rotação de cultura também é uma prática recomendável, com culturas não hospedeiras dos fungos causadores das podridões (IAC, 2014).

3.8.2. Colheita

A floração ocorre no início da estação chuvosa (dezembro/janeiro, no Brasil), atingindo o pico na segunda quinzena de março. A maturação completa das espigas ocorre seis meses após a floração (DUARTE; ALBUQUERQUE, 2005; JOY; PITTAPPILLIL; JOSE, 2002). No estado do Espírito Santo a colheita é realizada durante praticamente o ano todo, com maior intensidade nos primeiros meses do ano e safrinha no meio do ano. Já no estado do Pará é realizada entre os meses de junho e novembro (EMBRAPA, 2004). Na Índia, *e.g.*, a floração ocorre no início das monções de verão, entre maio e junho, e a colheita é geralmente entre dezembro e janeiro (RAVINDRAN; KALLUPURACKAL, 2012).

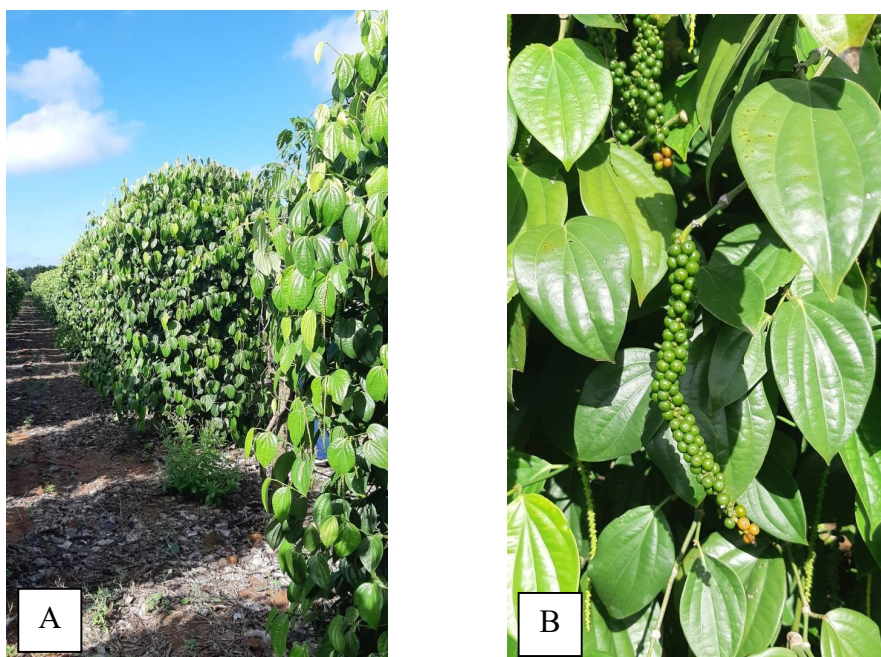


Figura 3. A. Cultivo de pimenta-do-reino (Pipericultura) em São Mateus (ES) com tutor morto. B. Espiga de pimenta-do-reino na maturidade ideal (início do amarelecimento) para colheita dos frutos destinados a produção de pimenta preta (Próprio autor, 2019).

O momento da colheita é dado quando no mínimo um fruto da espiga se torna amarelado/alaranjado (Figura 3). A colheita é feita manualmente e os cachos são colocados em sacolas ou cestas de pano pelos trabalhadores. No momento da colheita o ideal é cobrir o solo em torno de cada planta com plástico ou lona higienizados previamente, para impedir que os grãos atinjam o solo e sejam contaminados. A pimenta-do-reino colhida deve ser retirada dos sacos de colheita no mesmo dia para evitar que ocorra proliferação de fungos,

fermentação e perda de qualidade do produto (porém devido à logística, esta recomendação nem sempre é adotada); sendo aconselhável higienizar os recipientes de transporte das pimentas sempre entre uma colheita e outra para também evitar qualquer contaminação. Ademais, é de grande importância evitar que excretas humanas ou animais possam ser incorporadas em qualquer etapa da produção (EMBRAPA, 2004; SERRANO; NOVAK; LIMA, 2008).

3.8.3. Processo de beneficiamento

A depender da maturação do fruto de *Piper nigrum* L. e do processo de beneficiamento executado será alcançado um tipo diferente de pimenta. Sendo assim, é possível se obter quatro classes de pimenta-do-reino: verde, preta, vermelha e branca, definidas pela Instrução Normativa n° 10/2006 do MAPA (BRASIL, 2006).

Para obter a pimenta **verde**, a colheita é realizada quando os frutos não estão maduros e atingiram apenas 2/3 do desenvolvimento. Os frutos são arrancados das espigas de forma manual ou em debulhadores mecânicos. É feita a conservação e comercialização em salmoura a vácuo (DUARTE et al., 2006).

Para obter a pimenta **preta** os frutos são colhidos semimaduros – verdoengos (quando 1 ou 2 grãos do cacho começam a ficar amarelos) (ROSLAN; YUDIN, 2020). São debulhados (Figura 4) e secos ao sol (na maioria dos casos) durante 3-6 dias. Após estarem secos, os grãos são ventilados para remover sujidades e grãos chochos, e posteriormente, passam por peneiragem, padronização e classificação (LEMONS; TREMACOLDI; POLTRONIERI, 2014).



Figura 4. A. Espigas após colheita. B. Debulhador manual (Próprio autor, 2019).

Para obter a pimenta **vermelha**, a colheita das espigas é realizada somente depois de atingirem completa maturação, quando as cascas exibem uma textura lisa e cor avermelhada. Pode ser vendida seca, fresca ou em conserva (BRASIL, 2006).

Partindo da vermelha é possível obter a pimenta **branca**, sendo a colheita também realizada depois da completa maturação. Os frutos são lançados em tanques com água e lá permanecem durante 15-30 dias a fim de amolecer e soltar o pericarpo (a água é periodicamente trocada); ou é utilizada água corrente por 7 a 10 dias. A água é drenada e os frutos decorticados (sementes) são posteriormente lavados em água limpa e logo após secos ao sol ou em estufas, por aproximadamente três dias, não sendo recomendada a utilização de secadores com o intuito de conservar a coloração clara e o aroma. A pimenta branca também é ventilada, peneirada, padronizada e classificada, bem como a preta (EMBRAPA, 2004; RAVINDRAN; KALLUPURACKAL, 2012).

3.8.3.1. Secagem da pimenta preta

A secagem é um método de conservação de alimentos, que proporciona maior vida útil (*shelf-life*), menor peso para transporte e menor espaço para armazenamento. Consiste na remoção de umidade devido à transferência de calor e massa (SHREELAVANIYA; PANGAYARSELVI; KAMARAJ, 2017).

Dessa forma, o propósito da secagem é diminuir a umidade dos grãos, proporcionando um produto final de melhor qualidade, observando ser um estágio crítico no qual ampla contaminação pode vir a acontecer (DUARTE; ALBUQUERQUE, 2005).

O modo de secagem mais usual é o natural, em terreiros a **céu aberto** com duração de 3-6 dias, no qual a pimenta preta é despejada em lonas, para evitar o contato com o chão (Figura 5A). Para que a pimenta seque homogeneamente, ela deve ser misturada até que os grãos alcancem a umidade indicada. A ESA (*European Spice Association*) indica uma umidade dos grãos $\leq 12\%$ (ESA, 2015), e no Brasil o MAPA recomenda umidade máxima de 14% (BRASIL, 2006).

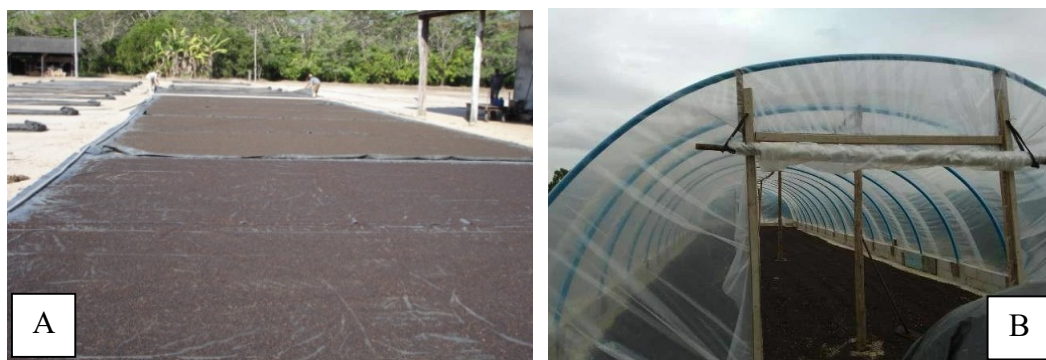


Figura 5. A. Secagem em terreiro (IBICT, 2008). B. Secagem em estufa (MFRural, 2023).

A pimenta seca passa por uma variedade de equipamentos de processamento, como peneiras mecânicas para remoção de pimentas pequenas (“cabeça de alfinete” [*sic*] ou chocha, ou seja, sem total desenvolvimento), caules, areia, poeira, matérias estranhas leves, pedras e similares. Essas operações são realizadas em máquinas como classificadores e separadores, os quais devem ser higienizados periodicamente (RAVINDRAN; KALLUPURACKAL, 2012).

Na secagem a céu aberto há risco de contaminação da pimenta por *Salmonella* spp. e coliformes termotolerantes por meio de urina e excrementos de animais que podem se aproximar e entrar na área. Diante disto, sugere-se proteger o local para impedir o acesso de animais. Durante a secagem, os grãos são continuamente remexidos no decorrer do dia, e à noite precisam de proteção contra o orvalho e a chuva. Salienta-se que os trabalhadores envolvidos na secagem devem exercitar bons hábitos de higiene e evitar circulação sobre os grãos e a lona com calçados não higienizados (DUARTE et al., 2006; PICCOLO, 2014).

Já a secagem em **estufa** permite maior proteção contra contaminantes ambientais e abrevia o tempo de secagem. A estrutura fechada previne contaminações oriundas do ambiente e deve ser cercada para evitar o acesso de pragas e animais. Ademais, a renovação de ar dentro da estufa deve ser frequente para remover a umidade dos grãos e evitar que o ambiente interno permaneça úmido. Desta forma, é necessário que haja aberturas protegidas por telas milimétricas para a remoção do ar úmido (Figura 5B) (SERRANO; NOVAK; LIMA, 2008).

Uma das alternativas para suprimir possíveis contaminações é o uso de jirau na secagem (Figura 6). É uma plataforma em tela suspensa que impede o acesso de animais e o contato dos grãos com os calçados ou os pés dos trabalhadores (além de acelerar o processo de secagem). Secadores mecânicos movidos à lenha (ou casca de macadâmia - comunicação pessoal, 2019) também podem ser utilizados para secagem rápida e mais uniforme, com

mecanismo de rotação horizontal ou vertical; ou secadores a diesel e elétricos (EMBRAPA, 2004).

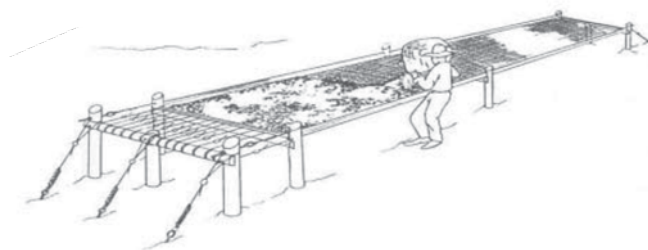


Figura 6. Representação de secagem feita em jirau (EMBRAPA, 2004).

A secagem mecânica é realizada em equipamentos onde o ar quente, oriundo de uma fonte de calor, é forçado a passar pela massa de grãos, retirando a sua umidade, o que permite ao produtor maior independência das condições climáticas e diminuição do tempo de secagem quando comparada à natural. Nos secadores com fornalha de **fogo direto**, a secagem é mais rápida (por volta de 25 horas), porém a fumaça é injetada diretamente sobre a massa de grãos, atingindo temperaturas acima de 120°C (SERRANO; NOVAK; LIMA, 2008), o que contribui para a incorporação de contaminantes químicos na pimenta, como as antraquinonas, e para a perda da qualidade sensorial em decorrência da queima dos grãos e impregnação de odor de fumaça. Após a secagem, a pimenta deve ser resfriada para garantir a remoção completa da umidade antes de ser acondicionada nas sacarias; caso contrário poderá ocorrer a proliferação de fungos (VINHA; LIMA; SECUNDINO, 2018).

A secagem mecânica em secadores que utilizam **fogo indireto** é mais aconselhada, uma vez que não ocorre contato entre a pimenta e a fumaça que sai da fornalha. A temperatura neste tipo de secagem é menor, varia entre 40 e 60°C (com duração por volta de 60 horas de secagem), o que garante maior segurança no processo. O controle da temperatura de secagem é essencial para evitar reações indesejáveis, perda de qualidades sensoriais e incorporação de substâncias tóxicas provenientes da fumaça, visto que tais componentes não podem ser eliminados em etapas posteriores ao processamento (VINHA; LIMA; SECUNDINO, 2018).

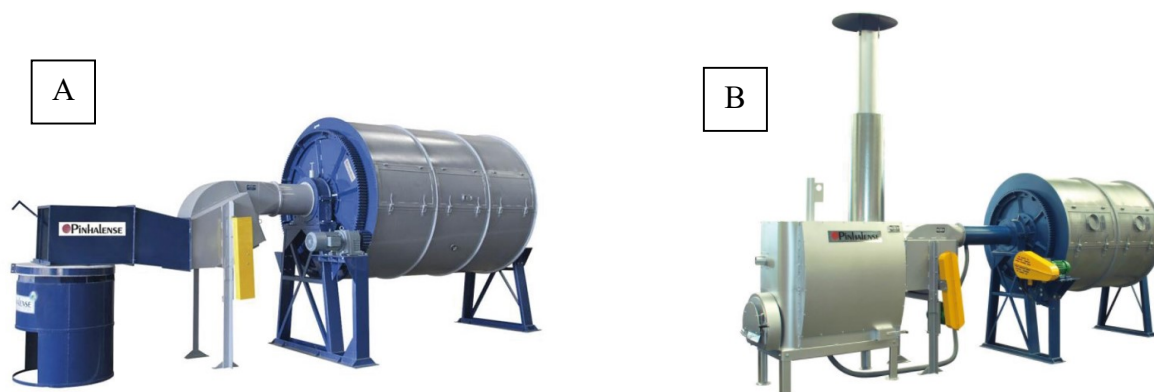


Figura 7. A. Secador de fogo direto. B. Secador de fogo indireto, com escape de fumaça antes do tambor de secagem (PINHALENSE, 2022).

3.8.4. Armazenamento

Posteriormente à secagem, as pimentas são ensacadas (preferencialmente em embalagens de material poroso como rafia) e armazenadas em área fechada e com ventilação adequada, prioritariamente em depósitos com estrutura de alvenaria, prevenindo que o produto reumidifique prolongando a conservação; nessas condições a pimenta pode ficar estocada por mais de 1 ano (LE MOS; TREMACOLDI; POLTRONIERI, 2014). Sendo assim, a sacaria deve ser armazenada sobre *pallets* e afastada da parede e do teto cerca de 30 cm para evitar condensações e favorecer a circulação do ar. Os depósitos devem estar em condições adequadas de manutenção e limpeza e não devem ser utilizados para outros fins ou para a guarda de objetos em desuso (EMBRAPA, 2004).

É fundamental que qualquer tipo de animal não consiga acessar as áreas de armazenamento (e.g., cães, gatos, morcegos, aves, ratos e camundongos) (DUARTE; ALBUQUERQUE, 2005). Isso porque a alta umidade pode acelerar as reações oxidativas promovendo o envelhecimento e resultando na deterioração dos grãos. Desse modo, os animais podem ser atraídos para dentro dos depósitos caso não estejam devidamente fechados, agindo como vetores de infecção fúngica e bacteriana da especiaria (PICCOLO, 2014). O limite seguro de a_w dos grãos recomendada pela ESA é de 0,65 (ESA, 2015).

Portanto, os estágios de colheita, secagem e armazenamento são críticos, visto que o teor de água do produto, a temperatura ambiente e a umidade relativa do ar (UR) podem causar a deterioração do alimento, promovendo o desenvolvimento de espécies fúngicas e, por conseguinte a possível produção de micotoxinas (DUARTE; ALBUQUERQUE, 2005;

PICCOLO, 2014). A figura 8 faz um compilado geral das etapas da produção de pimenta preta em forma de fluxograma.

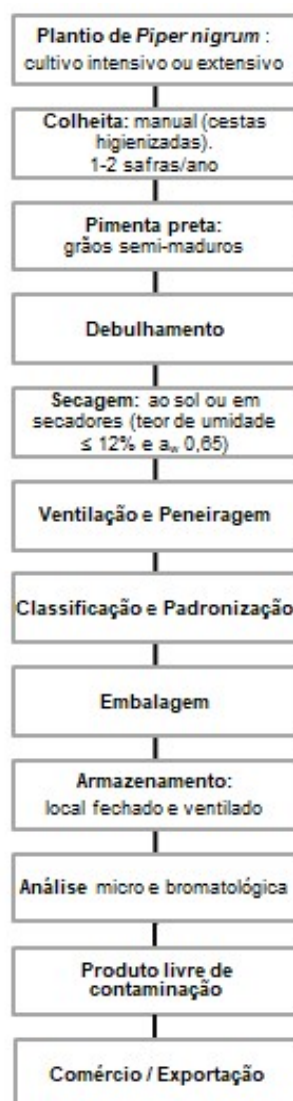


Figura 8. Fluxograma das etapas de produção de pimenta-do-reino preta (*Piper nigrum*) (DUARTE, 2004; EMBRAPA, 2004; DUARTE; ALBUQUERQUE, 2005; BRASIL, 2006; IAC, 2014; LEMOS; TREMACOLDI; POLTRONIERI, 2014; PICCOLO, 2014; ESA, 2015; BRASIL, 2019a).

3.8.5. Classificação e parâmetros de qualidade

As pimentas pretas que seguem as regulamentações vigentes de sanidade e qualidade recebem reconhecimento no mercado, aumentando o retorno financeiro para os produtores (EMBRAPA, 2004).

O MAPA qualifica a pimenta-do-reino em três categorias (Brasil Asta, Brasil 1 e Brasil 2) conforme a IN nº 10, de 15 de maio de 2006, que regulamenta o padrão de identidade e qualidade da pimenta-do-reino (BRASIL, 2006).

Estas categorias consideram os seguintes parâmetros de qualidade: matérias estranhas e impurezas, densidade mínima, grãos mofados e grãos chochos. As indústrias fazem a triagem e divisão dos grãos deste modo: a categoria "Brasil Asta" é a mais pura encontrada, são pimentas seletas e que possuem casca mais lisa; a categoria "Brasil 1" possui cascas um pouco enrugadas, maior quantidade de impurezas e grãos chochos se confrontada com a primeira; e a categoria "Brasil 2" tem a menor qualidade entre as três, porque exibe cascas enrugadas, maior quantidade de impurezas e grãos chochos, e apresentam os menores grãos (BRASIL, 2006).

Além disso, especificamente, a Resolução RDC nº 623, de 09 de março de 2022, estabelece disposições gerais para avaliar a presença de matérias estranhas macroscópicas e microscópicas que podem indicar risco à saúde humana e/ou que podem indicar falhas na aplicação de boas práticas na cadeia produtiva de alimentos e bebidas e fixar seus limites de tolerância. De acordo com esta Resolução, para pimenta-do-reino moída, é tolerado o limite de 60 fragmentos de insetos em 50g e 1 fragmento de pelo de roedor em 50g de produto (BRASIL, 2014).

Com relação aos parâmetros microbiológicos, os microrganismos que necessitam de controle são *Escherichia coli* e *Salmonella*, de acordo com a RDC nº 724 e a IN nº 161 de 01 de julho de 2022 da ANVISA (Grupo de Alimentos 18, Item a). Conforme a Instrução Normativa a pimenta deve estar isenta de contaminação por *Salmonella* (n=10, c=0, m=Aus em 25g) e *Escherichia coli* (n=5, c=2, m=10², M=5x10² por grama) (BRASIL, 2022a; BRASIL, 2022b). Além disso, é vedado o comércio de lotes que estejam acima de 2% de grãos mofados conforme a IN nº 10/2006 do MAPA (BRASIL, 2006).

Os lotes contaminados com micotoxinas acima dos limites estabelecidos (conforme tópicos 3.6.4 e 3.6.5) ou agrotóxicos também são descartados (DUARTE; ALBUQUERQUE, 2005). Nota-se que muitos países importadores estabeleceram seus próprios critérios de qualidade, que também incluem parâmetros físicos, químicos e resíduos de pesticidas (RAVINDRAN; KALLUPURACKAL, 2012).

Para alcançar a qualidade das pimentas também existe um mecanismo muito útil que é o processo de descontaminação como a ozonização e a irradiação.

Os impactos da utilização de ozônio sobre leveduras e fungos filamentosos foram apresentados por algumas pesquisas.

Restaino et al. (1995) relataram a eficiência da água ozonizada sobre alguns microrganismos. Foi possível observar que aproximadamente 4,5 unid. logarítmicas de células de *Zygosaccharomyces bailii* e *Candida albicans* por mililitro foram destruídas imediatamente em água ozonizada, ao passo que < 1 unidade logarítmica de esporos de *A. niger* por mililitro foram destruídas depois de 5 minutos.

Zhao e Cranston (1995) relataram a utilização de O_3 para descontaminar pimentas pretas. A população de *Aspergillus* spp. foi reduzida acima de 4 números de log com tratamento de 10 minutos; ao passo que a população de *Penicilium* spp. foi reduzida acima de 3 números de log com tratamento por 40 minutos.

Pesquisas também apresentam os impactos da radiação γ sobre ocratoxina A, AFs e *Aspergillus*.

Jalili, Jinap e Noranizan (2010) mostraram a redução nos níveis de aflatoxinas totais e OTA em pimenta preta. Com doses de radiação de 60 kGy, foi possível eliminar 43%, 24%, 40%, 36% e 52% de AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ e OTA, respectivamente.

Outra pesquisa avaliou três híbridos de pimenta (Red Sky, Maravilha King e Maha). Em doses de radiação de 2 e 4 kGy as contagens de *Aspergillus* foram reduzidas em 93% e 97%, respectivamente. Em uma dose de 6 kGy foi possível destruir totalmente a população de fungos filamentosos incluindo *Aspergillus*, porém os níveis de AFs reduziram apenas 6% nesta dose (QUMER et al., 2012).

CAPÍTULO I

Micobiota da pimenta preta

Resumo

A pimenta preta é o tipo de pimenta mais utilizado no mundo todo sendo de grande importância garantir sua qualidade para o comércio nacional e internacional, pois pode apresentar ampla susceptibilidade à infecções fúngicas. Sendo assim, os objetivos deste trabalho foram avaliar a microbiota das amostras de pimenta nas diferentes etapas do processamento e solo; identificar as espécies ou gêneros por meio de características morfológicas e por meio de identificação molecular de alguns representantes. Foi analisado um total de 105 amostras (95 amostras de pimenta preta e 10 amostras de solo) oriundas de produtores da cidade de São Mateus - ES. Foi realizado o plaqueamento direto dos grãos em meio DG18 e DRBC com desinfecção superficial, e diluição em placas para as amostras de solo. As espécies isoladas foram inoculadas em meios apropriados em diferentes temperaturas seguindo as chaves taxonômicas para avaliação morfológica. Foi obtido um total de 923 isolados de 30 grupos/espécies e 99% das amostras estavam infectadas. Os principais grupos/gêneros encontrados foram fungos dematiáceos (48,6%), *Fusarium* spp. (44,8%), *Aspergillus* section *Nigri* (41,9%), *Aspergillus chevalieri* (32,4%) e *Aspergillus* section *Flavi* (30,5%). Representantes de cada grupo foram selecionados a partir da avaliação morfológica (n=175), para identificação molecular. No total foram identificadas 30 espécies/grupos de fungos filamentosos, indicando grande diversidade fúngica na pimenta. Foi observada maior infecção (n=488 isolados) nas amostras de secagem em terreiro, em comparação com os outros métodos de secagem; pois, no terreiro o produto fica mais exposto, e consequentemente mais susceptível à contaminação fúngica.

Palavras-chave: *Aspergillus* sp., pimenta-do-reino preta, *black mold*, *Fusarium* sp., PCR.

1. Introdução

A pimenta preta é o tipo de pimenta mais utilizado no mundo todo sendo de grande importância garantir sua qualidade para o comércio nacional e internacional.

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de pimenta-do-reino preta (*Piper nigrum*) com uma produção de 76.000 t em 2019, perdendo apenas para o Vietnã (239.200 t) (IPC, 2020). Nos anos de 2017 e 2018 o estado do Espírito Santo (ES) ultrapassou o Pará e se tornou o maior produtor nacional de pimenta-do-reino. Ademais, São Mateus (ES) é o município que sozinho concentra a maior produção de pimenta-do-reino no Brasil (estimativamente 28% da produção nacional), com produção de 21.285 toneladas em 2019 (IBGE, 2019).

A planta está bem adaptada ao clima deste estado brasileiro, pois necessita de precipitação pluviométrica de 1.800 a 3.000 mm/ano, temperatura entre 23 °C e 28 °C e 80% de umidade relativa do ar (DUARTE et al., 2006; IAC, 2014); sendo que a colheita é realizada durante praticamente o ano todo, com maior intensidade nos primeiros meses do ano e safrinha no meio do ano (EMBRAPA, 2004).

Já para a secagem, existem diferentes tipos, entre eles: em terreiro (à céu aberto), em estufas, e em secadores com fogo direto e indireto; visto que a secagem em terreiro é mais demorada o que pode favorecer o crescimento de fungos e a produção de micotoxinas (SERRANO; NOVAK; LIMA, 2008; PICCOLO, 2014; VINHA; LIMA; SECUNDINO, 2018).

Assim sendo, estudos mostram uma grande variedade de contaminação da pimenta preta, por ser um produto muito susceptível à infecção fúngica. Entre ela os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Chaetomium*, *Scopulariopsis*, *Myrothecium*, *Phoma*, *Alternaria*, *Curvularia*, *Sordaria* e *Wallemia*; além de espécies toxigênicas como *Aspergillus flavus* e *A. niger*. Tais estudos são predominantemente de países asiáticos (onde se concentram os maiores produtores mundiais de pimenta preta) e do Oriente Médio como Índia e Vietnã (JESWAL; KUMAR, 2015; VYHNÁNEK et al., 2018), Sri Lanka (JACXSENS; YOGENDRARAJAHA; MEULENAER, 2016), Indonésia (NURTJAHJA et al., 2019), Arábia Saudita (BOKHARI, 2007; HASHEM; ALAMRI, 2010), Iraque (TOMA; ABDULLA, 2013) e Irã (MOTEBALIBASHI et al., 2018); além de Nigéria (EZEKIEL et al., 2013), Argélia (AZZOUNE et al., 2015) e Brasil (GARCIA; MALLMANN;

COPETTI, 2018; FREIRE; KOZAKIEWICZ; PATERSON, 2000; PERSSON DA SILVA et al., 2021).

Em sua grande maioria os estudos mostram a contaminação do produto final, portanto, o principal objetivo do presente trabalho foi avaliar a micobiota da pimenta preta nas diferentes etapas da pré e pós-colheita bem como diferentes tipos de secagem e determinar as etapas mais críticas de contaminação fúngica.

2. Materiais e Métodos

2.1 Amostras

Neste trabalho foram adquiridas 105 amostras no total, coletadas em lavouras de pequenos e médios produtores do município de São Mateus (bioma de Mata Atlântica), no norte do estado do Espírito Santo (215 km de distância da capital Vitória) (figura 1), coletadas em diferentes etapas da produção da pimenta preta, conforme tabela 1, no mês de junho de 2019; totalizando 20 amostras da Colheita, 7 da Secagem e 68 do Armazenamento; além de 10 do solo.

A coleta foi aleatória e cada amostra continha uma média de 400g. Para as amostras frescas colhidas direto das plantas e caídas no chão foi realizada a debulha manual no laboratório, e uma homogeneização cuidadosa para então coletar uma fração de cada amostra para as análises conforme os tópicos 2.2 e 2.3.

