

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E
DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

ROSÁLIA DE FÁTIMA FERREIRA MARTINS

**IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FUNGOS E AFLATOXINAS
EM AMENDOIM (*Arachis hypogaea* L)**

São Luís – MA

2023

ROSÁLIA DE FÁTIMA FERREIRA MARTINS

**IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FUNGOS E AFLATOXINAS
EM AMENDOIM (*Arachis hypogaea* L)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Mestre em Saúde e Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho

Área de concentração: Saúde e Ambiente

Linha de pesquisa: Qualidade Ambiental e Sustentabilidade.

São Luís - MA

2023

ROSÁLIA DE FÁTIMA FERREIRA MARTINS

**IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FUNGOS E AFLATOXINAS EM
AMENDOIM (*Arachis hypogaea* L)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do título de Mestre em Saúde e Ambiente.

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho (Orientador)

Doutor em Química (USP)
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Adenilde Nascimento Mouchreck

Doutora em Ciências dos Alimentos (UFLA)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dra. Djavania Azevêdo da Luz Silva

Doutora em Química (UFPB)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Silvio Carvalho Marinho

Doutora em Química (UFPB)
Faculdade Santa Terezinha-CEST

Martins, Rosália de Fátima Ferreira.

IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FUNGOS E AFLATOXINAS
EM AMENDOIM *Arachis hypogaea* L / Rosália de Fátima
Ferreira Martins. - 2023.

59 p.

Orientador(a): Victor Elias Mouchrek Filho.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Saúde e Ambiente/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
São Luís, Ma, 2023.

1. Segurança Alimentar. 2. Fungos Filamentosos. 3.
Aflatoxinas. 4. Maldi-tof. I. Mouchrek Filho, Victor
Elias. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus filhos, André Roney e Aliny Rafaela, simplesmente por fazerem parte de mim e serem responsáveis pelo que me tornei, pois, me apoiaram, me ajudaram em muitos processos desta jornada;

Agradeço a meus pais, Rosenilde e Oswaldo, por ter me dado a base e todo o suporte para eu me tornar uma pessoa justa, correta e trabalhadora e humana;

Aos meus irmãos que sempre contamos uns com os outros para seguir em frente, sem medir esforços para isso;

Ao professor Victor Mouchreck, que sempre acreditou em mim, estendeu a mão e confiou em meu projeto, me ajudando a torná-lo possível;

Ao Gustavo Oliveira, que sempre esteve disponível para que as análises fossem feitas da melhor forma possível;

Aos meus professores de banca, professora Adenilde Mouchreck, Djavania Azevêdo Silva e Silvio Marinho, por aceitarem o convite e principalmente por serem tão acolhedores comigo;

A todos os meus colegas de trabalho do HUMI, que sempre estiveram dispostos a me ajudar no que fosse preciso,

Agradeço também a UFMA, pela possibilidade de fazer acontecer um dos meus objetivos de vida, o de me tornar mestre.

RESUMO

O amendoim (*Arachis hypogaea* L) é um dos alimentos mais consumidos no mundo em função do seu alto valor nutritivo e disponibilidade. Entretanto, é um dos grãos mais susceptíveis à contaminação por fungos e toxinas, causando grande preocupação a nível de saúde pública. O presente estudo teve como objetivo identificar e quantificar fungos e aflatoxinas em amendoins. Para tanto, foram realizadas análises do teor de umidade dos grãos; quantificação de bolores; identificação das espécies fúngicas, por análise proteômica, Sistema MALDI-TOF, além de identificar e quantificar níveis de aflatoxinas no amendoim. Foram analisadas 24 amostras, divididas em 3 categorias, 14 amostras *in natura*, 05 Industrializadas, e 05 Torradas. Os valores encontrados para a umidade, variaram de 3,1% a 8,1%, adequados para o controle de contaminantes fúngicos. Para a contagem de bolores das 24 amostras analisadas, apenas 15 (62,5%) amostras foi considerada satisfatória, enquanto, 09 (37,5%) amostras, estavam insatisfatórias. As análises fúngicas revelaram a maior incidência para o gênero *Aspergillus* 41 (95,3 %) amostras, e sobre as espécies, *A. flavus* foi o mais evidenciado 17 (39,5%) amostras, seguida por *A. montevicensis* 10 (23,2%); *A. niger* 10 (23,2%); *A. minisclerotigenes* 03 (6,9%); *A. parasiticus* 01 (6,9%), *Purpureocillium lilacinum* 1 (2,3%) e *Rhizopus sexualis* 01 (6,9%). Quanto à identificação e quantificação de aflatoxinas apenas 09 (37,5%) amostras foi detectada aflatoxinas totais, que variaram de 1 a 82,3 µg/Kg. Estes resultados comprovaram que em relação a aflatoxinas, os amendoins não representam perigo para ingestão eventual, no entanto, outras micotoxinas podem ser produzidas por essas mesmas cepas de fungos. Concluímos que novos estudos para monitoramento são necessários, devido aos impactos climáticos sobre o *A. flavus*, devido sua alta capacidade de adaptação ambiental, bem como a maior expressão de algumas micotoxinas e a supressão de outras.

Palavras-chave: Segurança alimentar, fungos filamentosos, aflatoxinas, MALDI-TOF.

ABSTRACT

Peanut (*Arachis hypogaea* L) is one of the most consumed foods in the world due to its high nutritional value and availability. However, it is one of the grains most susceptible to contamination by fungi and toxins, causing great public health concern. The present study aimed to identify and quantify fungi and aflatoxins in peanuts. To this end, analyzes of the moisture content of the grains were carried out; mold quantification; identification of fungal species, by proteomic analysis, MALDI-TOF System, in addition to identifying and quantifying levels of aflatoxins in peanuts. 24 samples were analyzed, divided into 3 categories, 14 fresh samples, 05 Industrialized, and 05 Toasted. The values found for humidity ranged from 3.1% to 8.1%, suitable for controlling fungal contaminants. For the mold count of the 24 samples analyzed, only 15 (62.5%) samples were considered satisfactory, while 09 (37.5%) samples were unsatisfactory. Fungal analyzes revealed the highest incidence for the genus *Aspergillus* 41 (95.3%) samples, and regarding the species, *A. flavus* was the most evident 17 (39.5%) samples, followed by *A. montevicensis* 10 (23, two%); *A. niger* 10 (23.2%); *A. minisclerotigenes* 03 (6.9%); *A. parasiticus* 01 (6.9%), *Purpureocillium lilacinum* 1 (2,3%) and *Rhizopus sexualis* 01 (6.9%). Regarding the identification and quantification of aflatoxins, only 09 (37.5%) samples had total aflatoxins detected, which ranged from 1 to 82.3 µg/Kg. These results proved that in relation to aflatoxins, peanuts do not represent a danger for eventual ingestion, however, other mycotoxins can be produced by these same strains of fungi. We conclude that new monitoring studies are necessary, due to the climatic impacts on *A. flavus*, due to its high capacity for environmental adaptation, as well as the greater expression of some mycotoxins and the suppression of others.

Keywords: Food safety, filamentous fungi, aflatoxins, MALDI-TOF.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Amendoim expostos no comércio informal.....	31
Figura 2	Cepas de fungos filamentosos isoladas do amendoim.....	42
Figura 3	Cepas de fungos filamentosos visualizadas microscopicamente.....	43
Figura 4	Produção de escleródios em cepas de <i>Aspergillus flavus</i>	45
Figura 5	Produção de fluorescência em cepas de <i>Aspergillus</i> produtoras de aflatoxinas.....	46

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1	Espécies fúngicas seção <i>Flavi</i> produtoras de AFs e alimentos afetados.....	22
Tabela 2	Teor de umidade do amendoim.....	32
Tabela 3	Contagem de bolores e leveduras.....	34
Tabela 4	Fungos isolados nesta pesquisa	38
Tabela 5	Análise de aflatoxinas em amendoim, por LC-MS/MS.....	47

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Resultados da qualidade do amendoim em relação a bolores e leveduras.....	35
Gráfico 2	Percentuais de crescimento por espécie.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFs	Aflatoxinas
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AFB1	Aflatoxina B1
AFB2	Aflatoxina B2
AFG1	Aflatoxina G1
AFG2	Aflatoxina G2
AOAC	<i>Official Methods of Analysis of AOAC International</i>
APHA	Métodos Padrão para Análise de Produtos Lácteos
BAM	Manual Analítico Bacteriológico
BDA	Ágar Batata Dextrose
CBD	Caldo Batata Dextrose
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
DG18	<i>Dichloran Glycerol 18 Chloramphenicol</i>
DRBC	Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol Base
CEE	Comissão de Estudos Especiais
DON	Desoxinivalenol
DTA	Doenças Transmitidas por Alimento
ECL	Esclerócios
ESI	Eletrospray
FAO	Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação
FDA	Food And Drug Administration
FERG	Grupo de Referência de Epidemiologia de Origem Alimentar
FUMO	Fumosina
ISO	Organização Internacional de Normalização
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
KH ₂ PO ₄	Di-hidrogenofosfato de potássio
LAMIC	Laboratório de Análises Micotoxicológicas
LM	Limite Máximo
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em Tandem
MALDI-TOF	Dessorção Ionização a Laser Assistida por Matriz – Tempo de Voo
M β -cyd	Metil- β - Ciclodextrina
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
NaCl	Cloreto de sódio
NBR	Normas Brasileiras
OCRA	Ocratoxina A
OMS	Organização Mundial de Saúde
RDC	Resolução Da Diretoria Colegiada
SAB	<i>Sabouraud</i>
SLD	Dessorção Suave a Laser
UV	Ultravioleta
YES	Yeast Extract Sucrose Ágar
ZON	Zearalenona

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	OBJETIVOS.....	16
2.1	Objetivo geral.....	16
2.2	Objetivos específicos.....	16
3.	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
3.1	FUNGOS EM ALIMENTO.....	16
3.2	CONTAGEM DE BOLORES E LEVEDURAS EM SEMENTES.....	17
3.3	<i>Aspergillus</i> E AFLATOXINAS.....	18
3.4	IMPACTOS NA SAÚDE HUMANA.....	18
3.4.1	Aspergilose.....	18
3.4.2	Aflatoxicose.....	19
3.4.3	Carcinogênese.....	19
3.5	FATORES AMBIENTAIS E CONTAMINAÇÃO.....	20
3.5.1	Mudanças climáticas.....	20
3.5.2	Armazenamento.....	20
3.5.3	Temperatura e umidade do alimento.....	20
3.6	<i>Aspergillus</i> SESSÃO FLAVI.....	21
3.6.1	Produção de escleródios.....	23
3.6.2	Fungos toxigênicos e Atoxigênicos.....	23
3.7	IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS.....	24
3.7.1	Microcultivo.....	25
3.7.2	Análise proteômica por Espectrometria de Massa MALDI-TOF....	25
3.8	ANÁLISE DE AFLATOXINAS POR LC-MS/MS.....	26
4	METODOLOGIA.....	27
4.1	AMOSTRAS.....	27
4.2	TEOR DE UMIDADE.....	28
4.3	CONTAGEM DE BOLORES E LEVEDURAS - Método Horizontal.....	28
4.3.1	Preparo das diluições.....	28
4.3.2	Plaqueamento.....	28
4.3.3	Contagem de bolores e leveduras.....	29
4.3.4	Cálculos para contagem de Bolores e leveduras.....	29

4.4	IDENTIFICAÇÃO FÚNGICA.....	29
4.4.1	Espectrometria de massa MALDI-TOF.....	29
4.4.1.1	Extração do fungo filamentoso.....	29
4.4.1.2	Ionização por dessorção a Laser.....	30
4.4.1.3	Análise Microscópica.....	30
4.5	ANÁLISES DE AFLATOXINAS POR LC-MS/MS.....	31
4.6	ANÁLISE DE CEPAS AFLATOXIGÊNICAS E ATOXIGÊNICAS....	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
5.1	TEOR DE UMIDADE.....	32
5.2	CONTAGEM DE BOLORES E LEVEDURAS.....	34
5.4	IDENTIFICAÇÃO FÚNGICA.....	37
5.4.1	Espectrometria de massa Sistema MALDI-TOF.....	37
5.4.2	Identificação macroscópica e microscópica dos isolados.....	41
5.4.3	Produção de Escleródios.....	44
5.5	ANÁLISE DE AFLATOXINAS POR LC-MS/MS.....	46
5.5.1	Identificação de cepas Toxigênicas e Atoxigênicas por semeio direto.....	50
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	51
	REFERÊNCIAS.....	52

1- INTRODUÇÃO

O amendoim (*Arachis hypogaea* L) é uma planta da família da *Leguminosae* (Carvalho, 2014), de importante valor nutritivo, apresentando em sua composição, óleo de fácil digestão, proteína, vitaminas (principalmente complexo B e minerais, fósforo, cálcio, magnésio, potássio, ferro zinco e manganês) (Araújo *et al.*, 2007). No entanto, é considerado um dos grãos mais susceptíveis a contaminações, sendo afetado por falhas em toda a cadeia produtiva.

A contaminação desses grãos pode ocorrer por fungos, bactérias, vírus ou parasitas, podendo acontecer durante o processo pré-colheita, até o pós-colheita. Essa contaminação pode resultar na diminuição do poder germinativo dos grãos, assim como em variações nos aspectos físicos e nutricionais. (Saath *et al.*, 2021).

Os principais fatores que influenciam o crescimento fúngico e a produção de micotoxinas são as condições climáticas (tropicais, quentes e úmidas) (Rocha *et al.*, 2020) e umidade relativa, temperatura, transporte, estocagem e deficiência no manuseio e infestações por insetos (Saita; Pandolfi, 2019; Saath *et al.*, 2021).

Os fungos tem sido tema de grande importância em estudos relacionados à saúde alimentar, principalmente pela capacidade destes microrganismos em produzir metabólitos secundários, como as micotoxinas, que tem sido relacionadas em uma variedade de doenças e síndromes clínicas em seres humanos e animais (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2009).

Os fungos, principalmente dos gêneros *Fusarium spp*, *Aspergillus spp* e *Penicillium spp*, estão entre os mais importantes produtores de micotoxinas em alimentos (Iamanaka; Oliveira; Taniwaki, 2010), e dentre as micotoxinas mais prejudiciais à saúde, estão as Aflatoxinas, (B₁, B₂, G₁, G₂ e M₁), as Fumosinas (FUMO), a Patulina, o Desoxinivalenol (DON), a Ocratoxina A (OCRA) e a Zearalenona (ZON) (OMS, 2018).

As *Aflatoxinas* estão entre as micotoxinas mais tóxicas e são produzidas por principalmente por *A. flavus* e *A. parasiticus*, que crescem no solo, vegetação em decomposição, feno e grãos. As culturas que são frequentemente afetadas por este gênero incluem cereais (milho, sorgo, trigo e arroz), oleaginosas (soja, amendoim, girassol e algodão), especiarias (pimenta, pimenta-do-reino, coentro, cúrcuma e gengibre) e nozes (pistache, amêndoa, noz, coco e castanha-do-pará) (OMS, 2018).

No Brasil, a RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011 do Ministério da Saúde, alterada pela RDC Nº 138 de 8 de fevereiro de 2017 (Brasil, 2017), estabelecem limites máximos (LM) admissíveis para algumas das micotoxinas em alimentos prontos para oferta ao consumidor. Para as aflatoxinas em amendoim (com casca, descascado, cru ou tostado), pasta ou manteiga de amendoim, o limite máximo tolerado é de 20µg/kg (Brasil, 2011).

Os dados levantados pelo Grupo de Referência de Epidemiologia de Origem Alimentar (FERG) da Organização Mundial de Saúde (OMS) no ano de 2015, referentes a epidemia global de Carga de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), apontam que entre os agentes causadores, principalmente de doenças diarreicas, estão vírus, bactérias, parasitas e aflatoxinas, sendo que 40% dos afetados, crianças menores de 5 anos (Havelaar *et al.*, 2015).

