



**INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos**

**CCQA**

**CRISTINA AKEMI YASUMURA**

**Páprica (*Capsicum annum* L.): micobiota, ocorrência de fungos  
toxigênicos, aflatoxinas e ocratoxina A**

**CAMPINAS**

**2019**



**CRISTINA AKEMI YASUMURA**

**Páprica (*Capsicum annuum* L.): micobiota, ocorrência de fungos  
toxigênicos, aflatoxinas e ocratoxina A**

*Dissertação apresentada ao Instituto de  
Tecnologia de Alimentos para obtenção do  
título de Mestre em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos.*

Aluna: Cristina Akemi Yasumura

Orientadora: Dra. Beatriz Thie Iamanaka

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação defendida pela aluna  
Cristina Akemi Yasumura e orientada pelo Profa. Dra. Beatriz Thie Iamanaka

**CAMPINAS**

**2019**

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

Ficha Catalográfica  
Biblioteca do Instituto de Tecnologia de Alimentos  
Elaborado por: Lucilene Paulina da Silva – CRB 8/8507

Y29p Yasumura, Cristina Akemi.

Páprica (*Capsicum annuum* L.): micobiota, ocorrência de fungos toxigênicos, aflatoxinas e ocratoxina A. Cristina Akemi Yasumura / Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. - Campinas, SP: ITAL, 2019.

64 f.

Profa. Dra. Beatriz Thie Iamanaka.

1. *Capsicum annuum* L. 2. Páprica. 3. Aflatoxinas. 4. Ocratoxina A. 5. *Aspergillus* section *Nigri*. 6. *Aspergillus* section *Flavi*. I. Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL). Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos (CCQA). II. Yasumura, Cristina Akemi. III. Título.

**Título em inglês:** Paprika (*Capsicum annuum* L.): mycobiota, occurrence of toxigenic fungi, aflatoxins and ochratoxin A

**Key-words:** *Capsicum annuum* L.; paprika; aflatoxins; ochratoxin A; *Aspergillus* section *Nigri*; *Aspergillus* section *Flavi*

**Titulação:** Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

**Banca Examinadora:** Dra. Beatriz Thie Iamanaka (Orientadora), Dra. Marta Hiromi Taniwaki (Titular), Dra. Líliliana de Oliveira Rocha (Titular), Dr. Josué José da Silva (Suplente)

**Data da Defesa:** 27/06/2019

**Programa de Pós-graduação:** Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

## **BANCA EXAMINADORA**

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida por Cristina Akemi Yasumura, aprovada pela Comissão Julgadora em 27/06/19.

---

Dra. Beatriz T. Iamanaka  
Instituto de Tecnologia de Alimentos - Presidente

---

Dra. Marta H. Taniwaki  
Instituto de Tecnologia de Alimentos

---

Dra. Liliana O. Rocha  
Faculdade de Engenharia de Alimentos - FEA  
Universidade Estadual de Campinas

---

Dr. Josué José da Silva  
Universidade Estadual de Londrina - UEL  
Universidade de São Paulo - suplente

A ata de defesa de dissertação de mestrado com as respectivas assinaturas dos membros da banca encontra-se arquivada junto à documentação do aluno.

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais Marcos e Sonia pelo amor incondicional.

À minha amada oba Mie (*in memoriam*).

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, sempre presente em minha vida me protegendo, iluminando, direcionando e fortalecendo.

Aos meus queridos pais, Marcos e Sonia, por sempre terem sido pais amorosos e presentes, por terem me ensinado que o respeito e a gratidão são a base de tudo, e que devemos sempre dar o melhor de nós naquilo que fazemos. Amo vocês.

Ao meu amado namorado Guilherme por toda compreensão, amor e paciência. Não teria conseguido sem todo o seu apoio e carinho.

Às irmãs maravilhosas que a vida me deu, Susana e Beatriz que sempre estiveram ao meu lado nos momentos bons e ruins, enchendo minha vida de alegria. Também aos mais incríveis amigos Mayumi, Kaori, Fábio e Joice, por sempre estarem ao meu lado me apoiando, por todos os momentos inesquecíveis, por todas as risadas, pelo companheirismo em todas as horas.

Às minhas famílias Yasumura e principalmente Shiroma, por terem contribuído com a formação do meu caráter.

A todos os funcionários, pesquisadores e estagiários do ITAL. À querida Dra. Beatriz pela orientação, ensinamentos e incentivos durante toda minha jornada, desde a iniciação científica até o mestrado, estando sempre presente com paciência e amizade. A Dra. Marta pelo compartilhamento de conhecimento. Às funcionárias Josimara, Sílvia, Gabriela, Fabiana, Adriane, Adelaide e Luciara, por toda a ajuda no laboratório, e também pela amizade. À Margaret, Neusely e Neliane pela convivência durante esses anos.

Às minhas colegas de laboratório Josiane, Adriana, Tamara e Ligia pela companhia, compartilhamento de conhecimentos e experiências. Em especial a Josiane e Ligia, pela ajuda nos momentos de desespero e pelos ensinamentos compartilhados sempre com atenção, carinho e paciência.

A todos os colegas que conheci durante essa longa jornada. Em especial, à Larissa Ferranti pela orientação e ensinamentos durante a iniciação científica. À Aline Katsurayama, pela troca de conhecimentos, conversas e conselhos sobre a prova do mestrado. À Tainá Donnaruma, pela amizade e as conversas mais malucas. À Gabriela Cachoni pelo apoio, amizade e companheirismo.

A todos os professores que contribuíram para a minha formação acadêmica.

À querida secretária da pós-graduação, Elenice, sempre muito amável e atenciosa.

A todos meus colegas da pós-graduação.

Ao programa de pós-graduação do ITAL, pela oportunidade da realização do mestrado. Ao laboratório de microbiologia do CCQA, pela oportunidade e suporte técnico.

À banca examinadora, pela atenção e conselhos.

A todos que contribuíram para a realização desse trabalho.



## RESUMO

A páprica  uma especiaria obtida através da secagem e trituração de frutos maduros da espécie *Capsicum annuum* L. Estudos em páprica apontaram a presença de fungos toxigênicos e micotoxinas, metabólitos secundários tóxicos produzidos por algumas espécies de fungos filamentosos que podem causar danos  saúde humana e animal. As principais micotoxinas encontradas em páprica são a ocratoxina A, produzida principalmente por *Aspergillus carbonarius* e *Penicillium verrucosum* e em menor extensão *Aspergillus niger* e *Aspergillus ochraceus*, e as aflatoxinas, produzidas principalmente por *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*. Diversos países têm estabelecido limites de contaminação por micotoxinas em alimentos devido à preocupação com os riscos  saúde pública. No Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece o limite de 20,0 µg/Kg para aflatoxinas totais e 30,0 µg/Kg/kg para ocratoxina A em especiarias, incluindo a páprica. (RDC 07/2011). Os objetivos deste trabalho foram isolar e identificar os fungos da páprica, incluindo as espécies toxigênicas produtoras de aflatoxinas e ocratoxina A em 80 amostras comercializadas no Estado de São Paulo; avaliar o potencial para produção de aflatoxinas e ocratoxina A pelas cepas isoladas; e quantificar os níveis de aflatoxinas e ocratoxina A nas amostras. Para realização do estudo foram utilizadas: 1) Técnicas de diluição e plaqueamento em meio DG18 para o isolamento dos fungos; 2) Análise morfológica dos isolados para a identificação das espécies; 3) Técnica de ágar plug e cromatografia de camada delgada para análise da produção de aflatoxinas e ocratoxina A pelos isolados; e 4) Extração e limpeza com coluna de imunoafinidade e detecção e quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para avaliar a contaminação das amostras de páprica por ocratoxina A e aflatoxinas. Dentre o total de amostras analisadas, 72,5% apresentaram contaminação por fungos e 63,7% por fungos potencialmente toxigênicos. As principais espécies/grupos presentes foram *Aspergillus* section *Nigri*, *Aspergillus* section *Flavi* e *Aspergillus chevalieri*. A média de contaminação por *A. section Nigri* e *Flavi* foram de  $1,13 \times 10^4$  e  $1,3 \times 10^3$ , respectivamente. Um total de 63 isolados de *Aspergillus* section *Flavi* foram produtores de aflatoxina do grupo B, e dentre os 739 isolados de *Aspergillus* section *Nigri*, nenhum foi produtor de ocratoxina A. Em relação  presença de aflatoxinas e ocratoxina A, 85% das amostras apresentaram contaminação por aflatoxinas, em níveis variando de não detectado a 17,83µg/kg e 100% apresentaram contaminação por ocratoxina A, em níveis variando de 0,56 a 223µg/kg.

**Palavras-chave:** *Capsicum annuum* L.; páprica; aflatoxinas; ocratoxina A; *Aspergillus* section *Nigri*; *Aspergillus* section *Flavi*.



## ABSTRACT

Paprika is a spice obtained by drying and crushing ripe fruits of *Capsicum annuum* L. Studies on paprika have already indicated the presence of toxigenic fungi and mycotoxins, toxic secondary metabolites produced by some species of filamentous fungi that can cause damage to human and animal health. The main mycotoxins found in paprika are ochratoxin A, mainly produced by *Aspergillus carbonarius* and *Penicillium verrucosum* and with lower occurrence, *Aspergillus niger* and *Aspergillus ochraceus*, and aflatoxins, mainly produced by *A. flavus*, *A. parasiticus* and *Aspergillus nomius*. Several countries have set limits for mycotoxin contamination in food because of concerns about the risks to public health. In Brazil, the National Agency of Sanitary Surveillance (ANVISA) establishes the limit of 20µg/kg for total aflatoxins and 30µg/kg for ochratoxin A in spices, including paprika. (RDC 07/2011). The objectives of this work were to isolate and identify the fungi of paprika, including toxigenic species producing aflatoxins and ochratoxin A in 80 samples commercialized in the State of São Paulo; to evaluate the potential for aflatoxins and ochratoxin A production by isolated strains; and quantify levels of aflatoxins and ochratoxin A in the samples. To perform the study the following were carried out: 1) Dilution and plating techniques in DG18 medium for the isolation of fungi; 2) Morphological analysis of the isolates for the identification of the species; 3) Plug agar technique and thin layer chromatography for the analysis of the production of aflatoxins and ochratoxin A by isolates; and 4) Extraction and cleaning with an immunoaffinity column and detection and quantification by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) to evaluate the contamination of the paprika samples by ochratoxin A and aflatoxins. From the total of samples analyzed, 72.5% showed contamination by fungi and 63.7% by potentially toxigenic fungi. The main species present were *Aspergillus* section *Nigri*, *Aspergillus* section *Flavi* and *Eurotium chevalieri*. The average contamination by *A.* section *Nigri* and *Flavi* were  $1.13 \times 10^4$  and  $1.3 \times 10^3$  CFU/g respectively. A total of 63 isolates of *Aspergillus* section *Flavi* were aflatoxin B group producers, and of the 739 *Aspergillus* section *Nigri* isolates, none were ochratoxin A producers. Concerning the presence of aflatoxins and ochratoxin A, 85% of samples were contaminated by aflatoxins at levels varying from not detected to 17.83µg/kg and 100% presented contamination by ochratoxin A at levels varying from 0.56 to 223µg/kg.

**Key-words:** *Capsicum annuum* L.; paprika; aflatoxins; ochratoxin A; *Aspergillus* section *Nigri*; *Aspergillus* section *Flavi*.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivos específicos.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 Pimentas <i>Capsicum annuum</i> .....	4
3.1.1 Aspectos gerais.....	4
3.1.2 Capsaicina.....	5
3.2 Páprica.....	5
3.2.1 Variedades: páprica picante e doce.....	5
3.2.2 Processamento da páprica.....	6
3.2.3 Características organolépticas e qualidade da páprica.....	8
3.2.4 Produção e consumo.....	9
3.3 Micotoxinas.....	9
3.3.1 Fatores que influenciam a produção de micotoxinas.....	11
3.3.2 Aflatoxinas.....	12
3.3.3 Ocratoxina A.....	13
3.4 Fungos produtores de aflatoxinas e ocratoxina A.....	14
3.4.1 Gênero <i>Aspergillus</i> .....	14
3.4.2 Fungos produtores de aflatoxinas.....	14
3.4.3 Fungos produtores de ocratoxina A.....	15
3.5 Legislação brasileira e internacional.....	17
3.6 Ocorrência de fungos, aflatoxinas e ocratoxina A em páprica.....	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
4.1 Amostras.....	21
4.2 Atividade de água.....	21
4.3 Diluição decimal seriada e plaqueamento em superfície.....	21
4.4 Isolamento e identificação das espécies/grupos.....	22
4.5 Avaliação do potencial toxigênico das cepas.....	22
4.6 Análise de aflatoxinas e ocratoxina A em páprica.....	23
4.6.1 Aflatoxinas – Extração e limpeza.....	23
4.6.2 Ocratoxina A – Extração e limpeza.....	23
4.6.3 Parâmetros do HPLC.....	24
4.6.4 Otimização da metodologia de aflatoxinas e ocratoxina em páprica.....	24

5. RESULTADOS.....	25
5.1 Atividade de água.....	25
5.2 Isolamento e identificação das espécies/grupos.....	25
5.3 Avaliação do potencial toxigênico das cepas.....	30
5.4 Ocorrência de aflatoxinas e ocratoxina A nas amostras de páprica.....	31
6. DISCUSSÃO GERAL.....	35
7. CONCLUSÕES.....	38
8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS.....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFLA	Aflatoxinas
AFB <sub>1</sub>	Aflatoxina B <sub>1</sub>
AFB <sub>2</sub>	Aflatoxina B <sub>2</sub>
AFG <sub>1</sub>	Aflatoxina G <sub>1</sub>
AFG <sub>2</sub>	Aflatoxina G <sub>2</sub>
AFPA	<i>Aspergillus Flavus e Parasiticus</i> Agar
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Aa	Atividade de água
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CY20S	Ágar Czapek Extrato de Levedura Sacarose 20%
CYA	Ágar Czapek Extrato de Levedura
DG18	Ágar Dicloran Glicerol 18%
DL <sub>50</sub>	Dose letal 50
DRBC	Ágar Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol
EC	Comissão Européia
IAC	Coluna de Imunoafinidade
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
MEA	Ágar Extrato de Malte
ND	Não detectado
OTA	Ocratoxina A
PBS	Solução Salina tamponada com fosfato
SP	São Paulo
TLC	Cromatografia de Camada Fina
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UV	Ultravioleta
YESA	Ágar Extrato de Levedura Sacarose

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

As pimentas do gênero *Capsicum* são as mais conhecidas e difundidas e ocupam o segundo lugar no ranking de consumo mundial de especiarias no mundo, atrás apenas da pimenta preta (*Piper nigrum* L.), considerada a rainha das especiarias (YOGENDRARAJAH, 2014). Podem ser consumidas na forma *in natura* ou na forma de produtos industrialmente processados, desidratados inteiros, em flocos ou em pó (REIFSCHNEIDER, 2000).