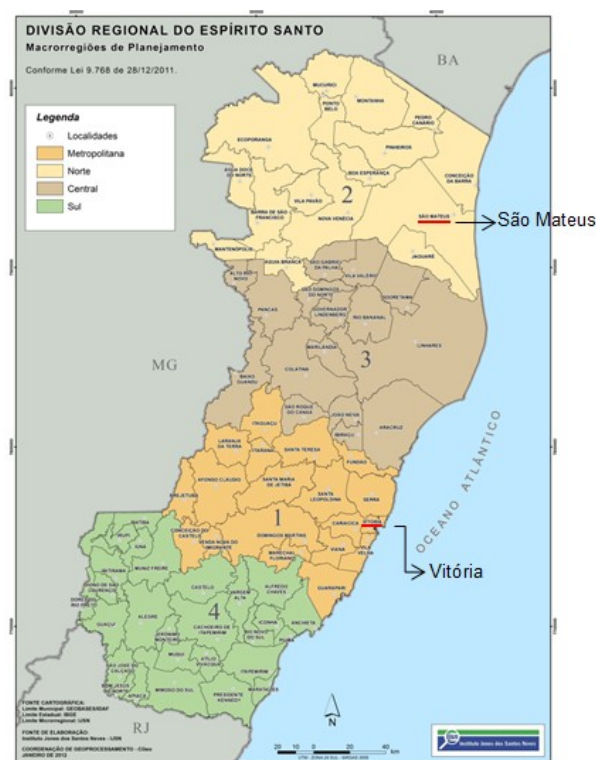


Figura 1. Mapa do estado do Espírito Santo. Em destaque a cidade de estudo São Mateus (Litoral Norte) e a capital Vitória (Região Metropolitana) (IJSN, 2012).

Tabela 1. Número de amostras de pimenta-do-reino preta e solo coletadas de três sítios.

Amostras	1	2	3
Solo	5	5	
Na Colheita:			
Chão	5	5	
Planta	5	5	
Durante Secagem:			
Terreiro úmida		2	
Terreiro semi-seca		2	
Fogo direto	3		
No Armazenamento:			
Terreiro	20	2	1
Fogo direto	20		1
Fogo indireto	20	1	1
Chocha (indireto)	1		
Estufa			1
Total	79	22	4

2.2 Atividade de água (a_w)

A atividade de água (a_w) de todas as amostras foi medida (pimentas e solos) em triplicata, com o equipamento AquaLab 3TE Series (Decagon, EUA), a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. A média e o desvio padrão foram calculados.

2.3 Análise micológica

A análise micológica foi realizada segundo Pitt e Hocking (2009), detalhada a seguir.

2.3.1. Plaqueamento direto para amostras de pimentas em grãos

Foi realizada a metodologia de plaqueamento direto para as pimentas em grão, no qual 50 grãos de cada amostra foram desinfetados com NaClO 0,4% sob agitação por 2 min. e distribuídos em 5 placas de Ágar Dicloran 18% Glicerol (DG18) para amostras com a_w abaixo de 0,95 e Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC) para amostras com a_w acima de 0,95. A incubação das placas foi realizada a $25^\circ\text{C}/5\text{-}7\text{dias}$. As infecções fúngicas por amostra e por espécie foram expressas em porcentagem de grãos infectados.

Inicialmente foram realizados testes para avaliar o desempenho dos meios DG18 e DRBC e não houve diferença no isolamento das diferentes espécies presentes, portanto seguiu-se o plaqueamento conforme Pitt e Hocking (2009), descrito acima.

2.3.2. Diluição e plaqueamento em superfície para amostras de solos

Para as amostras de solos foram realizados os métodos de diluição e plaqueamento em superfície. Foram colocados em bolsa estéril 25gramas de amostra de solo com 225 mililitros do diluente água peptonada a 0,1% (proporção 9:1). Esta mistura foi homogeneizada em Stomacher por 30 segundos. Foram realizadas diluições seriadas com 9 mL do diluente água peptonada a 0,1% e 0,1 mililitro de cada diluição foi plaqueado em superfície em meio DRBC. A incubação foi realizada a 25°C durante 5 a 7dias. Para o isolamento foram escolhidas placas com 15-150 UFC (Unidades Formadoras de Colônia) expressando o resultado em UFC/g de amostra.

2.3.3. Isolamento e identificação dos isolados

As espécies de *Eurotium* (*Aspergillus* teleomorfos) foram isoladas em meio Ágar Extrato de Levedura Czapek 20% de Sacarose (CY20S) (incubação a 25°C/14 dias), os fungos xerofílicos fastidiosos foram isolados em Ágar Extrato de Levedura e Malte 50% de Glicose (MY50G) (incubação a 25°C/14 dias), e as cepas de *Penicillium*, *Aspergillus* e demais foram isoladas em meio Ágar Extrato de Levedura Czapek (CYA) e Ágar Extrato de Malte (MEA). A incubação foi realizada durante 7 dias em quatro temperaturas (5°C, 25°C e 37 e 42/44°C). As cepas de *Penicillium* também foram inoculadas em Ágar Creatina Sacarose (CREA), com incubação a 25°C por 5 a 7 dias.

Os gêneros e algumas espécies foram identificados observando as características morfológicas macro e microscópicas segundo as chaves taxonômicas de Pitt (2000) para *Penicillium* spp., Klich (2002) para *Aspergillus* spp., e Samson et al. (2010) e Pitt e Hocking (2009) para as demais espécies.

2.4 Análise molecular

Um total de 40 isolados das amostras foram selecionados como representantes de diferentes grupos/gêneros fúngicos (pela identificação morfológica) para serem submetidos à extração de ácido nucleico e análise de sequenciamento de genes.

2.4.1. Extração de DNA

Primeiramente foram realizadas culturas monospóricas de cada isolado a ser sequenciado. A partir de então, o DNA genômico foi extraído diretamente do micélio fúngico da inoculação em Ágar Sacarose com Extrato de Levedura (YESA) incubado a 25 °C/2 dias, adicionando 3 mL de tampão de extração composto por 0,5 mL de EDTA, 0,5 mL de cloreto de sódio 5M, 1 mL de SDS 10%, 2 mL de Tris HCl 1M e 6 mL de H₂O. Essa suspensão foi transferida para criotubos com pérolas de vidro e agitada em vórtex a 10.000 rpm/6 min, colocada em banho-maria à 70°C/10 min e levada novamente ao vórtex a 10.000 rpm/10 min, para quebra das membranas celulares e exposição do DNA. Em seguida, foi centrifugada a 12.000 rpm/3 min para desproteinização e a fase aquosa superior foi recolhida (600 µL) e adicionado a ela 1 mL

de tampão de ligação (DD Buffer) do kit Gel DNA Purification (Mebeq Bioscience); 800 µL dessa mistura foi passado na coluna de sílica e centrifugado a 12.000 rpm/1 min. Em seguida realizou-se o mesmo procedimento com os outros 800 µL e descartando-se o resíduo que passou pela coluna.

A lavagem foi feita com 550 µL do tampão de lavagem (WB Buffer), centrifugação a 12.000 rpm/ 1-3 min. e descarte do resíduo que passou pela membrana (procedimento realizado duas vezes), para a retirada de sais. Para a eluição foi passado 200 µL de tampão de eluição (EB Buffer) na coluna, centrifugado a 12.000 rpm/1 min e coletado em tubo tipo eppendorf com 20 µL de NaCl 3M. Após, adicionou-se 400 µL de etanol absoluto refrigerado e homogeneizou-se manualmente para precipitação diferencial do DNA. O eluído foi guardado no freezer durante 45 minutos e passou por posterior centrifugação a 12.000 rpm/5 min, sendo o sobrenadante descartado.

Para a purificação e retirada de sais, o precipitado foi lavado com 300 µL de álcool 70% refrigerado, homogeneizado manualmente por inversão e centrifugado a 12.000 rpm/1 min, repetindo-se 3 vezes, sendo o sobrenadante descartado a cada vez. A secagem do DNA foi feita em estufa a 42°C/25 min. A ressuspensão foi feita com 50 µL de água MilliQ e homogeneizado manualmente com vigor e guardado em refrigerador overnight (DOYLE; DOYLE, 1987 modificado).

O DNA purificado e ressuspendido foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% na presença de brometo de etídio (0,5 µg/mL) e quantificado visualmente por comparação com marcador padrão conhecido (ng). Para finalizar, as amostras foram diluídas em água Milli-Q estéril para obter uma concentração final de 5 ng/µL.

2.4.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Foram preparados 24 µL do Mix com pares de primers F e R calmodulina CMD5 (CCGAGTACAAGGAGGCCTTC) e CMD6 (CCGATAGAGGTCATAACGTGG) (HONG et al., 2006) ou CF1 (GCCGACTCTTTGACYGARGAR) e CF4 (TTTYTGCATCATRAGYTGGAC) (PETERSON et al., 2005) (para *Aspergillus*); ITS 1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (WHITE et al., 1990) (para os fungos dematiáceos, Hifomicetos e Ascomicetos) e TF1a (CCTTCAAGTACGCYTGGGTTC) (PERRONE et al., 2011) (para *Fusarium*) para

amplificação do DNA utilizando a técnica de PCR (Reação em cadeia da polimerase) que foi desenvolvida em termociclador incluindo etapas de desnaturação (95°C/3 minutos), seguida por ciclos de desnaturação (95°C/1 minuto), anelamento de primers (56 ou 58°C/45 segundos) - sendo a temperatura dependente do primer utilizado -, e extensão (72°C/90 segundos), com 30 repetições (HONG et al., 2006; SILVA et al., 2020).

Por fim, o produto da PCR foi aplicado em gel de agarose 1,2% com marcador de peso molecular, para observação da especificidade.

2.4.3. Sequenciamento

Os produtos de PCR foram purificados com ExoSAP-IT (Thermo Fisher Scientific, USA) de acordo com as instruções do fabricante e sequenciados usando o kit de sequenciamento BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems, USA) em um analisador genético SeqStudio (Applied Biosystems, USA). As sequências obtidas foram alinhadas com as sequências de todas as cepas tipo do grupo em questão disponíveis no banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando o *software* BioEdit (HALL, 1999) e confirmadas usando a ferramenta BLASTn do *GenBank* (KIMURA, 1980). O *software* MEGA 11 foi utilizado para construir uma árvore filogenética de máxima verossimilhança (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2021). Para determinar o suporte para cada clado, a análise de *bootstrap* foi executada em 1.000 réplicas.

3. Resultados e Discussão

3.1 Atividade de água (a_w)

A tabela 2 apresenta a atividade de água (a_w) de todas as 105 amostras classificadas por etapas e tipos de secagem.

Tabela 2. Atividade de água das amostras de pimenta e solo analisadas (n=105).

Etapas da produção		Nº amostras	Variação	Média a_w
Solo	Solos	10	0,983-0,989	0,986
Colheita	Chão	10	0,978-0,985	0,983
	Planta	10	0,975-0,985	0,979
Durante secagem	Terreiro (úmidas)	2	0,973-0,980	0,976
	Terreiro (semi-secas)	2	0,750-0,952	0,851
	Fogo Direto	3	0,450-0,545	0,488
Armazenamento	Terreiro	23	0,567-0,710	0,649
	Fogo Direto	21	0,504-0,712	0,627
	Fogo Indireto	22	0,451-0,702	0,616
	Chocha (indireto)	1	-	0,476
	Estufa	1	-	0,651

É possível observar que as amostras frescas da colheita (chão e pé), do solo e as amostras úmidas e semi-secas da secagem em terreiro apresentaram maior a_w (média de 0,960) em comparação com as outras amostras. Com isso, as amostras com maior a_w favoreceram o crescimento de microrganismos mais hidrofílicos como os *Fusarium*. Já nas amostras com menor a_w (variação das médias entre 0,476 e 0,651) a prevalência foi de microrganismos mais xerofílicos, como os *Aspergillus* (PITT; HOCKING, 2009), que sobrevivem e crescem nesta condição.

3.2 Micobiota

As tabelas 3 e 4 apresentam o número de isolados das amostras de cada etapa do processamento, a média de infecção e porcentagem de frequência de ocorrência (FO%) dos fungos.

Tabela 3. Infecção fúngica das amostras de solo, pimentas da colheita (chão e planta) e pós-colheita (durante secagem em Terreiro - úmidas e semi-secas - ; e em Fogo Direto).

Espécies/Grupos fúngicos	Solo (n=10)			Chão (n=10)			Planta (n=10)			Terreiro úmidas (n=2)			Terreiro semi-secas (n=2)			Fogo Direto (n=3)		
	Isolados	FO	Média de infecção	Isolados	FO	Média de infecção	Isolados	FO	Média de infecção	Isolados	FO	Média de infecção	Isolados	FO	Média de infecção	Isolados	FO	Média de infecção
	(n)	(%)	(%)	(n)	(%)	(%)	(n)	(%)	(%)	(n)	(%)	(%)	(n)	(%)	(%)	(n)	(%)	(%)
<i>Fungos dematiáceos</i>	16	100	7,0x10 ⁴	22	100	7,0x10 ⁴	16	100	53,6	5	100	76	2	50	13	0	0	0
<i>Fusarium spp.</i>	15	90	2,7x10 ⁴	16	90	2,7x10 ⁴	12	80	21,4	3	100	33	8	100	94	1	33,3	1,3
<i>Hifomicetos</i>	2	20	2,0x10 ³	8	20	2,0x10 ³	11	80	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>R. oryzae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	100	7,3
<i>Absidia corymbifera</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	100	23,3
<i>A. chevalieri</i>	3	10	3,0x10 ³	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	66,7	28,6
<i>Penicillium sp</i>	2	10	5,0x10 ³	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. citrinum</i>	2	20	4,0x10 ³	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aspergillus sp</i>	4	30	3,4x10 ³	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	33,3	1,3
<i>A. section Nigri</i>	23	50	8,6 x 10 ²	0	0	0	0	0	0	1	50	1	2	50	2	10	66,7	6,6
<i>A. section Flavi</i>	4	30	1,3x10 ²	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	66,7	3,3
<i>A. section Circumdati</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. clavatus</i>	5	20	5,0x10 ²	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cladosporium sp</i>	4	40	3,0x10 ³	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Acremonium sp</i>	1	10	5,0x10 ²	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	2	20	4,0x10 ³	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Trichoderma sp</i>	1	10	5,0x10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Epicoccum sp</i>	1	10	4,0x10 ²	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pestalotiopsis sp</i>	0	0	0	0	0	0	1	10	2,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ascomicetos	3	30	1,4x10 ⁴	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

FO = Frequência de ocorrência (número de amostras infectadas/número total de amostras analisadas)

Média de infecção = Soma dos valores médios de infecção das amostras totais/ número total de amostras analisadas)

Tabela 4. Infecção fúngica das amostras de pimenta da pós-colheita/Armazenamento (Terreiro, Fogo Direto, Fogo Indireto, Chocha e Estufa).

Espécies/Grupos fúngicos	Terreiro (n=23)			Direto (n=21)			Indireto (n=22)			Outros (Chocha e Estufa) (n=2)		
	Isolados	FO	Média de infecção	Isolados	FO	Média de infecção	Isolados	FO	Média de infecção	Isolados	FO	Média de infecção
	(n)	(%)	(%)	(n)	(%)	(%)	(n)	(%)	(%)	(n)	(%)	(%)
<i>Fungos dematiáceos</i>	20	56,5	16	2	9,5	0,7	5	13,6	0,6	0	0	0
<i>Fusarium spp.</i>	29	56,5	12,5	3	4,8	0,4	3	9,1	0,5	1	50	1
<i>Hifomicetos</i>	2	4,3	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mucor racemosus</i>	0	0	0	1	4,8	0,1	1	4,5	0,3	0	0	0
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	0	0	0	1	4,8	0,2	0	0	0	0	0	0
<i>Rhizopus oryzae</i>	8	30,4	3	5	19	1,9	0	0	0	2	50	5
<i>Absidia corymbifera</i>	5	13	2,8	16	52,4	9,2	1	4,5	0,1	1	50	1
<i>A. chevalieri</i>	9	34,8	1	16	61,9	8,4	11	40,9	2,5	1	50	1
<i>A. amstelodami</i>	1	4,3	0,2	6	28,6	4,4	4	18,2	0,8	2	50	17
<i>A. ruber</i>	3	13	1	1	4,8	0,1	4	13,6	1,0	0	0	0
<i>A. nidulans</i>	8	21,7	0,9	2	9,5	0,3	1	4,5	0,1	0	0	0
<i>Penicillium sp</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. citrinum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aspergillus sp</i>	2	13	6,6	1	4,8	0,1	0	0	0	1	50	2

Tabela 4. Continuação

<i>A. section Nigri</i>	232	78,3	20,2	23	47,6	2,2	15	22,7	1,4	6	100	6
<i>A. section Flavi</i>	131	69,6	11,4	33	47,6	3,14	0	0	0	3	50	3
<i>A. section Circumdati</i>	11	17,4	0,6	2	9,5	0,2	0	0	0	0	0	0
<i>A. sydowii</i>	0	0	0	2	9,5	0,3	0	0	0	0	0	0
<i>A. clavatus</i>	0	0	0	1	4,8	0,1	1	4,5	0,1	0	0	0
<i>A. fumigatus</i>	3	8,7	0,9	1	4,8	0,1	0	0	0	0	0	0
<i>A. penicillioides</i>	3	8,7	0,4	1	4,8	0,2	0	0	0	0	0	0
<i>A. terreus</i>	1	4,3	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cladosporium sp</i>	3	13	0,7	1	4,8	0,1	1	4,5	0,1	0	0	0
<i>Acremonium sp</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Wallemia sebi</i>	2	8,7	0,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Trichoderma sp</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Epicoccum sp</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pestalotiopsis sp</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ascomicetos	5	21,7	1	12	42,9	2,7	26	72,7	4,5	2	100	14

FO = Frequência de ocorrência (número de amostras infectadas/número total de amostras analisadas)

Média de infecção = Soma dos valores médios de infecção das amostras totais/ número total de amostras analisadas)

Assim como vemos na literatura (PITT; HOCKING, 2009; PITT; TANIWAKI; COLE, 2013), a prevalência de *Fusarium* e fungos dematiáceos foi maior nas amostras do chão/pé (colheita) e solo. Em contrapartida, observamos infecção significativa por *Aspergillus* na pós-colheita, ou seja, nas amostras armazenadas originárias da secagem em terreiro, fogo direto e indireto; além de *Fusarium* e fungos dematiáceos.

Todas as amostras têm entre 91 e 100% de FO e as amostras com maior variedade de fungos foram as armazenadas da secagem em fogo direto (66,6% do total de grupos ou espécies fúngicas) e armazenadas de terreiro (63,3% do total de grupos ou espécies fúngicas), sendo que o último apresenta a maior contagem de isolados (n=499).

A figura 2 mostra o número de isolados fúngicos (n) e a porcentagem da frequência de ocorrência (FO %) encontrados de cada grupo em todas as amostras.

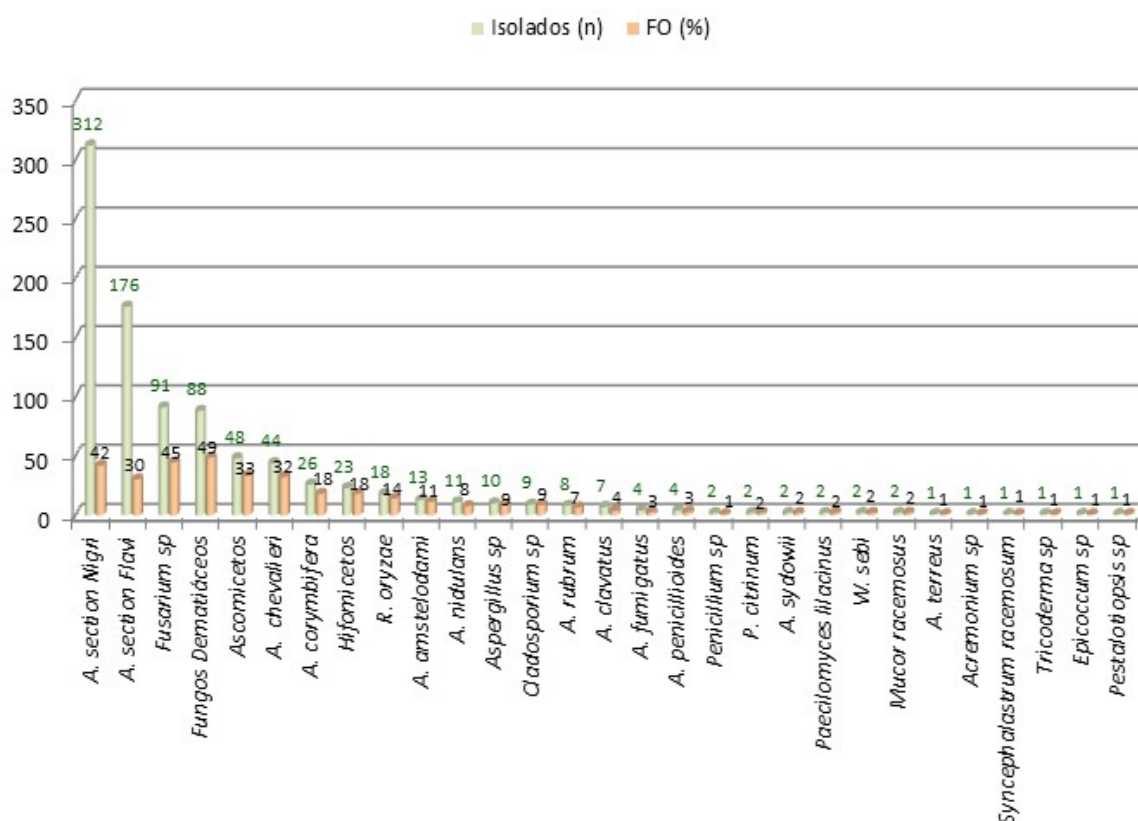


Figura 2 Gráfico com o número de isolados fúngicos e a frequência de ocorrência (FO) encontrados nas amostras de pimenta preta e solo.

Nas amostras do chão, da planta e solo a prevalência foi de fungos dematiáceos (100%). Nas amostras de secagem em Terreiro predominou-se *A. section Nigri* (74,1%), *A. section Flavi* (69,6%) e *Fusarium* spp. (62,9%), ou seja, grande prevalência de fungos potencialmente toxigênicos, demonstrando-se ser um método de secagem mais crítico se comparado aos demais.

Nas amostras de secagem em fogo Direto a prevalência foi de *Aspergillus chevalieri* (62,5%), *Absidia corymbifera* (58,3%), *A. section Nigri* (50%) e *A. section Flavi* (50%). Portanto, apesar da maior frequência ser de fungos deteriorantes, também estavam presentes fungos toxigênicos.

Nas amostras da secagem em fogo Indireto a maior ocorrência foi de Ascomicetos (72,7%), seguido de *A. chevalieri* (40,9%), que são fungos não aflá ou ocratoxigênicos. Por fim, nas outras amostras (chocha e de secagem em estufa) predominaram *A. section Nigri* (100%) e Ascomicetos (100%).

3.3 Identificação molecular dos isolados representantes

Para todas as cepas sequenciadas foi obtido um percentual de identidade acima de 90% e uma cobertura acima de 70% (E-value 0,0), segundo o alinhamento do BLASTn. Com base nisso, observa-se a necessidade de se construir árvores filogenéticas para uma identificação mais apurada.

Foram sequenciados no total 175 isolados, dentre eles 87 *Aspergillus section Nigri*, 35 *A. section Flavi* e 13 *A. section Circumdati* (detalhados nos capítulos 2 e 3). Os demais estão apresentados nas tabelas 5 e 6 a seguir com a respectiva identificação aproximada.

Tabela 5. Identificação molecular dos fungos sequenciados da pimenta preta (n=33).

Grupos fúngicos / Espécies	Isolados (n)	Representantes sequenciados (n)	%	Identificação aproximada (%)	% Identidade BLASTn
Fungos dematiáceos - Grupo 1	58	6	10,3	<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i> (33)	
				Cepa 145D	97,40
				Cepa 906D	99,40
				<i>Lasiodiplodia iranensis</i> (33)	
				Cepa 644D	96,76
				Cepa 163D	97,52
				<i>Lasiodiplodia mahajangana</i> (33)	
				Cepa 905D	97,32
				Cepa 928D	97,90
<i>Fusarium</i> spp.	76	10	13,1	<i>Fusarium poae</i> (30)	
				Cepa 416FUS	92,32
				Cepa 149FUS	95,25
				Cepa 156FUS	96,29
				<i>Fusarium equiseti</i> (20)	
				Cepa 1052FUS	95,37
				Cepa 203FUS	97,16
				<i>Fusarium concentricum</i> (10)	
				Cepa 175FUS	99,22
				<i>Fusarium phyllophilum</i> (10)	
				Cepa 180FUS	96,33
				<i>Fusarium xylarioides</i> (10)	
				Cepa 222FUS	95,76
				<i>Fusarium lactis</i> (10)	
				Cepa 647FUS	96,11
<i>Aspergillus chevalieri</i>	42	3	7	<i>Aspergillus chevalieri</i> (100)	
				Cepa 1112E	97,53
				Cepa 989E	97,69
				Cepa 649E	98,37
<i>Aspergillus nidulans</i>	10	4	40	<i>Aspergillus nidulans</i> (100)	
				Cepa 762V	98,08
				Cepa 984V	98,59
				Cepa 950V	98,66
				Cepa 821V	98,75
<i>Aspergillus penicillioides</i>	4	1	25	<i>Aspergillus penicillioides</i> (100)	
				Cepa 363A	97,13
<i>Aspergillus</i> spp.	6	1	16,6	<i>Aspergillus luteorubrus</i> (100)	
				Cepa 1030A	96,94
Ascomycetos	48	8	16,6	<i>Preussia persica</i> (75)	
				Cepa 1029	95,57
				Cepa 677	97,05
				Cepa 980	97,05
				Cepa 1006	97,05
				Cepa 1059	97,75
				Cepa 827	98,10
				<i>Preussia flanagani</i> (12,5)	
				Cepa 782	90,0
				<i>Preussia procaviae</i> (12,5)	
				Cepa 760	92,9
Hifomicetos	23	1	4,3	<i>Diaporthe miriciae</i> (100)	
				Cepa 201H	93,07

Tabela 6. Identificação molecular dos fungos sequenciados do solo (n=7).

Grupos fúngicos / Espécies	Isolados (n)	Representantes sequenciados (n)	%	Identificação aproximada (%)	% Identidade BLASTn
Fungos dematiáceos - Grupo 2	18	1	5,5	<i>Pyrenochaetopsis leptospora</i> (100) Cepa 294D	97,32
<i>Fusarium</i> spp.	15	1	6,6	<i>Fusarium concentricum</i> (100) Cepa 276FUS	98,39
<i>Aspergillus</i> spp.	4	4	100	<i>Aspergillus udagawae</i> (100) Cepa 275Asp	97,66
				Cepa 319Asp	97,79
				Cepa 280 Asp	98,10
				Cepa 271Asp	98,24

A figura 3 mostra algumas espécies da grande variedade de isolados das amostras.