A inspeção e monitoramento de bolores presentes nos grãos, faz parte de um série de medidas para minimizar os riscos de micotoxinas (OMS, 2018). No entanto, a identificação de fungos filamentosos, não é uma prática muito corriqueira e sempre fora conduzida por métodos tradicionais que dependem de análises fenotípicas, associado à avaliação dos aspectos macroscópicos e microscópicos, técnicas consideradas demoradas, muitas vezes subjetivas (Moreira *et al.*, 2021).

Com os avanços tecnológicos, a espectrometria de massa sistema MALDI-TOF (Dessorção Ionização a Laser Assistida por Matriz – Tempo de Voo), vem sendo evidenciado como um dos métodos analítico mais eficiente, de boa relação custo-benefício para a identificação fenotípica de forma rápida e segura de espécies fúngicas (Gómez-velásquez *et al.*, 2020).

Diante de tantos desafios para o monitoramento de contaminação de alimentos por fungos e suas micotoxinas, o presente trabalho teve como objetivo principal, identificar e quantificar fungos e aflatoxinas em amendoins disponíveis para consumo humano.

2- OBJETIVOS

2.1- Geral:

- Identificar e quantificar fungos e aflatoxinas em amendoim disponível para consumo.

2.2- Específicos:

- Analisar o teor de umidade dos grãos;
- Quantificar a presença de bolores nas amostras;
- Identificar as espécies fúngicas presentes no amendoim, por Espectrometria de massa Sistema MALDI-TOF;
- Identificar e quantificar níveis de aflatoxinas no amendoim por LC-MS/MS.

3- REVISÃO DE LITERATURA

3.1- FUNGOS EM ALIMENTOS

A contaminação dos alimentos por agentes físicos, químicos e biológicos é um problema de saúde pública, pois, mesmo com a implementação de boas práticas agrícolas relacionadas ao processamento e armazenamento destes produtos, ainda são considerados inevitável e de difícil controle (Alshannaq; Yu, 2017).

Segundo Eskola *et al* (2020), as estimativas para alimentos contaminados por micotoxinas, superam a previstas pela FAO (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura), que alerta para cerca de 25% de toda a produção mundial. Neste sentido, é imprescindível o controle de armazenagem dos grãos em ambientes com temperatura e umidade adequadas, para impedir os ataques por fungos e suas micotoxinas (Daou *et al.*, 2021).

Os fungos fitopatógenos causam doenças graves em plantas, diminuindo a produtividade das culturas. Alguns desses fungos também podem infectar humanos imunocomprometidos. Isso ocorre pela produção de substâncias nocivas, como enzimas degradadoras e micotoxinas, representando um risco para a saúde humana e animal. No entanto, algumas destas espécies também tem sido investigadas como agentes de

biocontrole contra pragas e pela sua capacidade de produzir compostos com diversas atividades biológicas, como herbicida, antibiótica e antifúngica (Salvatore; Andolfi, 2021).

Na indústria alimentícia, algumas espécies possuem grande relevância e são utilizadas por séculos pela indústria. Dentre alguns exemplos destes fungos filamentosos, destaca-se o *Aspergillus niger*, utilizado principalmente na produção de ácido cítrico, além disso, juntamente do *A. awamori*, além do ácido cítrico, também são utilizados na produção de amilase (Awasthi *et al.*, 2023).

3.2- CONTAGEM DE BOLORES E LEVEDURAS EM SEMENTES

A suscetibilidade das culturas oleaginosas, como amendoim, girassol, soja, canola, colza, linhaça, mostarda, gergelim e caroço de algodão, à contaminação por fungos e suas toxinas é determinada por uma combinação de fatores ambientais e intrínsecos, incluindo conteúdo nutricional, teor de umidade e pH. O amendoim destaca-se como a cultura mais suscetível a estes contaminantes, sendo considerado um fator de preocupação global de segurança alimentar, especialmente em regiões onde o amendoim é uma cultura essencial e significativo contribuinte para a exposição dietética à aflatoxina (Jallow *et al.*, 2021).

A Resolução Da Diretoria Colegiada - RDC Nº 724, de 1º de julho de 2022, dispõem sobre os padrões microbiológicos dos alimentos e suas aplicações, definidos na Instrução Normativa - IN nº 161, de 1º de julho de 2022 (Brasil, 2022), que revoga a RDC Nº 331, de 23 de dezembro de 2019 e a Instrução Normativa nº 60 (Brasil, 2019).

A Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) NBR ISO 21527-2:2021, elaborado pela Comissão de Estudos Especiais de Microbiologia de Alimentos (ABNT/CEE-157), descreve o método horizontal para enumeração de bolores e leveduras (ISO, 2021). Trata-se de método específico para a enumeração de leveduras osmofílica e bolores xerofílicos viáveis em produtos destinados ao consumo humano ou animal, com atividade de água menor ou igual a 0,95, como os grãos, cereais e produtos derivados de cereais, farinhas, nozes, especiarias e condimentos entre outros, por meio da técnica de contagem de colônias a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3- *Aspergillus* E AFLATOXINAS

Diante de uma infinidade de espécies fúngicas onipresentes no planeta, o gênero *Aspergillus* merece destaque quando se trata de segurança alimentar devido à sua notável capacidade de adaptação ambiental e a produção de substratos para manutenção de sua sobrevivência. Essa adaptabilidade pode resultar em impactos negativos significativos na economia mundial, uma vez que esses fungos são conhecidos como agentes degradadores de produtos agrícolas (Rocha *et al.*, 2020).

As aflatoxinas são metabólitos tóxicos produzidas principalmente pelo *A. flavus* e *A. parasiticus* e estão entre as micotoxinas mais tóxicas presentes em alimentos, e as culturas que são frequentemente afetadas por estes fungos incluem cereais (milho, sorgo, trigo e arroz), oleaginosas (soja, amendoim, girassol e algodão), especiarias (pimenta, pimenta-do-reino, coentro, cúrcuma e gengibre) e nozes (pistache, amêndoa, noz, coco e castanha-do-pará) (OMS, 2018).

Já foram identificados mais de 18 tipos diferentes de aflatoxinas, porém, a B₁ B₂, G₁ e G₂, são consideradas as mais importantes devido a sua alta prevalência em produtos alimentícios e aos possíveis danos causados à saúde humana e animal. A aflatoxina B₁ é considerada a mais danosa, por estar mais associada às aflatoxicoses, toxicidades agudas e crônicas, modificações na estrutura do DNA e consequentemente gerando processos de carcinogenicidade, teratogenicidade e imunotoxicidade, (Shabeer *et al.*, 2022).

3.4- IMPACTOS NA SAÚDE HUMANA

3.4.1- Aspergilose

Trata-se de uma infecção invasiva acometida por fungos filamentosos, especificamente o *Aspergillus* como o nome já evidencia. É problema bem frequente no mundo todo e que acomete com maior frequência, pessoas com imunodeficiências (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2009, p. 2.203).

A aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA) afeta de 1% a 15% da população mundial com fibrose cística e 2,5% dos asmáticos, totalizando 4,8 milhões de pessoas, e destes, 400.000 também sofrem de aspergilose pulmonar crônica (APC). A aspergilose está entre as quatro principais causas de morte em pacientes imunocomprometidos globalmente. Embora o *A. flavus* não seja uma causa frequente, ela representa cerca de

65% dos casos de aspergilose em crianças na América do Norte, sendo também o principal agente (Shabeer *et al.*, 2022).

As principais espécies relatadas em infecções por Aspergilose pulmonar invasiva são o *A. fumigatus*, responsável por 90% dos casos que estão associados a morbidade e mortalidade graves, seguidos de *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. nidulans* e *A. ustus* (Brasil, 2020; Campione *et al.*, 2021).

A principal via de contaminação ao homem, são as vias respiratórias, quando se desenvolvem na árvore bronco pulmonar e nos seios nasais. As propriedades aerodinâmicas e o tamanho dos conídios, especialmente os de *A. fumigatus* (2-5 μ m), facilitam o processo de inalação (Mesquita-Rocha, 2019). Já a contaminação por ingestão do alimento contaminado, afeta a função do trato gastrointestinal causando alterações na função de barreira, absorção de nutrientes, bem como mudanças histomorfológicas do intestino (Liew; Mohd-Redzwan, 2018).

3.4.2- Aflatoxicose

A exposição a aflatoxinas por meio da ingestão crônica é considerado um fator de risco ao desenvolvimento de doenças, entre outros, o hepatocarcinoma, principalmente em portadores de do vírus da hepatite B, gerando quadros de aflatoxicoses e que podem se apresentar de forma crônica ou aguda (Lewis *et al.*, 2005).

Os efeitos crônicos são: câncer de fígado, carcinoma de células hepática, cirrose em crianças desnutridas, redução de imunidade, crescimento atrofiado. Já os efeitos agudos cursam com febre alta, vômitos, ascite, insuficiência hepática, edema e icterícia. O quadro agudo é o mais grave, sendo observadas altas taxas de mortalidade comparando ao crônico. Não há um consenso sobre as concentrações tóxicas de aflatoxinas que culminem em quadros de aflatoxicoses, porém, estima-se que em concentrações de 1000 μ g/kg, possam causar esse processo (Shabeer *et al.*, 2022).

3.4.3- Carcinogênese

Dentre todas as aflatoxinas, a B₁ é reconhecida como a micotoxina mais carcinogênica, apresentando uma afinidade especial pelo fígado. Estudos em seres humanos, foram identificadas a presença dessa substância e seus metabólitos em diversos órgãos, incluindo rim, coração, tecidos cerebrais, bem como sua detecção em amostras de urina e fezes. Elas tem a capacidade de penetração nas membranas celulares, se ligam ao DNA, e exercem modificações no gene P53, proteína responsável por codificar

proteínas supressora de tumor, ou seja, importante inibidor do desenvolvimento de tumores e cânceres (Ekwoyadu; Mwanza; Musekiwa, 2022).

Em uma revisão sistemática da literatura de estudos epidemiológicos, com base em avaliações de monografias da IARC (Agência Internacional de Pesquisa em câncer) publicados nos últimos anos, Claeys *et al* (2020) reitera a correlação positiva entre a exposição de micotoxinas e risco de câncer.

3.5- FATORES AMBIENTAIS E CONTAMINAÇÃO

3.5.1- Mudanças climáticas

As mudanças climáticas estão acontecendo de forma muito intensa, e as consequências que podem trazer ao cenário da segurança alimentar, em relação as micotoxinas são muito preocupantes, pois, a capacidade destes fungos toxigênico ante a alterações climáticas, poderá mudar a distribuição geográfica nos padrões de ocorrência destes contaminantes (Zingales *et al.*, 2022).

Estudos já demonstram mudanças ambientais como clima, umidade do ar e os impactos gerados na agricultura, por isso, são grandes os esforços pela busca de estratégias de controle para diversas doenças no mundo, gerados por esse fenômeno meteorológico, especialmente fungos micotoxigênico, pois, as espécies termotolerante estão adaptadas a climas mais quentes, como é o caso do *A. flavus*, um dos maiores produtores de aflatoxinas (Paterson; Lima, 2010).

3.5.2- Armazenamento

O armazenamento é também um fator determinante para o desenvolvimento de fungos e micotoxinas, principalmente se o produto já apresenta um desequilíbrio de umidade e temperatura, pois, podem otimizar o crescimento fúngico e a biossíntese de micotoxinas pelo aumento de umidade dos grãos (16- 30%), o aquecimento dos grãos (25- 32°C) e a alta UR do ar (80- 100%) (Neme; Mohammed, 2017).

3.5.3- Temperatura e umidade do alimento

A temperatura tem uma importância muito determinante para as espécies fúngicas, pois elas são muito sensíveis aos tipos de mudanças e uma temperatura ótima para o

crescimento destes microrganismos, nem sempre serão as ideais para a produção de micotoxinas (Iamanaka; Oliveira; TaniwakI, 2010).

Após a colheita do amendoim, todo um controle de umidade é realizado para evitar que os grãos sofram danos e ocorra a contaminação por agentes indesejáveis. Outro parâmetro indispensável é o controle da umidade no pós-colheita utilizando calor suplementar durante a fase de cura. As umidades recomendáveis para o amendoim devem ser mantidas abaixo de 10%, preferencialmente de 5 a 7%, buscando impedir a infecção primária por *Aspergillus* (Pereira; Ignácio, 2019).

O equilíbrio higroscópico dos grãos ocorre quando o teor de água no qual a pressão de vapor d'água no produto é igual à pressão de vapor do ar que o envolve, e isso acontece quando a umidade do grão chega a 8% (Almeida *et al.*, 2013). Em virtude disso, técnicas para secagem dos grãos são utilizadas para que se chegue neste resultado. Carretas secadoras por insuflação de ar previamente aquecido a 34-36 °C e com 60% de umidade relativa, permite que amendoim chegue a 8% (Pereira; Ignácio, 2019).

3.6- *Aspergillus* SESSÃO FLAVI

Para fins de segurança alimentar, é essencial que as identificações das espécies de fungos sejam feitas corretamente, pois, uma grande variedade de microrganismos pode desenvolver diferentes tipos de micotoxinas. As espécies da seção *Flavi* destacam-se, por estarem mais relacionadas a causas de doenças agudas e crônicas, bem como atuarem comprovadamente como indutora de carcinogênese humana, especialmente a *aflatoxina B₁* (Norlia *et al.*, 2019).

Segundo revisão realizada por Jallow *et al* (2021), cerca de 24 espécies do grupo *Aspergillus* e pertencentes as seções *Flavi*, *Nidulantes* e *Ochraceorosei*, possuem a capacidade de produzir aflatoxinas e estão presentes em uma variedade de alimentos, principalmente grãos e cereais, como demonstrados na tabela 1.

Tabela 1: Espécies fúngicas seção *Flavi* produtoras de AFs e alimentos afetados.

Seção	Espécie	Aflatoxinas	Alimentos contaminados
<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i>	B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	Nozes, cereais e outros
	<i>A. novoparasiticus</i>	B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	Milho
	<i>A. mottae</i>	B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	Cereal
	<i>A. parasiticus</i>	B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	Amendoim, milho
	<i>A. nomius</i>	B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	Trigo e outros substratos
	<i>A. sergii</i>	B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	Cereais e oleaginosas
	<i>A. pseudotamarii</i>	B ₁ , B ₂	Cereal
	<i>A. pseudocaelatus</i>	B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	Milho
	<i>A. transmontanensis</i>	B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	Cereal
	<i>A. luteovirescens</i>	B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	Cereal
	<i>A. parvisclerotigenus</i>	B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	Amendoim
	<i>A. minisclerotigenes</i>	B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	Amendoim
	<i>A. arachidicola</i>	B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	Milho, <i>Arachis glabrata</i>
	<i>A. austwickii</i>	B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	Cereal
	<i>A. aflatoxiformans</i>	B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	Cereal
	<i>A. pipericola</i>	B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	Cereal
	<i>A. cerealis</i>	B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	Cereal
	<i>A. togoensis</i>	B ₁ , B ₂	Cereal
<i>Nidulante</i>	<i>A. astellatus</i>	B ₁	Cereal e outros substratos
	<i>A. miraensis</i>	B ₁	Cereal
	<i>A. olivicola</i>	B ₁	Cereal
	<i>A. venezuelensis</i>	B ₁	Cereal
<i>Ochraceorosei</i>	<i>A. rambellii</i>	B ₁	Cereal
	<i>A. ochraceoroseus</i>	B ₁	Cereal

Fonte: Jallow *et al* (2021)

Do ponto de vista da saúde pública, os mais importantes produtores de aflatoxinas são o *A. flavus* e *A. parasiticus*, ambos pertencentes a sessão *Flavi*, que tem sido estudada

com profundidade na busca de novas espécies por meio de análises moleculares (Del palacio; Pan, 2020).

A tabela 1 ainda expos, que das espécies produtoras de aflatoxinas, apenas *A. pseudotamarii* e *A. togoensis* produzem aflatoxinas B₁ e B₂, e 16 espécies são capazes de produzir B₁, B₂, G₁ e G₂, são elas: *A. flavus*, *A. novoparasiticus*, *A. mottae*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. sergii*, *A. pseudocaelatus*, *A. transmontanensis*, *A. luteovirescens*, *A. parvisclerotigenus*, *A. minisclerotigenes*, *A. arachidicola*, *A. austwickii*, *A. aflatoxiformans*, *A. pipericola*, *A. cerealis* (Jallow *et al.*, 2021).