A páprica é uma especiaria obtida através da desidratação e moagem de frutos maduros e vermelhos de pimentas da espécie *Capsicum annuum* L. A coloração vermelha é um importante ponto na qualidade da páprica, originada de pigmentos carotenoides como a capsantina e a capsorubina (HENZ et al., 2008). Pode ser do tipo picante, obtida através do processamento de variedades pungentes que apresentam a capsaicina como responsável pela sensação de ardência, ou do tipo doce, obtida através de uma variedade não pungente que possui um análogo capsinóide no lugar da capsaicina (HAN et al., 2013, EMBRAPA, 2006).

Dados sobre a produção e consumo de páprica no Brasil são escassos, principalmente pelo fato de que a maioria da produção ser destinada a comercialização regional e local, não entrando para as estatísticas. Em 2009, o Brasil exportou aproximadamente 8.700 toneladas de páprica, porém, em 2011 a exportação caiu para 377 toneladas (SECEX, 2012). Essa queda no número de exportações pode estar relacionada com a exigência dos países importadores por produtos de alta qualidade e também pelo aumento da produção e exportação de pimentas destinadas para a produção de páprica pela China, que tem tido um aumento significativo no mercado brasileiro. Mundialmente, a Hungria é o principal país consumidor de páprica, uma vez que sua utilização na culinária faz parte da tradição local (SOMOGYI et al., 2000).

A etapa mais crítica durante o processamento da páprica é a secagem pelos meios tradicionais, onde os frutos permanecem expostos à luz solar em ambientes abertos. Por ser uma etapa demorada e susceptível às condições climáticas, os frutos correm o risco de sofrerem uma secagem ineficiente, possibilitando o crescimento e desenvolvimento fúngico (BOKHARI, 2007; KIM, 2017). Durante essa etapa também pode ocorrer a contaminação dos frutos com fezes e urina de animais domésticos ou selvagens, e também por parte dos próprios trabalhadores que não seguirem boas práticas de higiene (DUARTE & ALBUQUERQUE., 2005).

Diversos estudos apontam a contaminação de diversas especiarias por fungos e seus metabólitos secundários tóxicos em vários estágios de sua produção (GATTI et al., 2003; YOGENDRARAJAH, 2014; JESWAL & KUMAR, 2015; KABAK et al., 2017). Estudos também mostram que especiarias que foram secas em condições inadequadas apresentam níveis maiores de contaminação fúngica quando comparadas com as que foram secas em condições adequadas (ERDOGAN, 2004; JESWAL et al., 2013). Há uma grande preocupação em relação à saúde pública e os danos socioeconômicos causados pela presença de fungos e suas micotoxinas em especiarias.

Um estudo sobre a micobiota das pimentas do gênero *Capsicum* apontou a presença elevada de contaminação por *Aspergillus*, seguida de *Eurotium*, *Penicillium* e zigomicetos (GHERBAWY et al., 2015). Em outro estudo sobre a micobiota das pimentas, foram isolados os fungos *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. tamarii*, *Eurotium rapens*, *Paecilomyces lilacenus*, *Penicillium arenicola*, *P. corylophilum*, *P. dunkii*, *P. funiculosum*, *P. oxalicum*, *P. waksmani*, *Rhizopus stolonifer*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Trichoderma harzianum* e *Ulocladium botrytis* (HASHEM et al., 2010). As espécies que integram o gênero *Aspergillus* são amplamente distribuídas em países de clima tropical (WILLIAMS & HALLSWORTH, 2009), e várias são capazes de produzir metabólitos secundários tóxicos.

Diversos países têm estabelecido limites de contaminação por micotoxinas em alimentos devido à preocupação com os riscos à saúde pública. A Comissão Européia (EC) estabeleceu em 2006 os valores de limite máximo tolerável de 10,0 µg/kg para aflatoxinas totais e 20µg/kg para ocratoxina A em frutos e produtos de *Capsicum* spp. (EC 2006). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu em 2011 através da RDC nº7/2011 os valores de limite máximo tolerável de 20,0 µg/kg para aflatoxinas totais e 30,0 µg/kg para ocratoxina A em diversas especiarias (RDC 07/11).

Devido aos estudos que apontam a ocorrente contaminação de especiarias por micotoxinas e a preocupação com a saúde pública e os danos socioeconômicos, a partir de 2015, o Codex Alimentarius estabeleceu como prioritária a avaliação de ocratoxina A e aflatoxinas nas especiarias chilli, páprica, gengibre, noz-moscada, pimentas e açafrão.

Diante da escassez de estudos sobre a micobiota e a presença de micotoxinas em pápricas comercializadas no Brasil e a existência de trabalhos que evidenciam a presença de fungos potencialmente toxigênicos e micotoxinas em pápricas em diferentes países, é de extrema importância um estudo detalhado sobre a páprica comercializada no Brasil, avaliando a micobiota e a presença de micotoxinas. Neste presente trabalho, foram analisadas as variedades picante e doce de pápricas comercializadas no Estado de São Paulo.



## 2. OBJETIVOS

Isolar e identificar os fungos presentes em páprica, incluindo a espécies potencialmente toxigênicas de *Aspergillus* section *Flavi*, *Nigri* e *Circumdati*, bem como avaliar a presença de ocratoxina A e aflatoxinas em amostras de páprica dos tipos doce e picante, embaladas e à granel, vendidas em estabelecimentos comerciais do Estado de São Paulo.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a microbiota e a presença de fungos toxigênicos produtores de aflatoxinas e ocratoxina A nas amostras;
- Determinar a atividade de água das amostras comercializadas no Estado de São Paulo;
- Isolar e identificar as espécies toxigênicas de *Aspergillus* section *Nigri*, *Circumdati* e *Flavi*;
- Avaliar o potencial de cada isolado de *Aspergillus* section *Nigri*, *Circumdati* e *Flavi* em relação à produção de ocratoxina A e aflatoxinas;
- Otimizar a metodologia de determinação de aflatoxinas e ocratoxina A utilizando coluna de imunoafinidade e cromatografia líquida de alta eficiência nas amostras.
- Determinar e quantificar os níveis de aflatoxinas e ocratoxina A nas amostras.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Pimentas *Capsicum annuum*

##### 3.1.1 Aspectos gerais

Originalmente das Américas, o gênero *Capsicum* se expandiu pelo mundo a partir do século XVI, com a aproximação entre a população europeia e as comunidades indígenas (HEISER et al., 1953; CASALI et al., 1984; GARCIA, 1991). Registros arqueológicos encontrados nas regiões andinas do Peru e México sugerem que as pimentas fizeram parte das primeiras plantas domesticadas nas Américas, juntamente com o feijão e as abóboras, e estavam presentes na alimentação da população local na época (NUEZ et al., 1998). No Brasil, registros indicam que os índios brasileiros já cultivavam e utilizavam as pimentas na alimentação, frescas ou secas, acompanhando as refeições e também como forma de proteção e defesa contra invasores. (STADEN, 1974).

Atualmente são conhecidas mais de 150 variedades do gênero *Capsicum* no mundo, derivadas de cinco espécies consideradas domesticadas: *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* e *C. pubescens*. Também são conhecidas aproximadamente 40 espécies silvestres, que são utilizadas em cruzamentos com o intuito de tornar os cultivares mais resistentes a pragas e doenças. (NETO, 2004).

As espécies do gênero *Capsicum* pertencem à família botânica Solanaceae, mesma família a que pertencem a batata, o tomate, a berinjela e o jiló. A altura e o crescimento das plantas variam de acordo com as condições de cultivo. Em sua maioria, são plantas autógamas, embora a polinização cruzada também aconteça. Suas flores são hermafroditas e suas características morfológicas são utilizadas por taxonomistas para identificação das espécies. As pimentas da espécie domesticada *Capsicum annuum* L. costumam apresentar apenas uma flor por nó, com corola (conjunto de pétalas) geralmente branca e anteras azuladas. Os frutos podem apresentar diversos formatos e cores (EMBRAPA, 2006).

*Capsicum* é o gênero mais conhecido e difundido no mundo podendo ser consumido em sua forma *in natura* ou na forma de produtos processados industrialmente, como azeites, desidratados inteiros, em flocos ou em pó. É fonte de vitaminas A, C, E, B1, B2, fósforo, potássio e cálcio, além de ser utilizado como planta medicinal, devido à alta quantidade de antioxidantes, como a capsaicina, principal substância ativa (REIFSCHNEIDER, 2000).

### 3.1.2 Capsaicina

A capsaicina é um alcaloide responsável pela sensação de pungência, encontrada unicamente nas sementes e na placenta das pimentas do gênero *Capsicum*. Atua como expectorante, descongestionante, indutor da termogênese (transformação de parte das calorias dos alimentos em calor), antioxidante e antibacteriano (MILLQVIST et al., 2006).

Também possui efeito carminativo (antiflatulência), provoca o aumento da circulação sanguínea no estômago e promove a cicatrização mais rápida (MOZSIK et al., 2005). Atualmente tem sido bastante estudada devido à sua capacidade analgésica a partir da liberação de endorfinas sintetizadas pelo Sistema Nervoso Central, provocando sensação de euforia e bem-estar (GRÉGIO et al., 2008).

### 3.2 Páprica

A páprica é produzida a partir da secagem e trituração dos frutos maduros de *Capsicum annuum* L. Os frutos maduros apresentam diversas cores, variando desde o amarelo claro até o vermelho intenso. Para a produção da páprica, além de maduros, os frutos escolhidos devem apresentar alta qualidade e intensa coloração vermelha originada de pigmentos carotenoides como a capsantina e a capsorubina (HENZ et al., 2008).

A páprica pode ser picante ou doce, de acordo com as variedades utilizadas em seu processamento. A páprica doce é a mais comum e amplamente utilizada, principalmente como corante natural pelas indústrias de alimentos, a fim de corrigir ou intensificar a cor de um produto, tornando-o mais atraente. Já a páprica picante é utilizada principalmente como flavorizante pelas indústrias alimentícias.

#### 3.2.1 Variedades: páprica picante e doce

A páprica picante é obtida através do processamento das variedades pungentes da espécie *Capsicum annuum* L. A seguir serão apresentadas as variedades pungentes existentes (EMBRAPA, 2006):

Pimenta-jalapeño: apresentam frutos geralmente cônicos, com paredes grossas e estrias, com comprimento de 5 a 8 cm e coloração vermelha quando maduros. Possui pungência média e aroma acentuado. Cultivada principalmente nos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Goiás.

Pimenta-cayenne: os frutos apresentam forma alongada ou de meia lua, com a pele bastante enrugada, com comprimento de 13 a 25 cm e coloração vermelha quando maduros. Também conhecida como pimenta vermelha. Possui alta pungência.

Pimenta-serrano: os frutos apresentam forma alongada com comprimento de 5 a 10 cm e coloração vermelha, laranja, marrom ou amarela quando maduros. É originária do México e possui pungência maior que a pimenta-jalapeño.

A páprica doce é processada a partir da pimenta-doce, também conhecida como pimenta-verde ou pimenta-americana. Essa variedade também pertence à espécie *Capsicum annuum L.*, porém, é a única variedade não pungente, apresentando o análogo não pungente capsinóide no lugar da capsaicina (HAN et al., 2013). Os frutos apresentam forma alongada com cerca de 18 cm de comprimento (EMBRAPA, 2006).

A figura 1 (A – D) apresenta as variedades utilizadas no processamento da páprica do tipo picante e doce.



Figura 1. Pimentas utilizadas no processamento da páprica. A) Pimenta-jalapeño. B) Pimenta-cayenne. C) Pimenta-serrano. D) Pimenta-doce (EMBRAPA, 2006).

### 3.2.2 Processamento da páprica

Para ter um produto com alta qualidade apenas os frutos maduros com coloração vermelha intensa são processados, após serem selecionados e higienizados adequadamente (PEREZ-GALVEZ et al., 2009). O processamento da páprica consiste basicamente em duas etapas, a desidratação e a moagem.

O processo de desidratação da fruta fresca pode ser realizado pela aplicação de técnicas tradicionais ou industriais. Dentre as técnicas tradicionais, está à exposição direta dos frutos à luz solar ao ar livre e a utilização de câmaras de secagem com fonte de calor proveniente da queima de toras de carvalho (MÍNGUEZ-MOSQUEIRA et al., 1996; PÉREZ-GÁLVEZ et al., 2001).