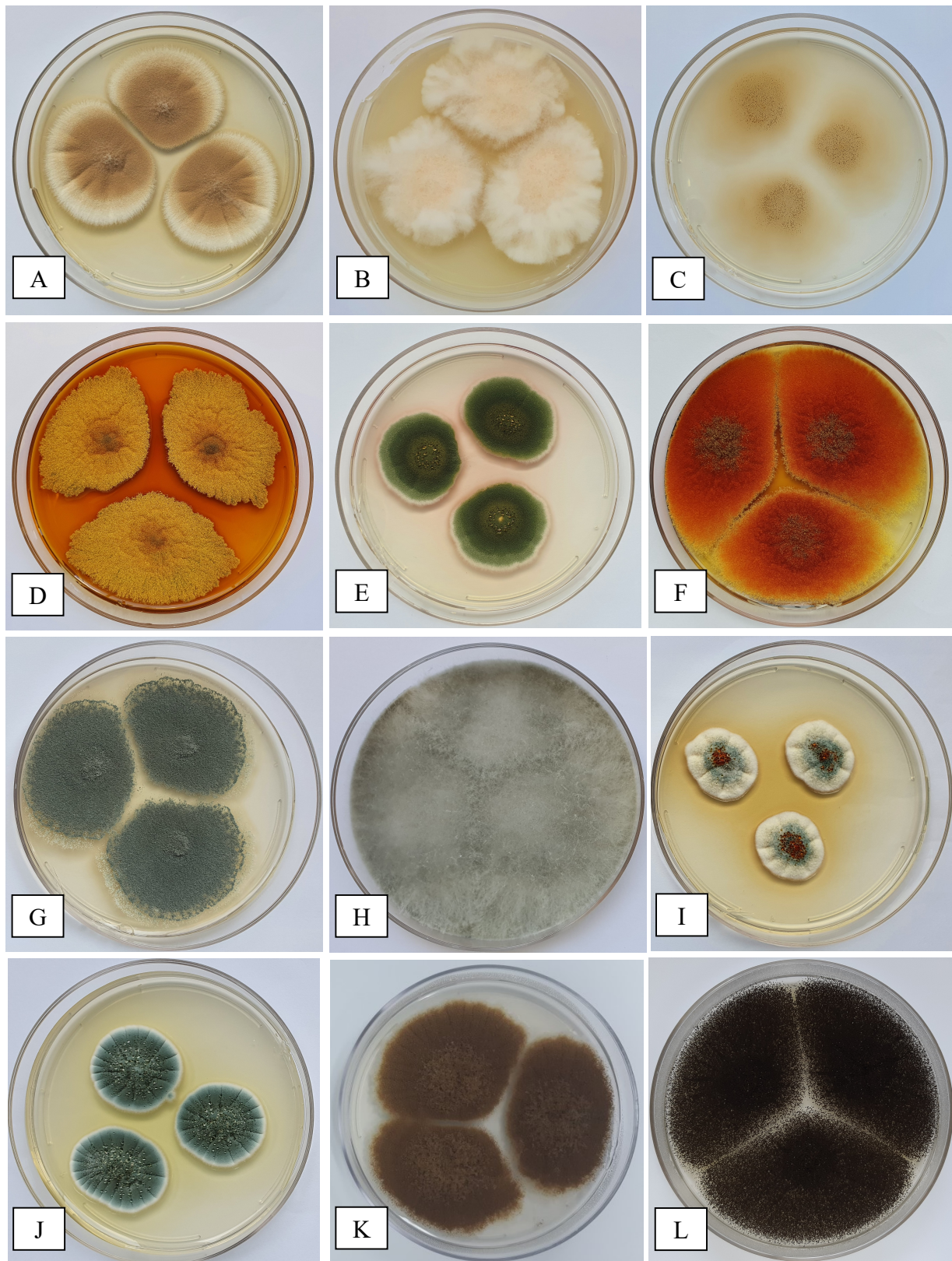


Figura 3. Algumas espécies encontradas nas amostras de pimenta-do-reino preta e solo. A-C, E e G-L em CYA à 25°C/7 dias; D e F em CY20S à 25°C/14 dias. **A.** *Aspergillus terreus*. **B.** *Fusarium poae*. **C.** *Preussia persica*. **D.** *Aspergillus chevalieri*. **E.** *Aspergillus nidulans*. **F.** *Aspergillus ruber*. **G.** *Aspergillus clavatus*. **H.** *Lasiodiplodia iranensis*. **I.** *Aspergillus sydowii*. **J.** *Penicillium citrinum*. **K.** *Aspergillus tamarii*. **L.** *Aspergillus niger*.

Foi observado que muitas das espécies aqui identificadas ainda não foram descritas em pimenta preta, como *Aspergillus luteorubrus*, espécies de *Preussia* spp., espécies de *Lasiodiplodia* spp., *Fusarium poae*, *F. phyllophilum*, *F. xylarioides*, *F. lactis*, e *F. deniculatum*. Já as espécies de *Aspergillus sydowii*, *A. terreus*, *A. chevalieri*, *A. ruber*, *A. clavatus*, *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *A. penicillioides*, *Penicillium citrinum*, *Mucor racemosus*, *Rhizopus oryzae*, *Fusarium concentricum*, e os gêneros *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Chaetomium*, *Scopulariopsis* e *Wallemia* já foram encontrados em amostras de pimenta preta em diversos estudos (FLANNIGAN; HUI, 1976; FREIRE; KOZAKIEWICZ; PATERSON, 2000; BOKHARI, 2007; HASHEM; ALAMRI, 2010; EZEKIEL et al., 2013; RUADREW; CRAFT; AIDOO, 2013; TOMA; ABDULLA, 2013; AZZOUNE et al., 2015; JESWAL; KUMAR, 2015; JACXSENS; YOGENDRARAJAHA; MEULENAER, 2016; GARCIA; MALLMANN; COPETTI, 2018; MOTEVALIBASHI et al., 2018; VYHNÁNEK et al., 2018; NURTJAHJA et al., 2019; CHINCHILLA-SALAZAR; BLANCO-MENESES; CASTRO-ZUNIGA, 2020; PERSSON DA SILVA et al., 2021).

Este fato pode ser explicado pela maioria dos trabalhos estudarem pimentas secas vendidas nos mercados e as espécies encontradas no presente trabalho também envolveram amostras das diferentes etapas do processo.

Cada etapa da produção da pimenta pode favorecer o desenvolvimento ou sobrevivência de um grupo fúngico específico, a depender de características como umidade do produto e UR, temperatura, substrato, pH, entre outras. Como por exemplo, no campo há maior incidência de fungos do gênero *Fusarium*, já na secagem (se for lenta) e no armazenamento (se for inadequado) a maior incidência é de *Aspergillus* (PITT; HOCKING, 2009).

4. Conclusão

A informação da micobiota da pimenta, bem como do solo onde ela se desenvolve, é fundamental para conhecermos seus contaminantes, incluindo espécies potencialmente toxigênicas, para entendermos os pontos críticos que podem ser melhorados para reduzir esta contaminação.

Neste caso podemos observar que as amostras de secagem em fogo direto e indireto foram as que apresentaram menores médias de infecções fúngicas. Isso pode ser em decorrência de um menor tempo para secagem se comparado com a secagem em terreiros,

portanto, assim evita-se uma carga alta de contaminação, sendo as melhores alternativas para propiciar melhor qualidade do produto.

Algumas espécies de *Preussia* spp., espécies de *Lasiodiplodia* spp., *Aspergillus luteorubrus*, *Fusarium poae*, *F. phyllophilum*, *F. xylarioides*, *F. lactis*, e *F. deniculatum* foram encontradas pela primeira vez em pimenta preta.

5. Referências

AZZOUNE, N.; MOKRANE, S.; RIBA A.; BOURAS, N.; VERHEECKE, C.; SABAOU, N.; MATHIEU, F. Contamination of common spices by aflatoxigenic fungi and aflatoxin B1 in Algeria. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, v. 8, n. 1, p.137-144, 2015.

BOKHARI, F. M. Spices mycobiota and mycotoxins available in Saudi Arabia and their abilities to inhibit growth of some toxigenic fungi. *Mycobiology*, v.35, n.2, p.47-53, 2007.

CHINCHILLA-SALAZAR, G.; BLANCO-MENESES, M.; CASTRO-ZÚÑIGA, O. Identificación Molecular y Morfológica de las especies de *Fusarium* spp., asociadas al cultivo de Pimienta Negra (*Piper Nigrum*) en Sarapiquí y Guatuso en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, v. 44, n. 2, p. 9-30, 2020.

DUARTE, M. L. R.; POLTRONIERI, M. C.; CHU, E. Y.; OLIVEIRA, R. F.; LEMOS, O. F.; BENCHIMOL, R. L.; CONCEIÇÃO, H. E.O.; SOUZA, G. F. A cultura da-pimenta-do-reino / Embrapa Amazônia Oriental. 2ª Ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. 73p. Coleção Plantar, 55.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, v. 19, n. 1, p. 11-15, 1987.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Manual de Segurança e Qualidade para a Cultura da Pimenta-do-Reino. Brasília: EMBRAPA/SEDE, 2004. 65 p. Série Qualidade e Segurança dos Alimentos.

EZEKIEL, C. N.; FAPOHUNDA, S. O.; OLORUNFEMI, M. F.; OYEBANJI, A. O.; OBI, I. Mycobiota and aflatoxin B1 contamination of *Piper guineense* (Ashanti pepper), *P. nigrum* L.

(black pepper) and *Monodora myristica* (calabash nutmeg) from Lagos, Nigeria. *International Food Research Journal*, v. 20, n. 1, p. 111-116, 2013.

FLANNIGAN, B.; HUI, S. C. The occurrence of aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* in the mould floras of ground spices. *Journal of Applied Microbiology*, v. 41, n. 3, p. 411–418, 1976.

FREIRE, F. C. O.; KOZAKIEWICZ, Z.; PATERSON, R. R. M. Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. *Mycopathologia*, v. 149, p. 13–19, 2000.

GARCIA, M. V.; MALLMANN, C. A.; COPETTI, M. V. Aflatoxigenic and ochratoxigenic fungi and their mycotoxins in spices marketed in Brazil. *Food Research International*, v. 106, p. 136–140, 2018.

HALL, T. A. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, n. 41, p. 95-98, 1999.

HASHEM, M.; ALAMRI, S. Contamination of common spices in Saudi Arabia markets with potential mycotoxin-producing fungi. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 17, p. 167-175, 2010.

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.

HOUBRAEN, J.; SPIERENBURG, H; FRISVAD, J. C. *Rasamsonia*, a new genus comprising thermotolerant and thermophilic *Talaromyces* and *Geosmithia* species. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 101, p. 403–421, 2011.

IAC. Instituto Agrônomo Campinas. Instruções agrícolas para as principais culturas econômicas. Campinas, SP, 7ª Edição, n. 200, jun, 2014. 452 p.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. São Mateus. Produção Agrícola – Lavoura Permanente. Pimenta-do-reino / Quantidade produzida. 2019. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/es/sao-mateus/pesquisa/15/11863?tipo=ranking&indicador=12035>> Acesso em: 07 jun 2021.

IJSN. Instituto Jones dos Santos Neves. Mapas - Divisão Regional do Espírito Santo – Macrorregiões de Planejamento, 2012. Disponível em: <<http://www.ijsn.es.gov.br/mapas/>> Acesso em: 24 mai 2021.

IPC. International Pepper Community. Crop Position Report: All Countries - 2019. International Pepper Conference, 2020. Available from: <https://internationalpepperconference.com/report/index?product=10&year=2019&report_type=10&member=&graph=20> Cited: 17 feb. 2021.

JACXSENS, L.; YOGENDRARAJAHA, P.; MEULENAER, B. Risk Assessment of Mycotoxins and Predictive Mycology in Sri Lankan Spices: Chilli and Pepper. *Procedia Food Science*, v. 6, p. 326 – 330, 2016.

JESWAL, P.; KUMAR, D. Mycobiota and Natural Incidence of Aflatoxins, Ochratoxin A, and Citrinin in Indian Spices Confirmed by LC-MS/MS. *International Journal of Microbiology*, v. 2015, 8 p., 2015.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, v. 16, p. 111–120, 1980.

KLICH, M. A. Identification of common *Aspergillus* species. Centraalbureau voor Schimmelfcultures, The Netherlands. 2002.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, v. 38, p. 3022-3027, 2021.

MOTEVALIBASHI, M; SABOKBAR, A.; TALEBI, S. Molecular identification of Aflatoxin B1 *Aspergillus flavus* in red, black and white pepper using PCR method.

International Journal of Molecular and Clinical Microbiology, v. 8, n. 2, p. 1016-1022, 2018.

NURTJAHJA, K.; ZUHRA, C. F.; SEMBIRING, H.; BUNGSU, A.; SIMANULLANG, J.; SILALAH, J. E.; GULTOM, B. N. L.; SARTINI, S. Fungal contamination spices from Indonesia with emphasis on *Aspergillus flavus*. *Czech Journal of Food Sciences*, v. 37, n. 5, p. 338–344, 2019.

PERRONE, G.; STEA, G.; EPIFANI, F.; VARGA, J.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. *Aspergillus niger* contains the cryptic phylogenetic species *A. awamori*. *Fungal Biology*, v. 115, p. 1138-1150, 2011.

PERSSON DA SILVA, A. R.; FUNGARO, M. H. P.; SILVA, J. J.; MARTINS, L. M.; TANIWAKI, M. H.; IAMANAKA, B. T. Ochratoxin A and related fungi in Brazilian black pepper (*Piper nigrum* L.). *Food Research International*, v. 142, 2021.

PETERSON, S. W.; VEGA, F. E.; POSADA, F.; NAGAI, C. *Penicillium coffeae*, a new endophytic species isolated from a coffee plant and its phylogenetic relationship to *P. fellutanum*, *P. thiersii* and *P. brocae* based on parsimony analysis of multilocus DNA sequences. *Mycologia*, v. 97, p. 659–666, 2005.

PICCOLO, M. P. *Ciência e Tecnologia de Alimentos: Produção e Sustentabilidade*. 1ª Edição. Editora: Paco Editorial, Jundiaí. 2014. 396p.

PITT, J. I. *A Laboratory Guide to Common Penicillium Species*. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Sydney, Australia. 2000.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. *Fungi and food spoilage*. Springer Science Business Media: New York, 593 p., 2009.

PITT, J. I.; TANIWAKI, M. H.; COLE, M. B. Mycotoxin production in major crops as influenced by growing, harvesting, storage and processing, with emphasis on the achievement of Food Safety Objectives. *Food Control*, v. 32, p. 205-215, 2013.

SAMSON, R. A.; HOUBRAKEN, J.; THRANE, U.; FRISVAD, J. C.; ANDERSEN, B. Food and indoor Fungi. Uthrech, NL: CBS Fungal Biodiversity Center, 390 p., 2010.

SERRANO, L. A. L.; NOVAK, L. R.; LIMA, I. M. Colheita e pós-colheita da pimenta-do-reino. Vitória, ES: *Incaper Documentos* 157, 40 p., 2008.

SILVA, J. J.; IAMANAKA, B. T.; FERRANTI, L. S.; MASSI, F. P.; TANIWAKI, M. H.; PUEL, O.; LORBER, S.; FRISVAD, J. C.; FUNGARO, M. H. Diversity within *Aspergillus niger* Clade and Description of a New Species: *Aspergillus vinaceus* sp. nov. *Journal of Fungi*, v.6, 317, 20p., 2020.

TOMA, F. M.; ABDULLA, N. Q. F. Isolation and Identification of Fungi from Spices and Medicinal Plants. *Research Journal of Environmental and Earth Sciences*, v. 5, n. 3, p. 131-138, 2013.

VINHA, M. B.; LIMA, I. M.; SECUNDINO, W. Contaminantes que comprometem a segurança da pimenta-do-reino ao longo de sua cadeia produtiva. *Incaper em Revista*, Vitória, v. 8, p. 55-67, 2018.

VYHNÁNEK, T.; HANÁČEK, P.; ŠAFRÁNKOVÁ, I.; ĐORĐEVIĆ, B.; BERANOVÁ, H.; TROJAN, V.; HAVEL, L. Molecular detection of fungi in paprika, chili powder and black pepper. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, v. 66, n. 4, p. 927-937, 2018.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols Guide Methods Appl.*, v. 18, p. 315–322, 1990.

CAPÍTULO II

Ocorrência de fungos ocratoxigênicos e de ocratoxina A em pimenta preta

Resumo

A pimenta preta é muito apreciada e consumida no mundo todo sendo importante garantir sua qualidade e inocuidade evitando sua contaminação. A principal causa desta contaminação pode ser na secagem em terreiro, ou seja, a céu aberto, pois a pimenta fica exposta às intempéries, animais e aos próprios trabalhadores. Tal exposição prejudica a qualidade da pimenta, pois quanto mais tempo demora a secagem, maior pode ser a contaminação fúngica, devido aos fatores como umidade e temperatura favoráveis para seu crescimento, além de favorecer a possível produção de micotoxinas como a ocratoxina A. Com isso, os objetivos foram verificar a contaminação por OTA em pimentas pretas de diferentes etapas da pré e pós-colheita, bem como a presença e identificação de fungos potencialmente produtores de ocratoxina A. Sendo assim, foram analisadas 95 amostras de pimenta preta no ES em diferentes estágios do processo, como: pimentas colhidas direto da planta, caídas no chão, em terreiros e secas em secadores de fogo direto e indireto. Também foram analisadas 10 amostras do solo das plantações onde foram colhidas as pimentas. *Aspergillus* section *Nigri* foram prevalentes (FO 39%) no total de amostras mas principalmente nas amostras de terreiro (78,3%) e apenas 2,9% foram capazes de produzir OTA. Podemos destacar que os isolados de *A. carbonarius* (FO 4%) foram encontrados apenas nas amostras de terreiro. O grupo de *Aspergillus* section *Circumdati* estava presente em 6% das amostras e os únicos produtores de OTA foram os 3 isolados de *A. ochraceopetaliformis* (FO 2%) também encontrados apenas nas amostras de terreiro. No total 312 e 13 isolados de *Aspergillus* section *Nigri* e *Aspergillus* section *Circumdati* foram identificados respectivamente através de análise morfológica e molecular, e as seguintes espécies potencialmente ocratoxigênicas foram identificadas: *A. niger*, *A. neoniger*, *A. welwitschiae*, *A. carbonarius* e *A. ochraceopetaliformis*; sendo a última reportada pela primeira vez em pimenta preta. A análise de OTA foi realizada usando coluna de imunoafinidade e HPLC/FD. Seis amostras estavam contaminadas (6,4 %) sendo 4 delas provenientes da secagem em Terreiro, com os seguintes resultados: 0,39 ng/g; 3,06 ng/g; 8,26 ng/g e 42,81 ng/g). Com isso, conclui-se que a secagem em terreiro pode ser considerada mais crítica com relação ao crescimento fúngico e contaminação por OTA.

Palavras-chave: *Aspergillus*, ocratoxina A, pimenta-do-reino, HPLC/FLD

1. Introdução

A pimenta-do-reino é um ingrediente altamente popular e muito consumido em países asiáticos como Índia, China e Indonésia e no Brasil o consumo foi de 6.720 t no ano de 2019 (IPC, 2020). Embora no Brasil não se consuma tanto pimenta, se comparado aos países supracitados, é o segundo maior país produtor e exportador de pimenta preta do mundo, com produção de 76.000 t e exportação de 81.289 t no ano de 2019 (IPC, 2020). Sendo assim, esta matéria-prima deve respeitar os parâmetros de qualidade exigidos para o comércio interno e externo. Logo, os cuidados com a colheita, secagem e armazenamento necessitam ser adequados, salvaguardando de possíveis contaminações tanto por animais quanto por fungos filamentosos capazes de produzir micotoxinas como a ocratoxina A.

OTA é considerada uma micotoxina possivelmente cancerígena para humanos (categoria 2B) e nefrotóxica e hepatotóxica para animais domésticos e de laboratório (IARC, 1993; O'BRIEN; DIETRICH, 2005). Ela pode ser produzida principalmente por *Aspergillus ochraceus*, *A. westerdijkiae*, *A. carbonarius*, *Penicillium verrucosum* e cerca de 3% dos isolados de *A. niger* (LARSEN; SVENDSEN; SMEDSGAARD, 2001; SAMSON et al., 2007; VISAGIE et al., 2014), e já foi encontrada em pimentas pretas variando de 17,4% a 100% e com contaminações de 0,07 a 100 µg/Kg (THIRUMALA-DEVI et al., 2001; JALILI; JINAP; RADU, 2010; OZBEY; KABAK, 2012; WASKIEWICZ et al., 2013; RAMESH; JAYAGOUDAR, 2014; YOGENDRARAJAH et al., 2014; JALILI, 2016). Sendo assim, as espécies de *Aspergillus* são as mais abundantes na pimenta, destacando-se *A. section Circumdati* e *Nigri* como seus principais contaminantes (GARCIA et al., 2018; JESWAL; KUMAR, 2015).

No Brasil, o limite máximo permitido de ocratoxina A em especiarias, incluindo a pimenta-do-reino preta, é de 30 µg/Kg, assim como no Vietnã (BRASIL, 2021; USDA, 2013). Já para a União Europeia o limite é mais restritivo, de 20 µg/Kg (CAC, 2017).

Os objetivos desse estudo foram verificar a contaminação por OTA em pimentas pretas de diferentes etapas da pré e pós-colheita, desde o campo até o armazenamento, produzidas no estado do Espírito Santo; bem como a presença e identificação de seus fungos potencialmente produtores de ocratoxina A.

2. Materiais e Métodos

2.1 Amostras

No estudo foram analisadas 105 amostras (95 de pimenta do reino preta e 10 de solo) (ao redor de 400g cada) que foram coletadas em lavouras de pequenos e médios produtores do município de São Mateus, no norte do estado do Espírito Santo, em diferentes etapas da produção da pimenta preta, conforme tabela 1, no mês de junho de 2019; totalizando 20 amostras da Colheita, 7 da Secagem, 1 amostra chocha e 67 do Armazenamento; além de 10 amostras de solo.

Para as amostras frescas direto das plantas e do chão foi realizada a debulha manual no laboratório e homogeneização cuidadosa para então coletar uma fração de amostra para as análises conforme os tópicos 2.2, 2.3 e 2.5.1.

Tabela 1. Número de amostras de pimenta-do-reino preta e solo coletadas de 3 sítios.

Amostras	1	2	3
Solo	5	5	
Na Colheita:			
Chão	5	5	
Planta	5	5	
Durante Secagem:			
Terreiro úmida		2	
Terreiro semi-seca		2	
Fogo direto	3		
No Armazenamento:			
Terreiro	20	2	1
Fogo direto	20		1
Fogo indireto	20	1	1
Chocha (indireto)	1		
Estufa			1
Total	79	22	4

2.2 Atividade de água (a_w)

A atividade de água (a_w) de todas as amostras (pimentas e solos) foi medida com o equipamento AquaLab 3TE Series (Decagon, EUA), em triplicata. A média e o desvio padrão foram calculados.

2.3 Análise micológica

A análise micológica foi realizada segundo Pitt e Hocking (2009), detalhada a seguir.

2.3.1. Plaqueamento direto para amostras de pimentas em grãos

A metodologia de plaqueamento direto foi utilizada para as amostras em grão, no qual 50 grãos por amostra são desinfetados com NaClO 0,4% sob agitação por 2 min. e distribuídos em 5 placas de Ágar Dicloran 18% de Glicerol (DG18) para amostras com a_w abaixo de 0,95 e Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) para amostras com a_w acima de 0,95. A incubação foi realizada a 25°C/5-7dias. As infecções fúngicas por espécie foram expressas em porcentagem de grãos infectados.

Foi realizado teste com DG18 e DRBC e não houve diferenças das espécies, portanto seguiu-se o plaqueamento conforme Pitt e Hocking (2009), descrito acima.

2.3.2. Diluição e plaqueamento em superfície para amostras de solo

Para as amostras de solo foram utilizados os métodos de diluição e o plaqueamento em superfície. Vinte e cinco gramas de amostra foram colocados em bolsa estéril com 225mL do diluente água peptonada a 0,1% (proporção 9:1). Esta mistura foi homogeneizada em Stomacher por 30 segundos. Foram realizadas diluições seriadas com 9mL do diluente água peptonada a 0,1% e 0,1mL de cada diluição foi plaqueado em DRBC. A incubação foi realizada a 25°C por 5 a 7dias. Foram escolhidas as placas com 15-150 UFC (Unidades Formadoras de Colônia) para contagem expressando o resultado em UFC/g de amostra.

2.3.3. Isolamento e identificação das cepas

As cepas de *Aspergillus section Nigri* e *Circumdati* foram isoladas em meio *Czapek Yeast Extract Agar* (CYA) e Ágar Extrato de Malte (MEA). A incubação foi realizada por 7 dias nas temperaturas de 5°C, 25°C e 37 e 42/44°C. A identificação foi realizada observando características morfológicas macro e microscópicas segundo as chaves taxonômicas de Klich (2002).

2.4 Análise do potencial toxigênico dos isolados

As cepas de *Aspergillus section Circumdati* e *Aspergillus section Nigri* foram avaliadas quanto à produção de OTA.

Para tanto os fungos potencialmente produtores de ocratoxina A foram inoculados em Ágar Sacarose com Extrato de Levedura (YESA) e a incubação foi a 25°C por 7 dias. Posteriormente foi empregada a técnica de ágar plug aliada à Cromatografia de Camada Delgada (CCD), conforme Filtenborg, Frisvad e Svendsen (1983).

Pedaços de ágar da placa de YESA (5-7mm²) foram retirados e as toxinas extraídas com clorofórmio :metanol (1 :1). Os pedaços foram então sobrepostos “carimbando” na placa de sílica gel (Merck, Alemanha) e juntamente foi aplicado na mesma placa 5 µL do padrão de OTA.

A fase móvel de tolueno :acetato de etila :ácido fórmico :clorofórmio (7 :5 :2 :5) foi utilizada para o desenvolvimento da cromatografia. Terminada a eluição e depois de secar a placa, ela foi visualizada em câmara escura Cromatovisor com lâmpada UV de comprimento de onda de 254 e 365 nm. Foi realizada a determinação qualitativa pela comparação do fator de retenção (Rf) e da fluorescência dos isolados em relação ao padrão.

2.5 Determinação de ocratoxina A nas amostras de pimenta preta por Cromatografia Líquida

2.5.1. Preparação de amostra

Aproximadamente 100 g de cada amostra foram trituradas finamente usando um moedor (IKA, Brasil) e passadas em peneira de malha 18 (Bronzinox, Brasil) até atingir granulometria abaixo de 1 mm.

2.5.2 Extração e limpeza

Uma alíquota de cinco gramas de cada amostra foi extraída com 100 mL de solução a 3% de metanol:bicarbonato (1:1) e homogeneizados por 30 min. no agitador horizontal (New Brunswick Scientific Company, USA). Foi realizada uma dupla filtragem com um filtro qualitativo (Nalgon, Alemanha) e um filtro de microfibra de vidro (Vicom, Suécia). Quatro mililitros do filtrado foram diluídos em 20 mL de tampão PBS (pH 7,0) com 0,01% de tween 80. Esse conteúdo foi passado através da coluna de imunoafinidade OchraTest (CIA) (Vicom, EUA) a uma vazão de 2-3 mL por minuto e lavado com 20 mL de água ultra pura (MilliQ, França).

A micotoxina foi eluída oito vezes com 500µL de metanol:ácido acético (98:2). O extrato foi seco sob fluxo de nitrogênio e ressuspenso com 300µL da fase móvel acetonitrila: água: ácido acético (51:47:02). Foi realizada uma última filtragem do extrato em filtro de 0,45µm PVDF (Analítica, China), antes de ser injetado. Um volume de 20 µL foi injetado em *High Performance Liquid Chromatograph* (HPLC) com detector de fluorescência. Seguiu-se a metodologia de Copetti et al. (2010).

2.5.3. Critérios do HPLC

Foi utilizado o sistema cromatográfico Agilent 1260 Infinity LC System (Agilent, EUA) com detector de fluorescência de 333 e 477 nm de excitação e emissão, respectivamente, e injeção automática. Uma coluna C18 (Agilent, EUA) (4,6×150mm) de fase reversa foi utilizada com temperatura do forno à 40 °C. A fase móvel utilizada foi metanol: acetonitrila:

água: ácido acético (35:30:34:01) com vazão de 0,8 mL / min (COPETTI et al., 2010, modificado).

2.5.4 Otimização do método

Um padrão de ocratoxina A foi utilizado para a elaboração de uma curva de calibração de seis pontos das áreas de pico x massa (ng/área). A recuperação foi calculada através de amostras fortificadas com o padrão de ocratoxina A (1,73 ng/g), em triplicata.

O Limite de Quantificação (LOQ) e o Limite de Detecção (LOD) do método foram calculados considerando oito réplicas de pimenta preta com nível baixo de ocratoxina A, de acordo com o Eurachem Guide (2014).

2.6 Análise molecular

Cem isolados das amostras foram selecionados (87 de *A. section Nigri* e 13 de *A. section Cirdumdati*) como representantes de diferentes espécies (pela identificação morfológica) incluindo produtores e não produtores de ocratoxina A para serem submetidos à extração de ácido nucleico e análise de sequenciamento de genes.