3.6.1- Produção de escleródios

Os micélios fúngicos estão divididos em vegetativos, que atuam no crescimento da espécie e reprodutivos, que atua na reprodução e disseminação da espécie através dos esporos. Os escleródios, fazem parte dos micélios vegetativos e são definidos como corpúsculos duros parenquimatoso de pigmentação escura, formada pelo entrelaçamento de hifas que compões diversas espécies fúngicas (Zaitz *et al.*, 2009, p. 116). Suas características podem ser diferenciadas e isso está relacionado a fase de desenvolvimento, como por exemplo:

O *A. flavus* é um fungo de solo amplamente distribuído globalmente, sendo mais prevalente em climas subtropicais e tropicais. Sobrevivem no solo por até três anos na forma de escleródios ou conídios e como micélio em tecidos vegetais infectados. Durante condições ambientais adversas no inverno, os escleródios permanecem no solo. Quando as condições ambientais são favoráveis, os escleródios germinam em micélios, que por sua vez produzem conidióforos. Estes conidióforos são dispersos pelo ar, infectando diversas culturas (Shabeer *et al.*, 2022)

3.6.2 Fungos toxigênicos e Atoxigênicos

O método mais potente utilizado para o controle da aflatoxina no campo é o uso de cepas atoxigênicas de ocorrência natural através da exclusão competitiva. O uso de cepas atoxigênicas de *Aspergillus* contra cepas toxigênicas tem controlado com sucesso a produção de aflatoxinas no campo, o que, em última análise, controla a contaminação por aflatoxinas em condições de armazenamento (Shabeer *et al.*, 2022).

Baseado na morfologia do *A. flavus*, elas estão classificadas como cepas S e L. As cepas S, são produtoras de escleródios pequenos, porém com níveis altos de

aflatoxinas produzidas, já a cepa tipo L, são produtoras de escleródios grandes mas com baixos níveis de aflatoxinas ou atoxigênicas (Shabeer *et al.*, 2022).

Estima-se que em regiões tropicais e subtropicais, estejam distribuídas as espécies de *Aspergillus* aflatoxigênicos, em virtude disso muitas estratégias têm sido empregadas para no combate e controle destes contaminantes no setor agrícola, e os métodos de controle biológico vem ganhando cada vez mais atenção, por isso, a identificação das espécies tem se tornado uma prática muito mais frequente (Kushiro *et al.*, 2018).

Na literatura, uma grande quantidade de meio de culturas e técnicas para diferenciação de cepas toxigênicas e atoxigênicas tem sido relatado. Trata-se de técnica relativamente mais simples e viável financeiramente, para a identificação destas cepas distintas em relação a produção de micotoxinas. Alguns meios comprovadamente viáveis incluem: ágar coco (CAM), ágar leite de coco (CMA), meia sacarose de extrato de levedura (YEAST) e meio de capacidade de produção de aflatoxina (APA). A cultura de *A. flavus* é cultivada em CAM, CMA, SIM ou YES acrescida de metil β -ciclodextrinas (M β Cyd) e APA (Shabeer *et al.*, 2022).

3.7- IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS

Os fungos são ecologicamente, fisiologicamente e morfologicamente diversos e representam um dos grupos de organismos mais evoluído e diversificado do planeta, contribuem valiosamente com o ecossistema por meio do trabalho de decomposição de matéria orgânica, com as inúmeras variações simbióticas com espécies animais e vegetais e também como fonte alimentícia (Blackwel, Meredith *et al.*, 2009).

São grandes os esforços empregados para que se cheguem a uma estimativa global da diversidade de espécies fúngicas no ecossistema, e essas buscas abordam diversos achados referentes a este reino tão particular. A estimativa é de que haja cerca de 2,2 a 3,8 milhões de espécies fúngicas no mundo (hawksworth; Lücking, 2017).

Uma grande variedade de fungos são usadas no processamento e aromatização de alimentos (leveduras de panificação e cervejaria, e na fabricação de queijos) bem como na produção de antibióticos e ácidos orgânicos (Blackwel, Meredith *et al.*, 2009; Zhou; May, 2023). Entretanto, outros grupos fúngicos produzem alguns tipos de metabólitos que estão relacionados em uma série de agravos a saúde, que vão desde respostas

alérgica, imunossupressão e até câncer no ser humanos e outros mamíferos (Blackwel, Meredith *et al.*, 2009; Pitt, 2000).

3.7.1- Microcultivo

A identificação de fungo no ambiente laboratorial sempre foi conduzida por seus achados morfológicos e propriedades fisiológicas e em relação as características macroscópica, são observadas a textura da colônia, coloração da superfície, produção de pigmentação observada no verso da placa, etc. (Midgley; Hay; Clayton, 1998). Entretanto, são consideradas técnicas demoradas, muitas vezes subjetivas, pois, requerem expertise dos profissionais analistas (Moreira *et al.*, 2021).

Os métodos aplicados dependem do tipo de fungo analisado, porém, para fungos filamentosos, a análise morfológica em microscopia é o padrão, onde são observadas as estruturas desenvolvidas à partir do seu crescimento micelial após a utilização da metodologia de microcultivo, um método simples de cultivo em lâmina, descrita por Ridell (Riddell, 1950).

3.7.2 Análise proteômica por Espectrometria de Massa MALDI-TOF

O sistema MALDI-TOF MS (Matriz-Assistida por Laser e Dessorção de Íons com Tempo de Voo em Espectrometria de Massa) é uma abordagem quimiotaxonômica utilizada para analisar proteínas ribossômicas específicas de microrganismos, como bactérias e fungos, a fim de identificar sua família, gênero e espécies de microrganismos. O processo envolve a extração de proteínas intracelulares através de uma matriz, seguida pela formação de cristais dessa matriz contendo moléculas de proteínas e outros compostos celulares (Akimowicz; Bucka-Kolendo, 2020).

A técnica de “dessorção/ionização a laser assistida por matriz” conhecida como MALDI, foi desenvolvida em 1985 por Franz Hillenkamp e Michael Karas, tornando-se uma das principais ferramentas para identificação de proteínas e portanto para as análises proteômica, sendo muito utilizadas até os dias de hoje para identificação de biomoléculas (Fuh; Heikaus; Schlüter, 2017).

A análise do proteoma microbiano tem sido frequentemente utilizada na micologia clínica para a identificação rápida de fungos, sendo um passo crucial para determinação da terapia antifúngica que será aplicada ao paciente (Delavy *et al.*, 2019), e a espectrometria de massa Sistema MALDI-TOF é reconhecida como um método analítico

de boa relação custo-benefício para a identificação fenotípica rápida e segura de espécies fúngicas (Gómez-Velásquez *et al.*, 2021).

3.8- ANÁLISE DE AFLATOXINAS POR LC-MS/MS

As principais técnicas empregadas para análises de micotoxinas são a Cromatografia de Camada Delgada (CCD), Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas (HPLC-MS), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, Cromatografia Gasosa (GC-MS) (Iamanaka; Oliveira; Taniwaki, 2010), e os mais utilizados, o HPLC associados a detecção por fluorescência (FLD) ou MS/MS (Pantano *et al.*, 2021).

A Cromatografia Líquida (LC), é uma técnica analítica consolidada que identifica e quantifica compostos em amostras. Sua ampla aplicabilidade se deve à sensibilidade, capacidade de quantificação e habilidade de separar moléculas não voláteis e termicamente frágeis, abrangendo 80% dos compostos sintéticos naturais. Com diversas aplicações em ciência e análise química, a técnica é utilizada para analisar uma vasta gama de compostos orgânicos, desde pequenas moléculas como metabólitos e peptídeos até moléculas grandes, como proteínas (Demoliner, 2008).

A cromatografia líquida tornou-se a técnica mais utilizada para a monitorização de micotoxinas, e a introdução de técnicas de ionização de pressão atmosférica (*Atmospheric Ionization Techniques* – API), em particular a ionização por eletrospray (*Electrospray Ionization* – ESI), foram determinantes para as análises destes compostos através de LC-MS (Sousa, 2018). Um grande avanço no acoplamento com cromatografia, foi o desenvolvimento e posterior aprimoramento das técnicas denominadas “tandem MS” (MS/MS) que originou o sistemas LC/MS/MS (Lanças, 2009).

A espectrometria de massas (MS) transforma moléculas em estado natural em íons no estado gasoso, e obtém a sua massa molecular (m) por meio da análise da razão massa-carga, indicada por m/z . Após a ionização, os íons gerados são separados de acordo com a sua razão massa-carga (m/z), e expostos a campos eletrostáticos (analisador de massa) e finalmente detectados. Uma etapa adicional de fragmentação de íons pode ser incluída antes da detecção para obter informação estrutural em uma técnica conhecida como espectrometria de massas tandem (MS/MS). O resultado da geração de íons, a separação, a fragmentação e a detecção são manifestadas como um espectro de massa que pode ser utilizado para interpretar o peso molecular ou a informação estrutural (Tonon, 2013).

4- METODOLOGIA

4.1- AMOSTRAS

Foram adquiridas para análise, 24 amostras de amendoins, sendo: 14 *in natura* e vendidos a granel; 05 Industrializadas e comercializadas em supermercados e 05 amostras torradas, distribuídas nos comércios informais e prontas para o consumo humano. Foram obtidos 1000g por unidade de amostra, sendo disponibilizados 500g para a análise de aflatoxinas e os outros 500g, foram utilizados para as análises de umidade e culturas para isolamento fúngico.

As amostras a granel encontravam-se expostas em embalagens plásticas e disponibilizadas em balcões em comércios sem controle de umidade e temperatura, como demonstrado na figura 1. Já as industrializadas, sempre estavam dispostas em ambiente climatizados.

Figura1: Amendoim expostos no comércio informal



Fonte: Autora, 2023.

4.2- TEOR DE UMIDADE

Para a determinação do teor de umidade, seguiu-se as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008, p. 98). Foi realizado em balança determinadora de umidade. Primeiramente selecionou-se a programação para o teste de determinação de umidade, programou-se a temperatura, que foi de 105°C e o tempo de 30 minutos de forma digital. O amendoim foi triturado e utilizado 2g por amostra, onde foi disponibilizada na balança e iniciado o processo de dessecação. Cada amostragem foi testada em triplicada e os resultados são disponibilizados em percentual de umidade final, além da umidade retida.

4.3 - CONTAGEM DE BOLORES E LEVEDURAS - MÉTODO HORIZONTAL

4.3.1- Preparo das diluições

Foram pesadas 25g de cada amostra de amendoim e colocado em recipientes contendo 225 mL de água peptonada a 0,1% e agitado por 3 minutos em vórtex, com isso obtivemos a amostra 10^{-1} . Em seguida, outros 2 tubos contendo 9 mL de água peptonada a 0,1% foram identificados como 10^{-2} e 10^{-3} . Na etapa seguinte, 1 mL da solução inicial (10^{-1}) foi adicionado ao tubo 10^{-2} , e 1 mL da solução 10^{-2} , adicionada no tubo 10^{-3} .

4.3.2- Plaqueamento

O meio de cultura utilizado para esta análise foi o Dicloran Glicerol Agar (DG18), pois é um dos meios utilizado para o método de enumeração de bolores e leveduras presentes nos produtos alimentares com baixa atividade da água ($a_w < 0,95$). Além disso, atua como um meio de isolamento seletivo destes microrganismos e que está de acordo com as especificações da norma ISO 21527-2: 2021.

Três placas contendo o Ágar Dicloran Glicerol (DG18), foram previamente identificadas com as respectivas diluições, e com o auxílio de uma pipeta estéril, foram transferidas alíquotas de 0,1 ml das soluções e distribuídas em superfície com o auxílio de uma alça de drigalsk e incubadas em estufa bacteriológica a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$, por período de 5 dias.

4.3.3- Contagem de Bolores e Leveduras

Para a contagem de bolores e leveduras, foram selecionadas as placas de petri com um número inferior a 150 colônias, cada um dos bolores desenvolvidos foi marcado com uma caneta e feita a contagem total de colônias desenvolvidas. Em casos em que a contagem de colônias seja menor que 20, o resultado numérico foi expresso como UFC/g, e na ausência de colônias, o registro foi de contagem menor que uma vez a menor diluição.

4.3.4- Cálculos para contagem de Bolores e leveduras

Os cálculos foram realizados pela conversão do número de colônias para Unidades formadoras de colônias (UFC), onde a divisão entre o somatório das colônias contadas nas placas consideradas ($\sum$ °placas) e a multiplicação do volume de inóculo pipetado para cada placa de DG18 (V), diluição correspondente à contagem de colônias (d) e a constante 1,1 (Maia, 2022).

$$\text{Equação: UFC/g} = \frac{\sum \text{°placas}}{1,1 \times V \times d}$$

A Instrução Normativa Nº 161, de 1º de julho de 2022, estabelece que a contagem de bolores e leveduras em amendoim deva ser ausente ou menor igual a 5×10^2 UFC/g. Os resultados foram expressos em um plano de duas classes, onde separa unidades amostrais entre "Satisfatório com Qualidade Aceitável" e "Insatisfatório com Qualidade Inaceitável".

4.4- IDENTIFICAÇÃO FÚNGICA

4.4.1 Espectrometria de massa MALDI-TOF

4.4.1.1-Extração do fungo filamentos

Em um tubo contendo Caldo Batata Dextrose líquido, foi inoculado um pouco dos micélios fúngicos. Com os tubos bem fechados, foram colocados em um processo de rotação intensa por um longo período até que o material biológico fosse observado a olho nu. Após esta etapa, os tubos foram colocados em repouso para que os filamentos fossem

sedimentados no fundo dos tubos. 1,5 ml do sedimento foi transferido para um tubo eppendorf, centrifugado por 2 minutos a 14.000 RPM em micro centrífuga.

Cuidadosamente foi removido o máximo de sobrenadante e adicionado 1 mL de água ao pellet e agitado em vórtex por 2 minutos. A próxima etapa foi suspender o pellet em 300ul de água, adicionar 900 µL de etanol e levar ao vórtex. Mais uma etapa de centrifugação a 14.000 RPM por 2 minutos, após isso, o sobrenadante foi cuidadosamente removido. O pellet foi levado a estufa a 37 graus para que secasse o máximo possível. Foi adicionado ao pellet já seco, 20µl de ácido fórmico (70%), e o mesmo volume de acetonitrila ao tubo e agitado cuidadosamente. Mais uma vez centrifugado a 14000 RPM por 2 minutos, adicionado 1,5 µL do sobrenadante na placa, deixamos secar e cobriu-se com 1 µL de HCCA matriz e esperamos secar.

4.4.1.2 Ionização por dessorção a Laser

As amostras secas foram submetidas a um analisador, onde ocorreram a liberação e ionização das moléculas da matriz e das proteínas do microrganismo sob a influência de um laser. Os íons de massa e carga diferentes foram submetidos a um campo elétrico que os deslocarão, e a distância percorrida em determinado tempo (relação carga/massa) ou seja, o tempo de voo de cada partícula até o detector foi utilizado para calcular sua massa. A soma de íons analisados formaram o espectro de massa da amostra analisada (Da Silva *et al.*, 2015) .

4.4.1.3- Análise Microscópica

Para a identificação das espécies fúngicas, foi realizada a técnica de microcultivo, descrita por Ridell (1950). Após o isolamento das colônias fúngicas, um pequeno quadrado de aproximadamente 2 cm² de meio de cultura Ágar Batata Dextrose foi recortado e colocado sobre uma lâmina histológica previamente esterilizada em autoclave (121°C -15 minutos). As colônias de fungos foram então semeadas nas quatro pontas do quadrado de meio e posteriormente cobertas com uma lamínula também previamente esterilizada. Todo o conjunto foi colocado no interior de uma placa de petri sobre um suporte de vidro e gaze embebido em água estéril e então incubados em estufa micológica, com temperatura de 28°C + 2°C.