As técnicas de desidratação industriais são mais utilizadas pelas grandes indústrias, porque garantem a uniformidade no processo, além de reduzirem o tempo de processo para 4-6 horas também permitem a redução da umidade dos frutos em níveis de

aproximadamente 3-4% (CHUNG et al., 1992; LEVY et al., 1995). Nestes, os frutos passam por um processo de desidratação em secadores por convecção, na qual as temperaturas variam de 50 a 80°C. O estresse térmico causado pela secagem pode desencadear um processo de oxidação de pigmentos carotenoides, porém, esse processo pode ser retardado com a adição de antioxidantes como o ácido ascórbico e extratos de ervas (PEREZ-GALVEZ et al., 2009).

Estudos realizados mostraram que a utilização de técnicas de pré-processamento da matéria prima antes da desidratação, podem reduzir a temperatura do processo e conseqüentemente, o estresse térmico (LAZARIDES et al., 1999). A técnica de pré-processamento pode ser simples como lavagem, corte e branqueamento a vapor, ou mais sofisticada como a desidratação osmótica, muita utilizada com frutas e hortaliças e que consiste na perda de água após a imersão do produto em solução contendo cloreto de sódio ou sacarose. (DOYMAZ et al., 2002; ADE-OMOWAYE et al., 2002).

O processo de moagem dos frutos após a secagem é realizado a fim de se obter um produto com granulometria ideal. Durante esse processo, um percentual de 30-35% de sementes é adicionado. Além da capsaicina, as sementes das pimentas *Capsicum* possuem óleo, que além de ajudarem na estabilização dos pigmentos carotenoides durante o período de armazenamento, deixam o produto mais brilhante e atraente. O produto então é armazenado em ambientes fechados e ventilados, com temperatura de 5 a 10°C, protegido da exposição à luz, e em locais com ausência de odor forte (LEMOS et al., 2014; FRAIFE et al., 2015).

A etapa mais crítica durante o processamento da páprica nos países produtores é a secagem pelos meios tradicionais, onde os frutos permanecem expostos à luz solar em ambientes abertos. Por ser uma etapa demorada e susceptível às condições climáticas, os frutos correm o risco de sofrerem uma secagem ineficiente, possibilitando o crescimento e desenvolvimento fúngico (BOKHARI, 2007; KIM, 2017). Durante essa etapa também pode ocorrer a contaminação dos frutos com fezes e urina de animais domésticos ou selvagens, e também por parte dos próprios trabalhadores que não seguirem boas práticas de higiene (DUARTE & ALBUQUERQUE, 2005).

Devidamente armazenada, a páprica tem validade de até 18 meses. Sua qualidade é avaliada com base nas características organolépticas, no teor de umidade e na ausência de contaminação microbiológica e sujidades (galhos, pedras). Durante o período de armazenamento também é importante o controle da umidade do local, uma vez que o aumento do teor de umidade do produto provoca o aumento da água livre presente, possibilitando o crescimento de fungos e a deterioração. Outro ponto importante é evitar o

acesso e a contaminação dos produtos por animais vetores de microrganismos, como roedores, répteis, morcegos e insetos (PICCOLO, 2014).

### 3.2.3 Características organolépticas e qualidade da páprica

A qualidade da páprica é medida principalmente pela intensidade de coloração do produto final, uma vez que um produto de alta qualidade possui coloração vermelho intenso. A intensidade da coloração da páprica é medida em unidades de cor ASTA (American Spice Trade Association). A unidade de cor ASTA é o padrão internacional para medir a cor extraída dos frutos dos pimentões e da páprica, sendo determinada através do método de espectrometria. A unidade de cor ASTA varia de 60 a 180, sendo 60 a menor coloração e 180 a maior. Apresenta maior unidade de cor ASTA o produto que apresentar coloração mais intensa e brilhante, tendo um valor comercial maior. Os produtos que apresentam ASTA maior que 160 unidades são considerados de alta qualidade, enquanto os que apresentam ASTA menor que 60 unidades, são considerados de baixa qualidade, e são utilizados principalmente como flavorizantes, pois nesse caso, a cor do produto não é o parâmetro mais importante (ASTA, 1985).

A figura 2 apresenta as diferentes colorações da páprica.



Figura 2. Diferentes colorações da páprica (ASTA, 1985).

Outro fator importante relacionado com a qualidade da páprica é o grau de ardência, exceto para o tipo doce, medida através da escala de Scoville. Wilbur Scoville foi um farmacêutico que criou, em 1912, a escala de Scoville, que mede o grau de pungência das pimentas. Para criar a escala, Scoville realizou um teste que consistia na diluição do extrato da pimenta em uma solução contendo água e glicose, até que a pungência não fosse mais perceptível ao paladar. Assim, um extrato de pimenta que necessita de 1000 unidades de água para diluição indica uma ardência de 1000 unidades na escala de Scoville. A capsaicina pura, responsável pela pungência das pimentas, equivale a 15 milhões de unidades na escala de Scoville (BONTEMPO, 2007).

A páprica doce não apresenta pungência, uma vez que possui o análogo não pungente capsinóide no lugar da capsaicina. A páprica picante pode apresentar ardência de até 700 unidades na escala de Scoville (Walker et al., 2004).

### **3.2.4 Produo e consumo**

A produo de pimentas vermelhas, incluindo o pimentão doce, que é utilizado para a fabricao da páprica, está estimada em 2017, em 36 milhões de toneladas, sendo a China (17 milhões), o México (3,2 milhões) e a Turquia (2,5 milhões) os maiores produtores (Factfish, 2019).

Dados e estatísticas da produo e consumo de páprica no Brasil ainda são bastante escassos, uma vez que grande parte de sua produo é destinada a comercializao regional e local.

Sabe-se que em 2009, a exportao de páprica brasileira foi de aproximadamente 8.700 toneladas (US\$ 26 milhões), porém em 2011 a exportao caiu para 377 toneladas (US\$ 745 mil) (SECEX, 2012). A retrao na exportao da páprica pode estar ligada com a exigência dos países importadores por produtos de alta qualidade, pois segundo Ribeiro (2012) são poucas as cultivares adequadas para a produo de páprica no Brasil. Além disso tem havido um aumento na exportao de pimentas para a produo de páprica pela China.

A Hungria é o principal país consumidor de páprica, pois a produo e o uso na culinária fazem parte da tradio local a milhares de anos (SOMOGYI et al., 2000). O goulash, guisado de carne, é um prato tradicional e um grande exemplo da utilizao da páprica na culinária e tradio húngara.

### **3.3 Micotoxinas**

O termo micotoxina tem origem da palavra grega “*mykes*” que significa fungo e da palavra em latim “*toxican*” que significa toxinas. O conhecimento sobre a existência das micotoxinas existe há muito tempo, mas seu estudo são foi aprofundado após o incidente ocorrido na Inglaterra em 1960, onde mais de 100.000 aves morreram após serem alimentadas com rao contaminada com aflatoxina (BENNETT et al., 2003; CALVO, 2005).

As micotoxinas são metabólitos tóxicos produzidos durante o metabolismo secundário de algumas espécies de fungos filamentosos. São substâncias resistentes aos

processos térmicos e estão presentes em uma variedade de alimentos e seus derivados, representando um grande risco à saúde humana e animal, uma vez que são responsáveis por causar micotoxicoses quando ingeridas (PITT & HOCKING, 1986; COULOMBE, 1991; REINHOLDS, 2017; TOSUN & OZDEN, 2016). A ingestão de micotoxinas pode acarretar em efeitos agudos e/ou crônicos, em humanos e animais, dependendo do tempo e da quantidade exposta ao agente tóxico. A toxicidade aguda ocorre quando há uma exposição rápida a uma dose alta e única do agente tóxico, podendo causar o envenenamento e a perda da função do órgão alvo, causando morte. A toxicidade crônica acontece quando a exposição ao agente tóxico ocorre diversas vezes em doses baixas, podendo causar alterações na replicação do DNA, levando à ocorrência de processos mutagênicos e teratogênicos, além de aumentar a probabilidade de indução ao câncer (PITT, 2000).

Os principais gêneros de fungos produtores de toxinas são *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (figura 3).

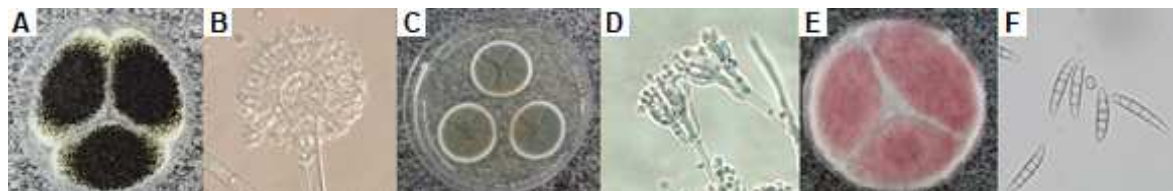


Figura 3. Características macro e microscópicas dos principais gêneros produtores de micotoxinas. A e B) *Aspergillus*. C e D) *Penicillium*. E e F) *Fusarium*. (imagem: próprio autor).

Dentre as micotoxinas que ocorrem em alimentos, destacam-se: as aflatoxinas, produzidas por algumas espécies de *Aspergillus* section *Flavi* (YU et al., 2005; BOK et al., 2004); as fumonisinas e os tricotecenos, produzidos por algumas espécies do gênero *Fusarium* (POZZI et al., 2002); e as ocratoxinas, produzidas por algumas espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (LEESON et al., 1995).

É bastante difícil realizar o controle das micotoxinas em alimentos, uma vez que sua produção pode ocorrer em todas as etapas da produção do alimento, tanto na época de crescimento até durante colheita e estocagem. A presença de fungos não está relacionada com a presença de micotoxinas, uma vez que nem todos os fungos são capazes de produzir as micotoxinas, e a micotoxina pode permanecer nos alimentos mesmo sem a presença visível dos fungos.



### 3.3.1 Fatores que influenciam a produção de micotoxinas

É importante o conhecimento dos fatores que podem influenciar a produção das micotoxinas pelos fungos, a fim de estabelecer medidas de prevenção e controle de qualidade dos alimentos. Os principais fatores são:

(a). Fungo: nem todas as espécies de fungos filamentosos são capazes de produzir micotoxinas, dessa forma, a presença do fungo não implica na presença da micotoxina no alimento. O contrário também ocorre, podendo a micotoxina permanecer nos alimentos mesmo depois da morte dos fungos que a produziram.

(b). Substrato: uma vasta variedade de alimentos podem ser susceptíveis à contaminação por fungos e micotoxinas. Estudos apontam que alimentos com alto teor de carboidratos são os mais susceptíveis.

(c). Umidade relativa do ar e do substrato: a produção de micotoxinas pode ocorrer em umidade relativa acima de 80% e na faixa de atividade de água de 0,60 a 0,90.

(d). Temperatura: geralmente, a temperatura ótima para produção de micotoxinas está entre as temperaturas mínima e máxima de crescimento. A tabela 1 apresenta os valores de temperatura de crescimento e produção de micotoxinas por algumas espécies toxigênicas.

(e). Atmosfera: em sua maioria os fungos são aeróbios, necessitando de oxigênio para produzir as micotoxinas.

(f). Interação microbiana: sempre há interação entre fungos, bactérias e leveduras nos alimentos. A produção das micotoxinas pelos fungos pode afetar o desenvolvimento dos outros microrganismos, assim como esses outros microrganismos podem inibir a produção das micotoxinas e até mesmo causar sua remoção ou degradação.

**Tabela 1.** Valores de temperatura máxima, mínima e ótima para crescimento e produção de micotoxinas por algumas espécies toxigênicas (PITT & HOCKING, 2009).

<b>Espécies fúngicas</b>	<b>T mínima (°C)</b>	<b>T ótima (°C)</b>	<b>T máxima (°C)</b>
<i>Aspergillus flavus</i> (crescimento)	10-12	33	43-48
<i>Aspergillus flavus</i> (produção de aflatoxinas)	13	16-31	37
<i>Aspergillus parasiticus</i> (crescimento)	12	32	42
<i>Aspergillus parasiticus</i> (produção de aflatoxinas)	12	-	40
<i>Aspergillus carbonarius</i> (crescimento)	10	30	41
<i>Aspergillus carbonarius</i> (produção de ocratoxina A)	-	15-20	35
<i>Penicillium verrucosum</i> (crescimento)	0	20	31
<i>Penicillium verrucosum</i> (produção de ocratoxina A)	0	-	31
<i>Penicillium expansum</i> (crescimento)	-6	25	35
<i>Penicillium expansum</i> (produção de patulina)	0	25	31
<i>Fusarium graminearum</i> (crescimento)	-	24-26	-
<i>Fusarium graminearum</i> (produção de desoxinivalenol)		25-30	
<i>Fusarium graminearum</i> (produção de zearalenona)	-	20	-
<i>Fusarium proliferatum</i> (crescimento)	5	25	37
<i>Fusarium proliferatum</i> (produção de fumonisinas)	15	25-30	

### 3.3.2 Aflatoxinas

As aflatoxinas são metabólitos secundários que podem ser produzidos principalmente pelas espécies *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*. Podem ser encontradas em uma vasta variedade de alimentos, como milho, trigo, cevada, cereais, pimentas e pimentões, amendoim, cerveja e rações animais. (HOLLINGER et al., 1999; JAIMEZ et al., 2000; STROKA et al., 2000; CHIAVARO et al., 2001).

As aflatoxinas possuem propriedades hepatotóxicas, agindo na forma aguda e crônica nos homens e animais. O mais importante efeito da toxicidade crônica das aflatoxinas é a carcinogênese hepática. Estudos da ingestão de AFB<sub>1</sub> em diversos animais como peixes, roedores, aves e primatas demonstram a capacidade da indução ao carcinoma hepatocelular, mesmo quando ingeridas em doses baixas pelos animais, podendo ser considerados uma potente substância hepatocarcinogênica natural. Animais alimentados com rações com aflatoxinas também podem apresentar tumores no pâncreas e no intestino (BUSBY et al., 1984, COULOMBE, 1991).