2.6.1. Extração de DNA

Primeiramente foram realizadas culturas monospóricas de cada isolado a ser sequenciado. A partir de então, o DNA genômico foi extraído diretamente do micélio fúngico da inoculação em meio YESA incubado a 25°C/2 dias, adicionando 3 mL de tampão de extração composto por 0,5 mL de EDTA, 0,5 mL de cloreto de sódio 5M, 1 mL de SDS 10%, 2 mL de Tris HCl 1M e 6 mL de H₂O. Essa suspensão foi transferida para criotubos com pérolas de vidro e agitada em vórtex a 10.000 rpm/6 min, colocada em banho-maria à 70°C/10 min e levada novamente ao vórtex a 10.000 rpm/10 min, para quebra das membranas celulares e exposição do DNA. Em seguida, foi centrifugada a 12.000 rpm/3 min para desproteinização e a fase aquosa superior foi recolhida (600 µL) e adicionado a ela 1 mL de tampão de ligação (DD Buffer) do kit Gel DNA Purification (Mebep Bioscience); 800 µL dessa mistura foi passado na coluna de sílica, aguardado 1 minuto para se ligar na membrana e centrifugado a 12.000

rpm/1 min. Em seguida realizou-se o mesmo procedimento com os outros 800 μ L e descartado o resíduo que passou pela coluna.

A lavagem foi feita com 550 μ L do tampão de lavagem (WB Buffer), centrifugação a 12.000 rpm/ 1-3 min. e descarte do resíduo que passou pela membrana (procedimento realizado duas vezes), para a retirada de sais. Para a eluição foi passado 200 μ L de tampão de eluição (EB Buffer) na coluna, aguardado 1 minuto, centrifugado a 12.000 rpm/1 min e coletado em tubo tipo eppendorf com 20 μ L de NaCl 3M. Após, adicionou-se 400 μ L de etanol absoluto refrigerado e homogeneizou-se manualmente para precipitação diferencial do DNA. O eluído foi guardado no freezer durante 45 minutos e passou por posterior centrifugação a 12.000 rpm/5 min, sendo o sobrenadante descartado.

Para a purificação e retirada de sais, o precipitado foi lavado com 300 μ L de álcool 70% refrigerado, homogeneizado manualmente por inversão e centrifugado a 12.000 rpm/1 min, repetindo-se 3 vezes, sendo o sobrenadante descartado a cada vez. A secagem do DNA foi feita em estufa a 42°C/25 min. A ressuspensão foi feita com 50 μ L de água MilliQ e homogeneizado manualmente com vigor e guardado em refrigerador overnight (DOYLE; DOYLE, 1987 modificado).

O DNA ressuspendido foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% na presença de brometo de etídio (0,5 μ g/mL) para observação da integridade e quantificado visualmente por comparação com marcador padrão conhecido (ng). Para finalizar, as amostras foram diluídas em água Milli-Q estéril para obter uma concentração final de 5 ng/ μ L.

2.6.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Foram preparados 24 μ L do Mix com pares de primers F e R calmodulina CF1 (GCCGACTCTTTGACYGARGAR) e CF4 (TTTYTGATCATRAGYTGGAC) (PETERSON et al., 2005) para amplificação do DNA utilizando a técnica de PCR (Reação em cadeia da polimerase) que foi desenvolvida em termociclador incluindo etapas de desnaturação (95°C/3 min), seguida por ciclos de desnaturação (95°C/40 seg), anelamento de primers (56°C/40 seg), e extensão (72°C/80 seg), com 35 repetições (HONG et al., 2006; SILVA et al., 2020).

Por fim, o produto da PCR foi aplicado em gel de agarose 1,2% com marcador de peso molecular, para observação da especificidade.

2.6.3. Sequenciamento

Os produtos de PCR foram purificados com o ExoSAP-IT (Thermo Fisher Scientific, Santa Clara, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante e sequenciados usando o kit de sequenciamento BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) em um analisador genético SeqStudio (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). As sequências obtidas foram alinhadas com as sequências de todas as cepas tipo do grupo em questão disponíveis no banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando o *software* BioEdit (HALL, 1999) e confirmadas usando a ferramenta BLASTn do *GenBank* versão 2.0 (KIMURA, 1980). O *software* MEGA 11.0 foi utilizado para construir uma árvore filogenética de máxima verossimilhança (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2021). Para determinar o suporte para cada clado, a análise de *bootstrap* foi executada em 1.000 réplicas.

3. Resultados e Discussão

3.1 Contaminação fúngica das amostras

Das 95 amostras de pimentas foi isolado um total de 289 cepas de *A. section Nigri*, ou seja, foram predominantes (FO = 41,1%); enquanto nas 10 amostras do solo foram isoladas 23 cepas.

O grupo mais comum encontrado foi o da série *Nigri* (n=275), com 38,1% de frequência de ocorrência. Em seguida, o grupo da série *Japonici* foi o mais frequente (n=26), com 12,4% de FO. Por fim foram identificados os 11 isolados da série *Carbonarii*, com 3,8% de FO e 100% produtores de OTA.

A figura 1 apresenta o número de isolados e a frequência de ocorrência (FO) de *Aspergillus section Nigri* encontrados no total de amostras; e as tabelas 2 e 3 mostram o número de isolados, FO e média de infecção nas diferentes amostras e tipos de secagem.

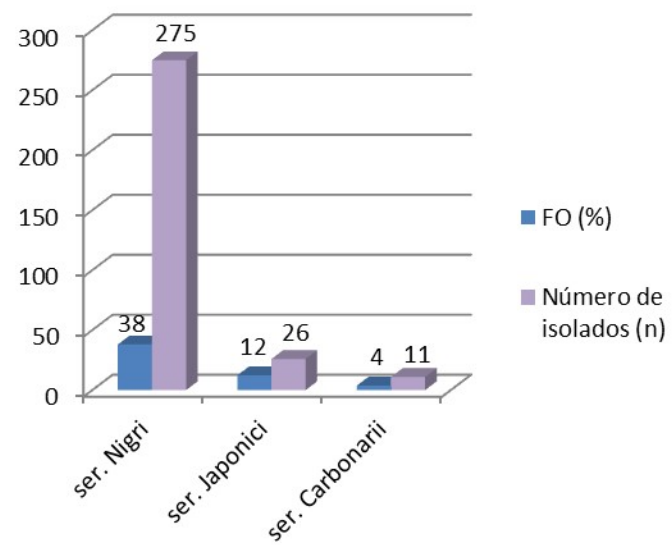


Figura1. Contaminação total das amostras por *Aspergillus* section *Nigri*.

Tabela 2. Número de isolados de *Aspergillus* section *Nigri*, porcentagem da frequência de ocorrência (FO) e média de infecção encontrados nas amostras do solo e durante secagem em terreiro (úmida e semi-secas) e em fogo direto.

Amostras	Solo n=10			Terreiro úmida n=2			Terreiro semi-seca n=2			Fogo Direto n=3		
Grupos	Isolados (n)	FO (%)	Média de infecção (%)	Isolados (n)	FO (%)	Média de infecção (%)	Isolados (n)	FO (%)	Média de infecção (%)	Isolados (n)	FO (%)	Média de infecção (%)
ser. <i>Nigri</i>	22	40	7,6 x 10 ²	1	50	1,0	2	50	2	5	66,7	3,3
ser. <i>Carbonarii</i>	0	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0	0	0
ser. <i>Japonici</i>	1	10	1,0 x 10 ²	0	0	0,0	0	0	0	5	33,3	3,3

* Não houve infecção por *Aspergillus* section *Nigri* nas amostras de pimentas do chão e da planta.

Tabela 3. Número de isolados de *Aspergillus* section *Nigri*, porcentagem da frequência de ocorrência (FO) e média de infecção encontrados nas amostras armazenadas de secagem em terreiro, fogo direto, fogo indireto, estufa e pimentas chochas.

Amostras	Terreiro n=23			Direto n=21			Indireto n=22			Outras (chocha e estufa) n=2		
Grupos fúngicos	Isolados (n)	FO (%)	Média de infecção (%)	Isolados (n)	FO (%)	Média de infecção (%)	Isolados (n)	FO (%)	Média de infecção (%)	Isolados (n)	FO (%)	Média de infecção (%)
ser. <i>Nigri</i>	208	78,3	18,1	19	47,6	1,8	12	9,1	1,1	6	100	6
ser. <i>Carbonarii</i>	11	17,4	1,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ser. <i>Japonici</i>	13	21,7	1,1	4	14,3	0,4	3	13,6	0,3	0	0	0

As amostras de pimenta do chão e da planta não tiveram crescimento de fungos do grupo *Aspergillus* section *Nigri*. Porém, há presença destes fungos no solo e após a colheita, nas etapas de secagem; além disso, todas as espécies identificadas do solo também foram encontradas nas amostras de pimenta dos 3 tipos de secagem (predominantemente *A. niger*, 69,2%). Nas amostras do solo foram obtidos 23 isolados de dois grupos fúngicos, sendo identificados 9 *A. niger*, 1 *A. luchuensis* e 1 *A. brunneoviolaceus*, podendo ser fonte de contaminação para as pimentas. Ou seja, é possível que tais espécies permaneceram latentes e se desenvolveram após condições mais favoráveis, ou ainda sugere-se que a contaminação pode não ter vindo do solo e sim de outras fontes, como: dispersão de esporos pelo ar, ação de insetos e outros animais, condições da secagem e armazenamento ou o manejo dos próprios trabalhadores.

Possivelmente por serem fungos xerofílicos as amostras secas de terreiro (com uma das menores a_w , com média de 0,649) foram as mais contaminadas (74,1%) e *Aspergillus carbonarius* (n=11) estavam presentes apenas nas amostras secas e armazenadas de secagem em terreiro, e todos os isolados são produtores de OTA e sabe-se que esse tipo de secagem é a mais demorada e pode facilmente propiciar a contaminação por esta micotoxina.

Com relação aos *A. section Circumdati*, também houve uma maior incidência nas amostras de secagem em terreiro (n=11) além de estarem presentes em amostras da secagem em fogo direto, porém em menor frequência (n=2) (Figura 2). Na secagem em terreiro foi verificada maior incidência de isolados no total, (n=235) corroborando com o fato de que se pode sugerir ser um método mais susceptível à contaminação fúngica e consequentemente à possível contaminação por OTA.

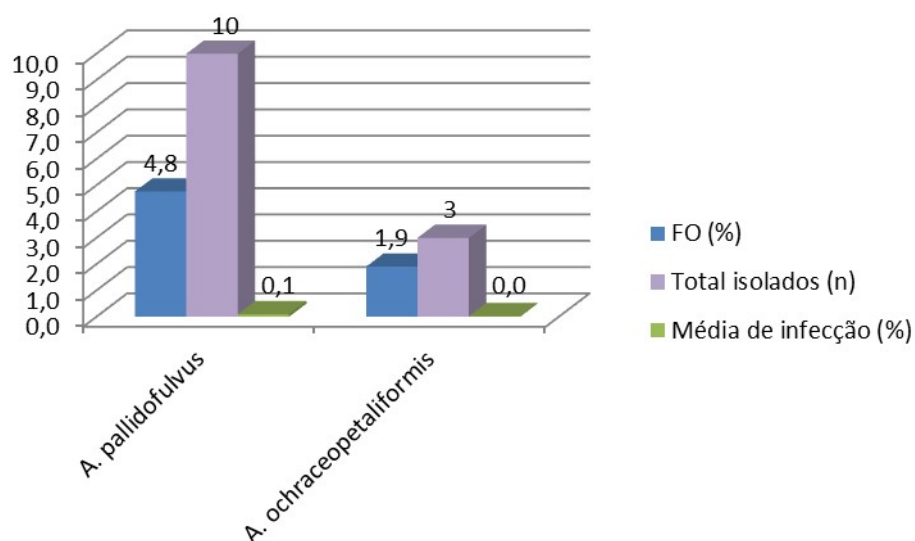


Figura 2. Contaminação total das amostras por *Aspergillus* section *Circumdati*.

3.2 Identificação molecular

Foram sequenciados 87 (27,8%) isolados (do total de $n=312$) de *Aspergillus* section *Nigri*, entre eles: 35 *A. niger*, 19 *A. luchuensis*, 11 *A. carbonarius*, 8 *A. brunneoviolaceus*, 5 *A. welwitschiae*, 3 *A. neoniger*, 2 *A. brasiliensis*, 1 *A. japonicus*, 1 *A. vinaceus*, 1 *A. tubingensis* e 1 *A. vadensis*; como pode-se observar na figura 3. E a figura 4 apresenta um exemplar de um gel de eletroforese com os produtos de PCR de 25 representantes no qual se observa a integridade da amplificação e o tamanho dos fragmentos em torno de 600 bp.

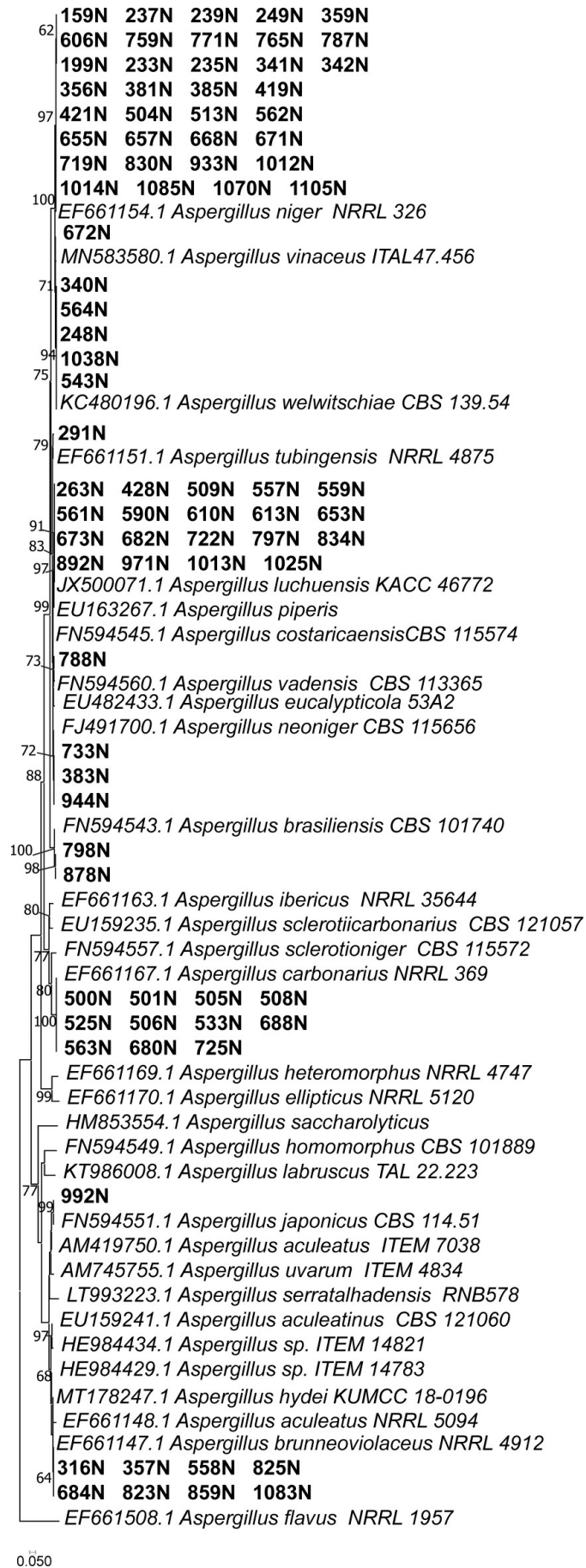


Figura 3. Árvore filogenética de *Aspergillus* section *Nigri* baseada nas sequências de *CaM* com Máxima Verossimilhança e *bootstrap* de 1000 réplicas. Modelo Tamura Nei. Apenas *bootstraps* $\geq 60\%$ foram mostrados. *Aspergillus flavus* é o outgroup.

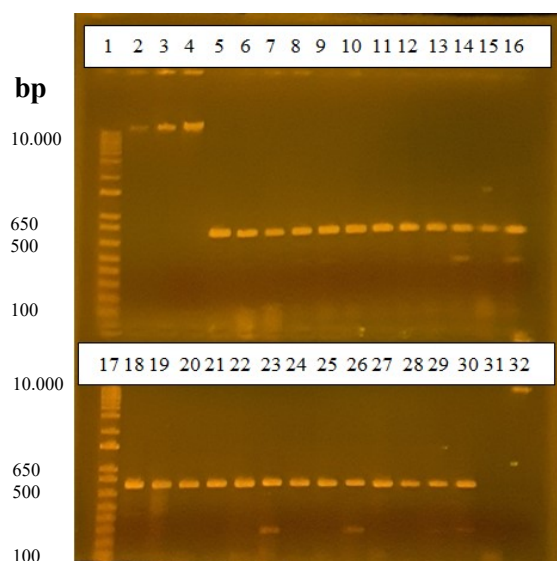


Figura 4. Eletroforese de produtos de PCR do gene *CaM* (*cfl* e *cf4*). **1 e 17.** Kb ladder, marcador de peso molecular (bp). **2.** λ 50 ng/ μ L. **3.** λ 100 ng/ μ L. **4.** λ 200 ng/ μ L. **5, 11-13, 15, 18, 20-22, 25, 27 e 28.** *Aspergillus luchuensis*. **6-10,14 e 16.** *A. carbonarius*. **19.** *A. vadensis*. **23, 26, 29 e 30.** *A. niger*. **24.** *A. neoniger*. **31.** Controle negativo. **32.** Controle positivo.

O grupo da série *Nigri* foi caracterizado por serem bisseriados, com colônias negras a levemente marrons (60 mm) em meio CYA a 25°C/7 dias e conídios lisos a levemente rugosos (4–5 μ m).

O grupo da série *Japonici* possuem colônias de cor marrom escuro a cinza escuro com textura de veludo (60 mm) em meio CYA a 25°C/7 dias, e conídios espinhosos (4–5 μ m). Os *A. carbonarius* (série *Carbonarii*) foram caracterizados por possuírem conídios grandes (7-10 μ m) e ornamentados com espinhos. Alguns representantes de tais grupos podem ser observados na figura 5.

Tais espécies/grupos já foram encontrados em amostras de pimentas pretas. Jeswal e Kumar (2015) e Jacxsens, Yogendrarajaha e Meulenae (2016) encontraram *A. niger* com FO 19,5% e 62%, respectivamente. Garcia, Mallmann e Copetti (2018) encontraram *A. niger* complex e *A. carbonarius* com FO 80% e 6,7% (respectivamente); além de Persson da Silva et al. (2021) que encontraram *A. niger* aggregate e *A. carbonarius* com FO 67,7% e 16,1%, respectivamente, e os aspergilos negros uniseriados só foram encontrados nas amostras sem desinfecção superficial dos grãos (9,7%).

Isto indica que *A. niger* e *A. carbonarius* são mais comuns neste tipo de matriz e o grupo dos uniseriados são mais raros de serem encontrados, ou seja, as espécies potencialmente ocratoxigênicas são mais frequentes, servindo de alerta para ações de medidas preventivas como as Boas Práticas para mitigação da contaminação.

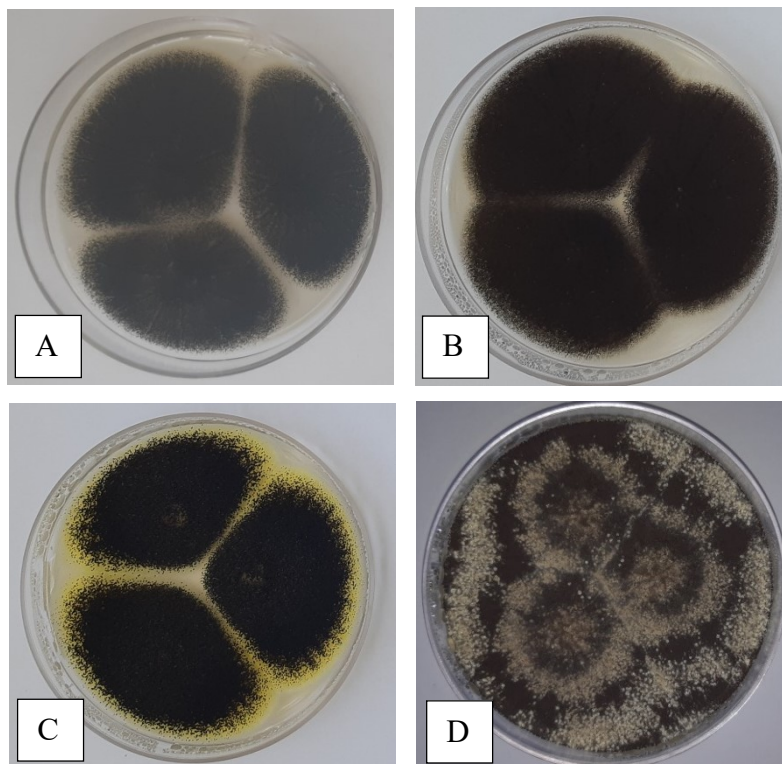


Figura 5. Algumas das principais espécies encontradas. CYA 25°C / 7 dias. **A.** *Aspergillus niger*. **B.** *A. luchuensis*. **C.** *A. carbonarius*. **D.** *A. brunneoviolaceus*.

Foram sequenciados todos os 13 isolados de *Aspergillus* section *Circumdati*, 10 deles correspondentes à *Aspergillus pallidofulvus* e 3 à *Aspergillus ochraceopetaliformis*, conforme observa-se na figura 6.

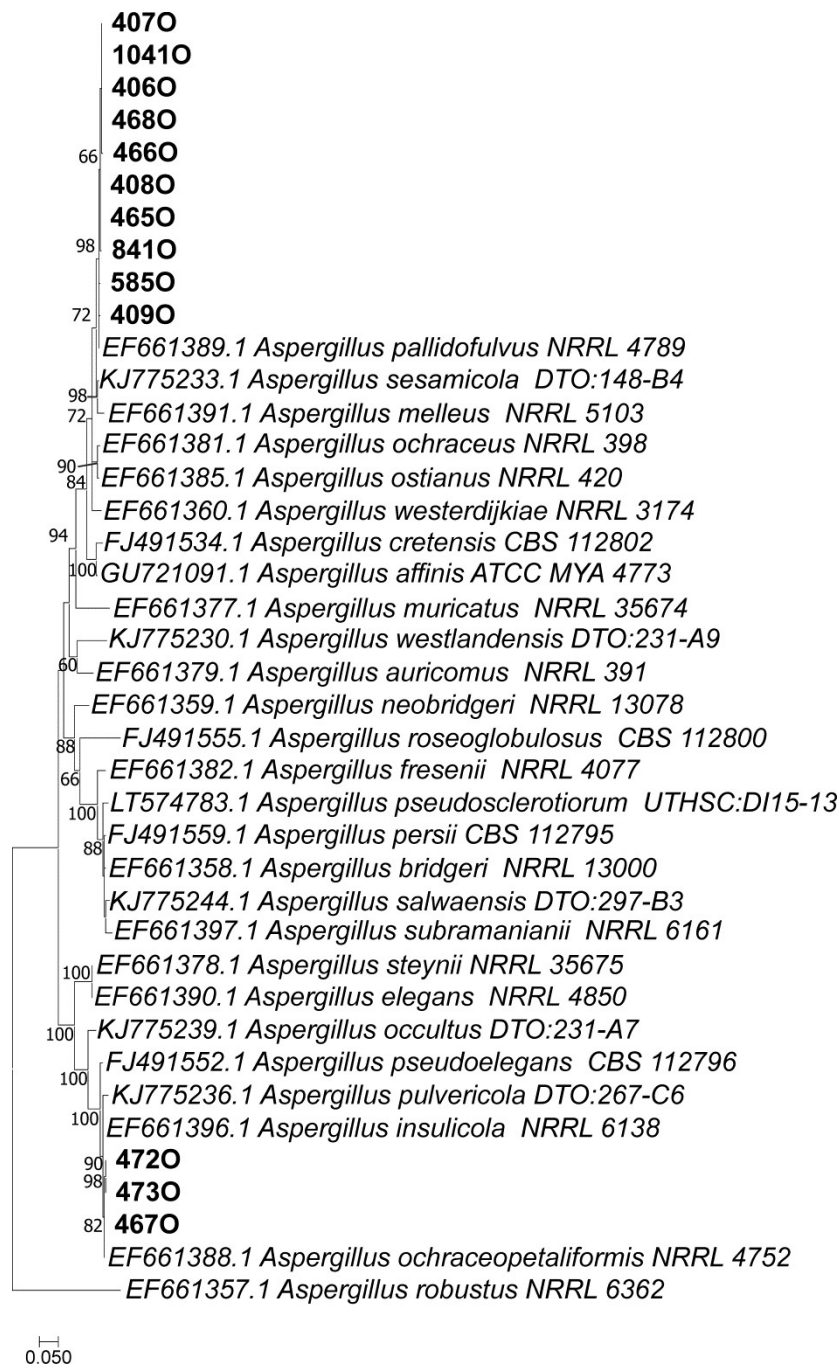


Figura 6. Árvore filogenética dos *Aspergillus* section *Circumdati* baseada nas sequências de *CaM* com Máxima Verossimilhança e *bootstrap* de 1000 réplicas. Modelo Tamura Nei. Apenas *bootstraps* $\geq 60\%$ foram mostrados. *Aspergillus robustus* é o outgroup.

Dentre os isolados de *Aspergillus* section *Circumdati* os *Aspergillus pallidofulvus* caracterizam-se por apresentarem vesículas pequenas (25.7 μm) e habilidade de crescer a 37°C (15 mm). Não são capazes de produzir OTA. São biseriados e apresentam métula de 8,0 μm e fiálides de 9,0 μm , além de conídios de 3,8 μm . Possuem esclerócios de cor amarela a

rosada em meio CYA a 25°C e reverso marrom. Suas colônias variam 39 a 60 mm após 7 dias de incubação (figura 7B) (VISAGIE et al., 2014). Esta espécie foi primariamente descrita por Visagie et al. (2014) sendo raramente reportada na pimenta preta. Persson da Silva et al. (2021) encontraram 16,1% de frequência de ocorrência desta espécie em amostras de pimenta preta provenientes de mercados.

Aspergillus ochraceopetaliformis possuem esparsos esclerócios na cor laranja queimado (geralmente cobertos pelo micélio), colônias de 38-51 mm predominantemente branca e com pouca esporulação, sendo capazes de crescer a 37°C (11-16 μ m). O tamanho da vesícula apresenta grande variação (20-44 μ m) e seus conídios são pequenos (2-3 μ m); são bisseriados com métulas variando de 8-26 μ m e fiálides de 7,6-10,5 μ m (figura 7A). São capazes de produzir OTA (FRISVAD et al., 2004; VISAGIE et al., 2014). É a primeira vez que esta espécie esta sendo reportada em pimenta preta.

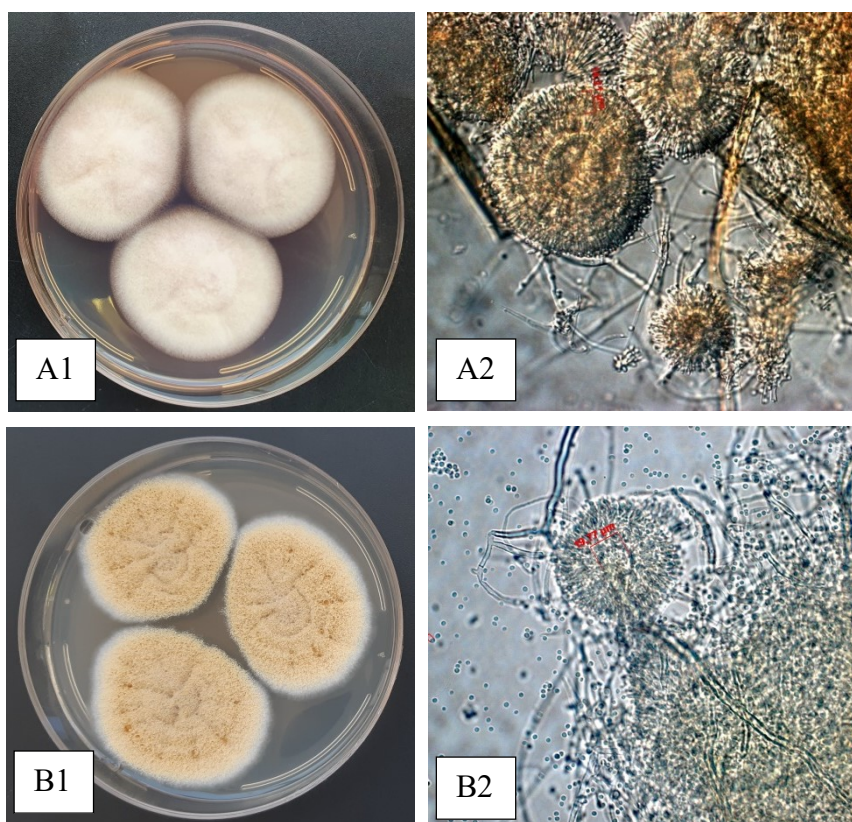


Figura 7. A. *Aspergillus ochraceopetaliformis*. **A1 e B1.** CYA 25°C / 7 dias. **A2 e B2.** Microscopia com objetiva de 40X. **B.** *Aspergillus pallidofulvus*.