4.5- ANÁLISES DE AFLATOXINAS POR LC-MS/MS

A identificação e quantificação das aflatoxinas foram conduzidas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS), no Laboratório de Análises Micotoxicológicas (LAMIC), com técnica validada atendendo todos os requisitos estabelecidos na ABNT, NBR, ISI/IEC, 17025: 2005. Alguns trabalhos descrevem e validam a técnica como segura e eficiente para análises toxicológicas em alimentos (Alsharif; Choo; Tan, 2019; Araújo, 2017; Araujo *et al.*, 2007; Spanjer; Rensen; Scholten, 2008; Tolentino Júnior *et al.*, 2021).

No sistema LC-MS/MS, a amostra é injetada na fase móvel e passa por uma coluna com fase estacionária, onde ocorre a separação dos compostos com diferentes tempos de retenção, baseados na interação entre a coluna e a fase móvel. Após a eluição, os compostos entram na fonte de ionização do espectrômetro de massas, onde sofrem ionização e perda de solvente. Os íons formados são direcionados para o primeiro analisador quadrupolo, que determina os íons precursores ($[M+H]^+$ ou $[M-H]^-$) com base na razão massa/carga (m/z). Em seguida, esses íons precursores são encaminhados para uma célula de colisão, um segundo quadrupolo, onde colidem com gás nitrogênio, gerando fragmentos que são analisados no terceiro quadrupolo, o segundo analisador. Esse processo é conhecido como "*Multiple Reaction Monitoring* MRM", permitindo o monitoramento de íons precursores e produtos selecionados, aumentando a sensibilidade na análise (Jornalismo-Analytica, 2020).

4.6. ANÁLISE DE CEPAS AFLATOXIGÊNICAS E ATOXIGÊNICAS

Após isolamento das espécies fúngicas, inoculou-se cada uma, em meio YEAST suplementados com 0,3% de MB-Cyd, e posteriormente foi incubado em estufa em temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por período de 3 dias. Após o período de incubação, as placas foram levadas a uma câmara com iluminação específica por radiação UV (365nm), para observação da presença ou ausência de hemólise em volta das cepas que sinalizam a fluorescência das aflatoxinas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. TEOR DE UMIDADE

Neste estudo, os teores de umidade encontrados variaram de 3,1% a 8,1%, e a média geral foi de 5,57 % como apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Teor de umidade do amendoim

Categoria	Amostra	Média + Desvio padrão
<i>In natura</i>	1	$5,33 \pm 0,47$
	2	$6,16 \pm 0,11$
	3	$5,97 \pm 0,01$
	4	$8,1 \pm 0,02$
	5	$6,39 \pm 0,26$
	6	$6,82 \pm 0,14$
	7	$6,07 \pm 0,08$
	8	$5,33 \pm 0,05$
	9	$5,63 \pm 0,03$
	10	$5,31 \pm 0,02$
	11	$5,41 \pm 0,00$
	12	$5,38 \pm 0,14$
	13	$5,34 \pm 0,57$
	14	$5,9 \pm 0,23$
Industrial	15	$5,44 \pm 0,01$
	16	$5,38 \pm 0,01$
	17	$6,69 \pm 0,01$
	18	$6,75 \pm 0,21$
	19	$6,22 \pm 0,11$
Torrado	20	$4,24 \pm 0,06$
	21	$3,62 \pm 0,03$
	22	$3,1 \pm 0,02$
	23	$5,14 \pm 0,01$
	24	$4,19 \pm 0,11$

Fonte: Autora, 2023.

Nas análises por categorias, as amostras *in natura* a granel, apresentaram umidade de 5,31% a 8,1%, com média geral de 5,93%. Já as industrializadas, ficaram entre 5,44% e 6,75% e média geral de 6,09%, enquanto as amostras torradas variaram de 3,1% a 5,14 %, e média de 4,05%.

De acordo com os dados obtidos, das 24 amostras analisadas, 19 (79.1%) delas, apresentaram teores de umidade entre de 5-7 %, ou seja, dentro dos padrões recomendados de conformidade quando se refere ao controle do crescimento de *Aspergillus* no alimento e somente, enquanto, apenas 1 amostra (4,1 %), estava com a umidade ideal de 8%, considerado ideal para o controle de umidade no amendoim e pode contribuir para a prevenção eficaz do crescimento de fungos.

Em um estudo que avaliou o impacto na umidade dos amendoins que tinham umidade de 8% e os impactos em relação a temperatura e tempo de armazenamento. Os resultados mostraram que a o teor de umidade apresentou efeito significativo para a temperatura de armazenamento versus tempo de armazenamento, ou seja, independente do tempo de armazenamento, a perda de água dos grãos foi mais intensa em temperatura elevada (25°C) do que as mantidas a temperatura baixa (18°C), quando ocorreu o balanço higroscópico e com maior teor de umidade presente, mantendo-se próximo a 7,5 % (Floriano *et al.*, 2023).

As amostras torradas foram as que apresentaram os menores teores de umidade, mas isso se justifica pelo fato de terem passado por esse processo de torra. Outra prática muito utilizada, é a temperarem do amendoim, com sal, azeite e até especiarias, que afetam o processo osmótico, gerando a perda de água do alimento. Entretanto, apesar de algumas perdas nutricionais, a torra e temperagem conferem um sabor diferenciado ao alimento e faz com que haja um prolongamento da vida útil do grão em prateleira.

Paula *et al* (2022), analisou teor de umidade em amendoins em diferentes categorias, e nas amostras *in natura*, com e sem casca e sal, e encontrou dois extremos de resultados. Verificou-se que os amendoins *in natura*, apresentavam a os maiores níveis de umidade, enquanto o amendoim sem casca e com sal, tiveram a maior perda por osmose, apontando que, além do efeito de perda hídrica com o sal, a ausência da casca do amendoim potencializou as perdas de água do alimento.

Portanto, conclui-se que para manter o equilíbrio higroscópico dos grãos de amendoim, é vantajoso adotar temperaturas controladas durante o processo de secagem e armazenamento. A presença de casca também pode ser benéfica nesse contexto, agindo como uma camada protetora. Em relação a adição de sal, parece ser uma estratégia útil

para diminuir o teor de umidade quando necessário, além de ressaltar o sabor e aumentar tempo de prateleira.

5.2. CONTAGEM DE BOLORES E LEVEDURAS

Após o período de 5 dias de incubação, verificou-se que dentre as 24 amostras analisadas, 15 (62,5%) apresentaram resultados satisfatórios com qualidade aceitável, enquanto 09 (37,5%), foram insatisfatórios com qualidade inaceitável. Os resultados foram descritos em UFC/g e como descritos na tabela 3.

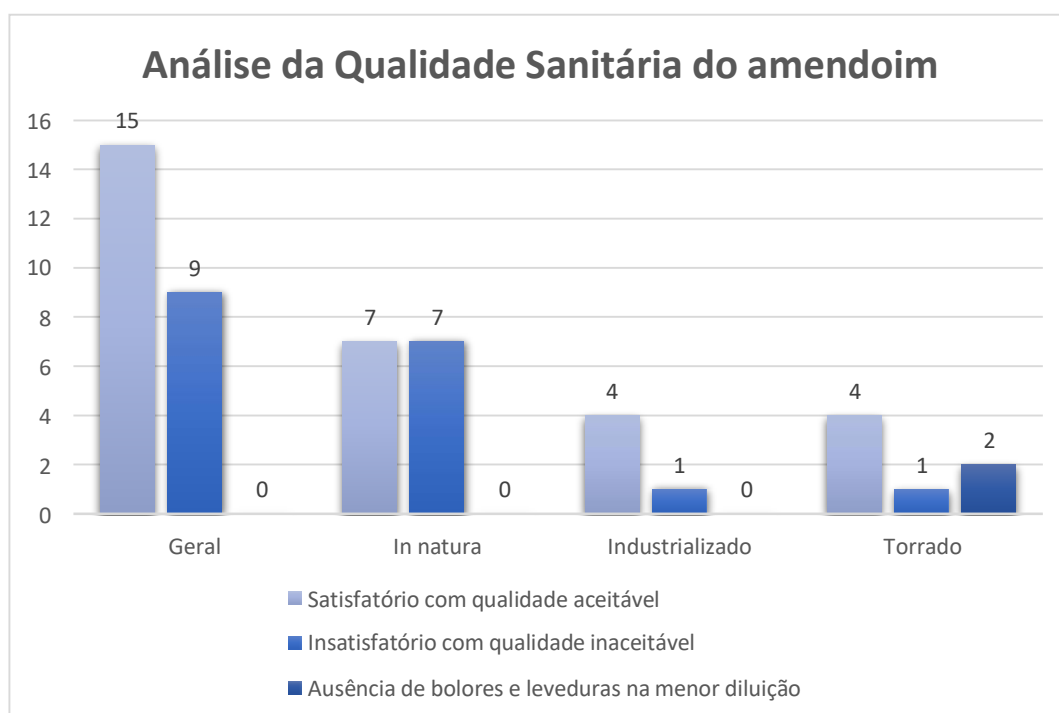
Tabela 3: Contagem de bolores e leveduras

Categoria	Amostra	Bolor UFC/g	Leved UFC/g	Resultado
<i>In natura</i>	1	$4,7 \times 10^5$	x	Insatisfatório com qualidade inaceitável
	2	6	x	Satisfatório com qualidade aceitável
	3	10	x	Satisfatório com qualidade aceitável
	4	$3,6 \times 10^4$	x	Insatisfatório com qualidade inaceitável
	5	10	x	Satisfatório com qualidade aceitável
	6	3	x	Satisfatório com qualidade aceitável
	7	6	x	Satisfatório com qualidade aceitável
	8	6	x	Satisfatório com qualidade aceitável
	9	$8,6 \times 10^5$	x	Insatisfatório com qualidade inaceitável
	10	15	x	Satisfatório com qualidade aceitável
	11	$2,3 \times 10^5$	x	Insatisfatório com qualidade inaceitável
	12	$3,2 \times 10^4$	x	Insatisfatório com qualidade inaceitável
	13	$2,7 \times 10^3$	x	Insatisfatório com qualidade inaceitável
	14	$2,6 \times 10^4$	x	Insatisfatório com qualidade inaceitável
Industrializado	15	13	x	Satisfatório com qualidade aceitável
	16	3	x	Satisfatório com qualidade aceitável
	17	$3,7 \times 10^3$	x	Insatisfatório com qualidade inaceitável
	18	15	x	Satisfatório com qualidade aceitável
	19	10	x	Satisfatório com qualidade aceitável
Torrado	20	$< 1 \times 10^{-1}$	x	Satisfatório com qualidade aceitável
	21	$12,9 \times 10^4$	x	Insatisfatório com qualidade inaceitável
	22	$< 1 \times 10^{-1}$	x	Satisfatório com qualidade aceitável
	23	9	x	Satisfatório com qualidade aceitável
	24	15	x	Satisfatório com qualidade aceitável

UFC: Unidade Formadora de Colônias. Fonte: Autora, 2023

Em relação a análise por categorias, nas amostras *in natura* e vendidas à granel, das 14 analisadas, 7 (50%) apresentaram resultados satisfatórios e aceitáveis e os outros 7 (50%), insatisfatórios e inaceitáveis. Já nas 5 amostras industrializadas, 4 (80%) foram satisfatórias e aceitáveis, enquanto 1 (20%) insatisfatória e inaceitável. E com relação as amostras torradas, 4 (80%) foram satisfatórias e aceitáveis, enquanto 1 (20%) insatisfatória e inaceitável e em 2 amostras não houve crescimento de bolores e leveduras na menor diluição realizada. Com relação as leveduras, o estudo não detectou nenhuma forma leveduriforme. Os dados estão ilustrados no gráfico 1.

Gráfico 1: Resultados da qualidade do amendoim em relação a bolores e leveduras



Satisfatório com qualidade aceitável: Ausente ou $\leq 5 \times 10^2$ UFC/g; insatisfatório com qualidade inaceitável: $> 5 \times 10^2$ UFC/g; Ausência de bolores e leveduras na menor diluição: $< 1 \times 10^{-1}$. Fonte: Autora, 2023.

Os resultados mostram as amostras *in natura*, foram as que tiveram maiores percentuais de contaminação em relação as outras categorias e isso se deve pela constante manipulação do produto e consequentemente maior probabilidade de contaminações cruzadas.

No momento das aquisições das amostras, observou-se um padrão de estocagem do amendoim disponibilizado no mercado à granel. Todas dispostas em sacos plásticos, em balcões de madeira ou concreto, algumas ficavam dispostas em cima de outro saco de

amendoim, com ausência de controle de temperatura e por vezes, expostas ao sol, ou seja, em condições que podem modificar as propriedades físico-química do produto.

Referente ao tipo de embalagens, uma análise sobre os impactos gerados pelo armazenamento do amendoim em embalagens do tipo: bolsas de poliamida/polietileno (PA/PE) e saco de filme de poliéster, de alumínio, de poliamida e de polietileno (PET/AL/PA/PE), por período de 24 meses encontraram os seguintes resultados. Sobre fungos e aflatoxinas, enquanto expostas em baixas temperaturas, em nenhuma das embalagens apresentou contaminação por bolor ou aflatoxinas após 6 meses de incubação, entretanto, com aumento na temperatura devido ao verão, foram detectadas aflatoxina B₁ nos sacos de tecidos e nos sacos de filme de PE (após 12 meses), e após 24 meses, os níveis de B₁ encontrados estavam muito acima dos recomendados pela legislação na China ($\leq 20\mu\text{g/kg}$) nos sacos de tecido e filme de PE, porém, nos sacos PET/AL/PA/PE não foram detectados fungo aflatoxigênicos ou níveis de aflatoxinas durante o período de armazenamento (Fu *et al.*, 2018).

O estudo citado demonstrou que todos os tipos de embalagens se mostraram seguras em relação ao tempo de armazenamento dos amendoins, no entanto, a temperatura em que estes produtos serão expostos podem fazer com que fungos toxigênicos e níveis de aflatoxinas se desenvolva, especialmente nos sacos de tecido e filme de polietileno (PE).

Para as amostras torradas, apenas 1 (20%) das 5, apresentou um resultado insatisfatório e de qualidade inaceitável. O processo de torra, normalmente eliminam as espécies fúngicas presentes, entretanto, 3 (60%) amostras apresentaram resultados positivos para fungos enquanto as outras 2 (40%), não apresentaram crescimento.

Spinelli e colaboradores (2018), em um estudo com 06 amostras de amendoim torrados, realizou uma análise de bolores e leveduras pelo método horizontal e os resultados não apresentaram crescimento para nenhum dos microrganismos pesquisados, e a autora relata que as possíveis contaminações oriundas dos processos de colheita e armazenamento, possam ter sido eliminados no torra.

Segundo Cho *et al.*, (2022), a maioria das espécies do gênero *Aspergillus* se propaga através da liberação de esporos no ambiente, e que embora algumas espécies possam produzir esporos sexuais, a reprodução predominante ocorre por meio de esporos assexuais denominados conídios, que são transportados por estruturas especializadas chamadas conidióforos, que ao contrário das hifas, os conídios possuem

uma parede celular espessa que proporciona resistência às condições ambientais e proteção contra o sistema imunológico do hospedeiro.

Portanto, os dados apontam que as amostras industrializadas e torradas se mostraram mais seguras, no quesito de qualidade sanitária e isso se deve aos processos ao qual são submetidos, bem como o ambiente ao qual são disponíveis para o comércio.

Vale ressaltar que, com exceção das amostras torradas, todos os níveis de umidades dos grãos, apresentaram-se dentro dos valores recomendados para controle de contaminação fúngica, com isso, pode-se reiterar que a qualidade sanitária do amendoim em relação aos contaminantes fúngicos, pode sofrer impactos na sua qualidade, em função da forma como são manipulados e a temperatura as quais são expostas em seu armazenamento.