Atualmente são conhecidos 17 compostos denominados pelo termo aflatoxinas, porém, as mais conhecidas pelo potencial toxigênicos produzidas são a B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>, onde B e G se referem à coloração fluorescente azul (Blue) e verde (Green) que os compostos apresentam quando expostos à luz ultravioleta (PITT, 2000).

O análogo B<sub>1</sub>, pró-carcinógeno, possui efeito tóxico maior quando comparado ao das outras aflatoxinas, uma vez que possui a capacidade de realizar biotransformação no fígado, para a sua forma ativada AFB<sub>1</sub>-epóxido, capaz de realizar ligações covalentes com sítios nucleofílicos de macromoléculas, como DNA, RNA e proteínas, podendo originar processos mutagênicos, teratogênicos ou carcinogênicos (WOGAN, 1992; SANTOS et al., 2001). Foi classificada como pertencente ao Grupo 1: carcinogênico para humanos pelo IARC (1993).

O DL50, também conhecido como dose letal média é utilizado para expressar o grau de toxicidade de uma substância, correspondendo à dose suficiente para eliminar 50% da população de animais utilizados no teste. A AFB<sub>1</sub> apresenta valores de DL50 variando de 0,3 a 9,0 mg/kg de peso corpóreo (KHOURY et al., 2008).

### 3.3.3 Ocratoxina A

A ocratoxina A foi descoberta em 1965, produzida por *Aspergillus ochraceus*. É um composto cristalino incolor formado a partir da união de uma dihidro-isocumarina a um grupo L-fenilalanina através de uma ligação peptídica (NOGUEIRA et al., 2006).

Essa micotoxina ocorre em aveia, cevada, centeio, trigo, uvas, cebolas e em outros diversos alimentos. Uma preocupação é a presença desta micotoxina também nos produtos processados derivados destas matérias primas, como os sucos de uva e vinhos por exemplo (MARQUARDT et al., 1992; PITT, 2000; VAN-EGMOND & DEKKER, 1995).

É uma micotoxina conhecida pelas suas propriedades nefrotóxicas, hepatóxicas, teratogênicas, mutagênicas, cancerígenas e imunossupressoras (KUIPER-GOODMAN et al., 1989; PLÉSTINA, 1996; SCHLATTER et al., 1996). Estudos em animais comprovam a nefrotoxicidade da OTA em aves e mamíferos (KROGH, 1980; SUJANI et al., 2000). Estudos na Dinamarca, Hungria, Escandinávia e Polônia comprovam o importante papel da OTA na etiologia da nefropatia em suínos (KROGH et al., 1973) e na capacidade teratogênica em ratos, hamsters, galinhas e coelhos. Estes últimos comprovaram que a OTA pode atravessar a placenta, se acumulando nos tecidos fetais e causando más formações do feto, principalmente no sistema nervoso central (KUIPER-GOODMAN et al., 1989).

A OTA foi classificada pela IARC como possível carcinógeno, pertencente ao Grupo 2B (IARC, 1993).

### 3.4 Fungos produtores de aflatoxinas e ocratoxina A

#### 3.4.1 Gênero *Aspergillus*

O nome *Aspergillus* foi dado pelo botânico Pier Antonio Micheli, em 1729, que após observar as estruturas do fungo, notou a semelhança com o instrumento utilizado pela igreja Católica Romana para aspergir água benta nos fiéis (BENETT, 2010).

Possui alto impacto econômico e social, de forma benéfica ou maléfica. Da forma benéfica temos os fungos atuando na indústria e biotecnologia, como fermentadores de alimentos e como produtores de enzimas, ácidos orgânicos e substâncias com uso farmacêutico. Da forma maléfica, temos os fungos responsáveis por danos nas plantações e produções na agricultura e na atuação como patógenos para humanos e animais, podendo causar alergias, asma, aspergilose e outros sérios problemas relacionados com os metabólitos tóxicos produzidos por algumas espécies (FRISVAD et al., 2004; KLICH, 2002; BENETT, 2010).

Suas colônias comumente apresentam crescimento rápido e colorações diversas em tons de branco, amarelo, marrom, preto ou verde, consistindo principalmente de uma densa camada de conidióforos. A cabeça do conidióforo é formada pela vesícula, pelas fiálides, pelas métulas (se presentes) e pelos conídios. Os conídios (lisos ou rugosos, hialinos ou pigmentados) podem formar estruturas colunares ou irradiadas (SAMSON et al., 2010). Segundo Samson et al. (2014) o gênero *Aspergillus* compreende 339 espécies, entre elas, espécies conhecidas pelo potencial de produção de micotoxinas importantes, como a ocratoxina A e as aflatoxinas.

#### 3.4.2 Fungos produtores de aflatoxinas

As aflatoxinas são metabólitos tóxicos produzidos principalmente pelas espécies *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*. , mas outras espécies menos comuns também podem produzir as aflatoxinas: *A. arachidicola*, *A. luteovirescens*, *A. minisclerotigenes*, *A. mottae*, *A. novoparasiticus*, *A. ochraceoroseus*, *A. parvisclerotigenus*, *A. pseudocaelatus*, *A. pseudonomius*, *A. pseudotamarii*, *A. rambelii*, *A. sergii*, *A. togoensis*, *A. toxicarius*, *A. transmontanensis*, *Emericella astellata*, *E. venezuelensis* (PITT & HOCKING, 2009; PETERSON et al., 2001; FRISVAD et al., 1999; VARGA et al., 2011).

Frisvad et al. (2019) descreveram recentemente mais três novas pertencentes à section *Flavi* que são produtoras de aflatoxinas: *A. aflatoxiformans*, *A. austwickii* e *A. cerealis*.

*Aspergillus flavus* assim como outras espécies de *Aspergillus*, são amplamente distribuídos no ambiente, decorrente dos inúmeros conídios produzidos que se dispersam facilmente pelo ar e pela ajuda de insetos. Suas colônias apresentam coloração verde amarelada, com presença ou não de esclerócios. Os conidióforos apresentam a parede grosseiramente rugosa, a vesícula pode ser globosa ou subglobosa, maioria é bisseriada, e os conídios podem ser globosos a elipsoidais e levemente rugosos. A atividade de água para crescimento reportada foi entre 0,86 e 0,96 e apresenta pH ótimo para crescimento de 7,5. A temperatura ótima para crescimento é entre 25 a 42°C, podendo ser observado o crescimento em temperaturas variando de 12-48°C (PITT & HOCKING, 2009). Ocorre principalmente nos trópicos e subtropicais (FRISVAD et al., 2006). As principais micotoxinas produzidas por *A. flavus* são as aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> (KLICH & PITT, 1988). Sua ocorrência já foi relatada em amendoim, amêndoas, milho, sorgo e pimenta (PITT, 1984; HASHEM et al., 2010; SANTOS et al., 2011).

*Aspergillus parasiticus* raramente são bisseriados e seus conídios são esféricos e rugosos. Não é tão comum como *A. flavus* e já foi isolado na América do Sul, Estados Unidos e Austrália (FRISVAD et al., 2006). A atividade de água para crescimento é entre 0,80 e 0,82 e o pH varia na faixa entre 2,4 a 10. A temperatura ótima para crescimento é 32°C, com crescimento observado com temperaturas entre 12 a 42°C. São produtores de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> (PITT & HOCKING, 2009). Segundo Frisvad et al. (2006), sua ocorrência é frequente em amendoim, mas rara em outros alimentos.

*Aspergillus nomius* produz as aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> (PITT & HOCKING, 2009). Podem apresentar pequenos esclerócios. A maioria é bisseriada e seus conídios são globosos a elipsoidais com a parede lisa a levemente rugosa. A temperatura ótima para crescimento varia entre 25 a 37°C, com atividade de água variando de 0,81 a 0,83 (Pitt & Hocking, 2009). Ocorre principalmente no Brasil, Estados Unidos e Tailândia (FRISVAD et al., 2006). Sua ocorrência já foi relatada em amendoim, amêndoas e castanha-do-brasil (PITT, 1984; OLSEN et al., 2008, CALDERARI et al, 2013).

### **3.4.3 Fungos produtores de ocratoxina A**

A ocratoxina A é produzida principalmente pelas espécies *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* e *Penicillium verrucosum*. Também pode ser produzida, em menor quantidade, pelos fungos *A. cretensis*, *A. flocculosus*, *A. lacticofeattus*, *A. niger*, *A.*

*pseudoelegans*, *A. roseoglobulosus*, *A. sclerotiumniger*, *A. sclerotiorum*, *A. steynii*, *A. sulphureus*, *A. westerdijkiae*, *Penicillium nordicum*, *Petromyces albertensis*, *Petromyces alliaceus* e *Neopetromyces muricatus* (ABARCA et al., 1994; PETERSON et al., 2000; TÉREN et al., 1996; PITT, 1987; FRISVAD et al., 2004; FRISVAD et al., 2004; FRISVAD et al., 2006). Ciegler (1972) e Hesseltine et al. (1972) classificaram as espécies *A. melleus*, *A. ostianus*, *A. persii* e *A. petrakii* como produtoras de ocratoxina A, mesmo que em pequenas quantidades, porém, segundo Frisvad et al. (2006), essas informações não foram confirmadas desde a publicação.

Algumas espécies de fungos ocratoxigênicos, como *A. niger*, por exemplo, são utilizados nas indústrias como fontes de enzimas extracelulares, ácidos orgânicos e no processamento de alimentos. Desta forma é necessário um controle rigoroso das cepas para saber quais são capazes de produzir a micotoxina.

*Aspergillus ochraceus* apresenta colônias com crescimento rápido quando incubadas a 25°C, de coloração ocre, amarela ou creme, podendo apresentar ou não esclerócios. Apresenta crescimento quando incubadas a 37°C. Os conidióforos são rugosos, bisseriados (presença de métula e fiálide), as vesículas são globosas, e os conídios são pequenos, globosos e levemente rugosos (PITT & HOCKING, 2009). A temperatura ótima de crescimento é entre 24 a 31 °C, e atividade de água ótima entre 0,96 a 0,98 (RAMOS et al., 1998; PASTER et al., 1980, PITT & HOCKING, 2009). Ocorre em países tropicais e sua ocorrência já foi relatada em grãos de café verde, uvas e pimentas (URBANO et al., 2001; BATTILANI et al., 2003; HASHEM et al., 2010; ALMELA et al., 2007).

*Aspergillus carbonarius* foi relatado pela primeira vez por Gupta (1956) como responsável pela podridão em uvas e só alguns anos mais tarde, ficou conhecido pela capacidade de produzir ocratoxina A em uvas e seus derivados (ABARCA et al., 1994). É uma espécie também encontrada frequentemente em grãos de café (TANIWAKI et al., 2003). Suas colônias apresentam coloração preta, com conídios grandes e escuros, que os diferem das demais espécies de *Aspergillus* negros. A temperatura ótima para crescimento é entre 30 a 35°C, com crescimento relatado em temperaturas variando de 10 a 42°C. A atividade de água varia entre 0,93 a 0,98 (PITT & HOCKING, 2009).

*Penicillium verrucosum* apresenta colônias com crescimento reduzido, com coloração variando de cinza esverdeado a verde. Os conidióforos são rugosos, verticiliados, com conídios globosos ou subglobosos e lisos. Diferente de *A. ochraceus* e *A. niger*, esta espécie ocorre em países de clima temperado e frio. A temperatura ótima de crescimento é de 20°C, e a atividade de água mínima para crescimento é de 0,80 (PITT & HOCKING, 2009). É encontrado principalmente em cereais armazenados (PITT, 1987;

LUND et al., 2003), mas já teve sua ocorrência também relatada em queijos duros suíços (LARSEN et al., 2001).

### 3.5 Legislação brasileira e internacional

Vários países adotaram limites máximos de micotoxinas em alimentos para proteger os consumidores dos efeitos nocivos causados por elas. Segundo a FAO (2004), até o ano de 2003, cerca de 100 países já tinham estabelecido limites de micotoxinas em alimentos e rações.

A Comissão Européia (EC) estabeleceu em 2006 os valores máximos de 10,0 µg/kg para aflatoxinas totais, 5,0 µg/kg para AFB<sub>1</sub> e 20,0 µg/kg para ocratoxina A em frutos *Capsicum* spp. (incluindo a páprica).

No Brasil, o órgão responsável por estabelecer limites para micotoxinas em alimentos é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Em 18 de fevereiro 2011, a ANVISA estabeleceu os valores máximos para micotoxinas através da resolução RDC nº7/2011, fixando os valores máximos de 20µg/kg para aflatoxinas totais e 30 µg/kg para ocratoxina A em páprica e outras especiarias.

A tabela 2 apresenta os limites estabelecidos para aflatoxinas e ocratoxina A em especiarias pela ANVISA e pela Comissão Européia.

**Tabela 2.** Limites estabelecidos para aflatoxinas e ocratoxina A pela ANVISA e pela Comissão Européia, respectivamente (ANVISA RDC N°7/2011; EC N°1881/2006).