3.3 Fungos produtores de OTA

Todas as cepas de *A. section Nigri* (n=312) e *A. section Circumdati* (n=13) foram avaliadas quanto à produção de OTA (tabela 4).

Tabela 4. Fungos produtores de ocratoxina A em amostras de pimenta preta das etapas de Colheita (Chão e Planta), Durante secagem (Terreiro e Fogo Direto) e pós-colheita (Armazenamento após secagem); além de amostras do solo.

Origem			<i>ser. Nigri</i>	<i>ser. Carbonarii</i>	<i>ser. Japonici</i>	Total
Solo	Solos	Isolados/OTA+ (n)	22/0	0/0	1/0	23/0
		% Produtores	0	0	0	0
Colheita	Chão e Planta	Isolados/OTA+ (n)	0/0	0/0	0/0	0/0
		% Produtores	0	0	0	0
Durante secagem	Terreiro úmidas	Isolados/OTA+ (n)	1/0	0/0	0/0	1/0
		% Produtores	0	0	0	0
	Terreiro semi-secas	Isolados/OTA+ (n)	2/0	0/0	0/0	2/0
		% Produtores	0	0	0	0
	Fogo Direto	Isolados/OTA+ (n)	5/0	0/0	5/0	10/0
		% Produtores	0	0	0	0
Armazenamento	Fogo Direto	Isolados/OTA+ (n)	19/0	0/0	4/0	23/0
		% Produtores	0	0	0	0
	Fogo Indireto	Isolados/OTA+ (n)	12/1	0/0	3/0	15/1
		% Produtores	8,3	0	0	6,7
	Chocha (Indireto)	Isolados/OTA+ (n)	5/0	0/0	0/0	5/0
		% Produtores	0	0	0	0
Estufa	Isolados/OTA+ (n)	1/0	0/0	0/0	1/0	
	% Produtores	0	0	0	0	
Total		Isolados/OTA+ (n)	275/8	11/11	26/0	312/19
		% Produtores	2,91	100	0	6,09

Dentre os pertencentes aos *Aspergillus section Circumdati* (n=13), apenas os 3 isolados de *A. ochraceopetaliformis* foram produtores de OTA, os quais estavam infectando amostras da secagem em terreiro.

Dentre os *Aspergillus section Nigri*, apenas 2,91% da série *Nigri* e 100% da série *Carbonarii* (*A. carbonarius*) foram produtores de OTA, confirmando os dados da literatura (FRISVAD et al., 2007; SAMSON et al., 2014). Embora existam relatos de isolados de *A. carbonarius* que não foram capazes de produzir OTA (CABAÑES; BRAGULAT; CASTELLÁ, 2013; PERSSON DA SILVA et al., 2021).

Foi observado que a maior ocorrência de fungos toxigênicos ocorreu nas amostras secas, obtidas da secagem em terreiro, mostrando ser uma forma de secagem mais crítica.

A figura 8 apresenta um exemplar de uma placa de Cromatografia de Camada Delgada, na qual se observa um isolado (*A. carbonarius*) produtor de OTA.

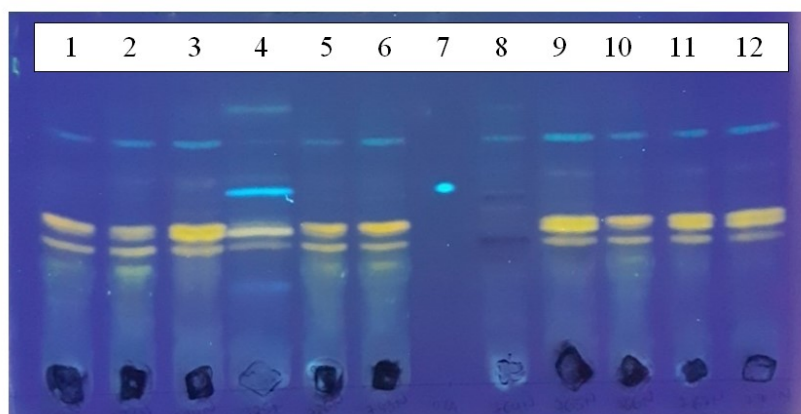


Figura 8. Exemplar de uma placa de CCD sob luz UV. 1-3, 5-6, 8-12. *Aspergillus section Nigri* (OTA -). 4. *A. carbonarius* (OTA +). 7. Padrão de OTA.

3.4 Presença de ocratoxina A nas amostras

Das 94 amostras de pimentas testadas, apenas 6 (6,4%) estavam contaminadas com OTA, sendo 4 delas provenientes da secagem em Terreiro: 2 abaixo de 1 ppb (0,39 e 0,89 ng/g), 3 amostras entre 1 e 10 ppb (1,09; 3,06; e 8,26 ng/g), e 1 amostra acima de 10 ppb (42,81 ng/g). Dez amostras apresentaram níveis abaixo do LOD ($< 0,317$ ng/g) (tabela 5).

Com exceção das amostras do Chão e Fogo Direto que apresentaram contaminação por OTA, mas não estavam infectadas por nenhum fungo ocratoxigênico; as outras 4 amostras (Terreiro secas armazenadas no mesmo local) tinham presença de fungos produtores de OTA. Portanto, é possível que no primeiro caso houve a produção da toxina e o fungo não sobreviveu (IAMANAKA; OLIVEIRA; TANIWAKI, 2010); já no segundo caso possivelmente os fungos encontraram condições favoráveis para a produção da micotoxina em alguma etapa da cadeia como a secagem (condições climáticas ou manejo inadequado) e/ou armazenamento (reumidificação) e ficaram latentes (PITT; HOCKING, 2009).

Tabela 5. Número de amostras contaminadas com ocratoxina A.

Amostras	Níveis de OTA (µg/kg)	<LOD	≥0.3- <1.0	≥1.0 – <5.0	≥5.0 – <10.0	≥10.0
Colheita	Chão (n=10)	9	0	1	0	0
	Planta (n=10)	10	0	0	0	0
Durante secagem	Terreiro semi-seca e úmidas (n=3)	3	0	0	0	0
	Direto (n=3)	3	0	0	0	0
Armazenamento	Terreiro (n=23)	19	1	1	1	1
	Direto (n=21)	20	1	0	0	0
	Indireto (n=23)	23	0	0	0	0
	Estufa (n=1)	1	0	0	0	0
Total (n=94)		78	2	2	1	1

*Pimenta chocha: amostra consta no grupo de Fogo Indireto. LOD = 0,3 µg/kg.

As amostras da presente pesquisa são provenientes da produção e a maioria das amostras relatadas nos outros trabalhos é do comércio (e indicam maiores porcentagens de contaminação por OTA), desse modo a comparação fica incompatível. Portanto, pelo fato do café ter um processo de secagem parecido com a pimenta preta é possível correlacionar sua contaminação. Taniwaki et al. (2003) constataram que os cafés que ficaram no solo e em condições impróprias de secagem e armazenamento, auxiliaram para uma maior contaminação por fungos toxigênicos. Além disso, foi visto que o café colhido do pé possuía uma taxa média de infecção baixa de fungos toxigênicos. O nível médio de OTA em 135 amostras de café maduras do pé, maduras demais no pé, maduras demais no solo, secagem em terreiro e armazenamento foi de 0,1; <0,2; 1,6; 2,1 e 3,3 µg/kg, respectivamente.

Adicionalmente, outros estudos micológicos relataram que, embora a pimenta-do-reino estivesse altamente contaminada com *A. flavus* e/ou *A. ochraceus*, foi observada baixa ou nenhuma produção de AF e/ou OTA (FREIRE et al. 2000; ELSHAFIE et al. 2002; GATTI et al. 2003). Estes e outros relatos concordam com nossos resultados mostrando que a maioria das pimentas estavam contaminadas com níveis baixos ou não detectáveis de micotoxinas,

portanto, deve-se ter cuidado para evitar resultados falso-positivos na análise dessas amostras (ALI et al., 2015).

3.5 Otimização do método

A metodologia utilizada apresentou uma recuperação satisfatória para o nível médio (1,73 ng/g), com média de 88,8% de recuperação, $DP \pm 0,284$, e estão de acordo com a Diretiva da Comunidade Europeia EC 401/2006 que considera 70-110% de recuperação para níveis de 1-10 ng/g.

Os Limites de Quantificação (LOQ) e Detecção (LOD) e do método foram 1,05 e 0,31 µg/kg, respectivamente; com tempo de retenção (Rf) de 10,7 minutos.

4. Conclusão

Neste estudo foi obtida uma baixa contaminação das pimentas analisadas, podendo indicar que, de modo geral, seu manejo e meios de secagem foram adequados; excetuando-se uma amostra de secagem em terreiro que estava acima dos limites permitidos; ficando assim um alerta para este tipo de secagem em especial, que pode ser mais crítica para a contaminação por OTA.

A ser. *Nigri* foi o maior grupo encontrado, sendo apenas 2,9% produtores de OTA, porém *Aspergillus ochraceopetaliformis* (isolado pela primeira vez em pimenta preta) e *Aspergillus carbonarius* foram encontrados apenas em amostras secas em Terreiro e se mostraram 100% produtores.

5. Referências

ALI, N.; HASHIM, N. H.; SHUIB, N. S. Natural occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in processed spices marketed in Malaysia. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 15 p., 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 88, de 26 de março de 2021. Estabelece os limites máximos tolerados (LMT) de contaminantes em alimentos. *Diário Oficial da União*. 2021.

CABAÑES, F. J.; BRAGULAT, M. R.; CASTELLÁ, G. Characterization of nonochratoxigenic strains of *Aspergillus carbonarius* from grapes. *Food Microbiology*, v. 36, p. 135-141, 2013.

COPETTI, M. V.; PEREIRA, J. L.; IAMANAKA, B. T.; PITT, J. I.; TANIWAKI, M. H. Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in cocoa during farm processing. *International Journal of Food Microbiology*, 143, p. 67-70, 2010.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, v. 19, n. 1, p. 11-15, 1987.

EURACHEM GUIDES. The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics. LGC, Teddington, 2nd ed., 2014.

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. C. O.; KOZAKIEWICZ, Z.; PATERSON, R. R. M. Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. *Mycopathologia*, v. 149, p. 13–19, 2000.

FRISVAD, J. C.; FRANK, J. M.; HOUBRAKEN, J. A. M. P.; KUIJPERS, A. F. A.; SAMSON, R. A. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Studies in Mycology*, v. 50, p. 23–43, 2004.

FRISVAD, J. C.; LARSEN, T. O.; VRIES, R. DE; MEIJER, M.; HOUBRAKEN, J.; CABAÑES, F. J.; EHRLICH, K.; SAMSON, R. A. Secondary metabolite profiling, growth profiles and other tools for species recognition and important *Aspergillus* mycotoxins. *Studies in Mycology*, v. 59, p. 31–37, 2007.

GARCIA, M. V.; MALLMANN, C. A.; COPETTI, M. V. Aflatoxigenic and ochratoxigenic fungi and their mycotoxins in spices marketed in Brazil. *Food Research International*, v. 106, p. 136–140, 2018.

GATTI, M. J.; FRAGA, M. E.; MAGNOLI, E. C.; DALCERO, A. M.; ROCHA ROSA C. A. Mycological survey for potential aflatoxin and ochratoxin producers and their toxicological properties in harvested Brazilian black pepper. *Food Additives and Contaminants*, v. 20, n. 12, p. 1120–1126, 2003.

HALL, T. A. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, n. 41, p. 95-98, 1999.

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.

IAMANAKA, B. T.; OLIVEIRA, I. S.; TANIWAKI, M. H. Micotoxinas em alimentos. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*, v. 7, p.138-161, 2010.

IARC. International Agency for Research on Cancer. Ochratoxin A. Summaries & Evaluations, v. 56, CAS n. 303-47-9, p. 489, 1993.

IPC. International Pepper Community. Crop Position Report: All Countries - 2019. International Pepper Conference, 2020. Available from: <https://internationalpepperconference.com/report/index?product=10&year=2019&report_type=10&member=&graph=20> Cited: 17 feb. 2021.

JACXSENS, L.; YOGENDRARAJAHA, P.; MEULENAER, B. Risk Assessment of Mycotoxins and Predictive Mycology in Sri Lankan Spices: Chilli and Pepper. *Procedia Food Science*, v. 6, p. 326 – 330, 2016.

JALILI, M.; JINAP, S.; RADU, S. Natural occurrence of ochratoxin A contamination in commercial black and white pepper products. *Mycopathologia*, v. 170, p. 251–258, 2010.

JALILI, M. Natural Occurrence of Ochratoxin A Contamination in Commercial Spices in Tehran. *Nutrition and Food Sciences Research*, v. 3, n. 3, p. 25-30, 2016.

JESWAL, P.; KUMAR, D. Mycobiota and Natural Incidence of Aflatoxins, Ochratoxin A, and Citrinin in Indian Spices Confirmed by LC-MS/MS. *International Journal of Microbiology*, v. 2015, 8 p., 2015.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, v. 16, p. 111–120, 1980.

KLICH, M. A. Identification of common *Aspergillus* species. Centraalbureau voor Schimmelcultures, The Netherlands. 2002.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, v. 38, p. 3022-3027, 2021.

LARSEN, T. O.; SVENDSEN, A.; SMEDSGAARD, J. Biochemical characterization of ochratoxin A – producing strains of the genus *Penicillium*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, p. 3630-3635, 2001.

O'BRIEN, E.; DIETRICH, D. R. Ochratoxin A: The Continuing Enigma. *Critical Reviews in Toxicology*, v. 35, p.33–60, 2005.

OZBEY, F.; KABAK, B. Natural co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in spices. *Food Control*, v. 28, p. 354-361, 2012.

PERSSON DA SILVA, A. R.; FUNGARO, M. H. P.; SILVA, J. J.; MARTINS, L. M.; TANIWAKI, M. H.; IAMANAKA, B. T. Ochratoxin A and related fungi in Brazilian black pepper (*Piper nigrum* L.). *Food Research International*, v. 142, 2021.

PETERSON, S. W.; VEGA, F. E.; POSADA, F.; NAGAI, C. *Penicillium coffeae*, a new endophytic species isolated from a coffee plant and its phylogenetic relationship to *P. fellutanum*, *P. thiersii* and *P. brocae* based on parsimony analysis of multilocus DNA sequences. *Mycologia*, v. 97, p. 659–666, 2005.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. Fungi and food spoilage. Springer Science Business Media: New York, 593 p., 2009.

RAMESH, C.; JAYAGOUDAR, S. Determination of Ochratoxin A in spices from Dharwad by High Performance Liquid Chromatography. *Asian Journal of Plant Science and Research*, v. 4, n. 1, p. 42-52, 2014.

SAMSON, R. A.; NOONIM, P.; MEIJER, M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; VARGA, J. Diagnostic tools to identify black aspergilli. *Studies in Mycology*, v. 59, p. 129–145. 2007.

SAMSON, R. A.; VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; HONG, S.-B.; HUBKA, V.; KLAASSEN, C. H. W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K. A.; SUSCA, A.; TANNEY, J. B.; VARGA J.; KOCSUBÉ, S.; SZIGETI, G.; YAGUCHI, T.; FRISVAD, J.C. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies In Mycology*, v. 78, p. 141–173, 2014.

SILVA, J. J.; IAMANAKA, B. T.; FERRANTI, L. S.; MASSI, F. P.; TANIWAKI, M. H.; PUEL, O.; LORBER, S.; FRISVAD, J. C.; FUNGARO, M. H. Diversity within *Aspergillus niger* Clade and Description of a New Species: *Aspergillus vinaceus* sp. nov. *Journal of Fungi*, v.6, 317, 20p., 2020.

THIRUMALA-DEVI, K.; MAYO, M. A.; REDDY, G.; EMMANUEL, K. E.; LARONDELLE, Y.; REDDY, D. V. R. Occurrence of ochratoxin A in black pepper, coriander, ginger and turmeric in India. *Food Additives & Contaminants*, v. 18, n. 9, p. 830-835, 2001.

USDA. United States Department of Agriculture. Vietnam - Technical Regulations on Mycotoxin an Heavy Metals MRLs in Foods. *Global Agricultural Information Network*, n. VM3070, 2013.

VISAGIE, C. M.; VARGA, J.; HOUBRAKEN, J.; MEIJER, M.; KOCSUBÉ, S.; YILMAZ, N.; FOTEDAR, R.; SEIFERT, K. A.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Ochratoxin production and taxonomy of the yellow aspergilli (*Aspergillus* section *Circumdati*). *Studies in Mycology*, v. 78, p. 1–61. 2014.

WAŚKIEWICZ, A.; BESZTERDA, M.; BOCIANOWSKI, J.; GOLIŃSKI, P. Natural occurrence of fumonisins and ochratoxin A in some herbs and spices commercialized in Poland analyzed by UPLC-MS/MS method. *Food Microbiology*, v. 36, p. 426-431, 2013.

YOGENDRARAJAH, P.; JACXSENS, L.; DE SAEGER, S.; DE MEULENAER, B. Co-occurrence of multiple mycotoxins in dry chilli (*Capsicum annum* L.) samples from the markets of Sri Lanka and Belgium. *Food Control*, v. 46, p. 26-34, 2014.

CAPÍTULO III

Ocorrência de fungos aflatoxigênicos e aflatoxinas em pimenta preta

Resumo

A pimenta-do-reino preta (*Piper nigrum* L.) é uma especiaria comumente seca ao sol, ficando exposta a intempéries e animais, o que a torna muito susceptível à contaminação por fungos e possivelmente à micotoxinas, como as aflatoxinas, que são compostos carcinógenos para humanos. Com isso, o objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de fungos aflatoxigênicos e aflatoxinas (AFs) em 95 amostras de pimenta-do-reino preta coletados em São Mateus/ES. As amostras foram coletadas em diferentes etapas da produção: direto da planta, caídas no chão, de terreiros durante a secagem, dos secadores de fogo direto e indireto e amostras secas armazenadas; além de 10 amostras de solo. No total 176 cepas de *Aspergillus* section *Flavi* foram isoladas após plaqueamento em meios DG18 (Dicloran 18% Glicerol) e DRBC (Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol) com desinfecção superficial dos grãos, e identificadas após avaliação morfológica e molecular. A contaminação por aflatoxinas nas pimentas foi determinada por coluna de imunoafinidade e HPLC/FLD com derivatização pós-coluna utilizando Kobracell. Dentre as 105 amostras analisadas, 30,5% estavam contaminadas com *A. section Flavi*, sendo que 26% dos isolados foram produtores de AFs. As seguintes espécies foram identificadas: *Aspergillus flavus*, *A. agricola*, *A. tamaraii*, *A. caelatus*, *A. parasiticus* e *A. novoparasiticus*. A maior incidência de *A. flavus* Group ocorreu em amostras de terreiro (48%). Em relação à contaminação por aflatoxinas, apenas 2% das amostras de pimentas estavam contaminadas com níveis acima de 1 µg/Kg.

Palavras-chave: *Aspergillus*, Aflatoxinas, pimenta-do-reino, HPLC/FLD

1. Introdução

A pimenta-do-reino preta (*Piper nigrum* L.) é uma especiaria comumente seca ao sol, a céu aberto por 3-6 dias, exposta a intempéries e animais, o que a torna muito susceptível à contaminação por fungos e possivelmente à micotoxinas, que são metabólitos tóxicos secundários produzidos por algumas espécies fúngicas, como as aflatoxinas, que pertencem à classe 1, ou seja, são compostos carcinógenos para humanos (EMBRAPA, 2004; LEMOS; TREMACOLDI; POLTRONIERI, 2014; IARC, 2002).

Esta micotoxina pode ser produzida por 26 espécies: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. novoparasiticus*, *A. pseudocaelatus*, *A. pseudotamarii*, *A. luteovirescens*, *A. nomius*, *A. pseudonomius*, *A. minisclerotigenes*, *A. arachidicola*, *A. sergii*, *A. mottae*, *A. transmontanensis*, *A. togoensis*, *A. austwickii*, *A. aflatoxiformans*, *A. cerealis* (FRISVAD et al., 2019), *A. agricola*, *A. toxicus*, *A. texensis* (SINGH et al., 2020), *A. saccharicola* sp. nov (SILVA et al., 2022), *A. astellata* (FRISVAD; SAMSON; SMEDSGAARD, 2004), *A. venezuelensis* (FRISVAD; SAMSON, 2004), *A. olivicola* (ZALAR et al., 2008), *A. ochraceoroseus* (KLICH et al., 2000) e *A. rambelli* (FRISVAD et al., 2005).

As condições de crescimento da planta são clima quente e úmido, de 23-27°C e precipitação acima de 1500 mm/ano, ou seja, condições estas que beneficiam a proliferação fúngica (YOGENDRARAJAH et al., 2014); sendo também compatível com o clima brasileiro, que é um dos principais países produtores de pimenta preta com produção de 76.000 ton em 2019 (IPC, 2020).

Sua produção se dá da seguinte maneira:

A colheita é realizada quando os frutos estão semimaduros (ROSLAN; YUDIN, 2020). Estes são debulhados e seguem para a secagem, que pode ser de 2 tipos, natural ou mecânica (LEMOS; TREMACOLDI; POLTRONIERI, 2014).

O sistema de secagem mais usual é a **céu aberto** em terreiros com duração de 3-6 dias até atingirem um teor de umidade $\leq 12\%$ de acordo com a *European Spice Association* (ESA) (ESA, 2015) ou no máximo 14% de acordo com o MAPA (BRASIL, 2006). Já a secagem em **estufa**, por ter uma estrutura fechada, confere maior proteção contra contaminantes ambientais e abrevia o tempo de secagem (SERRANO; NOVAK; LIMA, 2008).

A secagem mecânica permite ao produtor maior independência das condições climáticas e redução do tempo de secagem quando comparada à natural. Nos secadores com fôrnelha de **fogo direto**, a secagem é mais rápida (por volta de 25 horas), porém a fumaça é injetada

diretamente sobre a massa de grãos, atingindo temperaturas acima de 120°C (SERRANO; NOVAK; LIMA, 2008).

A secagem mecânica em secadores que utilizam **fogo indireto** é mais aconselhada, uma vez que não ocorre contato entre a pimenta e a fumaça que sai da fornalha. A temperatura de secagem é menor, varia entre 40 e 60°C (com duração por volta de 60 horas de secagem), o que garante maior segurança no processo (VINHA; LIMA; SECUNDINO, 2018).

Após a secagem, os grãos são ventilados para a retirada de grãos chochos e impurezas, e logo após, são peneirados, padronizados e classificados (LEMOS; TREMACOLDI; POLTRONIERI, 2014). Sendo assim, são acondicionados resfriados e desumidificados nas sacarias; evitando a proliferação de fungos e seguem para o comércio interno e externo (VINHA; LIMA; SECUNDINO, 2018).

Só em 2019 o Brasil exportou 81.289 ton (IPC, 2020), porém a qualidade da pimenta não só é importante para o comércio externo como também para o interno. Uma vez que a pimenta apresente níveis de aflatoxinas acima do permitido, os lotes são rejeitados e descartados, gerando grande perda econômica. Portanto, os cuidados são essenciais (EMBRAPA, 2004, BRASIL, 2006).

O Limite Máximo Tolerado (LMT) de aflatoxinas totais para pimenta do reino é de 20 ug/kg no Brasil, de acordo com a Instrução Normativa Nº 88, de 26 de Março de 2021 (BRASIL, 2021). Para a União Europeia o limite é de 10 ug/kg para aflatoxinas totais e 5 ug/kg para AFB1 (EC, 2010).

A maioria das pesquisas mostram níveis de contaminação da pimenta preta de 0,1 a 25,2 µg/kg de aflatoxinas totais, variando de 12,5% a 93% de amostras positivas para AFs (FERREIRA; MENDES; OLIVEIRA, 2004; BIRCAN, 2005; FAZEKAS; TAR; KOVÁČZ, 2005; COLAK et al., 2006; ZINEDINE et al., 2006; KURSUN; MUTLU, 2010; OZBEY; KABAK, 2012; YOGENDRARAJAH et al., 2014; BARANI; NASIRI; JARRAH, 2016; KHAZAELI et al., 2017; ZARESHAHRABADI et al., 2020).

Portanto, os objetivos deste estudo foram analisar a ocorrência de contaminação por fungos filamentos capazes de produzir aflatoxinas, e a presença de aflatoxinas em pimentas pretas de diferentes fases da pré e pós-colheita, incluindo técnicas distintas de secagem. Bem como a identificação molecular desses fungos como parte de identificação polifásica.

2. Materiais e Métodos

2.1 Amostras

Neste trabalho 95 amostras de pimenta preta e 10 amostras de solo foram coletadas em lavouras de pequenos e médios produtores do município de São Mateus (bioma de Mata Atlântica), no norte do estado do Espírito Santo (215 km de distância da capital Vitória), em diferentes etapas da produção, conforme tabela 1, no mês de junho de 2019; totalizando 20 amostras da Colheita, 7 da Secagem e 67 do Armazenamento.

Foi coletada uma média de 400g de cada amostra. Para as amostras frescas da planta e do chão foi realizada a debulha manual no laboratório e homogeneização cuidadosa para as análises conforme os tópicos 2.2, 2.3 e 2.5.1.

Tabela 1. Número de amostras de pimenta-do-reino preta e solo coletadas de três sítios.

Amostras	1	2	3
Solo	5	5	
Na Colheita:			
Chão	5	5	
Planta	5	5	
Durante Secagem:			
Terreiro úmida		2	
Terreiro semi-seca		2	
Fogo direto	3		
No Armazenamento:			
Terreiro	20	2	1
Fogo direto	20		1
Fogo indireto	20	1	1
Chocha (indireto)	1		
Estufa			1
Total	79	22	4

2.2 Atividade de água (a_w)

A atividade de água (a_w) das amostras de pimentas e dos solos foi medida com o equipamento AquaLab 3TE Series (Decagon, EUA), em triplicata a 25 ± 1 °C. A média e o desvio padrão foram calculados.

2.3 Análise micológica

A análise micológica foi realizada conforme Pitt e Hocking (2009), detalhada a seguir.

2.3.1. Plaqueamento direto para amostras de pimentas em grãos

A metodologia de plaqueamento direto foi utilizada para as amostras de pimentas (grãos), no qual 50 grãos de cada amostra foram desinfetados com NaClO 0,4% sob agitação por 2 min. e distribuídos em 5 placas com Ágar Dicloran 18% Glicerol (DG18) para amostras com a_w abaixo de 0,95 e *Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol* (DRBC) para amostras com a_w acima de 0,95. A incubação foi realizada a 25°C / 5-7dias. Os resultados de infecção fúngica por espécie foram expressos em porcentagem.

Inicialmente foram realizados testes para avaliar o desempenho dos meios DG18 e DRBC e não houve diferença no isolamento das diferentes espécies presentes, portanto seguiu-se o plaqueamento conforme Pitt e Hocking (2009), descrito acima.

2.3.2. Diluição e plaqueamento em superfície para amostras de solos

Para as amostras de solo foram realizados os métodos de diluição e o plaqueamento em superfície. Vinte e cinco gramas da amostra foram colocados em bolsa estéril com 225mL do diluente água peptonada a 0,1% (proporção 9:1). Esta mistura foi homogeneizada em Stomacher por 30 segundos. Foram realizadas diluições seriadas em tubos contendo 9 mL do diluente água peptonada a 0,1% e 0,1 mL de cada diluição foi plaqueado em superfície em meio DRBC. A incubação ocorreu a 25°C por 5 a 7dias e foram escolhidas as placas com 15-150 UFC para isolamento, expressando os resultados em UFC/g de amostra.