5.4- IDENTIFICAÇÃO FÚNGICA

5.4.1- Espectrometria de massa Sistema MALDI-TOF

Foram identificadas 43 cepas fúngicas e os resultados encontrados revelaram uma predominância do gênero *Aspergillus* 41 (95,3 %) presentes no amendoim. Quando analisamos à nível de espécie, o *A. flavus* foi o mais prevalente com 17 (39,5%) cepas identificadas, seguido por *A. montevicensis* 10 (23,2%), *A. niger* 10 (23,2%), *A. minisclerotigenes* 3 (6,9%), *A. parasiticus* 1 (2,3%), *Purpureocillium lilacinum* 1 (2,3%) e *Rhizopus sexualis* 1 (2,3%). Todos os isolados estão descritos na tabela 4.

As espécies que obtiveram maiores escores para a identificação, ou seja, uma identificação segura, foram os *A. flavus*, *Niger* e *Rhizopus sexualis*, que apresentaram escore > que 2. Já as amostras com escores < de 2, foram confirmadas por análise morfológica em microscopia realizando-se a técnica de microcultivo.

Levando-se em consideração que as características morfológicas dos grupos de fungos identificados são muito parecidas, o que dificultam a identificação das espécies a partir de técnica de microscopia para diferenciação morfológica, a análise proteômica se mostrou muito eficiente para o rastreo de espécies fúngicas isoladas de grãos armazenados.

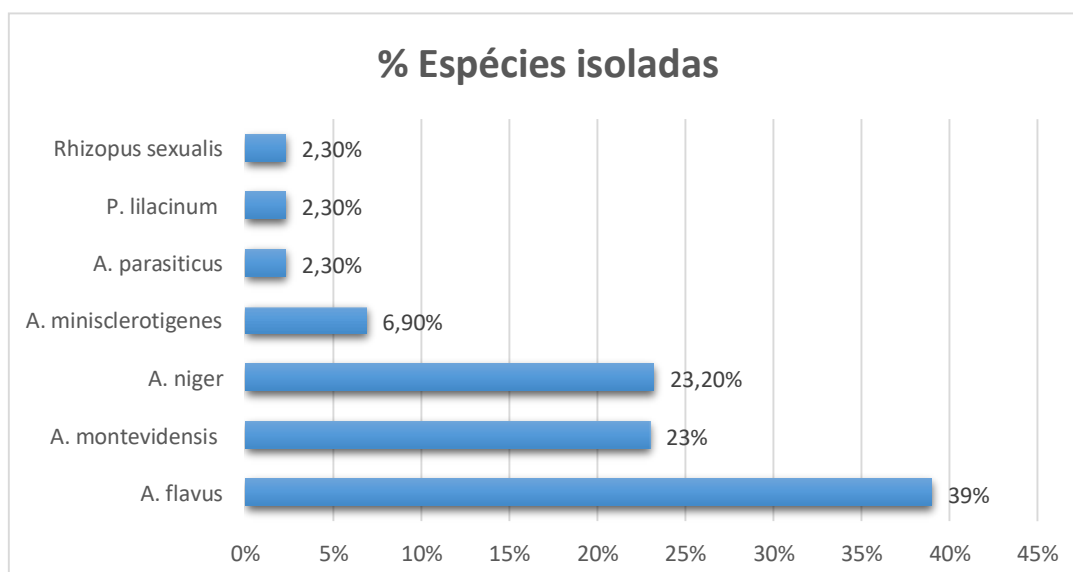
Tabela 4: Fungos isolados nesta pesquisa

Categoria	Isolado	<i>A. flavus</i>	<i>A. parasiticus</i>	<i>A. montevideensis</i>	<i>A. minisclerotigenes</i>	<i>A. niger</i>	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	<i>Rhizopus sexualis</i>
In natura	1	x	-	x	-	-	-	-
	2	x	-	x	-	-	-	x
	3	x	-		-	x	-	-
	4	x	-	x	-	-	-	-
	5	x	-	-	-	x	-	-
	6	x	-	-	x	x	-	-
	7	x	-	-	-	x	-	-
	8	x	-	-	-	x	-	-
	9	-	-	-	-	x	-	-
	10	x	-	-	-	x	-	-
	11	x	-	x	-	-	-	-
	12	x	-	-	-	x	-	-
	13	x	-	x	-	-	-	-
	14	x	-	-	x	-	-	-
Industrial	15	x	-	-	x	x	x	-
	16	-	-	x	-	-	-	-
	17	x	-	-	-	-	-	-
	18	x	-	-	-	-	-	-
	19	-	-	x	-	x	-	-
Torrado	20	-	-	-	-	-	-	-
	21	-	-	x	-	-	-	-
	22	-	-	-	-	-	-	-
	23	-	-	x	-	-	-	-
	24	x	x	x	-	-	-	-

Fonte: Autora, 2023.

O amendoim é uma cultura naturalmente suscetível a contaminações por fungos, e a sua composição nutricional oferece um ambiente propício para o desenvolvimento destes agentes, e este estudo não só evidenciou uma grande incidência, como também, uma grande variedade de espécies fúngicas, destacando o gênero *Aspergillus*, destacando 5 espécies distintas entre os isolados. Os percentuais por espécie estão descritos no gráfico 2.

Gráfico 2: Percentuais de crescimento por espécie



Fonte: Autora, 2023.

Um estudo comparando técnicas de identificação fúngica, analisou 193 isolados de fungos filamentosos, sendo a primeira por análise morfológica, a segunda pelo sistema Maldi-Tof, aplicada de forma direta e a terceira, também por Maldi-Tof, porém, realizando o processo prévio de extração dos fungos. Nos resultados por critérios morfológicos, 17 fungos foram identificados a nível de gênero. Com a espectrometria de massa Maldi-Tof e com a técnica direta, 9 isolados foram identificados a nível de gênero e 184 a nível de espécie, com um total de 75 espécies sendo observadas. Já com o método de extração prévio, foram identificados 190 isolados em nível de espécie, sendo observadas 43 espécies. Utilizando-se o sequenciamento genético como parâmetro, encontrou-se 87,5% de concordância para identificação com o método de extração Maldi-Tof MS, contra apenas 43,75% para o método direto (Hamal *et al.*, 2022)

O *Aspergillus* foi o gênero mais encontrado, fato muito evidenciado neste tipo de produto, e entre as causas de incidência estão a ampla distribuição na desses microrganismos na natureza, favorecendo sua colonização durante o cultivo, colheita e armazenamento dos grãos, além de serem espécies xerofílicas, ou seja, desenvolvem-se muito bem em ambientes com baixa atividade de água, como nozes e grãos.

Adetunj *et al.*, (2021), analisaram a diversidade de microbiota cultivável em amendoim de supermercado e a beira de estrada, e os resultados revelaram a predominância das espécies de *Aspergillus*, especialmente *Aspergillus fumigatus*, tanto em supermercados quanto no amendoim vendido na estrada. Além disso, outras espécies

com alta incidência, registrando mais de 40% em pelo menos um dos ambientes comerciais, foram *A. flavus* e *A. niger*. Esses estudos destacam a presença significativa dessas espécies de *Aspergillus* nos amendoins comercializados em diferentes locais de venda.

O *Aspergillus flavus* foi o mais isolado na categoria granel e industrializado, trata-se de uma espécie com capacidade adaptativa muito grande, ou seja, consegue se desenvolver em ambientes que podem ser favoráveis ou hostis a determinados fungos, portanto, é considerado o fungo mais comumente isolado nesse contexto, o principal fator de preocupação é a sua capacidade de produzir micotoxinas.

A espécie *niger*, foi a segunda espécie mais isolada, presente nas amostras a granel e industrializadas. Apesar de ser reconhecidamente como valiosa para a indústria na produção de ácidos orgânicos, também pode ser responsável por infecções invasivas em seres humanos.

Em um caso de um paciente que desenvolveu síndrome respiratória aguda grave em consequência da (SARS-COV-2), onde havia a suspeita de aspergilose. Após isolamento do fungo no lavado brônquico, foram realizadas as identificações morfológica macro e microscópica padrão da cepa de fungo encontrada, somente a análise proteômica em MALDI-TOF definiu a espécie *niger* como agente causador (Katsiari *et al.*, 2022).

O *A. parasiticus* teve um percentual de detecção relativamente baixo, apenas 1 cepa (2,30%) foi isolada na amostra da categoria torrada. Trata-se de um fungo de solo, cuja população é encontrada principalmente em campos de amendoim nos EUA, Uganda, Argentina e Botsuana. Também possui a capacidade de sintetizar micotoxinas que afetam a saúde humana e animal (NIKOLIĆ *et al.*, 2021). A produção de aflatoxinas por esta espécie é influenciada pela temperatura, dias de incubação/armazenamento e teor de umidade (Akinola; Ateba; Mwanza, 2021).

Três amostras apresentaram o fungo *A. minisclerotigenes*, também dentro da categoria a granel, e industrializada.

Trata-se de uma nova espécie produtora de aflatoxina, pertencente a seção *Flavi*, que foram isoladas de diferentes espécies de amendoim (NORLIA *et al.*, 2019). Esta espécie é muito isolada de amostras de regiões quenianas, sendo considerado um risco para a segurança alimentar. Vários registros de casos de aflatoxicoses por este fungo já foram relatados (Schamann; Geisen; Schmidt-Heydt, 2023).

Purpureocillium lilacinum tem sido muito estudado como um potencial agente de biocontrole de alguns fitopatógenos fúngicos, estando entre os mais promissores agentes contra fitopatógenos e pragas (Khan; Tanaka, 2023).

O *Purpureocillium lilacinum* AUMC 10149, foi analisado por Isaac et al (2021), avaliando seus efeitos promissores no controle do nematóide das galhas *Meloidogyne*, conhecido como nematóide-das-galhas, considerado um dos fatores bióticos que mais afetam a produção e a qualidade dos tomates. Os testes que avaliaram os efeitos nematocida do *purpureocillium lilacinum* AUMC 10149 sobre a sobrevivência de juvenis de segundo estágio e eclosão de ovos de *M. incognita* em diferentes tempos de exposição foi testado in vitro e os resultados mostraram que o *P. lilacinum* AUMC 10149, proporcionou uma porcentagem máxima de mortalidade de *M. incognita juveniles* (97,6%) e inibição da eclosão dos ovos (79,8%) após 72 horas de exposição (Isaac; El-Deriny; Taha, 2021).

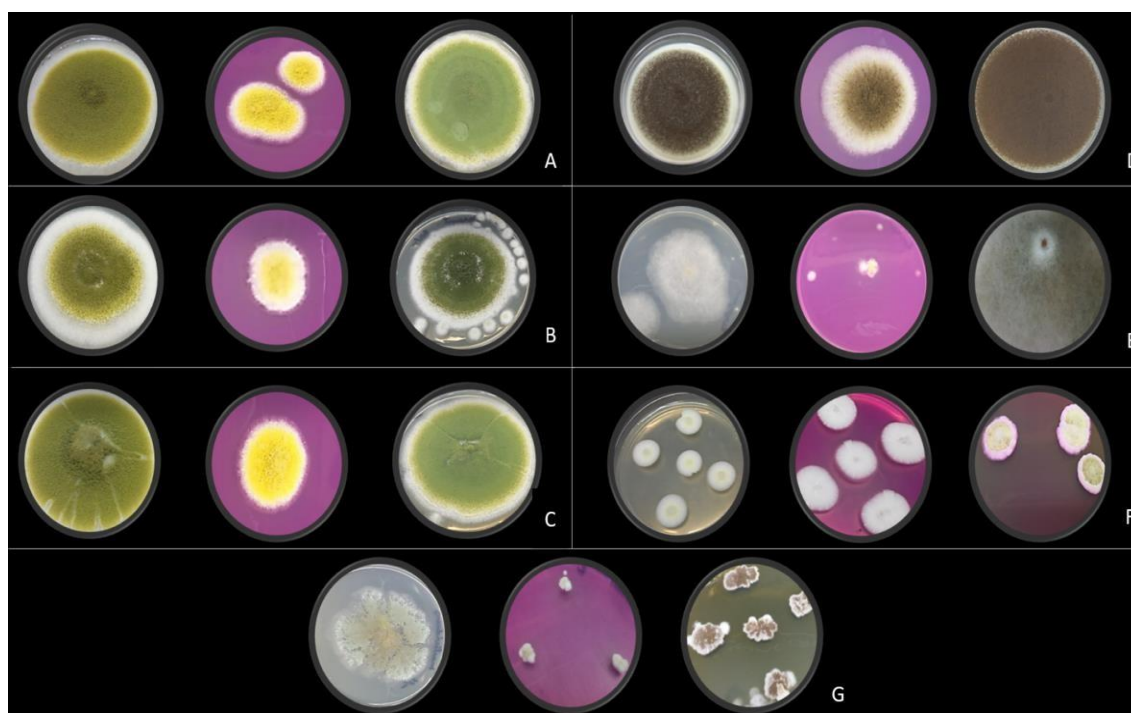
Com isso, conclui-se que a metodologia de análise proteômica Maldi-tof, é muito promissora no campo de pesquisa para a agricultura e hospitalar, pois fornece resultados mais assertivos e com a rapidez e a segurança necessárias para um bom desfecho na identificação dos fungos e outros microrganismos.

5.4.2- Identificação macroscópica e microscópica dos isolados

A identificação macroscópica foi realizada por observação de forma que os fungos pudessem ser diferenciados entre espécies, portanto, as principais características observadas foram: o aspecto das colônias, a coloração no meio de cultura, as bordas das cepas, o reverso da colônia.

Após 5 dias de inoculação, observou-se o crescimento de colônias felpuda de estruturas planas e rugosas, com colorações verdes–amarelado, verde escura, preta com bordas amareladas, cinza, brancas, felpudas etc. Todas estão ilustradas na figura 2

Figura 2: Cepas de fungos filamentosos isoladas do amendoim



Meios de cultura: Dicloran Glicerol Ágar (DG18), Dicloran Rosa de Bengala com Cloranfenicol (DRBC), Ágar Sabouraud Dextrose (BDA) respectivamente. **A:** *Aspergillus. flavus*; **B:** *Aspergillus parasiticus*; **C:** *Aspergillus minisclerotigenes*; **D:** *Aspergillus niger*, **E:** *Rhizopus sexualis*, **F:** *Purpureocillium lilacinum*; **G:** *Aspergillus montevidensis*. Fonte: Autora, 2023.

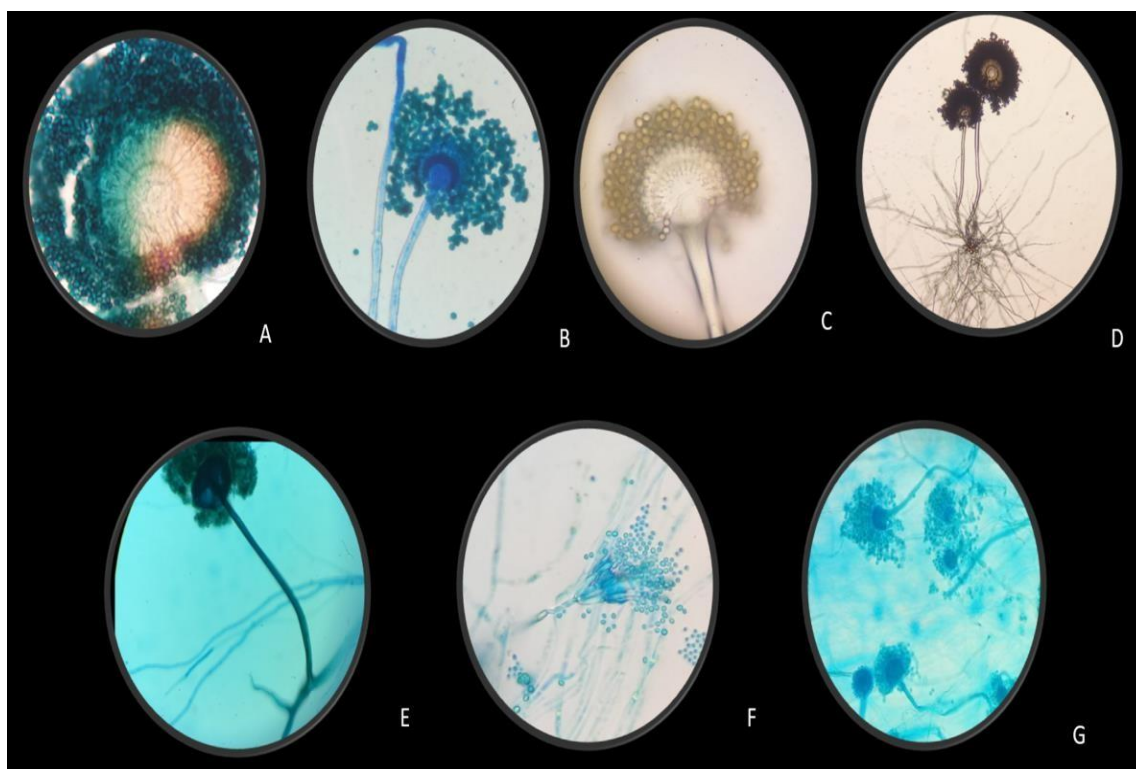
Como demonstrado na figura 2, os micélios fúngicos foram inoculados em 3 meios de cultura distintos, DG18, DRBC e BDA, para que fossem observadas o desenvolvimento em cada um deles. Observou-se que a maioria teve um bom desenvolvimento nos três tipos de meios e as diferenças observadas foram em relação a coloração e bordas das cepas. Em alguns casos uma lentidão no crescimento foi observada, comparando os tipos de meios. O gênero *Aspergillus* são fungos xerofílicos com um bom desenvolvimento em ambientes com baixa atividade de água (Siqueira *et al.*, 2018), como no caso do meio DG18, específicos para este grupo de microrganismo (ISO, 2021).