	Micotoxinas	Alimento	LMT (µg/kg)
ANVISA RDC N°7/2011	Aflatoxinas B1 B2 G1 G2	Especiarias: <i>Capsicum</i> spp. (o fruto seco, inteiro ou triturado, incluindo pimentas, pimenta em pó, pimenta de caiena e pimentão doce); <i>Pipiper</i> spp. (o fruto incluindo a pimenta branca e a pimenta preta); <i>Myristica fragrans</i> (noz-moscada); <i>Zingiber officinale</i> (gengibre); <i>Curcuma longa</i> (cúrcuma). Mistura de especiarias que contenham um ou mais das especiarias acima indicadas.	20
	Ocratoxina A	Especiarias: <i>Capsicum</i> spp. (o fruto seco, inteiro ou triturado, incluindo pimentas, pimenta em pó, pimenta de caiena e pimentão doce); <i>Pipiper</i> spp. (o fruto incluindo a pimenta branca e a pimenta preta); <i>Myristica fragrans</i> (noz-moscada); <i>Zingiber officinale</i> (gengibre); <i>Curcuma longa</i> (cúrcuma). Mistura de especiarias que contenham um ou mais das especiarias acima indicadas.	30
Comissão Europeia EC N°1881/2006	Aflatoxina B1	<i>Capsicum</i> spp. (frutos secos, inteiros ou moídos, incluindo pimentas, pimenta em pó, pimenta de caiena e páprica); <i>Pipiper</i> spp. (frutos secos, incluindo as pimentas branca e preta) <i>Myristica fragrans</i> (noz-moscada); <i>Zingiber officinale</i> (gengibre); <i>Curcuma longa</i> (cúrcuma)	5
	Aflatoxinas B1 B2 G1 G2	<i>Capsicum</i> spp. (frutos secos, inteiros ou moídos, incluindo pimentas, pimenta em pó, pimenta de caiena e páprica); <i>Pipiper</i> spp. (frutos secos, incluindo as pimentas branca e preta) <i>Myristica fragrans</i> (noz-moscada); <i>Zingiber officinale</i> (gengibre); <i>Curcuma longa</i> (cúrcuma).	10
	Ocratoxina A	<i>Capsicum</i> spp. (frutos secos, inteiros ou moídos, incluindo pimentas, pimenta em pó, pimenta de caiena e páprica).	20

### 3.6 Ocorrências de fungos, aflatoxinas e ocratoxina A em páprica

Diversos estudos já apontaram a presença de fungos em páprica e pimentas do gênero *Capsicum*. A principal preocupação com a microbiota desses alimentos é a presença de algumas espécies capazes de produzir micotoxinas, como por exemplo as espécies do gênero *Aspergillus*.

ALMELA *et al.* (2007) analisaram 5 amostras de páprica produzidas  partir de mteria prima do Peru que apresentavam alta contaminação por ocratoxina A e encontraram predominância do gênero *Aspergillus*, uma vez que dos 85 fungos isolados, 84 (98,8%) pertenciam ao gênero *Aspergillus*, onde 26 (30,9%) foram identificados como *Aspergillus* section *Circumdati*, e 58 (69%) foram identificados como *Aspergillus* section *Nigri*. A predominância do gênero *Aspergillus* também foi evidenciada com o estudo realizado por GONZÁLEZ *et al.* (2017), onde foram analisadas a qualidade microbiológica de 15 amostras de páprica da Argentina. O gênero *Aspergillus* esteve presente em 14 (93,3%) amostras, contando com as espécies *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. niger*, *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae*. GHERBAWY *et al.* (2015) analisaram 60 amostras de pimentas coletadas nos mercados e nos restaurantes da cidade de Ta'if na Arábia Saudita. Os fungos mais frequentes encontrado foram *Aspergillus* (65,49%), seguido por *Eurotium* sp. (9,92%), *Penicillium* sp. (7,80%), *Mucor racemosus* (3,78%), *Alternaria alternata* (3,55%) e *Mycosphaerella tassiana* (3,31%).

HASHEM *et al.* (2010) estudaram a microbiota de pimentas na região de Aseer da Arábia Saudita, e isolaram fungos toxigênicos como *Aspergillus flavus*, *A. niger* e *A. ochraceus*. Também foram isoladas espécies não toxigênicas como *A. tamarii*, *Eurotium rapens*, *Paecilomyces lilacenus*, *Penicillium arenicola*, *P. corylophilum*, *P. dunkii*, *P. funiculosum*, *P. oxalicum*, *P. waksmani*, *Rhizopus stolonifer*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Trichoderma harzianum* e *Ulocladium botrytis*.

Em um estudo realizado por SANTOS *et al.* (2011) com 11 amostras de pimentão e 17 amostras de páprica, foi detectado, através de análise de PCR (Polymerase Chain Reaction) a presença do DNA de *A. flavus* em 82% das amostras de pimentão, e em 60% nas amostras de páprica.

ALMELA *et al.* (2007) analisaram a ocorrência de ocratoxina A em amostras de páprica produzidas a partir de pimentas de diversos países (Peru, Brasil, Zimbábue e Espanha). Os autores observaram que as amostras que estavam contaminadas com ocratoxina A, em níveis variando de não detectado a 4g/kg, apresentavam alta



contaminação por *A. ochraceus* e *A. niger*. De 115 cepas isoladas das amostras contaminadas com ocratoxina A, 85 pertenciam ao gênero *Aspergillus*.

Diversos estudos em diferentes países apresentam a contaminação de pápricas com aflatoxinas e ocratoxina A em amostras de páprica. TABATA et al. (1998) analisaram a incidência de aflatoxinas em alguns alimentos e condimentos comercializados na região de Tóquio/Japão, no total foram analisadas 27 amostras de páprica, das quais 21 (77,77%) apresentaram contaminação por aflatoxinas, em níveis variando de 0,1 a 6,5µg/kg. MARTINS et al. (2001), analisaram a presença de aflatoxinas em 12 amostras de páprica comercializadas em supermercados e lojas de Lisboa, Portugal. Das 12 amostras analisadas, 8 (66,7%) apresentaram contaminação por aflatoxinas, em níveis variando de 1 a 20µg/kg.

BIRCAN (2005) analisou a presença de aflatoxinas em 30 amostras de páprica adquiridas de lojas, bazares e supermercados da Turquia e encontrou contaminação em 27 (90%) amostras, com níveis variando de 0,5 a 124,6µg/kg. Novamente na Turquia, BIRCAN et al. (2008) analisaram a presença de aflatoxinas em 23 amostras de páprica destinadas à exportação. A presença de aflatoxinas foi constatada em 19 (83%) amostras, com níveis variando de 0,38 a 14,71µg/kg.

ZINEDINE et al. (2006) realizaram um estudo sobre a presença de aflatoxinas em especiarias e cereais comercializados em Marrocos, foram analisadas 14 amostras de páprica, das quais 100% foram positivas para aflatoxinas, com concentrações médias de 2,88µg/kg para aflatoxina B<sub>1</sub> e 5,23µg/kg para aflatoxinas totais.

Um estudo realizado por HIERRO et al. (2008) evidenciou a presença das aflatoxinas e da ocratoxina A em amostras de páprica da Espanha, o nível de contaminação por aflatoxinas encontrou-se abaixo do limite estabelecido pela União Europeia, de 5µg/kg para aflatoxina B<sub>1</sub> e 10µg/kg para aflatoxinas totais, com contaminação variando de não detectado a 4,5µg/kg. Enquanto a presença da ocratoxina A foi mais frequente, com média de 11,8µg/kg. Em outro estudo realizado em amostras de páprica comercializadas no mercado espanhol, SANTOS et al. (2010) analisaram 64 amostras e constataram a presença de aflatoxinas em 59% das amostras, com níveis variando de não detectado a 7,25µg/kg, e a presença de ocratoxina A em 98% das amostras, com níveis variando de não detectado a 281µg/kg.

AHN et al. (2010) realizaram um estudo sobre a ocorrência de ocratoxina A em 192 amostras de pápricas comercializadas na Coréia, foi detectada a presença da ocratoxina A em 42 amostras, com níveis variando de 0,84 a 34,96µg/kg. Também na Coréia, HAM et al. (2016) analisaram a presença de micotoxinas em 30 amostras de pimentas em pó produzidas com *Capsicum annuum* L. Nenhuma das amostras apresentou contaminação

por aflatoxinas, e a ocratoxina A só esteve presente em 3 (10%) das amostras, em níveis variando de 1,03 a 2,08µg/kg.

Na Arábia Saudita, GHERBAWY et al. (2015) analisaram 60 amostras de pimentas da espécie *Capsicum annuum* L. para a presença de aflatoxinas. Das 60 amostras analisadas, 34 (56,7%) apresentaram contaminação por aflatoxinas, com níveis variando de 20 a 200µg/kg.

No Brasil são escassos os trabalhos reportando a ocorrência de micotoxinas em páprica. Apenas SHUNDO et al. (2009) relataram a contaminação de páprica por micotoxinas. Os autores analisaram a presença de aflatoxinas e ocratoxina A em 70 amostras de páprica comercializadas no estado de São Paulo, e 58 (82,9%) apresentavam contaminação por aflatoxinas, em níveis variando de 0,5 a 7,3µg/kg. A contaminação por ocratoxina A foi mais elevada, estando presente em 85,7% das amostras (60) com níveis variando de 0,2 a 97,2µg/kg e média de contaminação de 7,0µg/kg.

A tabela 3 apresenta os dados recentes disponíveis sobre a ocorrência de aflatoxinas e ocratoxina A em páprica disponíveis na literatura.

De acordo com os trabalhos apresentados, é possível verificar que a contaminação de páprica por fungos toxigênicos e micotoxinas é frequente, principalmente por ocratoxina A. A porcentagem de amostras contaminadas por ocratoxina A é alta e os níveis de contaminação são elevados, ultrapassando os limites estabelecidos pela Comunidade Européia e Brasil. Mais estudos são necessários visando avaliar a qualidade da páprica comercializada no Brasil. Estes dados são importantes para tomada de decisões pelos órgãos reguladores, diagnóstico do problema e adoção de medidas preventivas, visando a melhoria da qualidade da páprica e a segurança dos consumidores.

**Tabela 3.** Dados recentes disponíveis na literatura sobre a ocorrência de aflatoxinas e ocratoxina A em páprica.

Referência	País	Método	Nº amostras	Incidência AFT (%)	Variação (µg/kg)	Incidência OTA (%)	Variação (µg/kg)
Martins et al. (2001)	Portugal	CLAE	12	66,7	1,0 - 20,0	-	-
Bircan et al. (2005)	Turquia	CLAE	30	90	0,5 - 124,6	-	-
Zinedine et al. (2006)	Marrocos	CLAE	14	100	Média 5,23	-	-
Bircan et al. (2008)	Turquia	CLAE	23	83	0,38 - 14,71	-	-
Hierro et al. (2008)	Espanha	CLAE	21	90,5	0,7 - 4,5	66,7	0,7 - 73,8
Shundo et al. (2009)	Brasil	CLAE	70	82,9	0,5 - 7,3	85,7	0,2 - 97,2
Ahn et al. (2010)	Coréia do Sul	CLAE	192	-	-	21,9	0,84 - 34,96
Santos et al. (2011)	Espanha	CLAE	21	100	1,8 - 83,7	100	4,3 - 474,7
Gherbawy et al. (2015)	Arábia Saudita	CLAE	60	56,7	20,0 - 200,0	-	-
Ham et al. (2016)	Coréia do Sul	CLAE	30	0	ND	10	1,03 - 2,08

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Amostras**

Foi adquirido um total de 80 amostras de páprica, 40 do tipo picante e 40 do tipo doce, sendo 60 amostras a granel e 20 amostras embaladas, obtidas em estabelecimentos comerciais de São Paulo, Campinas, Sorocaba e Americana, no período de Março de 2017 à Agosto de 2018. As amostras a granel estavam armazenadas em recipientes de plástico transparente e foram pesadas no momento da compra. Foram coletados de 200g a 500g por amostra.

As amostras foram mantidas em temperatura ambiente até o término das análises. As análises foram realizadas no laboratório de micologia e micotoxinas do Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos (CCQA) do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), em Campinas – SP.

### **4.2 Atividade de água**

A atividade de água das amostras foi obtida através da leitura no equipamento Aqualab Serie 3TE (Decagon, Pullman, WA, EUA) a 25°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ), em triplicata.

### **4.3 Diluição decimal seriada e plaqueamento em superfície**

Em bolsas estéreis, 25 g da amostra foram diluídas em 225mL de água peptonada 0,1% após homogeneização em Stomacher (Stomacher Laboratory Blender 400, Seward Medical). Foram realizadas as demais diluições seriadas, retirando uma alíquota de 0,1mL de cada diluição para plaqueamento em superfície em meio Dichloran 18% Glycerol Agar (DG18). As placas foram incubadas a 25°C por 5 dias.

O limite de detecção do método foi de 10 UFC/g. Para análise dos resultados, foram selecionadas placas contendo entre 15 a 150 unidades formadoras de colônias (UFC), com a expressão dos resultados em UFC/g de amostra (PITT; HOCKING, 2009). Em caso de nenhum crescimento fúngico visível, a análise foi repetida com a diminuição do limite de detecção do método, plaqueando 1mL da primeira diluição em meio DG18, com incubação a 25°C por 5 dias.

#### 4.4 Isolamento e identificação das espécies/grupos

De acordo com PITT & HOCKING (2009), para purificação das colônias do meio DG18, foi realizada a inoculação em três pontos em meio Czapek Yeast Extract Agar 20% Sucrose (CY20S) a 25°C por 14 dias para as espécies de *Eurotium* e em meio Czapek Yeast Extract Agar (CYA) a 25°C por 7 dias para as espécies de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e demais.

Para avaliação das características morfológicas (diâmetro e coloração das colônias, presença de esclerócios e exsudatos, e diâmetro, cor e rugosidade dos conídios e conidióforos) os gêneros isolados foram inoculados em meios específicos. Para a identificação das espécies de *Aspergillus*, segundo KLICH & PITT (1988), foram utilizados os meios CYA e o meio Malt Extract Agar (MEA) (25°C e 37°C por 7 dias). Para as colônias de *Penicillium*, foram utilizados os meios CYA e MEA (25°C por 7 dias) e o meio Creatine Sucrose Agar (CREA) (25°C por 7 dias), para identificação segundo Pitt (2000).