2.3.3. Isolamento e identificação das cepas

As cepas de *Aspergillus* section *Flavi* foram isoladas em meio Ágar Extrato de Levedura Czapek (CYA) e Ágar Extrato de Malte (MEA), incubados por sete dias nas temperaturas de 5°C, 25°C e 37 e 42/44°C. Tais espécies também foram inoculadas em *Aspergillus Flavus* e *Parasiticus* Agar (AFPA) e incubadas por 48 horas a 30°C.

A identificação foi realizada observando características morfológicas macro e microscópicas segundo as chaves taxonômicas de Klich (2002) e Samson et al. (2010).

2.4 Análise do potencial toxigênico dos isolados

As cepas de *Aspergillus* section *Flavi* foram avaliadas em relação à produção de aflatoxinas.

Para tanto os fungos potencialmente produtores de aflatoxinas foram inoculados em Ágar Sacarose com Extrato de Levedura (YESA) com incubação a 25°C durante 7 dias. Posteriormente foi empregada a técnica de ágar plug aliada à Cromatografia de Camada Delgada (CCD), conforme Filtenborg, Frisvad e Svendsen (1983).

Pedaços de ágar da placa de YESA (5-7mm²) foram retirados e as toxinas extraídas com clorofórmio :metanol (1 :1). Os pedaços foram então sobrepostos “carimbando” na placa de sílica gel (Merck, Alemanha) e na mesma placa foi aplicado 5 µL de uma suspensão padrão das aflatoxinas totais.

A fase móvel de tolueno :acetato de etila :ácido fórmico :clorofórmio (7 :5 :2 :5) foi utilizada para o desenvolvimento da cromatografia. Terminada a eluição e depois de secar a placa, ela foi visualizada em câmara escura Cromatovisor com lâmpada UV de comprimento de onda de 254nm e 365nm. Foi realizada a determinação qualitativa através da comparação do fator de retenção (Rf) e da fluorescência dos isolados em relação ao padrão.

2.5 Determinação de aflatoxinas nas amostras de pimentas por Cromatografia Líquida

2.5.1. Preparo da amostra

Aproximadamente 100 g de cada amostra de pimenta em grão (95 amostras) foram triturados finamente usando um moedor (IKA, Brasil) e passados em peneira de malha 18 (Bronzinox, Brasil), até atingirem granulometria abaixo de 1 mm.

2.5.2. Extração e limpeza

A extração da toxina foi realizada utilizando 10 g de cada amostra com 60mL de metanol :água (8 :2) e 1 g de NaCl e homogeneizada por 30 min. no agitador horizontal (New Brunswick Scientific Company, USA). Foi executada dupla filtração utilizando um filtro qualitativo e um filtro de fibra de vidro (Vicom, Suécia). Quatro mililitros do filtrado foi diluído em 24mL de tampão fosfato PBS Tween a 0,01% (pH 7,0) e colocado em coluna de imunoafinidade (CIA) AflaTest WB (Vicom, USA) a uma vazão de 2-3mL / minuto, e lavado com 30mL de água ultra pura (MilliQ, França).

A toxina foi eluída 8 x 500µL (4mL) de metanol grau HPLC. Foi realizada a secagem do extrato em banho a 40 °C sob fluxo de nitrogênio gasoso e ressuspendido com 1mL de metanol : água ultra pura (2 : 3). O extrato passou por filtração em filtro de PVDF de poro 0,45µm (Analítica, China), antes de ser injetado no HPLC. Um volume de 20µL foi injetado em *High Performance Liquid Chromatograph* (HPLC) (Agilent, EUA) com derivatização pós-coluna. Seguiu-se a metodologia de Copetti et al. (2011).

2.5.3. Critérios do HPLC

Foi utilizado o sistema cromatográfico Agilent 1260 Infinity LC System (Agilent, EUA) com detector de fluorescência de 362 e 455 nm de excitação e emissão, respectivamente, e injeção automática. Uma coluna C18 (Agilent Poroshell 120, EUA) (4,6 x 100 mm) de fase reversa com pré-coluna foi utilizada com temperatura de forno à 40°C. Foi utilizado o Kobra®Cell (R-Biopharm Rhône Ltd., Escócia) para a derivatização pós-coluna das aflatoxinas B₁ e G₁.

A fase móvel utilizada foi água: acetonitrila: metanol (6 :2 :3) com brometo de potássio (119 mg/L) e ácido nítrico (4M, 350 µL/L), e um fluxo de 1 mL/minuto (COPETTI et al., 2011).

Uma solução estoque do padrão de aflatoxinas foi preparada e diluições sequenciais foram realizadas para a construção da curva de calibração de seis pontos de área do pico $\times$ massa (área/ng).

2.5.4. Otimização do método

Fortificaram-se amostras de pimenta com o padrão de aflatoxinas totais (com nível de 4,76 µg/kg), em triplicata, para o cálculo da porcentagem de recuperação. O Limite de Quantificação (LOQ) e o Limite de Detecção (LOD) do método foram calculados avaliando oito réplicas de uma amostra de pimenta contaminada com um nível conhecido de aflatoxinas, conforme as indicações do Eurachem Guide (2014).

2.6 Análise molecular

Trinta e cinco isolados (de *Aspergillus* section *Flavi*) das amostras foram selecionados como representantes de diferentes espécies (pela identificação morfológica) incluindo produtores e não produtores de aflatoxinas para serem submetidos à extração de ácido nucleico e análise de sequenciamento de genes.

2.6.1. Extração de DNA

Primeiramente foi realizado o isolamento para obtenção de culturas monospóricas de cada fungo. Após, o DNA genômico foi extraído diretamente do micélio fúngico a partir da inoculação em Ágar Sacarose com Extrato de Levedura (YESA) incubado a 25 °C/2 dias, adicionando 3 mL de tampão de extração composto por 0,5 mL de EDTA, 0,5 mL de cloreto de sódio 5M, 1 mL de SDS 10%, 2 mL de Tris HCl 1M e 6 mL de H₂O. Essa suspensão foi transferida para criotubos com pérolas de vidro e agitada em vórtex a 10.000 rpm/6 min, colocada em banho-maria à 70°C/10 min e levada novamente ao vórtex a 10.000 rpm/10 min, para quebra das membranas celulares e exposição do DNA. Em seguida, foi centrifugada a 12.000 rpm/3 min para desproteínização e a fase aquosa superior foi recolhida (600 µL) e

adicionado a ela 1 mL de tampão de ligação (DD Buffer) do kit Gel DNA Purification (Mebe Bioscience); 800 µL dessa mistura foi passado na coluna de sílica, aguardado 1 minuto para se ligar na membrana e centrifugado a 12.000 rpm/1 min. Em seguida realizou-se o mesmo procedimento com os outros 800 µL e descartado o resíduo que passou pela coluna.

A lavagem foi feita com 550 µL do tampão de lavagem (WB Buffer), centrifugação a 12.000 rpm/ 1-3 min. e descarte do resíduo que passou pela membrana (procedimento realizado duas vezes), para a retirada de sais. Para a eluição foi passado 200 µL de tampão de eluição (EB Buffer) na coluna, aguardado 1 minuto, centrifugado a 12.000 rpm/1 min e coletado em tubo tipo eppendorf com 20 µL de NaCl 3M. Após, adicionou-se 400 µL de etanol absoluto refrigerado e homogeneizou-se manualmente para precipitação diferencial do DNA. O eluído foi guardado no freezer durante 45 minutos e passou por posterior centrifugação a 12.000 rpm/5 min, sendo o sobrenadante descartado.

Para a purificação e retirada de sais, o precipitado foi lavado com 300 µL de álcool 70% refrigerado, homogeneizado manualmente por inversão e centrifugado a 12.000 rpm/1 min, repetindo-se 3 vezes, sendo o sobrenadante descartado a cada vez. A secagem do DNA foi feita em estufa a 42°C/25 min. A ressuspensão foi feita com 50 µL de água MilliQ e homogeneizado manualmente com vigor e guardado em refrigerador overnight (DOYLE; DOYLE, 1987 modificado).

O DNA ressuspendido foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% na presença de brometo de etídio (0,5 µg/mL) e quantificado visualmente por comparação com marcador padrão conhecido (ng). Para finalizar, as amostras foram diluídas em água Milli-Q estéril para obter uma concentração final de 5 ng/µL.

2.6.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Foram preparados 24 µL do Mix com pares de primers F e R calmodulina CF1 (GCCGACTCTTTGACYGARGAR) e CF4 (TTTYTGATCATRAGYTGGAC) (PETERSON et al., 2005) para amplificação do DNA utilizando a técnica de PCR (Reação em cadeia da polimerase) que foi desenvolvida em termociclador incluindo etapas de desnaturação (95°C/3 minutos), e por ciclos de desnaturação (95°C/1 minuto), anelamento de primers (60°C/45 segundos), e extensão (72°C/90 segundos), com 35 repetições (HONG et al., 2006; SILVA et al., 2020).

Por fim, o produto da PCR foi aplicado em gel de agarose 1% com marcador de peso molecular, para observação da integridade.

2.6.3. Sequenciamento

Os produtos de PCR foram purificados com ExoSAP-IT (Thermo Fisher Scientific, USA) de acordo com as instruções do fabricante e sequenciados usando o kit de sequenciamento BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems, USA) em um analisador genético SeqStudio (Applied Biosystems, USA). As sequências obtidas foram alinhadas com as sequências de todas as cepas tipo do grupo em questão disponíveis no banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando o *software* BioEdit (HALL, 1999) e confirmadas usando a ferramenta BLASTn do *GenBank* versão 2.0 (KIMURA, 1980). O *software* MEGA 11.0 foi utilizado para construir uma árvore filogenética de máxima verossimilhança (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2021). Para determinar o suporte para cada clado, a análise de *bootstrap* foi executada em 1.000 réplicas.

3. Resultados e Discussão

3.1 Contaminação das amostras por *Aspergillus section Flavi*

A tabela 2 apresenta os resultados de incidência, porcentagem de infecção e número de isolados de *Aspergillus section Flavi* nas amostras analisadas.

Nas amostras do chão, planta, terreiro (úmidas e semi-secas) e secas em fogo indireto e estufa, não houve incidência de *Aspergillus section Flavi*, e sim apenas nas amostras secas da secagem em terreiro e por fogo direto (ambas armazenadas), cujos valores de a_w eram baixos (0,649 e 0,627 respectivamente). Estas espécies são xerofílicas e capazes de se desenvolver em condições de baixa a_w , menor que 0,85, favorecendo a sua sobrevivência frente às demais espécies (PITT, 1975).

Tabela 2. Contaminação das amostras por *Aspergillus* section *Flavi*.

Grupos fúngicos	Solo (n=10)			Terreiro - armazenadas (n=23)			Direto – na secagem (n=3)			Direto - armazenadas (n=21)		
	Isolados (n)	FO (%)	MI (%)	Isolados (n)	FO (%)	MI (%)	Isolados (n)	FO (%)	MI (%)	Isolados (n)	FO (%)	MI (%)
<i>A. flavus</i> Group	1	10	10	61	47,8	5,3	1	33,3	0,6	17	33,3	1,6
<i>A. caelatus</i>	0	0	0	2	4,3	0,2	0	0	0	0	0	0
<i>A. parasiticus</i>	0	0	<100	2	4,3	0,2	0	0	0	5	14,3	0,5
<i>A. novoparasiticus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4,8	0,1
<i>A. tamarii</i>	3	30	1,2x10 ²	66	56,5	5,7	4	66,7	2,6	10	23,8	0,9

FO = Frequência de ocorrência (número de amostras infectadas/número total de amostras analisadas)

MI = Média de infecção (Soma dos valores médios de infecção das amostras totais/número total de amostras analisadas)

*Pimenta chocha: 3 isolados de *Aspergillus tamarii*.

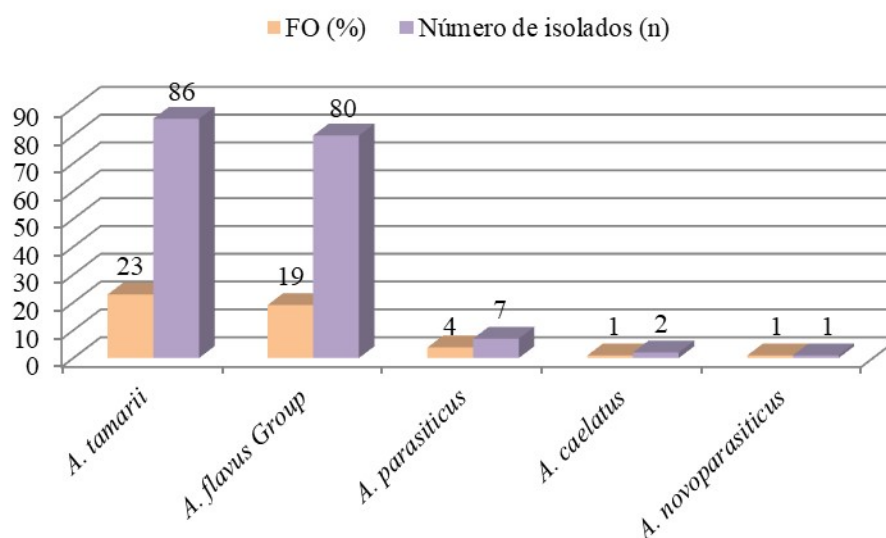


Figura 1. Contaminação total das amostras por *Aspergillus* section *Flavi*. Gráfico com frequência de ocorrência (%) e número de isolados (n).

A maior ocorrência de *A. section Flavi* foi verificada nas amostras da secagem em terreiro (69,6%) seguida pela secagem em fogo direto (50,0%) (tabela 2), sendo as espécies/grupos predominantes *A. flavus* Group e *A. tamarii* (Figura 1). Motevalibashi e colaboradores (2018) também encontraram com grande frequência *A. flavus* (33,3%) em 30

amostras de pimenta preta de mercados do Irã, assim como Garcia e colaboradores (2018) que também encontraram 46,7% de *A. flavus* em 15 amostras de pimenta preta de mercados brasileiros.

A frequência fúngica do solo foi mais baixa sendo encontrados 10% de *A. flavus* Group e 30% de *A. tamaraii*; o qual também pode servir como uma fonte de contaminação, uma vez que os fungos são componentes comuns da micobiota do solo (PITT; HOCKING 2009).

Dentre os tipos de secagem, podemos observar que a secagem em terreiro é mais crítica em relação à contaminação por fungos e micotoxinas, por demorar cerca de 3-6 dias para secar e por ficar mais exposto ao ambiente. Já a secagem com secadores de fogo direto acaba passando para a pimenta toda a fumaça e isso pode trazer consigo alguma sujidade do secador junto com ela, o que também pode explicar uma contagem alta de fungos.

3.2 Identificação molecular das espécies de *Aspergillus* section *Flavi*

Foram sequenciados 35 (19,8%) isolados (do total de n=176) de *Aspergillus* section *Flavi* e identificados como *A. flavus* (24), *A. tamaraii* (5), *A. caelatus* (2) *A. parasiticus* (2), *A. novoparasiticus* (1) e *A. agricola* (1); conforme mostra a árvore filogenética a seguir (Figura 2).

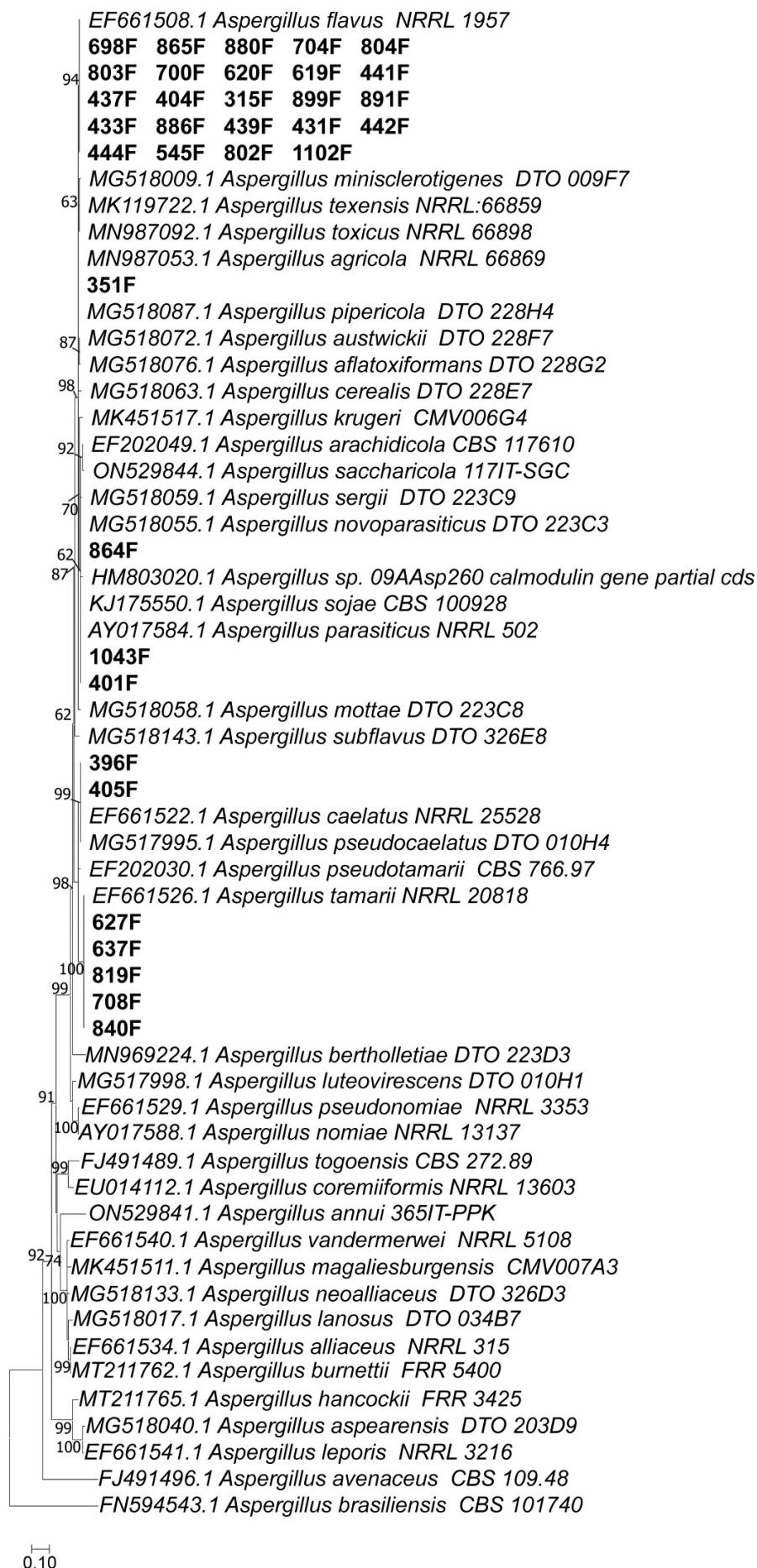


Figura 2. Árvore filogenética de *Aspergillus* section *Flavi*, baseada nas sequências de *CaM* com Máxima Verossimilhança e *bootstrap* de 1000 réplicas. Modelo Tamura Nei G+I. Apenas *bootstraps* > 60% foram mostrados. *Aspergillus brasiliensis* é o outgroup.

Aspergillus flavus caracteriza-se por apresentar colônias predominantemente verdes (70 mm), conídios lisos a levemente rugosos (3-5µm), vesícula grande (20-65µm), esclerócios, meio AFPA com reverso laranja e por ser bisseriado (SAMSON et al., 2010) (Figura 3). *Aspergillus agricola* é intimamente relacionado com *A. flavus*, porém produz visivelmente mais conídios. Ambas as espécies produzem AFB1 e AFB2 (VARGA; FRISVAD; SAMSON, 2009; SINGH et al., 2020) (Figura 4). Foi recentemente descrito por Singh e colaboradores (2020), isolado de milho no Texas/EUA.

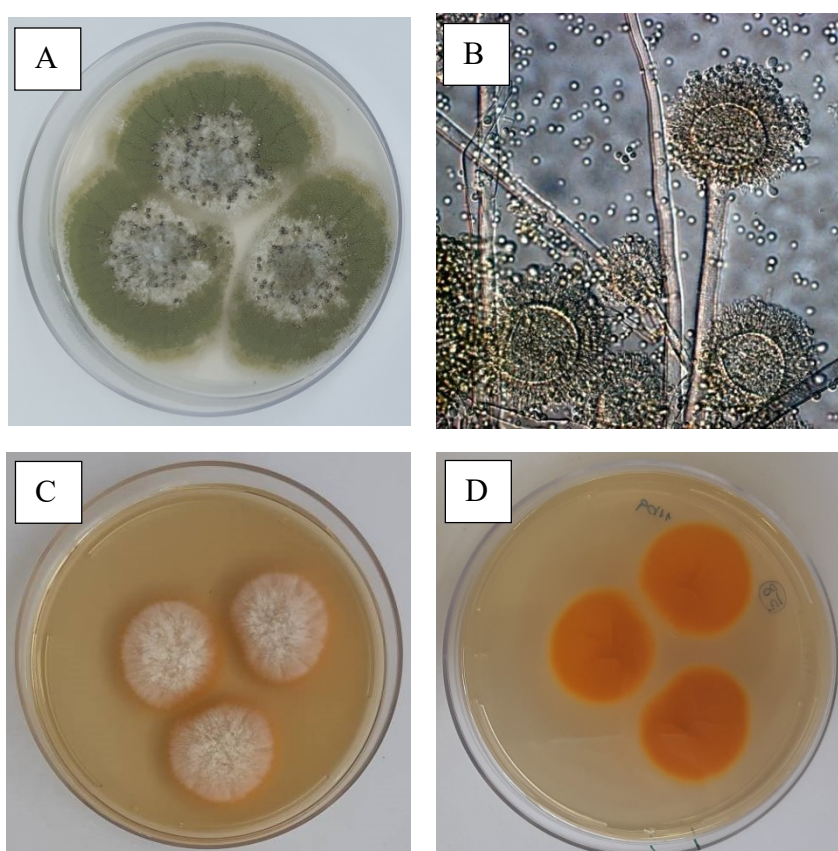


Figura 3. *Aspergillus flavus*. **A.** CYA 25°C / 7 dias, colônia com 65 mm, presença de esclerócios. **B.** Microscopia com aumento de 400X. **C.** AFPA 30°C / 48h. **D.** Reverso positivo (laranja) para a reação de citrato férrico presente no meio AFPA com ácido aspergílico produzido pelo fungo.

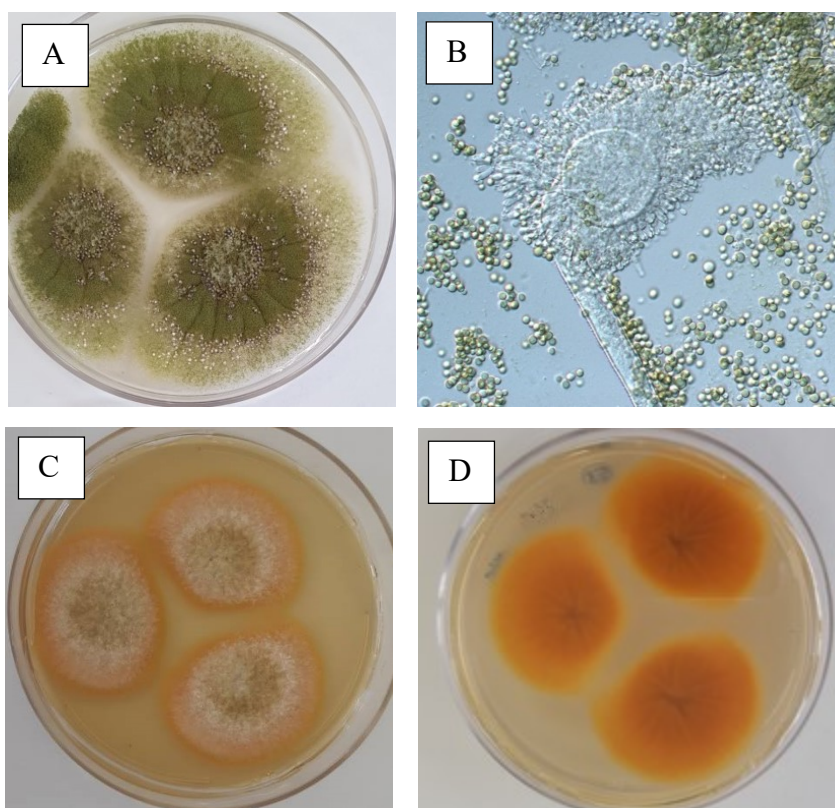


Figura 4. *Aspergillus agricola*. **A.** CYA 25°C / 7 dias, colônia com 65 mm. **B.** Microscopia com aumento de 400x. **C.** AFPA 30°C / 48h. **D.** AFPA 30°C / 48h, reverso positivo (laranja) para a reação de citrato férrico presente no meio AFPA com ácido aspergílico produzido pelo fungo.

Os *Aspergillus tamaritii* exibem colônias marrons (65 mm), conídios rugosos (5-7 μ m), meio AFPA com reverso marrom carmesim e são bisseriados (KLICH; PITT, 1988; SAMSON et al., 2010) (Figura 5). *Aspergillus caelatus* apresentam colônia verde oliva amarelado e possuem características morfológicas semelhantes aos *A. tamaritii*. Ambas as espécies não produzem aflatoxinas (HOUBRAKEN et al., 2020) (Figura 6).

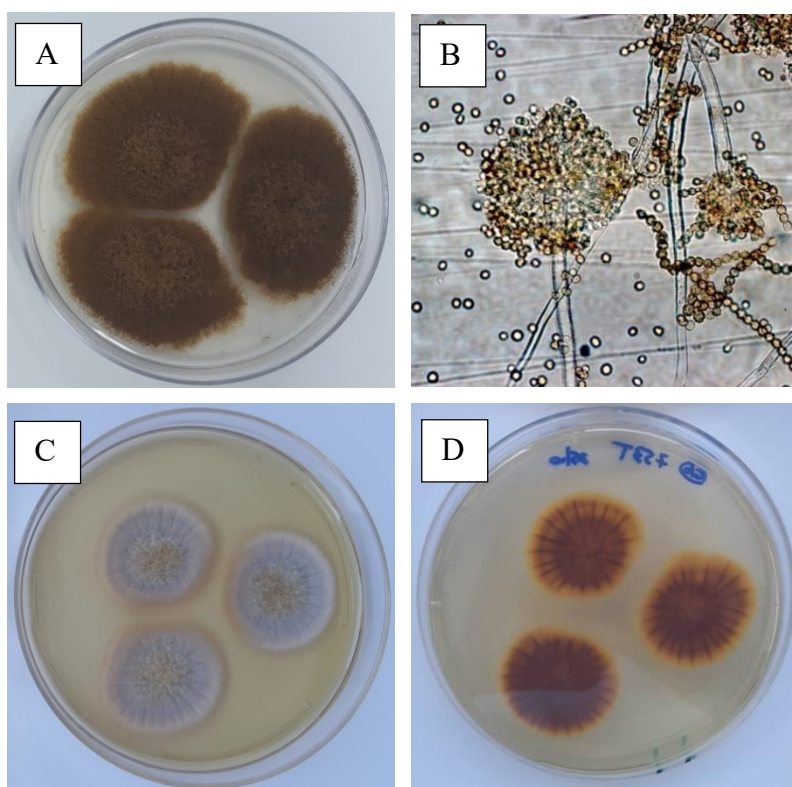


Figura 5. *Aspergillus tamarii*. **A.** CYA 25°C / 7 dias, colônia com 60 mm. **B.** Microscopia com aumento de 400x. **C.** AFPA 30°C / 48h. **D.** AFPA 30°C / 48h, sem reação (reverso marrom).