O *A. montevidensis*, por exemplo, no DG18, desenvolveu-se de forma mais abundante, com os micélios bem evidentes, enquanto no DRBC e BDA, as colônias eram compactas e secas, justamente por terem a característica de inibirem bioquimicamente o crescimento exacerbado destes fungos.

Na identificação microscópica, as análises morfológicas foram baseadas em compêndios e artigos científicos que descrevem as características destas espécies, são eles: (Adelaide university, 2023; Karimizadeh Esfahani *et al.*, 2019; Midgley; Hay; Clayton, 1998; Moreira *et al.*, 2021; Murray, 2012; Zaitz *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2007).

Após realização de microcultivo, verificou-se a morfologia das espécies por microscopia, para que fossem comparadas aos resultados das análises proteômicas, e os achados estão ilustrados na figura 3:

Figura3: Cepas de fungos filamentosos visualizados microscopicamente



A: *Aspergillus flavus*; B: *Aspergillus parasiticus*; C: *Aspergillus minisclerotigenes*; D: *Aspergillus niger*; E: *Rhizopus sexualis*; F: *Purpureocillium lilacinum*; G: *Aspergillus montevidensis*. Fonte: Autora, 2023.

Para o *A. flavus*, observou-se a estrutura ainda em desenvolvimento, apresentando vesícula achatadas, uni seriadas e com conídio colunar, fiálides primárias produzidas diretamente na vesícula. Já em uma estrutura mais desenvolvida, a vesícula é maior e mais arredondada, bisseriadas, com conidiação radial, fiálides secundárias que se produzem desde as métulas.

No *A. parasiticus*, verificou-se a presença de conidióforos, apresentavam hifas subsuperficiais e com paredes incolores e lisas. Alguns apresentavam apenas fiálides, e

em outros as cabeças também apresentavam métulas. Observou-se a presença ou ausência de métulas, muitos conídios esféricos e com paredes espinhosas.

O *A. minisclerotigenes*, é uma espécie ainda pouco relatada na literatura, seguindo as descrições de alguns artigos relacionados, observou-se a presença de conidióforo bisseriado, com vesículas globosas ou subglobosas, com a presença de fiálides, conídios subglobosos ou em forma de elipse, finos e claros.

O *A. niger*, observou-se conidióforo hialino em sua metade superior, as vesículas esféricas, as cabeças conidiais. As cabeças conidiais bisseriadas apresentando várias métulas e fiálides secundárias ao redor da vesícula.

No *Rhizopus sexualis*, observou-se esporangióforos distais, apresentando alargamento ou columela hemisférica, os esporângios redondos e hialinos e com base plana. Apresentavam esporangiospora unicelulares e ovoides/elíptica.

O *Purpureocillium lilacinun* apresentou conidióforos eretos, ramos com conidióforos, as fiálides grossas em suas bases, e mais finas em um pescoço esguio. Os conídios elipsoidais, fusiformes, de paredes lisas a levemente rugosos, hialinos a roxos, produzidos em cadeias.

Aspergillus montevidensis exhibe ascósporos rugosos, com cristas irregulares. É uma espécie também muito pouco relatada na literatura, os achados normalmente são descritos por identificação molecular.

Em estudo realizado por Siqueira, *et al* (2018), que analisou a presença espécies fúngicas um conjunto de amostras clínicas dos Estados Unidos usando uma análise de sequência multilocus baseada na região do espaçador interno transcrito (ITS) do RNAr e fragmentos dos genes β -tubulina (BenA), calmodulina (CaM) e segunda maior subunidade da polimerase II (RPB2). Os resultados mostraram que em um total de 25 isolados, o *A. montevidensis* (44%) foi a espécie mais prevalente, seguidas por *A. chevalieri* (36%), *A. pseudoglaucus* (8%) e *A. costiformis* (4%).

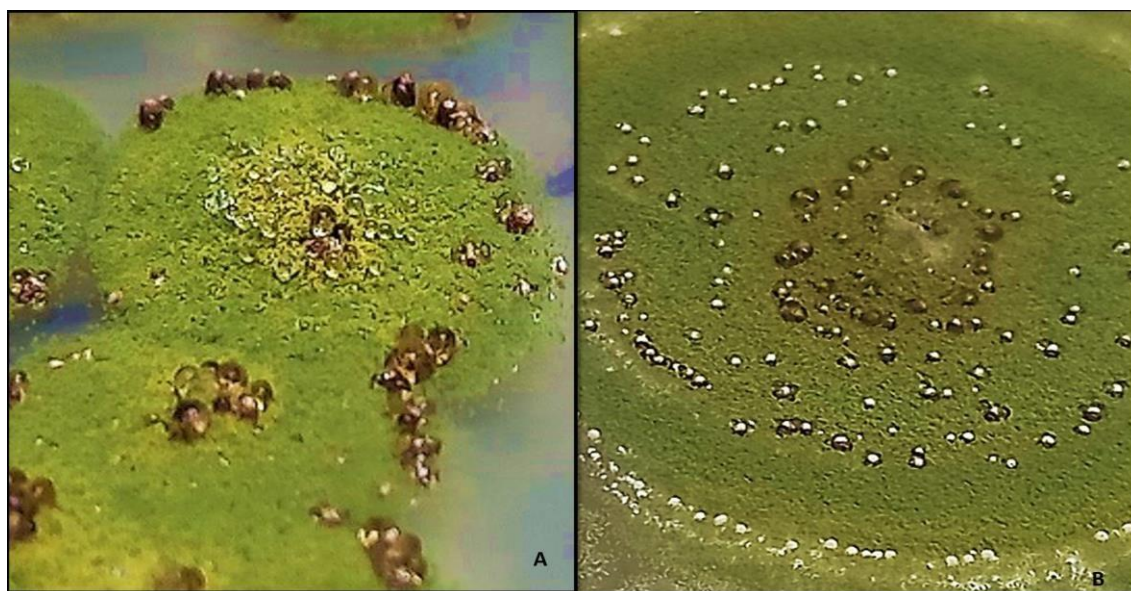
A maioria deles foram de amostras clínicas humanas, principalmente do trato respiratório (LBA, escarro e seios), mas também em menor número de córneas, unhas, fezes e linfonodos. O autor chama a atenção pelo aumento contínuo do número de espécies de *Aspergillus* envolvidas infecções humanas (Siqueira *et al.*, 2018).

5.4.3 Produção de Escleródios

A grande maioria das espécies de *Aspergillus* pertencentes a sessão *Flavi*, são capazes de produzir escleródios (Ramírez; Espinosa, 2020). Neste trabalho, observou-se

que dos 17 isolados de *Aspergillus flavus* 14 (82,3%) das cepas, apresentavam a produção de escleródios, algumas já no terceiro dia de incubação a 25°C, outras demoraram mais que cinco dias para que fossem observadas a olho nu. A Figura 4, representa a produção de escleródios em cepas de *Aspergillus*.

Figura 4: Produção de escleródios em cepas de *Aspergillus flavus*



A: escleródios na primeira e segunda fases; B: escleródios na segunda e terceira fase. Fonte: Autora, 2023.

Os escleródios produzidos por *A. flavus* e *A. parasiticus* podem existir no solo como escleródios, conídios ou micélios no tecido vegetal, assim como podem ser produzidos em estágio assexuado ou sexuado. Possuem a capacidade de sobreviver no campo em condições extremas ambientais, conseguem germinar em micélios, seguidos pela formação dos conidióforos e conídios quando a condição se torna favorável (Norlia *et al.*, 2019).

Foram observados a presença de escleródios nas três fases de crescimento. Isso demonstra que estas cepas possui uma capacidade de sobreviver e se multiplicar no ambiente, mesmo em condições adversas e ainda persistir no ambiente por longos períodos.

Os escleródios são classificados em tipo L (produtoras de poucos, porém grandes esclerócios, maior que 400 μ m e baixos níveis de aflatoxinas), e tipo S, (produtoras de pequenos e numerosos esclerócios diâmetro abaixo de 400 μ m e altos níveis de aflatoxinas) (Aquino; Potenza, 2013).

Em um estudo onde foram medidos os escleródios produzidos por 14 cepas de *A. flavus* isolados do ambiente, foram encontrados. As cepas apresentavam escleródios

marrons de formatos variados e com diâmetro de 603-1035 µm, ou seja, todos os escleródios produzidos pelas cepas de *A. flavus* foi do tipo L (> 400µm de diâmetro) (Ramírez; Espinosa, 2020).

Embora o tamanho do escleródio possa fornecer algumas informações sobre as características das cepas de *Aspergillus flavus*, não é um indicador definitivo para distinguir entre cepas aflatoxigênicas (produtoras de aflatoxinas) e atoxigênicas (não produtoras). A capacidade de uma cepa produzir aflatoxinas está mais diretamente relacionada à expressão dos genes envolvidos na síntese dessas toxinas do que ao tamanho do escleródio.

5.5 - ANÁLISE DE AFLATOXINAS POR LC-MS/MS

A metodologia de LC-MS/MS, que dentre outras técnicas descritas, é considerada a mais eficiente, com elevada sensibilidade e seletividade para multitoxinas, foi utilizada para as análises e os resultados foram os seguintes: das 24 amostras analisadas, 09 (37.5%) apresentaram níveis de aflatoxinas detectáveis, com valores que variaram de 1 a 82,3 µg/Kg de aflatoxinas totais, porém, apenas 2 estavam acima dos limites máximos toleráveis (20µg/Kg), apresentando 62,4 e 82,3 µg/Kg de aflatoxinas totais, acima do preconizado pela legislação (Brasil, 2011), como descritos na tabela 5.

Estes resultados demonstram um cenário de segurança em relação à presença de aflatoxinas, devido à quantidade de amostras e os baixos níveis detectados. De fato, um cenário melhorado quando comparado com uma análise realizada em 2014, em que 12 amostras de amendoim, comercializado à granel e industrializados vendidos em comércio formal de São Luís do Maranhão, revelaram resultados preocupantes, onde, 1 (16%) de 6 amostras industrializada apresentou aflatoxinas totais com níveis de 71 µg/kg, e 5 (83.3%) das 6 amostras à granel, continham níveis de aflatoxinas B₁ que variaram de 27 a 3000 µg/kg com níveis de aflatoxinas totais, que variaram de 23 µg/kg a 2.175 µg/kg de (AFT) (Martins *et al.*, 2017, p. 111).

Depois desse período, os resultados obtidos apontam um declínio nos níveis de aflatoxinas, o que representa uma conquista importante na mitigação dos riscos associados ao consumo de produtos à base de amendoim contaminados por esta micotoxina, indicando eficácia nas práticas agrícolas, armazenamento e processamento dos produtos comercializados localmente.

Tabela 5- Análise de aflatoxinas em amendoim, por LC-MS/MS

Categoria	Amostra	AFB ₁ µg/Kg	AFB ₂ µg/Kg	AFG ₁ µg/Kg	AFG ₂ µg/Kg	AFTs µg/Kg
<i>In natura</i>	1	ND	ND	ND	ND	ND
	2	6,8	1	ND	ND	ND
	3	ND	ND	ND	ND	ND
	4	ND	ND	ND	ND	ND
	5	ND	ND	ND	ND	ND
	6	ND	ND	ND	ND	ND
	7	ND	ND	ND	ND	ND
	8	74,3	8,0	ND	ND	82,3
	9	ND	ND	ND	ND	ND
	10	1	ND	ND	ND	1
	11	1	ND	ND	ND	1
	12	ND	ND	ND	ND	ND
	13	ND	ND	ND	ND	ND
	14	ND	ND	ND	ND	ND
Industrial	15	1	ND	ND	ND	1
	16	ND	ND	ND	ND	ND
	17	1	ND	ND	ND	ND
	18	1	ND	ND	ND	ND
	19	ND	ND	ND	ND	ND
Torrado	20	ND	ND	ND	ND	ND
	21	54,5	7,9	ND	ND	62,4
	22	1	ND	ND	ND	1
	23	ND	ND	ND	ND	ND
	24	ND	ND	ND	ND	ND

AFB₁: Aflatoxina B₁; AFB₂: Aflatoxina B₂; AFG₁: Aflatoxina G₁; AFG₂: Aflatoxina G₂;

AFT: Aflatoxinas Totais; ND: Não detectável. Fonte: Autora, 2023.

Muitos processos implementados no setor agrícola, podem estar diretamente relacionados a esta mudança, como os avanços tecnológicos e aplicação de biocontrole podem ter levado a práticas mais eficazes de prevenção e controle de fungos, reduzindo assim a contaminação.

O uso de bioprodutos no setor agrícola tem sido mundialmente implementado há décadas e as estratégias tem sido bem sucedidas com o uso de cepas nativas não produtoras de aflatoxinas, do gênero *A. flavus* (Okun *et al.*, 2015).

Um estudo que analisou 12 micotoxinas, tais como: aflatoxina B₁ (AFB₁), aflatoxina B₂ (AFB₂), aflatoxina G₁ (AFG₁) e aflatoxina G₂ (AFG₂); fumonisina B₁ (FB₁) e fumonisina B₂ (FB₂); ocratoxina A (OTA); esterigmatocistina (STE); desoxinivalenol

(DON); zearalenona (ZON); toxina T-2 (T₂); e toxina HT-2 (HT₂) em 80 amostras de manteiga de amendoim, de avelã e chocolate do comércio local da Turquia, por metodologia de LC-MS/MS.

Os resultados revelaram-se que, em todas as amostras foram detectadas as aflatoxinas B₁ e B₂. Na manteiga de amendoim, foram detectadas OTA (95%), STE (45%), FB₂ (12,5%), ZON (7,5%) e AFG₁(5%). As micotoxinas foram detectadas com AFB₁ (50%), AFG₁ (35%), AFB₂ (30%), T₂ (30%), OTA (25%), ZON (25%), HT₂ (20%) e STE (15%) em manteigas de avelã. A micotoxina OTA foi detectada na taxa de 100% nas amostras de chocolate. As micotoxinas DON (55%), AFB₁ (50%), AFG₁(50%), ZON (50%) e STE (40%) em amostras de chocolate. As toxinas AFG₂, FB₁, T₂, DON e HT₂ não foram detectadas na manteiga de amendoim e na pasta de amendoim, já as toxinas AFG₂, FB₁, FB₂ e DON não foram detectadas na manteiga de avelã. Os níveis detectados, variaram de 0,01 a 42,09 µg/kg nas 80 amostras (Er Demirhan; Demirhan, 2022).