Para as demais espécies isoladas, foram utilizadas as chaves de classificação de SAMSON *et al.* (2010) e PITT & HOCKING (2009).

A identificação dos isolados foi realizada utilizando como base as chaves taxonômicas e as características morfológicas macroscópicas (diâmetro e coloração das colônias e presença de esclerócios e exsudatos em todas as temperaturas e meios testados) e microscópicas (diâmetro, cor e rugosidade dos conídios e conidióforos em CYA 25°C).

#### 4.5 Avaliação do potencial toxigênicos das cepas

Todas as espécies de *Aspergillus* section *Nigri* e *Circumdati* foram testadas quanto à capacidade de produção de ocratoxina A e section *Flavi* testadas quanto à produção de aflatoxinas.

Os fungos potencialmente toxigênicos foram inoculados no meio Yeast Extract Sucrose Agar (YESA) e incubados a 25°C por 7 dias. Após o período de incubação foi realizada a técnica de ágar plug associada à cromatografia de camada delgada, segundo FILTENBORG *et al.* (1983).

Para a análise, um pequeno pedaço da colônia foi cortado e adicionadas 2 gotas da solução metanol : clorofórmio (1:1) para extração da toxina. O pedaço da colônia foi pressionado sobre uma placa de sílica gel (Merck, Darmstadt, Alemanha), com medidas de 20x10cm, juntamente com os padrões de aflatoxinas e ocratoxina A para comparação com as cepas. A placa seguiu para realização da cromatografia de camada delgada em

cuba de vidro, utilizando como fase móvel a solução tolueno: acetato de etila: ácido fórmico 90%: clorofórmio (7:5:2:5, v/v/v/v).

A leitura foi realizada em câmara com luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 365 e 254nm. O resultado foi qualitativo, através da comparação da intensidade e cor da fluorescência e do fator de retenção das cepas em relação ao padrão aplicado.

## **4.6 Análise de aflatoxinas e ocratoxina A em páprica**

### **4.6.1 Aflatoxinas – Extração e limpeza**

A análise de aflatoxinas em páprica foi realizada seguindo o método proposto por STROKA *et al.*, (2000) com modificações.

Foram pesados 12,5g da amostra em frascos de vidro de 250mL e adicionados 1,25g de NaCl e 75mL do solvente de extração MeOH : H<sub>2</sub>O (8:2). Após homogeneização em shaker por 30 minutos, todo o conteúdo do frasco seguiu para etapa de filtração com filtro qualitativo e filtro de fibra de vidro. Em seguida, 10mL do filtrado foram transferidos para um balão volumétrico e adicionados 60mL de solução PBS pH 7,0. Todo o conteúdo do balão foi passado pela coluna de imunoafinidade EASI-EXTRACT® AFLATOXIN (R-Biopharm AG, Alemanha), em um fluxo de 2-3mL/min, e lavado com 30mL de água ultra pura (MilliQ, França).

A etapa de eluição foi realizada com 1250µL de metanol HPLC e 1750µL de água ultra pura. O extrato da eluição foi recolhido em frasco âmbar e armazenado em refrigeração até a etapa de injeção. Antes da injeção, o extrato passou por filtração em filtro PVDF com poro de 0,22µm (Analítica, China). Foram injetados 20µL em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) com detector de fluorescência (Agilent, EUA).

### **4.6.2 Ocratoxina A – Extração e limpeza**

A análise de ocratoxina A em páprica foi realizada seguindo o método proposto por VARGAS *et al.*, (2005) com modificações.

Foram pesados 12,5g da amostra em frascos de vidro de 250mL e adicionados 100mL do solvente de extração MeOH : Bic 3% (1:1). Após homogeneização em shaker por 30 minutos, todo o conteúdo do frasco seguiu para etapa de filtração com filtro qualitativo e filtro de fibra de vidro. Em seguida, 4mL do filtrado foram transferidos para um

balão volumétrico de 100mL e o volume foi completado com solução PBS pH 7,0. Todo o conteúdo do balão foi passado pela coluna de imunoafinidade OCHRAPREP® (R-Biopharm AG, Alemanha), em um fluxo de 2-3mL/min, e lavado com 30mL de água ultra pura (MilliQ, França).

A etapa de eluição foi realizada com em quatro fases de 1mL de metanol HPLC, totalizando 4mL. O extrato da eluição foi recolhido em frasco âmbar e seco em fluxo de nitrogênio líquido. O extrato seco foi armazenado em refrigeração até a etapa de injeção. Antes da injeção, o extrato foi ressuspendido em 300µL de fase móvel ACN: MeOH: H<sub>2</sub>O: Ác. Acético (35:35:29:01) e filtrado em filtro PVDF com poro de 0,22µm (Analítica, Brasil). Foram injetados 20µL em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) com detector de fluorescência (Agilent, EUA).

#### **4.6.3 Parâmetros do HPLC**

Foi utilizado, para determinação das aflatoxinas e ocratoxina A nas amostras de páprica, o Cromatógrafo Agilent 1260 Infinity LC System (Agilent, EUA), com injetor automático e detector de fluorescência.

Para aflatoxinas, a coluna utilizada para separação cromatográfica foi a coluna de C18 4.6x150mm, 5µm (Agilent, EUA) com pré-coluna C18 4.6x20mm. Para derivatização das aflatoxinas B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub> foi associado o KOBRA®CELL (R-biopharm Rhône Ltd., Escócia). O detector de fluorescência (Agilent, EUA), nos comprimentos de onda de 362nm (excitação) e 455nm (emissão). A fase móvel utilizada foi H<sub>2</sub>O: ACN: MeOH (6:2:3, v/v/v), com brometo de potássio (119 mg/L) e ácido nítrico (4M, 350µL/L), em fluxo isocrático de 1mL/min. A temperatura atingida pela coluna foi de 40°C, e o tempo de corrida das amostras foi de 9 minutos.

Para ocratoxina A, a coluna utilizada foi a C18 4.6x100mm, 3,5µm (Agilent, EUA). Foi utilizado o detector de fluorescência (Agilent, EUA), nos comprimentos de onde de 333nm de excitação e 477nm de emissão. A fase móvel utilizada foi H<sub>2</sub>O: MeOH: ACN: Ác. Acético (35:35:29:01), em fluxo isocrático de 0,8mL/min. A temperatura atingida pela coluna foi de 40°C, e o tempo de corrida das amostras foi de 9 minutos.

#### **4.6.4 Otimização da metodologia de aflatoxinas e ocratoxina A em páprica**

Para a otimização da metodologia, amostras de páprica foram fortificadas com padrões de aflatoxinas e ocratoxina A em dois níveis conhecidos, em triplicata.

Para aflatoxinas, os níveis de contaminação foram de 1,8 e 12,6µg/Kg e para ocratoxina A, os níveis foram de 0,9 e 14,4µg/Kg. Os valores de recuperação para cada nível foram obtidos. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram calculados seguindo EURACHEM (2014), após realização de 8 extrações de amostras fortificadas com um nível baixo de aflatoxinas e ocratoxina A e cálculo do desvio padrão e desvio padrão relativo.

Para cada dia de extração foi realizada a análise de uma amostra controle positivo.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Atividade de água**

A média da atividade de água (Aa) obtida foi de 0,535, variando de 0,336 a 0,62. Todas as amostras apresentaram resultados dentro do limite seguro de até 0,65 estabelecido pela European Spice Association (ESA, 2015).

### **5.2 Isolamento e identificação das espécies/grupos**

Das 80 amostras analisadas, 58 (72,5%) apresentaram contaminação por fungos filamentosos.

Foi isolado um total de 1179 fungos, contando com 19 espécies ou grupos distintos de fungos. A tabela 4 apresenta os valores de frequência de ocorrência (%), média (UFC/g) e variação de cada espécie/grupo isolados.

**Tabela 4.** Frequência de ocorrência (%), média (UFC/g) e variação (UFC/g) das espécies/grupos isolados das amostras de páprica.

	<b>Espécies/grupos</b>	<b>FO (%)</b>	<b>Média (UFC/g)</b>	<b>Variação (UFC/g)</b>
1	<i>Aspergillus section Nigri</i>	63,8	1,7x10 <sup>4</sup>	<10 - 2,4x10 <sup>5</sup>
2	<i>Aspergillus section Flavi</i>	55,0	2,4x10 <sup>3</sup>	<10 - 2,0x10 <sup>4</sup>
3	<i>Aspergillus chevalieri</i>	47,5	8,7x10 <sup>2</sup>	<10 - 6,0x10 <sup>3</sup>
4	<i>Rhizopus oryzae</i>	46,3	2,5x10 <sup>3</sup>	<10 - 2,5x10 <sup>4</sup>
5	<i>Aspergillus ruber</i>	25	1,1x10 <sup>3</sup>	<10 - 5,0x10 <sup>3</sup>
6	<i>Penicillium sp.</i>	10,0	5,8x10 <sup>2</sup>	<10 - 4,0x10 <sup>3</sup>
7	<i>Penicillium citrinum</i>	8,8	7,7x10 <sup>2</sup>	<10 - 2,0x10 <sup>3</sup>
8	<i>Aspergillus sp. (Eurotium sp.)</i>	7,5	1,2x10 <sup>3</sup>	<10 - 3,0x10 <sup>3</sup>
9	<i>Fusarium sp.</i>	7,5	9,4x10 <sup>3</sup>	<10 - 4,9x10 <sup>4</sup>
10	<i>Aspergillus terreus</i>	5,0	5,7x10 <sup>2</sup>	<10 - 1,0x10 <sup>3</sup>
11	<i>Aspergillus section Circumdati</i>	3,8	1,0x10 <sup>3</sup>	<10 - 1,0x10 <sup>3</sup>
12	<i>Aspergillus montevidensis</i>	3,8	1,2x10 <sup>3</sup>	<10 - 3,0x10 <sup>3</sup>
13	<i>Alternaria sp.</i>	3,8	7,0x10 <sup>2</sup>	<10 - 1,0x10 <sup>3</sup>
14	Levedura	3,8	1,1x10 <sup>3</sup>	<10 - 2,0x10 <sup>3</sup>
15	<i>Penicillium paneum</i>	2,5	5,5x10 <sup>2</sup>	<10 - 1,0x10 <sup>3</sup>
16	<i>Penicillium expansum</i>	1,3	1,0x10 <sup>3</sup>	<10 - 1,0x10 <sup>3</sup>
17	<i>Aspergillus clavatus</i>	1,3	1,0x10 <sup>2</sup>	<10 - 1,0x10 <sup>3</sup>
18	<i>Aspergillus versicolor</i>	1,3	5,0x10 <sup>3</sup>	<10 - 5,0x10 <sup>3</sup>
19	<i>Aspergillus nidulans</i>	1,3	1,0x10 <sup>3</sup>	<10 - 1,0x10 <sup>3</sup>

O grupo mais frequente isolado foi *Aspergillus section Nigri* (739 isolados), apresentando frequência de ocorrência de 63,8% e média de contaminação de 1,7x10<sup>4</sup> UFC/g. A ocorrência de *Aspergillus section Nigri* em produtos que sofrem processo de secagem tem sido relatada em diversos trabalhos. A capacidade de sobreviver em baixa atividade de água e a presença de melanina na constituição de sua parede celular, o que pode promover resistência térmica aos raios solares (PITT & HOCKING, 2009), são fatores que podem estar relacionados com o favorecimento deste grupo frente às demais espécies. Diferenças morfológicas foram verificadas nos isolados de *Aspergillus section Nigri* avaliadas neste trabalho, sendo assim foi realizada a separação em 12 grupos distintos. A figura 4 apresenta as colônias em meio Czapek Extrato de Levedura após período de incubação de 7 dias a 25°C. Dos 739 isolados de *Aspergillus section Nigri*, 737 (99,73%), após avaliação em microscopia óptica, apresentaram características semelhantes ao grupo de *Aspergillus* do agregado *niger*. Apresentaram métula e fiálide (bisseriados) e conídios de 4-5µm levemente rugosos. Os demais (n=2) se diferiram por suas características morfológicas, como a coloração da colônia, forma de esporulação e a presença de esclerócios. Representantes de cada grupo foram enviados para avaliação molecular.



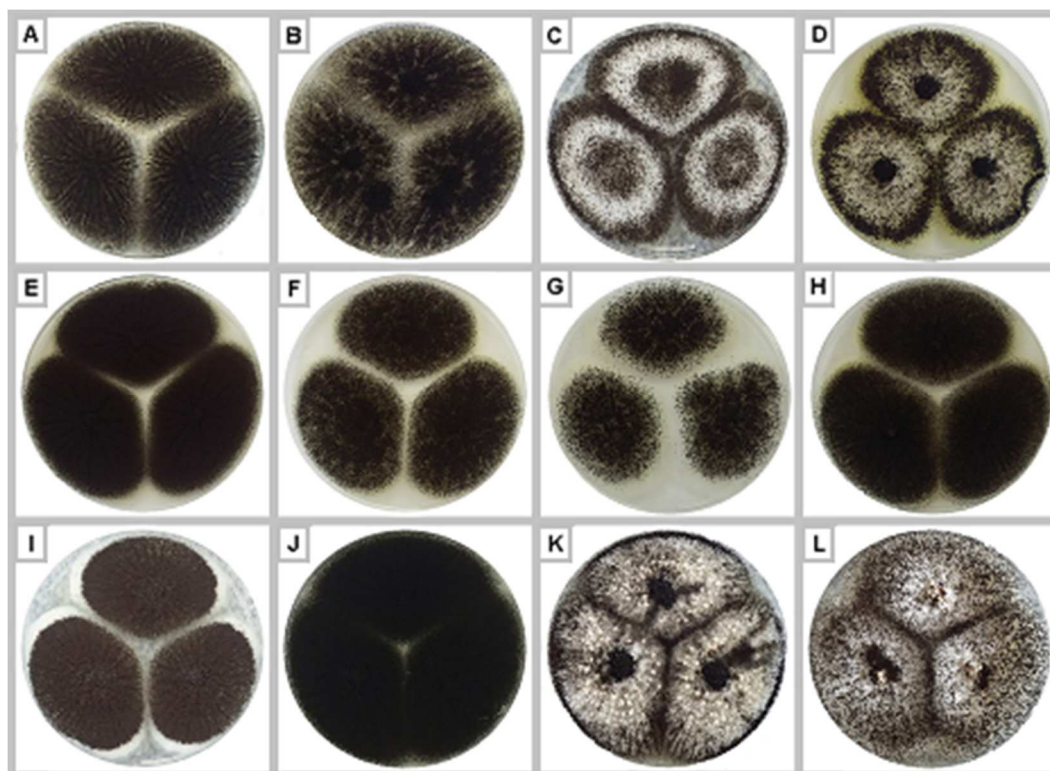


Figura 4. Representantes dos grupos de *Aspergillus* section *Nigri*. A – L, colônias em meio CYA (25°C, 7 dias). De A – L) grupos 1 a 12, respectivamente.