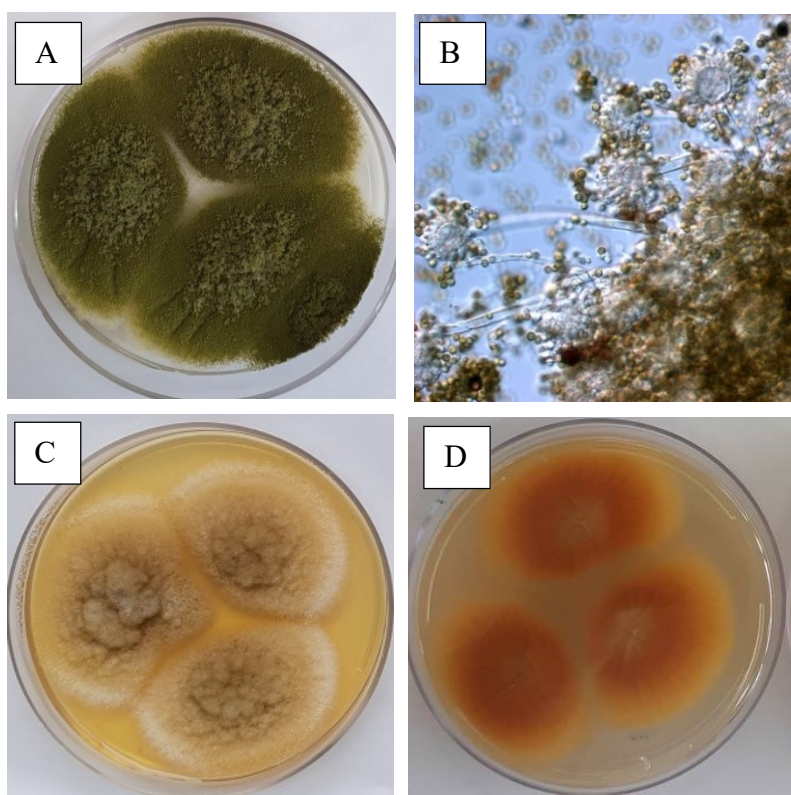


Figura 6. *Aspergillus caelatus*. **A.** CYA 25°C / 7 dias, colônia com 60 mm. **B.** Microscopia com aumento de 400x. **C.** AFPA 30°C / 48h. **D.** AFPA 30°C / 48h, reverso positivo (laranja) para a reação de citrato férrico presente no meio AFPA com ácido aspergílico produzido pelo fungo.

Os *Aspergillus parasiticus* apresentam colônias verde escuras (50-70 mm), raramente com esclerócios, AFPA com reverso laranja, conídios rugosos (3-5µm), vesícula pequena (20-35µm) fértil apenas em $\frac{3}{4}$ de sua superfície, e sua maioria é uniseriado. São produtores de AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 (KLICH; PITT, 1988; PITT; HOCKING, 2009; SAMSON et al., 2010) (Figura 7). *Aspergillus novoparasiticus* é muito semelhante morfológicamente a *A. parasiticus* e também produz aflatoxinas B e G, sendo necessária análise de sequência de DNA para identificação acurada (IAMANAKA et al., 2019) (Figura 8).

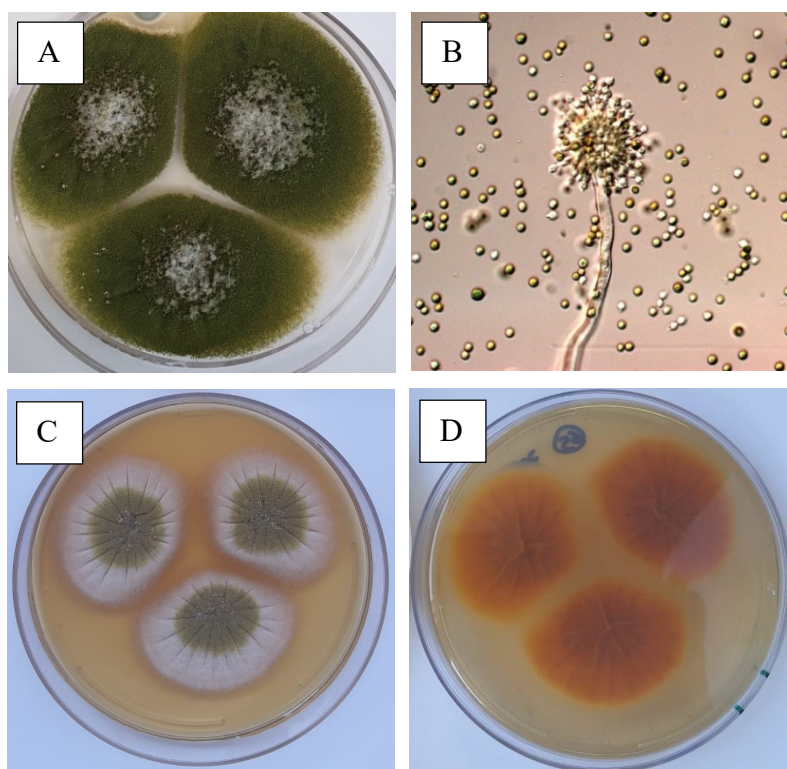


Figura 7. *Aspergillus parasiticus*. **A.** CYA 25°C / 7 dias, colônia com 65 mm. **B.** Microscopia com aumento de 400x. **C.** AFPA 30°C / 48h. **D.** AFPA 30°C / 48h, reverso positivo (laranja) para a reação de citrato férrico presente no meio AFPA com ácido aspergílico produzido pelo fungo.

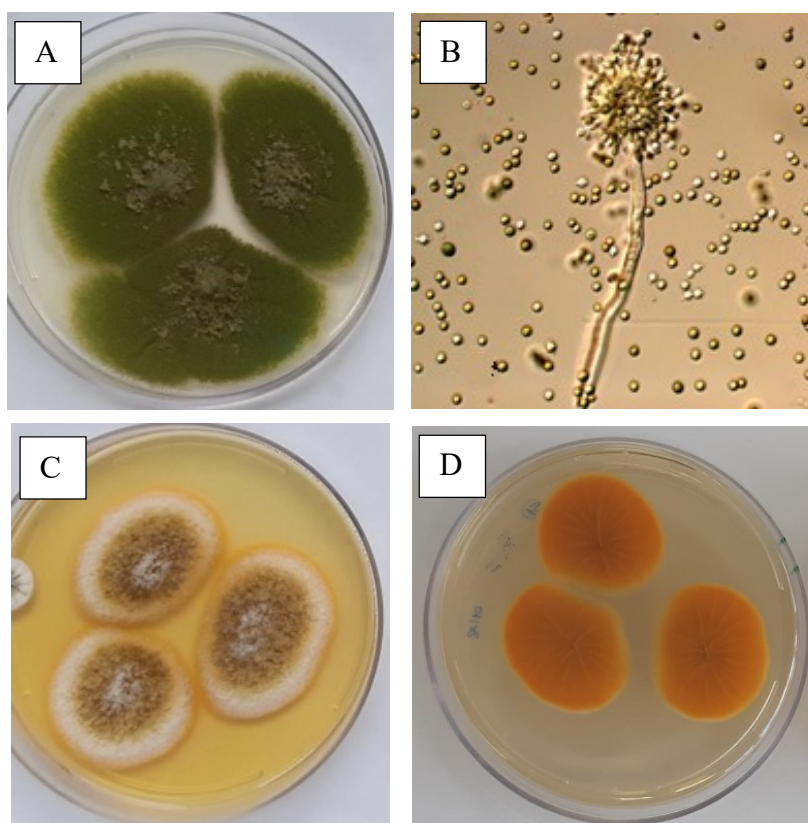


Figura 8. *Aspergillus novoparasiticus*. **A.** CYA 25°C / 7 dias, colônia com 60 mm. **B.** Microscopia com aumento de 400x. **C.** AFPA 30°C / 48h. **D.** AFPA 30°C / 48h, reverso positivo (laranja) para a reação de citrato férrico presente no meio AFPA com ácido aspergílico produzido pelo fungo.

Com exceção de *A. agricola* as demais espécies identificadas também foram encontradas em amostras de pimenta do reino preta em diversos estudos (HASHIM; ALAMRI, 2010; EZEKIEL et al., 2013; JESWAL; KUMAR, 2015; JACXSENS; YOGENDRARAJAHA; MEULENAER, 2016; GARCIA; MALLMANN; COPETTI, 2018; PERSSON DA SILVA et al., 2021)

3.4 Produção de aflatoxinas pelos isolados

Amostras de pimentas da pré-colheita (Chão e Planta), da secagem em terreiro que ainda estavam semi-secas e úmidas, dos secadores de fogo Indireto (exceto amostra chocha) e Estufa não apresentaram nenhum isolado de *A. section Flavi*.

Cem por cento dos *A. parasiticus* (n=7) e *A. novoparasiticus* (n=1) foram capazes de produzir aflatoxinas e 47,5% dos *A. flavus* Group produziram AFs. Também pudemos confirmar que *A. tamaritii* (Tabela 3 e Figura 9) e *A. caelatus* não produzem AFs.

Foi observado que apesar das amostras de terreiro terem o maior número de isolados, foram nas amostras de fogo direto que se obteve a maior porcentagem de produtores de AFs, conforme a Tabela 3 que mostra o número de fungos isolados e porcentagem dos produtores de aflatoxinas.

Tabela 3. Fungos produtores de aflatoxinas nas amostras de pimenta-do-reino preta e solo.

Origem das amostras			<i>A.flavus</i> Group	<i>A. caelatus</i>	<i>A. parasiticus</i>	<i>A. novoparasiticus</i>	<i>A. tamarii</i>	Total
Solo	Solos	Isolados/Produtores (n/n)	1/1	0/0	0/0	0/0	3/0	4/1
		% Produtores	100	0	0	0	0	25
Durante secagem	Direto	Isolados/Produtores (n/n)	1/0	0/0	0/0	0/0	4/0	5/0
		% Produtores	0	0	0	0	0	0
Armazenamento	Terreiro	Isolados/Produtores (n/n)	61/22	2/0	2/2	0/0	66/0	131/24
		% Produtores	36,1	0	100	0	0	18,3
	Direto	Isolados/Produtores (n/n)	17/15	0/0	5/5	1/1	10/0	33/21
		% Produtores	88,2	0	100	100	0	48,5
	Chocha (Indireto)	Isolados/ Produtores (n/n)	0/0	0/0	0/0	0/0	3/0	3/0
		% Produtores	0	0	0	0	0	0
Total		Isolados/ Produtores (n/n)	80/38	2/0	7/7	1/1	86/0	176/46
		% Produtores	47,5	0	100	100	0	26,1

* Amostras de pimentas da pré-colheita (Chão e Planta), da secagem em terreiro semi-secas e úmidas, dos secadores de fogo Indireto (exceto amostra chocha) e Estufa não apresentaram isolados de *A. section Flavi*.

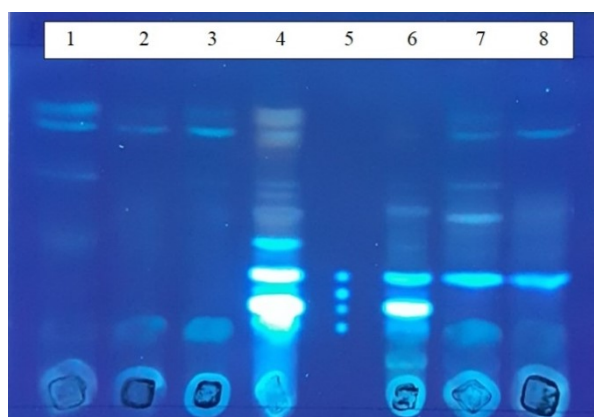


Figura 9. Exemplar de uma placa de CCD sob luz UV. **1-3.** *Aspergillus tamarii*. **4.** *A. parasiticus*. **6.** *A. novoparasiticus*. **5.** Padrão de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 (nesta ordem de cima para baixo). **7-8.** *A. flavus*.

3.5 Aflatoxinas nas amostras

A tabela 4 apresenta o número de amostras de pimenta do reino preta contaminadas com aflatoxinas.

Tabela 4. Número de amostras contaminadas com aflatoxinas (total de amostras n=94).

Níveis de aflatoxinas (µg/Kg)	B1	B2	G1	G2	Aflatoxinas totais
<LOD	92	94	94	94	92
> LOD -1,0	0	0	0	0	0
> 1-5,0	2	0	0	0	2
> 5,0	0	0	0	0	0

LOD = Limite de detecção de 0,370; 0,371; 0,311; 0,151 e 1,2 µg/kg para AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 e aflatoxinas totais, respectivamente.

Dezessete (18%) amostras apresentaram fungos aflatoxigênicos, mas não estavam contaminadas com aflatoxinas, e as duas amostras contaminadas por aflatoxinas não apresentaram infecção por *A section Flavi* toxigênicos (apenas por *A. tamaritii*) na amostra de pimenta chocha e nenhuma infecção fúngica na amostra de fogo direto.

Dentre as 95 amostras de pimenta, foram testadas 94 e apenas 2 (2,12%) estavam acima de 1ppb de aflatoxinas totais, que foram uma amostra da secagem por fogo direto (1,14 µg/kg) e a amostra de pimenta “chocha” (1,34 µg/kg), ou seja, dentro dos limites das regulamentações nacionais e internacionais.

Obtivemos um limite de detecção (LOD) de 0,370; 0,371; 0,311 e 0,151 µg/kg e um limite de quantificação (LOQ) de 1,232; 1,235; 1,038 e 0,502µg/kg para B₁, B₂, G₁ e G₂, respectivamente.

A pimenta preta foi contaminada com níveis acima de 1 ppb para AFB1 e AFB2 (1,71 e 1,55 ng/g) e abaixo de 1 ppb para AFG1 e AFG2 (0,92 e 0,56 ng/g), sendo assim as recuperações obtidas para o nível médio testado (4,76 µg/kg) foram de 73,4%, 84,4%, 65,5%, 66,2% e 75,6% para B₁, B₂, G₁, G₂ e aflatoxinas totais, respectivamente; ou seja, G₁ e G₂ tiveram uma recuperação baixa e Ali et al. (2005) afirmam que isso pode ser devido à baixa afinidade antígeno-anticorpo para AFG na CIA usada.

Contudo esta recuperação está dentro dos valores estabelecidos pela Diretiva da Comunidade Europeia CE 401/2006 que garante uma recuperação de 70-110% para o nível entre 1 e 10 ppb e de 50-120% para níveis menores que 1 ppb.

Pesquisadores encontraram problemas nos tempos de retenção e na recuperação de G1 e G2 em algumas especiarias, que foi atribuído a uma ligação não específica entre a CIA e a interferência de matrizes da amostra (ALI et al., 2005; ALI et al., 2015).

Freire et al. (2000), também detectaram problemas na análise de aflatoxinas em pimentas pretas o que consequentemente culminou em recuperações baixas (30–45%).

Por outro lado, os resultados obtidos neste trabalho indicam contaminação baixa de pimentas por aflatoxinas, sugerindo que as amostras direto dos produtores podem apresentar maior qualidade e que as pimentas começam a representar algum risco após o processo de transporte, embalagem e armazenamento nos pontos de venda, pois estudos mostram uma contaminação maior nas amostras do comércio do que a encontrada no presente trabalho (amostras do campo).

A maioria dos estudos (com pimentas de mercados) mostram níveis de contaminação de pimenta preta de 0,1 a 25,2 µg/kg de aflatoxinas totais, variando de 12,5% a 93% de amostras positivas para AFs (FERREIRA; MENDES; OLIVEIRA, 2004; BIRCAN, 2005; FAZEKAS; TAR; KOVÁČZ, 2005; COLAK et al., 2006; ZINEDINE et al., 2006; KURSUN; MUTLU, 2010; OZBEY; KABAK, 2012; BARANI; NASIRI; JARRAH, 2016; KHAZAELI et al., 2017; ZARESHAHRABADI et al., 2020). Também têm aqueles que não encontraram aflatoxinas nas amostras (FREIRE; KOZAKIEWICZ; PATERSON, 2000; CHO et al., 2008; RUADREW; AIDOO, 2013; GARCIA; MALLMANN; COPETTI, 2018; AZZOUNNE et al., 2019).

4. Conclusão

Pode-se concluir que o tipo de secagem mais crítico é a secagem em terreiro e possivelmente em fogo direto.

Apenas 2% das amostras estavam contaminadas por aflatoxinas, sendo a pimenta chocha uma delas. Portanto, uma sugestão aos produtores é rever a prática de adicionar pimentas chochas às outras pimentas para ajuste de peso, para não correr o risco de contaminar pimentas inócuas.

Foram identificadas 6 espécies de *Aspergillus* section *Flavi*: *A. flavus*, *A. tamaraii*, *A. caelatus*, *A. parasiticus*, *A. novoparasiticus* e *A. agricola*.

Foi observado neste e em outros estudos que a análise de aflatoxinas em pimenta preta pode sofrer problemas analíticos e/ou com a matriz.

5. Referências

- ALI, N.; HASHIM, N. H.; SAAD, B.; SAFAN, K.; NAKAJIMA, M.; YOSHIZAWA, T. Evaluation of a method to determine the natural occurrence of aflatoxins in commercial traditional herbal medicines from Malaysia and Indonesia. *Food and Chemical Toxicology*, v. 43, p. 1763–1772, 2005.
- ALI, N.; HASHIM, N. H.; SHUIB, N. S. Natural occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in processed spices marketed in Malaysia. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 15 p., 2015.
- AZZOUNE N.; MOKRANE, S.; RIBA, A.; BOURAS, N.; VERHEECKE, C.; SABAOU, N.; MATHIEU, F. Contamination of common spices by aflatoxigenic fungi and aflatoxin B1 in Algeria. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 2015, v. 8, n. 1, p.137-144, 2015.
- BARANI, A.; NASIRI, Z.; JARRAH, N. Natural occurrence of Aflatoxins in commercial pepper in Iran. *Food and Agricultural Immunology*, v. 27, n. 4, p. 570-576, 2016.
- BIRCAN, C. The determination of aflatoxins in spices by immunoaffinity column extraction using HPLC. *International Journal of Food Science & Technology*, v.40, p.929-934, 2005.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 88, de 26 de março de 2021. Estabelece os limites máximos tolerados (LMT) de contaminantes em alimentos. *Diário Oficial da União*. 2021.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 10 de 15 de maio de 2006. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade da Pimenta-do-Reino. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 2006.
- CHO, S.; LEE, C.; JANG, M.; SON, Y.; LEE, S.; CHOI, I.; KIM, S.; KIM, D. Aflatoxins contamination in spices and processed spice products commercialized in Korea. *Food Chemistry*, v. 107, p. 1283–1288, 2008.

COLAK, H.; BINGOL, E. B.; HAMPIKYAN, H.; NAZLI, B. Determination of Aflatoxin Contamination in Red-Scaled, Red and Black Pepper by ELISA and HPLC. *Journal of Food and Drug Analysis*, v. 14, n. 3, p. 292-296, 2006.

EC. European Commission. Commission Regulation (EU) No 165/2010 of 26th February 2010 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. *Official Journal of the European Union*, 2010.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Manual de Segurança e Qualidade para a Cultura da Pimenta-do-Reino. Brasília: EMBRAPA/SEDE, 2004. 65 p. Série Qualidade e Segurança dos Alimentos.

FAZEKAS, B.; TAR, A.; KOVÁČZ, M. Aflatoxin and ochratoxin A content of spices in Hungary. *Food Additives & Contaminants*, v.22, p.856-863, 2005.

FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; MENDES, E.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Quantification of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 in pepper by HPLC/fluorescence. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 27, n. 2, p. 325-334, 2004.

FREIRE, F. C. O.; KOZAKIEWICZ, Z.; PATERSON, R. R. M. Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. *Mycopathologia*, v.149, p.13–19, 2000.

FRISVAD, J C.; SAMSON, R. A. *Emericella venezuelensis*, a new species with stellate ascospores producing sterigmatocystin and aflatoxin B1. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 27, p. 672–680, 2004.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A.; SMEDSGAARD, J. *Emericella astellata*, a new producer of aflatoxin B1, B2 and sterigmatocystin. *Letters in Applied Microbiology*, v. 38, p. 440–445, 2004.

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.; HUBKA, V.; EZEKIEL, C. N.; HONG, S. B.; NOVÁKOVÁ, A.; CHEN, A. J.; ARZANLOU, M.; LARSEN, T. O.; SKLENÁR, F.; MAHAKARNCHANAKUL, W.; SAMSON, R. A.; HOUBRAKEN, J. Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. *Studies in Mycology*, v. 93, p. 1–63, 2019.

GARCIA, M. V.; MALLMANN, C. A.; COPETTI, M. V. Aflatoxigenic and ochratoxigenic fungi and their mycotoxins in spices marketed in Brazil. *Food Research International*, v. 106, p. 136–140, 2018.

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.

IARC. International Agency for Research on Cancer. WHO IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins naphthalene and styrene. Aflatoxins. v. 82, 590 p., feb., 2002.

IPC. International Pepper Community. Crop Position Report: All Countries - 2019. International Pepper Conference, 2020. Available from: <https://internationalpepperconference.com/report/index?product=10&year=2019&report_type=10&member=&graph=20> Cited: 17 feb. 2021.

KHAZAELI, P.; MEHRABANI, M.; HEIDARI, M. R.; ASADIKARAM, G.; NAJAFI, M. L. Prevalence of Aflatoxin Contamination in Herbs and Spices in Different Regions of Iran. *Iranian Journal Public Health*, v. 46, n. 11, p.1540-1545, 2017.

KLICH, M. A. Identification of common *Aspergillus* species. Centraalbureau voor Schimmelcultures, The Netherlands. 2002.

KLICH, M. A.; MULLANEY, E. J.; DALY, C. B.; CARY, J. W. Molecular and physiological aspects of aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis by *Aspergillus tamarii* and *A. ochraceoroseus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.53, p. 605-609, 2000.

KURSUN, O.; MUTLU, A. G. Aflatoxin in spices marketed in the west Mediterranean region of Turkey. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, v. 9, p. 2979-2981, 2010.

LEMOS, O. F.; TREMACOLDI, C. R.; POLTRONIERI, M. C. Boas práticas agrícolas para aumento da produtividade e qualidade da pimenta-do-reino no Estado do Pará. Brasília, DF: Embrapa, 2014, 52p.

OZBEY, F.; KABAK, B. Natural co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in spices. *Food Control*, v. 28, p. 354-361, 2012.

PETERSON, S. W.; VEGA, F. E.; POSADA, F.; NAGAI, C. *Penicillium coffeae*, a new endophytic species isolated from a coffee plant and its phylogenetic relationship to *P. fellutanum*, *P. thiersii* and *P. brocae* based on parsimony analysis of multilocus DNA sequences. *Mycologia*, v. 97, p. 659–666, 2005.

PITT, J. I. Xerophilic Fungi and the Spoilage of Foods of Plant Origin. *Water Relations of Foods*, p. 273-307, 1975.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. Fungi and food spoilage. Springer Science Business Media: New York, 593 p., 2009.

RUADREW, S.; CRAFT, J.; AIDOO, K. Occurrence of toxigenic *Aspergillus* spp. and aflatoxins in selected food commodities of Asian origin sourced in the West of Scotland. *Food and Chemical Toxicology*, v. 55, p. 653–658, 2013.

SAMSON, R. A.; HOUBRAKEN, J.; THRANE, U.; FRISVAD, J. C.; ANDERSEN, B. Food and indoor Fungi. Uthrech, NL: CBS Fungal Biodiversity Center, 390p., 2010.

SILVA, J. J.; FUNGARO, M. H. P.; WANG, X.; LARSEN, T. O.; FRISVAD, J. C.; TANIWAKI, M. H.; IAMANAKA, B. T. Deep genotypic species delimitation of *Aspergillus*

section *Flavi* isolated from brazilian foodstuffs and the description of *Aspergillus annui* sp. nov. and *Aspergillus saccharicola* sp. nov. *Journal of Fungi*, v. 8, 1279, 21p., 2022.

SILVA, J. J.; IAMANAKA, B. T.; FERRANTI, L. S.; MASSI, F. P.; TANIWAKI, M. H.; PUEL, O.; LORBER, S.; FRISVAD, J. C.; FUNGARO, M. H. Diversity within *Aspergillus niger* Clade and Description of a New Species: *Aspergillus vinaceus* sp. nov. *Journal of Fungi*, v.6, 317, 20p., 2020.

SINGH, P.; CALLICOTT, K. A.; ORBACH; M. J.; COTTY, P. J. Aflatoxin producers from the United States reveals previously unknown diversity and two new taxa. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, 1236, 2020.

YOGENDRARAJAH, P.; JACXSENS, L.; DE SAEGER, S.; DE MEULENAER, B. Co-occurrence of multiple mycotoxins in dry chilli (*Capsicum annum* L.) samples from the markets of Sri Lanka and Belgium. *Food Control*, v. 46, p. 26-34, 2014.

ZALAR, P.; FRISVAD, J C.; GUNDE-CIMERMAN, N.; VARGA, J.; SAMSON, R. A. Four new species of *Emericella* from the Mediterranean region of Europe. *Mycologia*, v. 100, n. 5, p. 779–795, 2008.

ZARESHAHRABADI Z., BAHMYARI, R.; NOURAEI, H.; KHODADADI, H.; MEHRYAR, P.; ASADIAN, F.; ZOMORODIAN, K. Detection of aflatoxin and ochratoxin A in spices by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Food Quality*, v. 2020, 8 p., 2020.

ZINEDINE, A.; BRERA, C.; ELAKHDARI, S.; CATANO, C.; DEBEGNACH, F., ANGELINI, S.; DE SANTIS, B.; FAID, M.; BENLEMLIH, M.; MINARDI, V.; MIRAGLIA, M. Natural occurrence of mycotoxins in cereals and spices commercialized in Morocco. *Food Control*, v.17, p.868–874, 2006.

7. DISCUSSÃO GERAL

Cada etapa da produção da pimenta pode favorecer o desenvolvimento de um grupo fúngico específico, a depender de características como umidade do produto e UR, temperatura, substrato, pH, entre outras. Considerando os tipos de amostras analisadas é possível observar que as amostras da pré-secagem e solo, ou seja, que apresentaram maior a_w (média de 0,960) favoreceram o crescimento de fungos mais hidrofílicos como os *Fusarium*. Já nas amostras secas (variação das médias de a_w entre 0,476 e 0,651) a prevalência foi de fungos mais xerofílicos, como os *Aspergillus* (PITT; HOCKING, 2009), que sobrevivem e crescem nesta condição. Somado a isto, o tipo de secagem com maior contaminação tanto fúngica quanto de micotoxinas testadas foi no terreiro.

Nas amostras de pimentas secas em terreiro houve o maior número de isolados (n=488 isolados), sendo os grupos fúngicos toxigênicos predominantes (*Aspergillus* section *Nigri* e *Aspergillus* section *Flavi*); além disso, 50% das amostras contaminadas com OTA e AFs pertenciam à secagem em terreiro, com a ressalva de que estavam dentro dos limites estabelecidos pelas regulamentações brasileira e internacional, excetuando-se uma amostra com 42,8 ug/kg de OTA. Não houve co-ocorrência das 2 micotoxinas analisadas em nenhuma amostra.

Em contrapartida, as mostras da secagem com Fogo Indireto apresentaram a menor média de infecção fúngica e não houve nenhuma incidência de *Aspergillus* section *Flavi*, ademais, nenhuma amostra apresentou níveis detectáveis (ou <LOD) de micotoxinas analisadas neste trabalho.

Portanto, é sabido que a secagem em terreiro é mais crítica em relação à contaminação por fungos e micotoxinas, por demorar mais tempo para secar e por ficar mais exposto ao ambiente. Já a secagem com secadores de fogo indireto não passa fumaça para a pimenta e possíveis sujidades consigo (como ocorre com a secagem de Fogo Direto), e a secagem leva um tempo mais curto para ser concluída, corroborando assim para uma maior qualidade e menor contaminação.

De modo geral foi observada uma baixa contaminação por micotoxinas (2% das amostras com média de 1,24 ug/kg de AFs e 6% das amostras com média de 9 ug/kg de OTA) podendo sugerir que as amostras adquiridas no local da produção podem apresentar maior qualidade e que as pimentas podem começar a representar algum risco no pós-processamento, como: distribuição/transporte em más condições sanitárias e climáticas, embalagens e armazenamento nos pontos de venda de forma inadequada, pois a maioria dos estudos mostra

uma contaminação maior nas amostras do comércio do que a encontrada no presente trabalho (amostras do campo).

8. CONCLUSÃO GERAL

Conclui-se que as amostras secas com métodos de secagem mais rápidos, como secadores de fogo direto e indireto são menos susceptíveis à contaminação por fungos e micotoxinas, sendo mais adequados e seguros.