Os biofungicidas registrados no Brasil, são a base de bactérias do tipo *Bacillus*, e são combinados com fungicidas químicos. As expectativas para o mercado nacional é registrar produtos que contenham uma mistura de espécies de microrganismos ou múltiplas cepas de mesma espécie como forma mais segura e eficiente para os biocontrole fúngicos (Bettiol; Medeiros, 2023).

Com o resultado das análises realizadas, revelou-se a presença de Cepas fúngicas com um potencial para bioproduto. O *Purpureocillium lilacinum*, onde estudos ressaltam o potencial desta cepa como potencial bioproduto promissor (Khan; Tanaka, 2023), além disso, detectou-se também, a presença de *Aspergillus flavus*, não aflatoxigênico, também utilizado na agricultura no controle de cepas aflatoxigênicas. Entretanto, análise mais aprofundada com relação a esta competitividade entre espécies e impacto nas contaminações dos grãos precisam ser realizadas.

Embora o método de identificação por morfologia, ainda seja muito aplicada em laboratórios e de fato, essa é uma etapa importante para a identificação, ainda é muito imprecisa em relação as espécies, principalmente do gênero *Aspergillus*. Isso reforça a importância da utilização de tecnologia para a identificação das espécies fúngicas de forma rápida e eficiente, como é o caso da espectrometria de massa MALDI-TOF.

Outra causa sobre o impacto na produção de aflatoxinas diz respeito as cenário climático mundial previsto, estima-se um aumento de temperatura para o próximo século de +2°C e +5°C, com isso, as espécies termo adaptáveis como o *Aspergillus flavus*, se

tornará um problema de segurança alimentar (Zingales *et al.*, 2022). Estudos relacionados aos contaminantes alimentares retratam a capacidade dos fungos de se adaptarem a mudanças ambientais (Zhou; May, 2023).

Uma das maiores ameaças à segurança alimentar e à saúde humana em todo o mundo é a contaminação de culturas básicas com micotoxinas e as alterações climáticas têm e terão, um maior efeito sobre o crescimento e a distribuição dos fungos micotoxigênicos e das micotoxinas subsequentemente produzidas (Meneely *et al.*, 2023).

A espécie *flavus* é capaz de produzir tanto aflatoxinas quanto o ácido ciclopiazônico em alimentos, que frequentemente são encontrados em amendoim (Gonzalez *et al.*, 2013), no entanto, diante do cenário adaptativo por mutação e recombinação sexual devido ao aumento da temperatura, trará mudanças na dominância de espécies termotolerantes como as de *Aspergillus* toxigênicos sobre espécies de *Penicillium*, assim como, o *Aspergillus flavus*, mudando a produção de aflatoxinas para ácido ciclopiazônico (Zhou; May, 2023).

Embora as análises tenham indicado um controle satisfatório sobre a presença de aflatoxinas no amendoim, é importante notar que houve uma incidência considerável de fungos produtores dessas toxinas. Nesse contexto, não podemos descartar a possibilidade de que a produção de outras micotoxinas possa ser mais expressiva do que a aflatoxina.

De acordo com Frisvand *et al* (2019) o *A. flavus*, é capaz de produzir aflatoxina B₁, G₁, M₁, ácido ciclopiazônico e ácido 3-nitropropionico, enquanto o *A. minisclerotigenes* pode produzir aflatoxina B₁, G₁, M₁ e ácido ciclopiazônico, já o *A. parasiticus*, é capaz de produzir aflatoxina B₁, G₁.

Um estudo que analisou a caracterização morfológica, molecular e metabólica de *Aspergillus* seção *Flavi* e seu potencial toxigênico, em 80 amostras de especiarias comercializadas no Líbano. Os resultados mostraram que o *Aspergillus* foi identificado em 60% das amostras e 40% eram pertencentes a seção *Flavi*, sendo o *A. flavus*, foi o gênero mais frequente representando quase 80% dos isolados, seguidos de *A. tamarii* e *A. minisclerotigenes*. Com relação a produção de micotoxinas, 80% das cepas produziram micotoxinas, sendo 47% de aflatoxinas e 72% produziram ácido ciclopiazônico.

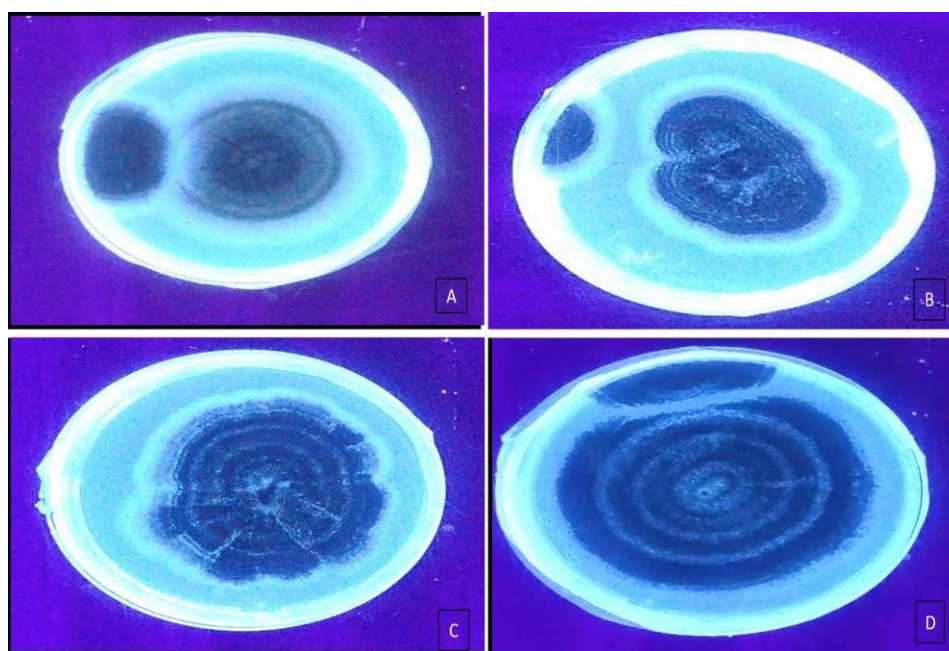
Com isso, demonstra-se que mesmo que os resultados apontem baixos níveis de aflatoxinas, outras micotoxinas podem estar sendo produzidas por essas cepas de *Aspergillus*. Com isso, ressalta-se a importância da vigilância e do controle contínuo ao

longo da cadeia de produção e armazenamento de alimentos, visando garantir a segurança alimentar e a saúde pública.

5.5.1 Identificação de cepas Toxigênicas e Atoxigênicas por semeio direto

O presente estudo revelou-se, sob as observações de luz UV, 6 cepas 35,2% de *Aspergillus flavus*, cultivados em meio Yeast + β -ciclodextrina apresentaram fluorescência em suas colônias, como mostra a Figura 5.

Figura 5: Produção de fluorescência em cepas de *Aspergillus* produtoras de aflatoxinas.



A: Produção forte de fluorescência; B: Produção forte de Fluorescência; C: Produção fraca de fluorescência; D: Ausência de fluorescência. Fonte Autora, 2023.

A figura 5 sugerem que entre os isolados, havia cepas de *A. flavus* aflatoxigênicos e não aflatoxigênicos a partir das expressões de produção de fluorescência nas mostras, utilizando a placas contendo meio de cultura Yeast Sucrose Ágar, acrescido de 0,3g de M β Cyd e inoculadas com cepas de *Aspergillus flavus*. Observou-se uma resposta diferenciada entre as amostras. Notavelmente, em três das placas, observou-se uma reação marcante, evidenciada pela expressão de fluorescência. Essa resposta fluorescente foi atribuída à interação específica da ciclodextrina com a aflatoxina produzida pelo *Aspergillus flavus*, realçando a sensibilidade da detecção da micotoxina. Por outro lado, uma das placas não apresentou reação, indicando a ausência de fluorescência.

Essa disparidade nos resultados sugere variações na produção de aflatoxina pelas cepas de *Aspergillus* ou em suas interações com a Ciclodextrina. Esses achados destacam a técnica como uma ferramenta de triagem na detecção de aflatoxinas produtora de aflatoxinas ou atoxigênicas, além de ressaltar a importância de considerar a variabilidade nas respostas fúngicas ao implementar métodos de detecção fluorescente.

De acordo com Fent, (2001) a utilização do ágar SAB e YES suplementado com 0,3% M β -cyd a 28°C, foi suficiente para detectar um sinal fluorescente claro de cepas aflatoxigênicas. Porém, ele ressaltar, que a presença da fluorescência das colônias circunvizinhas em ambos os meios propostos por ele é indicativa da capacidade de produção de aflatoxinas, no entanto, recomenda-se uma determinação cromatográfica para confirmar a presença de aflatoxina.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da alta incidência de *Aspergillus flavus*, os níveis de aflatoxinas detectados não representam um risco para o consumo eventual destes produtos, porém, vale ressaltar que as espécies fúngicas isoladas, devido a mudanças climáticas e o seu poder adaptativo, possuem a capacidade de produzir outras micotoxinas, além das aflatoxinas. Portanto, novas análises e o monitoramento constantes são necessários para o controle das cepas colonizadoras e micotoxinas produzidas nestes alimentos.

REFERÊNCIAS

- ADELAIDE UNIVERSITY. Micologia, Preparação de cultura em lâmina. 2023. **Mycology | University of Adelaide**. Disponível em: <https://www.adelaide.edu.au/mycology/laboratory-methods/slide-culture-preparations>. Acesso em: 20 set. 2023.
- ADETUNJI, M. C. *et al.* Phylogenetic diversity and prevalence of mycoflora in ready-to-eat supermarket and roadside-vended peanuts. **Mycologia**, v. 113, n. 1, p. 1–11, 2 jan. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00275514.2020.1804235>. Acesso em: 7 fev. 2024.
- AKIMOWICZ, M.; BUCKA-KOLENDO, J. MALDI-TOF MS - application in food microbiology. **Acta Biochimica Polonica**, v. 67, n. 3, p. 327–332, 14 set. 2020.
- AKINOLA, S. A.; ATEBA, C. N.; MWANZA, M. Behaviour of *Aspergillus parasiticus* in aflatoxin production as influenced by storage parameters using response surface methodology approach. **International Journal of Food Microbiology**, v. 357, p. 109369, 2 nov. 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160521003287>. Acesso em: 11 dez. 2023.
- ALMEIDA, D. P. *et al.* Higroscopicidade das sementes de feijão adzuki. **Científica**, v. 41, n. 2, p. 130–137, 29 out. 2013. Disponível em: <http://cientifica.org.br/index.php/cientifica/article/view/420>. Acesso em: 8 dez. 2023.
- ALSHANNAQ, A.; YU, J.-H. Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 6, p. 632, 13 jun. 2017.
- ALSHARIF, A. M. A.; CHOO, Y.-M.; TAN, G.-H. Detection of Five Mycotoxins in Different Food Matrices in the Malaysian Market by Using Validated Liquid Chromatography Electrospray Ionization Triple Quadrupole Mass Spectrometry. **Toxins**, v. 11, n. 4, p. 196, 31 mar. 2019.
- AQUINO, S.; POTENZA, M. R. Análise da micobiota associada à entomofauna em rações a granel para animais domésticos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, p. 243–247, jun. 2013. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aib/a/mpSpNZtMVHB9KVS49J5Gybj/>. Acesso em: 7 fev. 2024.
- ARAÚJO, A. S. F. Validação do método de quantificação de micotoxinas por LC- MS/MS em farinhas de trigo, aveia e milho. 2017.
- ARAUJO, I. M. da S. A. *et al.* Características físico-químicas de sementes de diferentes genótipos de amendoim. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S1, p. 870–872, 2007.
- AWASTHI, M. K. *et al.* Filamentous fungi for sustainable vegan food production systems within a circular economy: Present status and future prospects. **Food Research International**, v. 164, p. 112318, 1 fev. 2023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S096399692201376X>. Acesso em: 4 fev. 2024.
- BETTIOL, W.; MEDEIROS, F. H. V. Artigo: Como o Brasil se tornou o maior produtor e consumidor de produtos de biocontrole. 2023. **EMBRAPA.BR**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/79156418/artigo-como-o-brasil-se-tornou-o-maior-produtor-e-consumidor-de-produtos-de-biocontrole>. Acesso em: 16 set. 2023.

BLACKWEL, MARETH et al. Fungi. 2009. Disponível em: <http://www.tolweb.org/fungi/2377>. Acesso em: 20 ago. 2023.

BRASIL. Aspergilose. 2020. **Ministério da Saúde**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/aspergilose/aspergilose>. Acesso em: 9 set. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. **RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA RDC Nº 138 DE 08 DE FEVEREIRO DE 2017**, 2017.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. 2011. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0007_18_02_2011_rep.html.

BRASIL. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 724, DE 1º DE JULHO DE 2022. 2022.

BRASIL, I. RESOLUÇÃO - RDC Nº 331, DE 23 DE DEZEMBRO DE 2019 - RESOLUÇÃO - RDC Nº 331, DE 23 DE DEZEMBRO DE 2019 - DOU - Imprensa Nacional. 2019. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou>. Acesso em: 14 ago. 2023.

CAMPIONE, E. et al. Antifungal Effect of All-trans Retinoic Acid against *Aspergillus fumigatus* In Vitro and in a Pulmonary Aspergillosis In Vivo Model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 65, n. 3, p. e01874-20, 17 fev. 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8092556/>. Acesso em: 16 set. 2023.

CARVALHO, P. E. R. Espécies arbóreas brasileiras. 2014.

CHO, H.-J. et al. Regulation of Conidiogenesis in *Aspergillus flavus*. **Cells**, v. 11, n. 18, p. 2796, 7 set. 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9497164/>. Acesso em: 10 dez. 2023.

CLAEYS, L. et al. Mycotoxin exposure and human cancer risk: A systematic review of epidemiological studies. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 4, p. 1449–1464, jul. 2020. Disponível em: <https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1541-4337.12567>. Acesso em: 11 out. 2023.

DA SILVA, F. C. et al. TAXONOMIA POLIFÁSICA PARA IDENTIFICAÇÃO DE *ASPERGILLUS* SEÇÃO FLAVI: UMA REVISÃO. **Revista Ifes Ciência**, v. 1, n. 1, p. 18–40, 15 jun. 2015. Disponível em: <https://ojs.ifes.edu.br/index.php/ric/article/view/235>. Acesso em: 6 maio 2023.

DAOU, R. et al. Mycotoxins: Factors influencing production and control strategies. **AIMS Agriculture and Food**, Cc_license_type: cc_byPrimary_atype: AIMS Agriculture and FoodSubject_term: ReviewSubject_term_id: Review, v. 6, n. 1, p. 416–447, 2021. Disponível em: <http://www.aimspress.com/article/doi/10.3934/agrfood.2021025>. Acesso em: 27 ago. 2023.

DEL PALACIO, A.; PAN, D. Occurrence and toxigenic potential of *Aspergillus* section Flavi on wheat and sorghum silages in Uruguay. **Mycology**, v. 11, n. 2, p. 147–157, 2 abr. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21501203.2020.1752321>. Acesso em: 28 nov. 2023.

DELAVY, M. et al. Investigating Antifungal Susceptibility in *Candida* Species With MALDI-TOF MS-Based Assays. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, 2019. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2019.00019>. Acesso em: 26 abr. 2023.

DEMOLINER, A. OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA EMPREGANDO SPE E LC-ESI-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE MULTICLASSES DE AGROTÓXICOS E METABÓLITOS EM ÁGUA DE SUPERFÍCIE E DE ABASTECIMENTO PÚBLICO. 2008.

EKWOMADU, T.; MWANZA, M.; MUSEKIWA, A. Mycotoxin-Linked Mutations and Cancer Risk: A Global Health Issue. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 13, p. 7754, 24 jun. 2022.

ER DEMIRHAN, B.; DEMIRHAN, B. Investigation of Twelve Significant Mycotoxin Contamination in Nut-Based Products by the LC–MS/MS Method. **Metabolites**, v. 12, n. 2, p. 120, 26 jan. 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8877173/>. Acesso em: 19 dez. 2023.

ESKOLA, M. *et al.* Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited 'FAO estimate' of 25%. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 16, p. 2773–2789, 7 set. 2020. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2019.1658570>. Acesso em: 5 mar. 2022.