O segundo grupo de maior ocorrência foi *Aspergillus* section *Flavi* (195 isolados), com 55% de frequência de ocorrência e média de contaminação de  $2,4 \times 10^3$  UFC/g. As espécies do grupo de *Aspergillus* section *Flavi* também foram separadas em grupos, baseando-se nas características das colônias, presença de esclerócios e comportamento em meio *Aspergillus Flavus* e *Parasiticus* (AFPA) e cinco grupos distintos foram definidos. O grupo mais frequente, com 137 representantes apresentaram características morfológicas de *Aspergillus flavus*, colônias de coloração verde, bisseriados, em alguns isolados a presença de esclerócios, conídios lisos, reverso laranja no meio AFPA, e estiveram presentes 47,5% das amostras. Cinquenta e cinco isolados apresentaram características morfológicas de *Aspergillus tamarii*, colônias de coloração marrom, bisseriados, reverso marrom púrpura em meio AFPA, e estiveram presentes em 33,7% das amostras analisadas. Três isolados com características morfológicas macroscópicas diferentes, colônias mais algodonosas e/ou com pigmentação rosada no meio de cultura, foram encontradas em 2 amostras. Representantes destes grupos foram enviados para identificação por avaliação molecular. A figura 5 (A – E) apresenta representantes dos 5 grupos de *Aspergillus* section *Flavi* presentes.

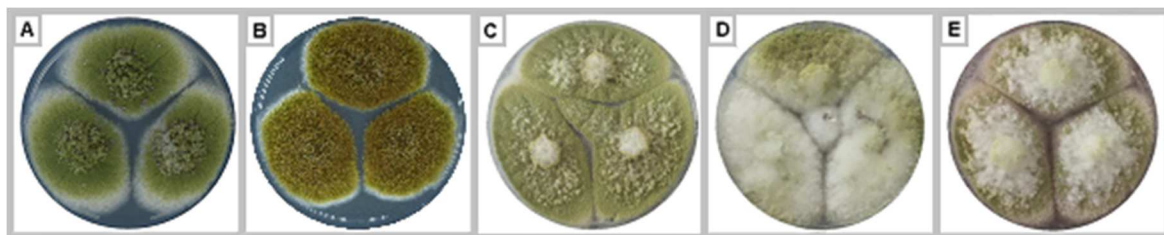


Figura 5. Representantes dos grupos de *Aspergillus* section *Flavi*. A – E, colônias em meio CYA (25°C, 7 dias). A) *A. flavus*. B) *A. tamarii*. C) *A. section Flavi* I. D) *A. section Flavi* II. E) *A. section Flavi* III.

*Aspergillus chevalieri* (47,5%) e *Rhizopus oryzae* (46,25%) também foram frequentes nas amostras avaliadas. A espécie *Aspergillus chevalieri* é uma espécie xerofílica e comumente encontrada em sementes, grãos e frutas que sofrem processo de secagem. *Rhizopus oryzae* é uma espécie que apresenta rápido crescimento, e embora necessite de atividade de água alta para desenvolvimento no produto, seus esporos podem permanecer mesmo em produtos com atividade de água baixa. Essa espécie sobrevive em ecossistemas simples, crescendo vigorosamente em temperaturas variando entre 25 a 45°C, sendo encontrada por toda a natureza e podem contaminar alimentos de origem vegetal (CANTABRANA et al., 2015). É uma espécie que está ganhando espaço nos processos de fermentação por indústrias alimentícias, promovendo novos sabores e texturas e melhora nas características nutricionais do alimento (DENTER et al., 1998; DINESH BABU et al., 2009).

Outras espécies também encontradas, porém em menor ocorrência foram: *A. rubrum* (25%), *Penicillium* sp. (10%), *P. citrinum* (8,75%), *Eurotium* sp. (7,5%), *Fusarium* sp. (7,5%), *A. terreus* (5%), *A. section Circumdati* (3,75%), *A. montevidensis* (3,75%), *Alternaria* sp. (3,75%), levedura (3,75%), *P. paneum* (2,5%), *P. expansum* (1,25%), *A. clavatus* (1,25%), *A. versicolor* (1,25%) e *A. nidulans* (1,25%).

*Aspergillus* section *Circumdati* também foi isolado das amostras analisadas, porém em baixa frequência (3,7%). Os três isolados apresentaram características semelhantes, colônia amarela, sem crescimento à 37°C, bisseriado e conídios pequenos (2,5 - 3µm) e lisos.

Avaliando separadamente as amostras a granel e embaladas, é possível notar baixa contaminação fúngica nas amostras embaladas. Das 20 amostras embaladas, apenas 5 (25%) apresentaram contaminação por fungos e foram identificadas 7 espécies/grupos isolados. Para as amostras a granel (n=60), 53 (88,33%) apresentaram contaminação por fungos. Embora a frequência de ocorrência de fungos tenha sido menor nas amostras embaladas, a média de contaminação por *Aspergillus* section *Nigri* e *Flavi* foi alta,  $2,55 \times 10^4$  e  $1,63 \times 10^3$  UFC/g respectivamente. A tabela 5 apresenta os valores de

frequência de ocorrência (%), média (UFC/g) e variação (UFC/g) das amostras à granel e embaladas.

**Tabela 5.** Frequência de ocorrência (%), média (UFC/g) e variação (UFC/g) das espécies/grupos isolados das amostras à granel e embaladas.

Espécies/grupos	Amostras à granel (n=60)			Amostras embaladas (n=20)		
	FO (%)	Média (UFC/g)	Variação (UFC/g)	FO (%)	Média (UFC/g)	Variação (UFC/g)
1 <i>Aspergillus section Nigri</i>	76,7	8,6x10 <sup>3</sup>	<10 - 4,1x10 <sup>4</sup>	25,0	1,0x10 <sup>5</sup>	<10 - 2,4x10 <sup>5</sup>
2 <i>Aspergillus section Flavi</i>	66,7	1,8x10 <sup>3</sup>	<10 - 6,0x10 <sup>3</sup>	25,0	6,5x10 <sup>3</sup>	<10 - 2,0x10 <sup>4</sup>
3 <i>Aspergillus chevalieri</i>	60,0	8,9x10 <sup>2</sup>	<10 - 6,0x10 <sup>3</sup>	10,0	5,5x10 <sup>2</sup>	<10 - 1,0x10 <sup>3</sup>
4 <i>Rhizopus oryzae</i>	66,7	1,3x10 <sup>3</sup>	<10 - 5,1x10 <sup>3</sup>	15,0	1,9x10 <sup>4</sup>	<10 - 2,5x10 <sup>4</sup>
5 <i>Aspergillus ruber</i>	31,7	1,1x10 <sup>3</sup>	<10 - 5,0x10 <sup>3</sup>	5,0	1,0x10 <sup>2</sup>	<10 - 1,0x10 <sup>2</sup>
6 <i>Penicillium sp.</i>	13,3	5,8x10 <sup>2</sup>	<10 - 4,0x10 <sup>3</sup>	0	<10	-
7 <i>Penicillium citrinum</i>	10,0	7,3x10 <sup>2</sup>	<10 - 2,0x10 <sup>3</sup>	5,0	1,0x10 <sup>3</sup>	<10 - 1,0x10 <sup>3</sup>
8 <i>Aspergillus sp. (Eurotium sp.)</i>	10,0	1,2x10 <sup>3</sup>	<10 - 3,0x10 <sup>3</sup>	0	<10	-
9 <i>Fusarium sp.</i>	8,3	1,4x10 <sup>3</sup>	<10 - 2,0x10 <sup>3</sup>	5,0	4,9x10 <sup>4</sup>	<10 - 4,9x10 <sup>4</sup>
10 <i>Aspergillus terreus</i>	6,7	5,7x10 <sup>2</sup>	<10 - 1,0x10 <sup>3</sup>	0	<10	-
11 <i>Aspergillus section Circumdati</i>	5,0	1,0x10 <sup>3</sup>	<10 - 1,0x10 <sup>3</sup>	0	<10	-
12 <i>Aspergillus montevidensis</i>	5,0	1,2x10 <sup>3</sup>	<10 - 3,0x10 <sup>3</sup>	0	<10	-
13 <i>Alternaria sp.</i>	5,0	7,0x10 <sup>2</sup>	<10 - 1,0x10 <sup>3</sup>	0	<10	-
14 Levedura	5,0	1,1x10 <sup>3</sup>	<10 - 2,0x10 <sup>3</sup>	0	<10	-
15 <i>Penicillium paneum</i>	3,3	5,5x10 <sup>2</sup>	<10 - 1,0x10 <sup>3</sup>	0	<10	-
16 <i>Penicillium expansum</i>	1,7	1,0x10 <sup>3</sup>	<10 - 1,0x10 <sup>3</sup>	0	<10	-
17 <i>Aspergillus clavatus</i>	1,7	1,0x10 <sup>2</sup>	<10 - 1,0x10 <sup>3</sup>	0	<10	-
18 <i>Aspergillus versicolor</i>	1,7	5,0x10 <sup>3</sup>	<10 - 5,0x10 <sup>3</sup>	0	<10	-
19 <i>Aspergillus nidulans</i>	1,7	1,0x10 <sup>3</sup>	<10 - 1,0x10 <sup>3</sup>	0	<10	-

Quando analisamos as amostras separadas entre os tipos doce e picante, é possível observar que não houve diferença em relação à contaminação fúngica. Das 40 amostras do tipo picante analisadas, 30 (75%) apresentaram contaminação por fungos, contando com 14 espécies/grupos distintos. Para o tipo doce, 28 (70%) das 40 amostras apresentaram contaminação por fungos, contando com 18 espécies/grupos distintos. Os fungos potencialmente toxigênicos de *Aspergillus section Flavi*, *Nigri* e *Circumdati* foram isolados de ambos os tipos, com dados de frequência de ocorrência, média e variação semelhantes. A tabela 6 apresenta os valores de frequência de ocorrência (%), média (UFC/g) e variação (UFC/g) das amostras dos tipos picante e doce.

**Tabela 6.** Frequência de ocorrência (%), média (UFC/g) e variação (UFC/g) das espécies/grupos isolados das amostras picantes e doces.

Espécies/grupos	Amostras picantes (n=40)			Amostras doces (n=40)		
	FO (%)	Média (UFC/g)	Varição (UFC/g)	FO (%)	Média (UFC/g)	Varição (UFC/g)
1 <i>Aspergillus section Nigri</i>	62,5	1,6x10 <sup>4</sup>	<10 – 2,4x10 <sup>5</sup>	65,0	1,9x10 <sup>4</sup>	<10 – 2,2x10 <sup>5</sup>
2 <i>Aspergillus section Flavi</i>	47,5	1,9x10 <sup>3</sup>	<10 – 1,0x10 <sup>4</sup>	62,5	2,8x10 <sup>3</sup>	<10 – 2,0x10 <sup>4</sup>
3 <i>Aspergillus chevalieri</i>	55,0	6,8x10 <sup>2</sup>	<10 – 6,0x10 <sup>3</sup>	40,0	1,1x10 <sup>3</sup>	<10 – 5,0x10 <sup>3</sup>
4 <i>Rhizopus oryzae</i>	52,5	1,3x10 <sup>3</sup>	<10 – 6,0x10 <sup>3</sup>	55,0	2,7x10 <sup>3</sup>	<10 – 4,0x10 <sup>3</sup>
5 <i>Aspergillus ruber</i>	17,5	6,8x10 <sup>2</sup>	<10 – 4,0x10 <sup>3</sup>	32,5	1,3x10 <sup>3</sup>	<10 – 5,0x10 <sup>3</sup>
6 <i>Penicillium sp.</i>	5,0	1,0x10 <sup>2</sup>	<10 – 1,0x10 <sup>2</sup>	15,0	7,3x10 <sup>2</sup>	<10 – 4,0x10 <sup>3</sup>
7 <i>Penicillium citrinum</i>	7,5	7,3x10 <sup>2</sup>	<10 – 1,0x10 <sup>3</sup>	10,0	8,0x10 <sup>2</sup>	<10 – 2,0x10 <sup>3</sup>
8 <i>Aspergillus sp. (Eurotium sp.)</i>	7,5	1,1x10 <sup>3</sup>	<10 – 2,1x10 <sup>3</sup>	7,5	1,3x10 <sup>3</sup>	<10 – 3,0x10 <sup>3</sup>
9 <i>Fusarium sp.</i>	7,5	1,7x10 <sup>4</sup>	<10 – 4,9x10 <sup>4</sup>	7,5	1,7x10 <sup>3</sup>	<10 – 2,0x10 <sup>3</sup>
10 <i>Aspergillus terreus</i>	5,0	6,0x10 <sup>2</sup>	<10 – 1,0x10 <sup>3</sup>	5,0	5,5x10 <sup>2</sup>	<10 – 1,0x10 <sup>3</sup>
11 <i>Aspergillus section Circumdati</i>	2,5	1,0x10 <sup>3</sup>	<10 – 1,0x10 <sup>3</sup>	5,0	2,0x10 <sup>3</sup>	<10 – 1,0x10 <sup>3</sup>
12 <i>Aspergillus montevidensis</i>	5,0	3,5x10 <sup>2</sup>	<10 – 5,0x10 <sup>2</sup>	2,5	3,0x10 <sup>3</sup>	<10 – 3,0x10 <sup>3</sup>
13 <i>Alternaria sp.</i>	2,5	1,0x10 <sup>2</sup>	<10 – 1,0x10 <sup>2</sup>	5,0	1,0x10 <sup>3</sup>	<10 – 1,0x10 <sup>3</sup>
14 Levedura	0	<10	-	10,0	1,1x10 <sup>3</sup>	<10 – 2,0x10 <sup>3</sup>
15 <i>Penicillium paneum</i>	0	<10	-	5,0	5,5x10 <sup>2</sup>	<10 – 2,0x10 <sup>3</sup>
16 <i>Penicillium expansum</i>	2,5	1,0x10 <sup>3</sup>	<10 – 1,0x10 <sup>3</sup>	0	<10	-
17 <i>Aspergillus clavatus</i>	0	<10	-	2,5	1,0x10 <sup>2</sup>	<10 – 1,0x10 <sup>2</sup>
18 <i>Aspergillus versicolor</i>	0	<10	-	2,5	5,0x10 <sup>3</sup>	<10 – 5,0x10 <sup>3</sup>
19 <i>Aspergillus nidulans</i>	0	<10	-	2,5	1,0x10 <sup>3</sup>	<10 – 1,0x10 <sup>3</sup>