As espécies potencialmente toxigênicas foram *A. flavus* (47,5% produtores de AFs), *A. parasiticus* (100% produtores de AFs) e *A. carbonarius* (100% produtores de OTA).

Algumas espécies de *Preussia* spp., *Lasiodiplodia* spp. e *Fusarium* spp., além de *Aspergillus luteorubrus* e *Aspergillus ochraceopetaliformis* foram encontradas pela primeira vez em amostras de pimenta preta.

A contaminação das amostras foi maior com relação à OTA (6%; sendo que uma amostra excedeu os limites máximos, com 42,8 ug/kg) do que aflatoxinas (2%), podendo representar maior preocupação para este tipo de *commodity*; ou pode ser consequência de problemas analíticos e/ou com a matriz para análise de aflatoxinas.

Mais estudos com relação à contaminação fúngica e por micotoxinas em pimentas são necessários nas etapas de transporte, distribuição, fracionamentos e armazenamento nos pontos de venda, para um melhor entendimento e mapeamento dos pontos mais críticos de contaminação deste produto.

9. REFERÊNCIAS

- ABARCA, M. L.; BRAGULAT, M. R.; CASTELLÁ, G.; CABAÑES, F. J. Ochratoxin A Production by Strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.60, n. 7, p.2650-2652, 1994.
- ALMELA, L.; RABE, V.; SÁNCHEZ, B.; TORRELLA, F.; PÉREZ, J. P. L.; GABALDÓN, J. A.; GUARDIOLA, L. Ochratoxin A in red paprika: Relationship with the origin of the raw material. *Food Microbiology*, v. 24, n. 4, p. 319-327, 2007.
- ANNIS, S. L.; VELASQUEZ, L.; XU, H.; HAMMERSCHMIDT, R.; LINZ, J.; TRAIL, F. Novel Procedure for Identification of Compounds Inhibitory to Transcription of Genes Involved in Mycotoxin Biosynthesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, n. 10, p. 4656-4660, 2000.
- AZZOUNE N.; MOKRANE, S.; RIBA, A.; BOURAS, N.; VERHEECKE, C.; SABAOU, N.; MATHIEU, F. Contamination of common spices by aflatoxigenic fungi and aflatoxin B1 in Algeria. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 2015, v. 8, n. 1, p.137-144, 2015.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 161 de 01º de julho de 2022. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos, 2022b.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 88, de 26 de março de 2021. Estabelece os limites máximos tolerados (LMT) de contaminantes em alimentos. *Diário Oficial da União*. 2021a.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada nº 623, de 09 de março de 2022. Dispõe sobre os limites de tolerância para matérias estranhas em alimentos, os princípios gerais para o seu estabelecimento e os métodos de análise para fins de avaliação de conformidade, 2022.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada nº 724, de 01º de julho de 2022. Dispõe sobre os padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação, 2022a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada nº 487, de 26 de março de 2021. Dispõe sobre os limites máximos tolerados (LMT) de contaminantes em alimentos, os princípios gerais para o seu estabelecimento e os métodos de análise para fins de avaliação de conformidade. *Diário Oficial da União*.2021b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 10 de 15 de maio de 2006. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade da Pimenta-do-Reino. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 2006.

BARANI, A.; NASIRI, Z.; JARRAH, N. Natural occurrence of Aflatoxins in commercial pepper in Iran. *Food and Agricultural Immunology*, v. 27, n. 4, p. 570-576, 2016.

BAYMAN, P.; BAKER, J.; MAHONEY, N. *Aspergillus* on tree nuts: incidence and associations. *Mycopathologia*, v. 155, n. 03, p. 161-169, 2002.

BENNETT, J. W. An overview of the genus *Aspergillus*. In: MACHIDA, M.; GOMI, K. *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*. Portland: *Caiser Academic Press*, 2010, p. 1–17.

BENNETT, J.; KLICH, M. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Review*, v. 16, n. 3, p. 497-516, 2003.

BIRCAN, C. The determination of aflatoxins in spices by immunoaffinity column extraction using HPLC. *International Journal of Food Science & Technology*, v.40, p.929-934, 2005.

BOK, J. W.; KELLER, N. P.; LAE, A. A regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryotic Cell*, v. 3, p. 527-535, 2004.

BOKHARI, F. M. Spices mycobiota and mycotoxins available in Saudi Arabia and their abilities to inhibit growth of some toxigenic fungi. *Mycobiology*, v.35, n.2, p.47-53, 2007.

BONTEMPO, M. Pimenta e seus benefícios à saúde. São Paulo: Alaúde Editorial, 2007, 107p.

BOVAY, J. FDA Refusals of Imported Food Products by Country and Category, 2005–2013. United States Department of Agriculture. *Economic Research Service*, n. 151, 2016.

CAC. Codex Alimentarius Commission. CODEX Committee on Food Additives and Contaminants. Position Paper on Ochratoxin A. *Joint FAO/WHO Food Standards Programme*, Agenda Item 14(a), 1998.

CAC. Codex Alimentarius Commission. Codex Committee on contaminants in foods. Discussion paper on the establishment maximum levels for mycotoxins in spices. *Joint FAO/WHO Food Standards Programme*, Agenda Item 11, 2017.

CHIAVARO, E.; DALL'ASTA, C.; GALAVERNA, G.; BIANCARDI, A.; GAMBARELLI, E.; DOSSENA, A.; MARCHELLI, R. New reversed-phase liquid chromatography method to detect aflatoxins in food and feed with cyclodextrins as fluorescence enhancers added to the eluent. *Journal of Chromatography A*, v. 937, p. 31-40, 2001.

CHO, S.; LEE, C.; JANG, M.; SON, Y.; LEE, S.; CHOI, I.; KIM, S.; KIM, D. Aflatoxins contamination in spices and processed spice products commercialized in Korea. *Food Chemistry*, v. 107, p. 1283–1288, 2008.

CNNPA. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução Nº 12, de 24 de julho de 1978. Condimentos ou temperos. *Diário Oficial da União*, 1978.

CCCF. Codex Committee on Contaminants in Foods. Discussion paper on the development of maximum levels for mycotoxins in spices and possible prioritization of work. *Joint FAO/WHO Food Standards Programme*. Agenda Item 13, 2016.

COLAK, H.; BINGOL, E. B.; HAMPIKYAN, H.; NAZLI, B. Determination of Aflatoxin Contamination in Red-Scaled, Red and Black Pepper by ELISA and HPLC. *Journal of Food and Drug Analysis*, v. 14, n. 3, p. 292-296, 2006.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Conjuntura Pimenta-do-reino no Espírito Santo. 2015.

COPETTI, M. V.; IAMANAKA, B. T.; PEREIRA, J. L.; FUNGARO, M. H.; TANIWAKI, M. H. Aflatoxigenic fungi and aflatoxin in cocoa. *International Journal of Food Microbiology*, v. 148, p. 141–144, 2011.

COPETTI, M. V.; PEREIRA, J. L.; IAMANAKA, B. T.; PITT, J. I.; TANIWAKI, M. H. Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in cocoa during farm processing. *International Journal of Food Microbiology*, 143, 67-70, 2010.

COSTA, R. S. C.; MEDEIROS, I. M. Pimenta-do-reino em Rondônia. Porto Velho: Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2011.

DUARTE, M, L. R. Cultivo da pimenta-do-reino na região norte. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2004.

DUARTE, R. M. L.; ALBUQUERQUE, C. F. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Sistema de Produção da Pimenteira-do-reino. Embrapa Amazônia Oriental, Sistemas de Produção, 01. Dez, 2005.

DUARTE, M. L. R.; POLTRONIERI, M. C.; CHU, E. Y.; OLIVEIRA, R. F.; LEMOS, O. F.; BENCHIMOL, R. L; CONCEIÇÃO, H. E.O.; SOUZA, G. F. A cultura da-pimenta-do-reino / Embrapa Amazônia Oriental. 2ª Ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. 73p. Coleção Plantar, 55.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, v. 19, n. 1, p. 11-15, 1987.

EATON, D. L.; GROOPMAN, J. D. The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary and agricultural significance. *Academic Press*, 1994.

EC. European Commission. Commission Regulation (EU) No 165/2010 of 26th February 2010 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain

contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. *Official Journal of the European Union*, 2010.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Manual de Segurança e Qualidade para a Cultura da Pimenta-do-Reino. Brasília: EMBRAPA/SEDE, 2004. 65 p. Série Qualidade e Segurança dos Alimentos.

ESA. European Spice Association. Quality Minima Document. Germany, Rev. 5, oct., 2015.

ESPÍRITO SANTO. Lei Estadual nº 10.582, de 11 de outubro de 2016. Dispõe sobre o incentivo à produção de pimenta-do-reino de qualidade. *Diário Oficial dos Poderes do Estado*, Vitória, ES, 11 out. 2016. Protocolo 269260, p. 16-17.

EURACHEM GUIDES. The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics. LGC, Teddington, 2nd ed., 2014.

EZEKIEL, C. N.; FAPOHUNDA, S. O.; OLORUNFEMI, M. F.; OYEBANJI, A. O.; OBI, I. Mycobiota and aflatoxin B1 contamination of *Piper guineense* (Ashanti pepper), *P. nigrum* L. (black pepper) and *Monodora myristica* (calabash nutmeg) from Lagos, Nigeria. *International Food Research Journal*, v. 20, n. 1, p. 111-116, 2013.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT, Crops and livestock products, Pepper (*Piper* spp.) raw - 2022. 2023. Available from: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>> Cited: 25 jan 2024.

FAZEKAS, B.; TAR, A.; KOVÁČZ, M. Aflatoxin and ochratoxin A content of spices in Hungary. *Food Additives & Contaminants*, v.22, p.856-863, 2005.

FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; MENDES, E.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Quantification of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 in pepper by HPLC/fluorescence. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 27, n. 2, p. 325-334, 2004.

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.

FLANNIGAN, B.; HUI, S. C. The occurrence of aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* in the mould floras of ground spices. *Journal of Applied Microbiology*, v. 41, n. 3, p. 411–418, 1976.

FREIRE, F. C. O.; KOZAKIEWICZ, Z.; PATERSON, R. R. M. Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. *Mycopathologia*, v. 149, p. 13–19, 2000.

FREIRE, F. C. O.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F.; MENDES, F. N. P. Micotoxinas: Importância na alimentação e na saúde humana e animal. Fortaleza: *Embrapa Agroindústria Tropical*. Documentos, 110, 48 p., out., 2007.

FRISVAD, J. C.; FRANK, J. M.; HOUBRAKEN, J. A. M. P.; KUIJPERS, A. F. A.; SAMSON, R. A. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Studies in Mycology*, v. 50, p. 23–43, 2004.

FRISVAD, J. C.; HUBKA, V.; EZEKIEL, C. N.; HONG, S.-B.; NOVÁKOVÁ, A.; CHEN, A. J.; ARZANLOU, M.; LARSEN, T. O.; SKLENÁŘ, F.; MAHAKARNCHANAKUL, W.; SAMSON, R. A.; HOUBRAKEN, J. Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. *Studies in Mycology*, v. 93, p. 1–63, 2019.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. *Emericella venezuelensis*, a new species with stellate ascospores producing sterigmatocystin and aflatoxin B₁. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 27, p. 672–680, 2004.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A.; SMEDSGAARD, J. *Emericella astellata*, a new producer of aflatoxin B₁, B₂ and sterigmatocystin. *Letters in Applied Microbiology*, v. 38, p. 440–445, 2004.

FRISVAD, J. C.; SKOUBOE, P.; SAMSON, R. 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.

GARCIA, M. V.; MALLMANN, C. A.; COPETTI, M. V. Aflatoxigenic and ochratoxigenic fungi and their mycotoxins in spices marketed in Brazil. *Food Research International*, v. 106, p. 136–140, 2018.

GRACIANO, R. A. S.; ATUI, M. B.; DIMOV, M. N. Avaliação das condições higiênico-sanitárias de cominho e pimenta-do-reino em pó comercializados em cidades do Estado de São Paulo, Brasil, mediante a presença de matérias estranhas. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, n. 65, v. 3, p. 204-208, 2006.

HALL, T. A. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, n. 41, p. 95-98, 1999.

HAMMAMI, W.; FIORI, S.; THANI, R.; KALI, N. A.; BALMAS, V.; MIGHELI, Q.; JAOUA, S. Fungal and aflatoxin contamination of marketed spices. *Food Control*, v. 37, p. 177-181, 2014.

HASHEM, M.; ALAMRI, S. Contamination of common spices in Saudi Arabia markets with potential mycotoxin-producing fungi. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 17, p. 167-175, 2010.

HOLLINGER, K; EKPERIGIN, H. E. Mycotoxicosis in food producing animals. *Chemical Food Borne Hazards and their Control*, v. 15, n. 1, p. 133-165, 1999.

HOMMA, A. K.O. Extrativismo, Biodiversidade e Biopirataria na Amazônia. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 97 p., 2008.

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.

HOUBRAKEN, J.; KOCSUBÉ, S.; VISAGIE, C. M.; YILMAZ, N.; WANG, X.-C.; MEIJER, M.; KRAAK, B.; HUBKA, V.; BENSCH, K.; SAMSON, R. A.; FRISVAD, J. C. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (*Eurotiales*): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Studies in Mycology*, v. 95, p. 5–169, 2020.

IAC. Instituto Agronômico Campinas. Instruções agrícolas para as principais culturas econômicas. Campinas, SP, 7ª Edição, n. 200, jun, 2014. 452 p.

IAMANAKA, B. T.; OLIVEIRA, I. S.; TANIWAKI, M. H. Micotoxinas em alimentos. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*, v. 7, p. 138-161, 2010.

IARC. International Agency for Research on Cancer. Ochratoxin A. Summaries & Evaluations, v. 56, CAS n. 303-47-9, p. 489, 1993.

IARC. International Agency for Research on Cancer. WHO IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins naphthalene and styrene. Aflatoxins. v. 82, 590 p., feb., 2002.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. São Mateus. Produção Agrícola – Lavoura Permanente. Pimenta-do-reino / Quantidade produzida. 2019. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/es/sao-mateus/pesquisa/15/11863?tipo=ranking&indicador=12035>> Acesso em: 07 jun 2021.

IJSN. Instituto Jones dos Santos Neves. Mapas - Divisão Regional do Espírito Santo – Macrorregiões de Planejamento, 2012. Disponível em: <<http://www.ijsn.es.gov.br/mapas/>> Acesso em: 24 mai 2021.

IPC. International Pepper Community. Crop Position Report: All Countries - 2019. International Pepper Conference, 2020. Available from: <https://internationalpepperconference.com/report/index?product=10&year=2019&report_type=10&member=&graph=20> Cited: 17 feb. 2021.

JAIMEZ, J.; FENTE, C. A.; VAZQUEZ, B. I.; FRANCO, C. M.; CEPEDA, A.; MAHUZIER, G.; PROGNON, P. Review: Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. *Journal of Chromatography A*, v. 882, p. 1-10, 2000.

JALILI, M.; JINAP, S.; RADU, S. Natural occurrence of ochratoxin A contamination in commercial black and white pepper products. *Mycopathologia*, v. 170, p. 251–258, 2010.

JALILI, M. Natural Occurrence of Ochratoxin A Contamination in Commercial Spices in Tehran. *Nutrition and Food Sciences Research*, v. 3, n. 3, p. 25-30, 2016.

JALILI, M.; JINAP, S.; NORANIZAN, A. Effect of gamma radiation on reduction of mycotoxins in black pepper. *Food Control*, v. 21, n. 10, p. 1388–1393, oct., 2010.

JAYASHREE, T.; SUBRASMANYAM, C. Oxidative stress as a prerequisite for aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 29, n. 10, p. 981-985, 2000.

JESWAL, P.; KUMAR, D. Mycobiota and Natural Incidence of Aflatoxins, Ochratoxin A, and Citrinin in Indian Spices Confirmed by LC-MS/MS. *International Journal of Microbiology*, v. 2015, 8 p., 2015.

JOHRI, R. K.; THUSA, N.; KHAJURA, A.; ZUTSHI, U. Piperine mediated changes in permeability of rat intestinal epithelial cells. *Biochem. Pharmacol.*, v. 43, p. 1401–1407, 1992.

JOY, C. M.; PITTAPPILLIL, G. P.; JOSE, K. P. Drying of Black Pepper (*Piper nigrum* L.) Using Solar Tunnel Dryer. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, v. 25, n. 1, p. 39-45, 2002.

KABAK, B.; DOBSON, A. D. W Mycotoxins in Spices and Herbs: An Update. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 57, n. 1, p. 18-34, 2017.

KHAZAELI, P.; MEHRABANI, M.; HEIDARI, M. R.; ASADIKARAM, G.; NAJAFI, M. L. Prevalence of Aflatoxin Contamination in Herbs and Spices in Different Regions of Iran. *Iranian Journal Public Health*, v. 46, n. 11, p.1540-1545, 2017.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, v. 16, p. 111–120, 1980.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, v. 38, p. 3022-3027, 2021.

KURSUN, O.; MUTLU, A. G. Aflatoxin in spices marketed in the west Mediterranean region of Turkey. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, v. 9, p. 2979-2981, 2010.

LARSEN, T. O.; SVENDSEN, A.; SMEDSGAARD, J. Biochemical characterization of ochratoxin A – producing strains of the genus *Penicillium*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, p. 3630-3635, 2001.

LEESON, S.; DIAZ, G. J.; SUMMERS, J. D. Poultry Metabolic Disorders and Mycotoxins. Guelph, Ontario: University Books, p. 249-280, 1995.

LEMOES, O. F.; TREMACOLDI, C. R.; POLTRONIERI, M. C. Boas práticas agrícolas para aumento da produtividade e qualidade da pimenta-do-reino no Estado do Pará. Brasília, DF: Embrapa, 2014, 52p.

MANDA, P.; ADANOU, K. M.; ARDJOUA, D.; ADEPO, A. J. B.; DANO, D. S. Occurrence of ochratoxin A in spices commercialized in Abidjan (Côte d'Ivoire). *Mycotoxin Research*, v. 32, p. 137–143, 2016.

MARQUARDT, R. R.; FROHLICH, A. A. A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *Journal of Animal Science*, v. 70, p. 3968-3988, 1992.

MENEZES, A. J. E. A.; HOMMA, A. K. O.; ISHIZUKA, Y.; KODAMA, N. R.; KODAMA, E. E. Gliricídia como Tutor Vivo para Pimenteira-do-reino. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 393, 31p., 2013.

MOTEVALIBASHI, M.; SABOKBAR, A.; TALEBI, S. Molecular identification of Aflatoxin B1 *Aspergillus flavus* in red, black and white pepper using PCR method. *International Journal of Molecular and Clinical Microbiology*, v. 8, n. 2, p. 1016-1022, 2018.

NURTJAHJA, K.; ZUHRA, C. F.; SEMBIRING, H.; BUNGSU, A.; SIMANULLANG, J.; SILALAH, J. E.; GULTOM, B. N. L.; SARTINI, S. Fungal contamination spices from Indonesia with emphasis on *Aspergillus flavus*. *Czech Journal of Food Sciences*, v. 37, n. 5, p. 338–344, 2019.

OZBEY, F.; KABAK, B. Natural co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in spices. *Food Control*, v. 28, p. 354-361, 2012.

PERSSON DA SILVA, A. R.; FUNGARO, M. H. P. F.; SILVA, J. J.; MARTINS, L. M.; TANIWAKI, M. H.; IAMANAKA, B. T. Ochratoxin A and related fungi in Brazilian black pepper (*Piper nigrum* L.). *Food Research International*, v. 142, 2021.

PETZINGER, E.; WEIDENBACH, A. Mycotoxins in the food chain: the role of ochratoxins. *Livest. Prod. Sci.*, v. 76, p. 245–250, 2002.

PICCOLO, M. P. Ciência e Tecnologia de Alimentos: Produção e Sustentabilidade. 1ª Edição. Editora: Paco Editorial, Jundiaí. 2014. 396p.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. Fungi and food spoilage. Springer Science Business Media: New York, 593 p., 2009.

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

PRADO, G.; OLIVEIRA, M. S.; MOREIRA, A. P. A.; LIMA, A. S.; SOUZA, R. A.; ALVES, M. C. Determinação de aflatoxina B1 em pimenta (*Piper nigrum* L.) e orégano (*Origanum vulgare* L.) por cromatografia em camada delgada e densitometria. *Química Nova*, v. 31, n. 3, p. 514-517, 2008.

RAMESH, C.; JAYAGOUDAR, S. Determination of Ochratoxin A in spices from Dharwad by High Performance Liquid Chromatography. *Asian Journal of Plant Science and Research*, v. 4, n. 1, p. 42-52, 2014.

RAVINDRAN, P. N.; KALLUPURACKAL, J. A. Black pepper. In: PETER, K. V. Handbook of herbs and spices. 2nd Edition. India: *Woodhead Publishing Limited*, v. 1, p. 86-115, 2012.

ROSLAN, N. F. M.; YUDIN, A. S. M. Drying process of black pepper in a swirling fluidized bed dryer using experimental method. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 863, 012047, p. 1-9, 2020.

RUADREW, S.; CRAFT, J.; AIDOO, K. Occurrence of toxigenic *Aspergillus* spp. and aflatoxins in selected food commodities of Asian origin sourced in the West of Scotland. *Food and Chemical Toxicology*, v. 55, p. 653–658, 2013.

SAMSON, R. A.; HOUBRAKEN, J.; THRANE, U.; FRISVAD, J. C.; ANDERSEN, B. Food and indoor Fungi. Utrecht, NL: CBS Fungal Biodiversity Center, 390 p., 2010.

SAMSON, R. A.; NOONIM, P.; MEIJER, M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; VARGA, J. Diagnostic tools to identify black aspergilli. *Studies in Mycology*, v. 59, p. 129–145. 2007.

SASIDHARAN, I.; MENON, A. N. Comparative chemical composition and antimicrobial activity of berry and leaf essential oils of *Piper nigrum* L. *International Journal of Biological & Medical Research*, v. 1, n. 4, p. 215-218, 2010.

SAXENA, J.; MEHROTRA, B. S. Screening of Spices Commonly Marketed in India for Natural Occurrence of Mycotoxins. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 2, p. 286-292, 1989.

SCHATZKI, T. F.; ONG, M. S. Dependence of aflatoxin in almonds on the type and amount of insect damage. *Journal of Food Chemistry*, v. 49, n. 09, p. 4513-4519, 2001.

SERRANO, L. A. L.; NOVAK, L. R.; LIMA, I. M. Colheita e pós-colheita da pimenta-do-reino. Vitória, ES: *Incaper Documentos* 157, 40 p., 2008.

SHREELAVANIYA, R.; PANGAYARSELVI, R.; KAMARAJ, S. Mathematical Modeling of Drying Characteristics of Black Pepper (*Piper nigrum*) in Indirect Type Solar-Biomass Hybrid Dryer. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, v. 6, n. 11, p. 2634-2644, 2017.

SILVA, A. E. S.; SECUNDINO, W. A pimenta-do-reino em terras capixabas. In: DADALTO, G. G.; SILVA, A. E. S.; COSTA, E. B.; GALVÊAS, P. A. O.; LOSS, W. R. Transformações da agricultura Capixaba: 50 anos. Vitória: Cedagro - Centro de Desenvolvimento do Agronegócio, 2016. p. 99-101.

SILVA, B. S. O.; NETO, A. P. D.; SILVA, M. B. Pimenta-do-reino: importância da defesa fitossanitária para a sustentabilidade da atividade na região norte do Espírito Santo. *Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável*, v. 1, n. 1, p. 88-92, 2011.

SILVA, J. J.; FUNGARO, M. H. P.; WANG, X.; LARSEN, T. O.; FRISVAD, J. C.; TANIWAKI, M. H.; IAMANAKA, B. T. Deep genotypic species delimitation of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from brazilian foodstuffs and the description of *Aspergillus annui* sp. nov. and *Aspergillus saccharicola* sp. nov. *Journal of Fungi*, v. 8, 1279, 21p., 2022.

SINGH, P.; CALLICOTT, K. A.; ORBACH, M. J.; COTTY, P. J. Aflatoxin producers from the United States reveals previously unknown diversity and two new taxa. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, 1236, 2020.

SRINIVASAN, K. Black pepper and its pungent principle-piperine. A review of diverse physiological effects. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v. 47, p. 735-748. 2007.

STROKA, J.; van OTTERDIJK, R.; ANKLAM, E. Immunoaffinity column clean-up prior to thin-layer chromatography for the determination of aflatoxins in various food matrices. *Journal of Chromatography A*, v. 904, p. 251-256, 2000.

THIRUMALA-DEVI, K.; MAYO, M. A.; REDDY, G.; EMMANUEL, K. E.; LARONDELLE, Y.; REDDY, D. V. R. Occurrence of ochratoxin A in black pepper, coriander, ginger and turmeric in India. *Food Additives & Contaminants*, v. 18, n. 9, p. 830-835, 2001.

TOMA, F. M.; ABDULLA, N. Q. F. Isolation and Identification of Fungi from Spices and Medicinal Plants. *Research Journal of Environmental and Earth Sciences*, v. 5, n. 3, p. 131-138, 2013.

USDA. United States Department of Agriculture. Vietnam - Technical Regulations on Mycotoxin and Heavy Metals MRLs in Foods. *Global Agricultural Information Network*, n. VM3070, 2013.

VAN EGMOND, H. P.; DEKKER, W. H. Worldwide regulations for mycotoxins in 1994. *Natural Toxins*, v. 3, p. 332-336, 1995.

VENTURA, J. A.; COSTA, H. Manejo da fusariose da pimenta-do-reino no Estado do Espírito Santo. Vitória, ES: Incaper, 18p., 2004.

VINHA, M. B.; LIMA, I. M.; SECUNDINO, W. Contaminantes que comprometem a segurança da pimenta-do-reino ao longo de sua cadeia produtiva. Incaper em Revista, Vitória, v. 8, p. 55-67, 2018.

VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J. Updating the taxonomy of *Aspergillus* in South Africa. *Studies in Mycology*, v. 95, p. 253–292, 2020.

VYHNÁNEK, T.; HANÁČEK, P.; ŠAFRÁNKOVÁ, I.; ĐORĐEVIĆ, B.; BERANOVÁ, H.; TROJAN, V.; HAVEL, L. Molecular detection of fungi in paprika, chili powder and black pepper. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, v. 66, n. 4, p. 927-937, 2018.

WAŚKIEWICZ, A.; BESZTERDA, M.; BOCIANOWSKI, J.; GOLIŃSKI, P. Natural occurrence of fumonisins and ochratoxin A in some herbs and spices commercialized in Poland analyzed by UPLC-MS/MS method. *Food Microbiology*, v. 36, p. 426-431, 2013.

WILLIAMS, J. P.; HALLSWORTH, J. E. Limits of life in hostile environments: no barriers to biosphere function? *Environmental Microbiology*, v.11, n. 12, p. 3292–3308, 2009.

YOGENDRARAJAH, P.; JACXSENS, L.; DE SAEGER, S.; DE MEULENAER, B. Co-occurrence of multiple mycotoxins in dry chilli (*Capsicum annum* L.) samples from the markets of Sri Lanka and Belgium. *Food Control*, v. 46, p. 26-34, 2014.

YU, J.; CLEVELAND, T. E.; NIERMAN, W. C.; BENNETT, J. W. *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases. *Revista Iberoamericana de Micologia*, v. 22, p. 194-202, 2005.

ZALAR, P.; FRISVAD, J C.; GUNDE-CIMERMAN, N.; VARGA, J.; SAMSON, R. A. Four new species of *Emericella* from the Mediterranean region of Europe. *Mycologia*, v. 100, n. 5, p. 779–795, 2008.

ZARESHAHRABADI Z., BAHMYARI, R.; NOURAEI, H.; KHODADADI, H.; MEHRYAR, P.; ASADIAN, F.; ZOMORODIAN, K. Detection of aflatoxin and ochratoxin A in spices by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Food Quality*, v. 2020, 8 p., 2020.

ZINEDINE, A.; BRERA, C.; ELAKHDARI, S.; CATANO, C.; DEBEGNACH, F., ANGELINI, S.; DE SANTIS, B.; FAID, M.; BENLEMLIH, M.; MINARDI, V.; MIRAGLIA, M. Natural occurrence of mycotoxins in cereals and spices commercialized in Morocco. *Food Control*, v.17, p.868–874, 2006.