FENTE, C. *et al.* New Additive for Culture Media for Rapid Identification of Aflatoxin-Producing *Aspergillus* Strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 4858–4862, out. 2001. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AEM.67.10.4858-4862.2001>. Acesso em: 30 jan. 2023.

FLORIANO, R. de F. *et al.* Effect of storage on the quality of peanut grain oil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 124, p. 105688, 1 dez. 2023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.ez14.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0889157523005628>. Acesso em: 8 dez. 2023.

FRISVAD, J. C. *et al.* Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. **Studies in Mycology**, v. 93, p. 1–63, 1 jun. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166061618300289>. Acesso em: 19 maio 2023.

FU, X. *et al.* Effects of packaging materials on storage quality of peanut kernels. **PLoS ONE**, v. 13, n. 3, p. e0190377, 8 mar. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5843212/>. Acesso em: 17 dez. 2023.

FUH, M. M.; HEIKAUS, L.; SCHLÜTER, H. MALDI mass spectrometry in medical research and diagnostic routine laboratories. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 416, p. 96–109, 1 maio 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138738061630207X>. Acesso em: 26 abr. 2023.

GÓMEZ-VELÁSQUEZ, J. C. *et al.* Development and validation of an in-house library for filamentous fungi identification by MALDI-TOF MS in a clinical laboratory in Medellín (Colombia). Accepted: 2020-09-16T10:01:50Z, 6 set. 2020. Disponível em: <https://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/66982>. Acesso em: 18 ago. 2023.

GÓMEZ-VELÁSQUEZ, J. C. *et al.* MALDI-TOF MS: Foundations and a Practical Approach to the Clinically Relevant Filamentous Fungi Identification. **Current Fungal Infection Reports**, v. 15, n. 4, p. 162–170, 1 dez. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12281-021-00423-9>. Acesso em: 26 abr. 2023.

GONÇALEZ, E. *et al.* Produção de aflatoxinas e ácido ciclopiazônico por cepas de *Aspergillus flavus* isoladas de amendoim. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, n. 3, p. 312–317, set. 2013. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1808-16572013000300008&lng=pt&tlng=pt. Acesso em: 29 ago. 2023.

HAMAL, P. *et al.* Identification of filamentous fungi including dermatophytes using MALDI-TOF mass spectrometry. **Folia Microbiologica**, v. 67, n. 1, p. 55–61, fev. 2022.

HAVELAAR, A. H. *et al.* World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. **PLOS Medicine**, v. 12, n. 12, p. e1001923, 3 dez. 2015. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosmedicine/article?id=10.1371/journal.pmed.1001923>. Acesso em: 27 abr. 2023.

HAWKSWORTH, D. L.; LÜCKING, R. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 4, p. 5.4.10, 25 ago. 2017. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016>. Acesso em: 25 abr. 2023.

IAL, I. A. L. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. 1ª, 2008 (Digital).

IAMANAKA, B. T.; OLIVEIRA, I. S.; TANIWAKI, M. H. MICOTOXINAS EM ALIMENTOS. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 7, p. 138–161, 2010. Disponível em: <https://www.journals.ufrpe.br/index.php/apca/article/view/128>. Acesso em: 18 ago. 2023.

ISAAC, G. S.; EL-DERINY, M. M.; TAHA, R. G. Efficacy of *Purpureocillium lilacinum* AUMC 10149 as biocontrol agent against root-knot nematode *Meloidogyne incognita* infecting tomato plant. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, p. e253451, 29 out. 2021. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjb/a/GNX5mWgysYcyp8hTdjSXN4t/?lang=en>. Acesso em: 16 fev. 2024.

ISO. **Microbiologia de alimentos para consumo humano e animal — Método horizontal para enumeração de leveduras e bolores Parte 2: Técnica de contagem de colônias em produtos com atividade de água menor ou igual a 0,95**. 2021.

JALLOW, A. *et al.* Worldwide aflatoxin contamination of agricultural products and foods: From occurrence to control. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, n. 3, p. 2332–2381, 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1541-4337.12734>. Acesso em: 16 set. 2023.

JORNALISMO-ANALYTICA. **A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em Tandem HPLC-MS/MS**. 11 jun. 2020. **Revista Analytica**. Disponível em: <https://revistaanalytica.com.br/a-cromatografia-liquida-acoplada-a-espectrometria-de-massas-em-tandem-hplc-ms-ms/>. Acesso em: 15 out. 2023.

KARIMIZADEH ESFAHANI, M. *et al.* First case of fungal keratitis due to *Aspergillus minisclerotigenes* in Iran. **Current Medical Mycology**, [S. l.], v. 5, n. 2, p. 45–48, jun. 2019.

KATSIARI, M. *et al.* Possible COVID-19-Associated Pulmonary Aspergillosis Due to *Aspergillus niger* in Greece. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, [S. l.], v. 11, n. 3, p. 300, 23 fev. 2022.

KHAN, M.; TANAKA, K. *Purpureocillium lilacinum* for plant growth promotion and biocontrol against root-knot nematodes infecting eggplant. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 18, n. 3, p. e0283550, 24

mar. 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10038259/>. Acesso em: 11 dez. 2023.

KUSHIRO, M. *et al.* Detection of Aflatoxigenic and Atoxigenic Mexican *Aspergillus* Strains by the Dichlorvos–Ammonia (DV–AM) Method. **Toxins**, v. 10, n. 7, p. 263, 27 jun. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6070877/>. Acesso em: 17 dez. 2023.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, 2009.

LEWIS, L. *et al.* Aflatoxin Contamination of Commercial Maize Products during an Outbreak of Acute Aflatoxicosis in Eastern and Central Kenya. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 12, p. 1763–1767, dez. 2005. Disponível em: <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/full/10.1289/ehp.7998>. Acesso em: 16 out. 2023.

LIEW, W.-P.-P.; MOHD-REDZWAN, S. Mycotoxin: Its Impact on Gut Health and Microbiota. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, p. 60, 2018.

MAIA, B. B. F. IMPLEMENTAÇÃO DOS MÉTODOS DE DETECÇÃO DE CRONOBACTER SPP. E ENUMERAÇÃO DE FUNGOS EM GÊNEROS ALIMENTÍCIOS NO LABORATÓRIO MICROCHEM. **maia** 2022. 2022. **Bing**. Disponível em: <https://www.bing.com/search?q=IMPLEMENTAÇÃO+DOS+MÉTODOS+DE+DETECÇÃO+D+E+CRONOBACTER+SPP.+E+ENUMERAÇÃO+DE+FUNGOS+EM+GÊNEROS+ALIMENTÍCIOS+NO+LABORATÓRIO+MICROCHEM.+maia+2022&q=n&form=QBRE&sp=-1&ghc=2&lq=1&pq=implementação+dos+métodos+de+deteção+de+cronobacter+spp.+e+enumeração+de+fungos+em+gêneros+alimentícios+no+laboratório+microchem.+maia+2022&sc=1-139&sk=&cvid=4EFA65AC088B4D44DC9DE7B89F851CB&ghsh=0&ghacc=0&ghpl=>. Acesso em: 9 dez. 2023.

MARTINS, R. F. F. *et al.* **Anais do XIII Congresso Internacional de Nutrição Funcional**. VP Editora, 2017.

MENEELY, J. P. *et al.* The Challenge of Global Aflatoxins Legislation with a Focus on Peanuts and Peanut Products: A Systematic Review. **Exposure and Health**, v. 15, n. 2, p. 467–487, 1 jun. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12403-022-00499-9>. Acesso em: 19 dez. 2023.

MESQUITA-ROCHA, S. *Aspergillus fumigatus*: aspectos gerais e importância na medicina contemporânea. 2019.

MIDGLEY, G.; HAY, R. j.; CLAYTON, Y. M. **Micologia médica, diagnóstico em cores**. 1ª. São Paulo: Acqua Estúdio gráfico, 1998.

MORAES, A. M. L.; PAES, R. de Al.; HOLANDA, V. L. de. *Micologia*. [s. d.].

MOREIRA, F. M. *et al.* Identificação de fungos filamentosos em indústrias farmacêuticas: uma revisão integrativa da literatura. **Revista Científica do UBM**, p. 124–144, 19 dez. 2021. Disponível em: <https://revista.ubm.br/index.php/revistacientifica/article/view/1246>. Acesso em: 30 jun. 2023.

MURRAY, P. R. What Is New in Clinical Microbiology—Microbial Identification by MALDI-TOF Mass Spectrometry. **The Journal of Molecular Diagnostics : JMD**, v. 14, n. 5, p. 419–423, set. 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3427873/>. Acesso em: 26 abr. 2023.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. *Microbiologia Médica*. n. 6ª, 2009.

NEME, K.; MOHAMMED, A. Mycotoxin occurrence in grains and the role of postharvest management as a mitigation strategies. A review. **Food Control**, v. 78, p. 412–425, 1 ago. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713517301329>. Acesso em: 12 out. 2023.

NIKOLIĆ, M. *et al.* Toxigenic Species *Aspergillus parasiticus* Originating from Maize Kernels Grown in Serbia. **Toxins**, v. 13, n. 12, p. 847, 26 nov. 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8704542/>. Acesso em: 11 dez. 2023.

NORLIA, M. *et al.* Molecular Characterisation of Aflatoxigenic and Non-Aflatoxigenic Strains of *Aspergillus* Section *Flavi* Isolated from Imported Peanuts along the Supply Chain in Malaysia. **Toxins**, v. 11, n. 9, p. 501, 29 ago. 2019.

OKUN, D. O. *et al.* Distribution of indigenous strains of atoxigenic and toxigenic *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in maize and peanuts agro-ecological zones of Kenya. **Agriculture & Food Security**, v. 4, n. 1, p. 14, 30 set. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40066-015-0033-5>. Acesso em: 16 set. 2023.

OMS. Mycotoxins. 2018. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mycotoxins>. Acesso em: 26 ago. 2023.

PANTANO, L. *et al.* QuEChERS LC–MS/MS Screening Method for Mycotoxin Detection in Cereal Products and Spices. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 7, p. 3774, 4 abr. 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8038554/>. Acesso em: 28 nov. 2023.

PATERSON, R. R. M.; LIMA, N. How will climate change affect mycotoxins in food? **Food Research International**, v. 43, n. 7, p. 1902–1914, ago. 2010. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996909002130>. Acesso em: 12 out. 2023.

PAULA, T. C. *et al.* qualidade do amendoim comercializado no município. 2022. **Bing**. Disponível em: https://www.bing.com/search?pglt=43&q=qualidade+do+amendoim+comercializado+no+município&cvid=87a362628b54478eb9a65ca3b9a568e6&gs_lcrp=EgZjaHJvbWUyBggAEEUYOdIBCTIzMTU2ajBqMagCALACAA&FORM=ANNTA1&PC=DCTS. Acesso em: 17 dez. 2023.

PEREIRA, L. \dias R.; IGNÁCIO, E. O. CADEIA PRODUTIVA DO ÓLEO DE AMENDOIM. 2019. **Bing**. Disponível em: <https://www.bing.com/search?q=CADEIA+PRODUTIVA+DO+ÓLEO+DE+AMENDOIM&qsn&form=QBRE&sp=-1&lq=0&pq=equilibrio+higroscópico+de+leguminosas+amendoim&sc=10-47&sk=&cvid=9702AF1838FD4E9A8C764D575D35E2A3&ghsh=0&ghacc=0&ghpl=>. Acesso em: 8 dez. 2023.

PITT, J. I. Toxigenic fungi and mycotoxins. **British Medical Bulletin**, v. 56, n. 1, p. 184–192, 1 jan. 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1258/0007142001902888>. Acesso em: 6 maio 2023.

RAMÍREZ, I. P.; ESPINOSA, K. C. S. Caracterización de esclerocios de cepas ambientales de *Aspergillus flavus* y su relación con la producción de micotoxinas. **Revista Cubana de Ciencias Biológicas**, v. 8, n. 1, 2020. Disponível em: <https://revistas.uh.cu/rccb/article/download/943/790>. Acesso em: 6 dez. 2023.

RIDDELL, R. W. Permanent Stained Mycological Preparations Obtained by Slide Culture. **Mycologia**, v. 42, n. 2, p. 265–270, 1 mar. 1950. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00275514.1950.12017830>. Acesso em: 17 set. 2023.

ROCHA, M. P. *et al.* Sistema de armazenamento e incidência dos principais fungos produtores de micotoxinas em grãos. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 50176–50193, 2020. Disponível em: <https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/13763/11518>. Acesso em: 21 fev. 2022.

SAATH, R. *et al.* Gestão da qualidade na pós-colheita do amendoim como ferramenta à competitividade. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 14, n. 1, p. e007927, 31 jan. 2021. Disponível em: <https://periodicos.unicesumar.edu.br/index.php/rama/article/view/7927>. Acesso em: 27 abr. 2023.

SAITA, A. C.; PANDOLFI, M. A. C. EFEITOS DA AFLATOXINA NA COMERCIALIZAÇÃO DO AMENDOIM. p. 11, 2019.

SALVATORE, M. M.; ANDOLFI, A. Phytopathogenic Fungi and Toxicity. **Toxins**, v. 13, n. 10, p. 689, 28 set. 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8541165/>. Acesso em: 4 fev. 2024.

SCHAMANN, A.; GEISEN, R.; SCHMIDT-HEYDT, M. Whole-Genome Sequences of Two Kenyan *Aspergillus minisclerotigenes* Strains. **Microbiology Resource Announcements**, v. 12, n. 8, p. e00219-23, 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10443383/>. Acesso em: 11 dez. 2023.

SHABEER, S. *et al.* Aflatoxin Contamination, Its Impact and Management Strategies: An Updated Review. **Toxins**, v. 14, n. 5, p. 307, 27 abr. 2022.

SIQUEIRA, J. P. Z. *et al.* Species of *Aspergillus* section *Aspergillus* from clinical samples in the United States. **Medical Mycology**, v. 56, n. 5, p. 541–550, 1 jul. 2018. Disponível em: <https://academic.oup.com/mmy/article/56/5/541/4372452>. Acesso em: 16 fev. 2024.

SOUSA, J. M. A. de. **Validação de uma metodologia de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS) para a monitorização de micotoxinas emergentes em plantas.** 2018. 2018.

SPANJER, M. C.; RENSEN, P. M.; SCHOLTEN, J. M. LC-MS/MS multi-method for mycotoxins after single extraction, with validation data for peanut, pistachio, wheat, maize, cornflakes, raisins and figs. **Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment**, v. 25, n. 4, p. 472–489, abr. 2008.

SPINELLI, L.; LONGONI, L.; SILVEIRA, A. B. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE AMOSTRAS DE AMENDOIM PROVENIENTES DO MERCADO PÚBLICO DE PORTO ALEGRE/RS. v. 12, n. 2, 2018. Disponível em: <http://revistas.unilasalle.edu.br/index.php/Rbca>.

TOLENTINO JÚNIOR, D. S. *et al.* Revisão sobre cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas aplicada à análise toxicológica de alimentos. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 5, p. e47910515419, 14 maio 2021. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/15419>. Acesso em: 29 abr. 2023.

TONON, K. M. **AValiação da micoflora contaminante e micotoxinas em leite humano e alimentos infantis para lactentes e crianças de primeira infância por LC-MS/MS.** 2013. Florianópolis, 2013.

ZAITZ, C. *et al.* **Compêndio De Micologia Médica:** Editora Guanabara Koogan Ltda, 2009.

ZHENG, R.-Y. *et al.* A monograph of *Rhizopus*. **Sydowia**, v. 59, p. 273–372, 30 dez. 2007.

ZHOU, L.-W.; MAY, T. W. Fungal taxonomy: current status and research agendas for the interdisciplinary and globalisation era. **Mycology**, v. 14, n. 1, p. 52–59, 2 jan. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21501203.2022.2103194>. Acesso em: 6 maio 2023.

ZINGALES, V. *et al.* Climate Change and Effects on Molds and Mycotoxins. **Toxins**, v. 14, n. 7, p. 445, 30 jun. 2022.