### 5.3 Avaliação do potencial toxigênico das cepas

Das 1179 cepas isoladas, 937 pertenciam aos grupos de fungos potencialmente toxigênicos, sendo eles 739 isolados de *Aspergillus section Nigri* (78,87%), 195 isolados de *Aspergillus section Flavi* (20,81%) e 3 isolados de *Aspergillus section Circumdati* (0,32%). *Aspergillus section Nigri* e *Flavi* foram os grupos toxigênicos com maior ocorrência encontrados tanto nas amostras à granel quanto nas amostras embaladas. *Aspergillus section Circumdati* teve baixa ocorrência, e foram isolados apenas nas amostras à granel. Os fungos dos grupos *Aspergillus section Nigri* e *Flavi* apresentaram maior frequência de ocorrência nas amostras à granel, porém as amostras embaladas apresentaram maior média de contaminação por estes grupos.

Nenhum isolado dos grupos de *Aspergillus section Nigri* e *Circumdati* foram produtoras de ocratoxina A. Para os isolados de *Aspergillus section Flavi*, 63 (46%) dos isolados classificados como *Aspergillus flavus* foram produtores das aflatoxinas do grupo B. Os isolados com características de *A. tamarii* foram confirmados como não produtores

de aflatoxinas. A tabela 7 apresenta as porcentagens de produtores de aflatoxinas e ocratoxina A.

**Tabela 7.** Número de isolados, frequência de ocorrência (%), média (UFC/g) e porcentagem de produtores de aflatoxinas e ocratoxina A por grupo

Fungos	N° de isolados	N° de produtores	FO (%)	Média (UFC/g)	% de produtores do grupo B
<i>Aspergillus niger</i> agregados	737	0	63,75	1,12x10 <sup>4</sup>	0
<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	2	0	2,5	2,5x10	0
<i>Aspergillus flavus</i>	137	63	47,5	1,28x10 <sup>3</sup>	46,0
<i>Aspergillus tamarii</i>	55	0	33,75	5,86x10 <sup>2</sup>	0
<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	3	0	2,5	3,75x10	0
<i>Aspergillus</i> section <i>Circumdati</i>	3	0	3,75	3,75x10	0

#### 5.4 Ocorrência de aflatoxinas e ocratoxina A nas amostras de páprica

Para avaliar a performance do método foram calculadas a recuperação, utilizando dois níveis de fortificação. Para aflatoxinas, o nível baixo de 1,8µg/kg e alto de 12,6µg/kg. Para ocratoxina A o nível baixo de 0,9µg/kg e o nível alto 14,5µg/kg. Foram realizadas 3 repetições para cada nível testado.

A tabela 8 apresenta os valores das recuperações de aflatoxinas e ocratoxina A para cada nível testado.

**Tabela 8.** Recuperação (%) de aflatoxinas e ocratoxina A em 2 níveis de contaminação.

Concentração (ng/g)	Recuperação (%)					Concentração (ng/g)	Recuperação (%)				
	rep 1	rep 2	rep 3	Média	rep 1		rep 2	rep 3	Média		
<b>B<sub>1</sub></b>	0,652	75,55	81,07	83,28	79,97	4,564	107,97	102,92	131,95	114,28	
<b>B<sub>2</sub></b>	0,586	97,34	94,26	100,41	97,37	4,099	101,81	96,19	121,93	106,64	
<b>G<sub>1</sub></b>	0,360	93,67	89,0	103,0	95,22	2,520	104,71	98,05	121,38	108,05	
<b>G<sub>2</sub></b>	0,209	65,19	52,84	56,95	58,37	1,462	52,63	47,21	58,54	52,79	
<b>Totais</b>	1,806	86,96	85,23	91,41	87,87	12,645	98,93	93,33	88,65	93,64	
<b>OTA</b>	0,961	98,64	88,89	79,15	88,90	14,461	87,03	95,91	118,27	100,40	

Levando em consideração a Diretiva da Comunidade Européia N°1881/2006 (EC, 2006), que estabelece os valores de recuperação de: 50-120% para nível <1µg/kg; 70-110% entre 1-10µg/kg; e 80-110% para nível >10µg/kg, para aflatoxinas totais, o método utilizado para análise de aflatoxinas em páprica apresentou resultado satisfatório para aflatoxinas totais, com recuperação variando de 85,23 a 98,93%. Considerando as

aflatoxinas separadamente , é possível observar que a recuperação de G<sub>2</sub> foi baixa em ambos os níveis testados, com recuperação variando de 47,21 a 65,19%. A causa para estes valores baixos pode estar relacionada com a interferência na detecção causada por sujidades na matriz, retenção inadequada da coluna de imunoafinidade ou baixo rendimento do solvente de extração.

O método de análise de ocratoxina em páprica apresentou resultado satisfatório segundo os valores recomendados pela Diretiva da Comunidade Européia N° 401/2006 (EC, 2006), 50-120% para nível <1µg/kg; 70-110% entre 1-10µg/kg, com recuperação média de 88,9% para o nível 0,96µg/kg, e 100,4% para o nível 14,5µg/kg, com níveis variando de 79,15 a 118,27%.

Para aflatoxinas, os valores de limite de detecção (LOD) foram de 0,15µg/kg para B<sub>1</sub>, 0,03µg/kg para B<sub>2</sub>, 0,02µg/kg para G<sub>1</sub>, 0,02µg/kg para G<sub>2</sub> e 0,22µg/kg para aflatoxinas totais e os valores de limites de quantificação (LOQ) foram de 0,51µg/kg para B<sub>1</sub>, 0,1µg/kg para B<sub>2</sub>, 0,06µg/kg para G<sub>1</sub>, 0,09µg/kg para G<sub>2</sub> e 0,76µg/kg para aflatoxinas totais. Para ocratoxina A, o limite de detecção (LOD) foi de 0,27µg/kg e o limite de quantificação (LOQ) foi de 0,9µg/kg.

As tabelas 9 e 10 apresentam os resultados de aflatoxinas e ocratoxina A das amostras de páprica analisadas separadas em amostras à granel e embaladas. As tabelas 11 e 12 apresentam os resultados de aflatoxinas e ocratoxina A das amostras de páprica analisadas separadas nos tipos picante e doce.

**Tabela 9.** Valores de média (µg/kg), mediana (µg/kg), variação (µg/kg) e frequência de ocorrência (%) de AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub> e aflatoxinas totais nas amostras de páprica separada em à granel e embaladas.

		<b>AFB<sub>1</sub></b>	<b>AFB<sub>2</sub></b>	<b>AFG<sub>1</sub></b>	<b>AFG<sub>2</sub></b>	<b>AFLA Totais</b>
<b>Amostras à granel (n=60)</b>	Média (µg/kg)	2,97	0,27	0,30	0,04	3,57
	Mediana (µg/kg)	2,12	0,20	0,21	n.d.	2,78
	Variação (µg/kg)	0,01 - 15,99	n.d. - 1,72	n.d. - 2,80	n.d. - 0,73	n.d. - 17,83
	FO (%)	100	91,66	71,66	25	100
<b>Amostras embaladas (n=20)</b>	Média (µg/kg)	1,16	0,07	0,04	n.d.	1,27
	Mediana (µg/kg)	0,44	n.d.	n.d.	n.d.	0,46
	Variação (µg/kg)	n.d. - 5,06	n.d. - 0,31	n.d. - 0,21	n.d.	n.d. - 5,57
	FO (%)	85	45	20	-	85

**Tabela 10.** Valores de média ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), mediana ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), variação ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) e frequência de ocorrência (%) de ocratoxina A nas amostras de páprica separada em à granel e embaladas.

			OTA
<b>Amostras à granel (n=60)</b>		Média ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	37,97
	FO (%): 100	Mediana ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	28,09
		Variação ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	0,56 - 129,68
<b>Amostras embaladas</b>		Média ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	35,92
	FO (%): 100	Mediana ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	16,67
		Variação ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	4,4 - 223,0

**Tabela 11.** Valores de média ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), mediana ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), variação ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) e frequência de ocorrência (%) de AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub> e aflatoxinas totais nas amostras de páprica dos tipos picante e doce.

		AFB <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	AFG <sub>1</sub>	AFG <sub>2</sub>	AFLA Totais
<b>Amostras picantes (n=40)</b>	Média ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	2,28	0,16	0,20	0,02	2,70
	Mediana ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	1,58	0,18	0,17	n.d.	2,23
	Variação ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	n.d. – 15,99	n.d. – 1,67	n.d. – 0,99	n.d. – 0,24	n.d. – 17,83
	FO (%)	97,5	77,5	57,5	20,0	97,5
<b>Amostras doces (n=40)</b>	Média ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	2,76	0,23	0,27	0,04	3,28
	Mediana ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	1,89	0,19	0,17	n.d.	2,30
	Variação ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	n.d. – 14,51	n.d. – 1,72	n.d. – 2,80	n.d. – 0,73	n.d. – 16,23
	FO (%)	95,0	82,5	60,0	17,5	95,0

**Tabela 12.** Valores de média ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), mediana ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), variação ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) e frequência de ocorrência (%) de ocratoxina A nas amostras de páprica dos tipos picante e doce.

			OTA
<b>Amostras picantes (n=40)</b>		Média ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	37,86
	FO (%): 100	Mediana ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	20,96
		Variação ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	0,56 – 202,29
<b>Amostras doces (n=40)</b>		Média ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	37,08
	FO (%): 100	Mediana ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	23,59
		Variação ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	1,06 – 223,0

Das 80 amostras analisadas, 77 (96,25%) apresentaram contaminação por aflatoxinas totais, em níveis variando de 0,01 a 17,83 $\mu\text{g}/\text{kg}$  e média de 2,99 $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Todas as amostras apresentaram valores de contaminação por aflatoxinas dentro do limite estabelecido pela RDC N° 07/2011, de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

Quando avaliadas separadamente pela forma de comercialização, todas as amostras à granel (60) apresentaram contaminação por aflatoxinas totais, em níveis variando de não detectado a 17,83 $\mu\text{g}/\text{kg}$  e média de 3,57 $\mu\text{g}/\text{kg}$ . E dentre as 20 amostras

embaladas, 17 (85%) apresentaram contaminação em níveis variando de não detectado a 5,57µg/kg e média de 1,27µg/kg.

Avaliadas pelo tipo, 39 (97,5%) das 40 amostras picantes apresentaram contaminação por aflatoxinas totais, em níveis variando de não detectado a 17,83µg/kg e média de 2,70µg/kg. E das 40 amostras doces, 38 (95%) apresentaram contaminação por aflatoxinas totais, em níveis variando de não detectado a 16,23µg/kg e média de 3,28µg/kg.

Dentre as amostras contaminadas por aflatoxinas (n=77), 21 (27,27%) apresentaram contaminação por fungos potencialmente toxigênicos do grupo Flavi, com média de  $2,3 \times 10^2$  UFC/g, e 56 (72,73%) não apresentaram contaminação por este grupo (<10 UFC/g). Este fato é indicativo de que as aflatoxinas foram produzidas em alguma etapa do processamento da páprica e estas permaneceram no produto mesmo após a morte dos fungos.

Todas as amostras apresentaram contaminação por ocratoxina A, em níveis variando de 0,56 a 223µg/kg e média de 37,46µg/kg. Para as amostras à granel a variação de contaminação foi de 0,56 a 129,68µg/kg e a média de 37,97µg/kg, e para as amostras embaladas a variação foi de 4,4 a 223µg/kg e a média de 35,92µg/kg. As amostras picantes apresentaram variação de 0,56 a 202,29µg/kg e média de 37,86µg/kg, e as amostras doces apresentaram variação de 1,06 a 223,0µg/kg e média de 37,08µg/kg.

Das 80 amostras analisadas, 33 (41,25%) apresentaram níveis de contaminação acima do limite de 30µg/kg estabelecido pela RDC N° 07/2011, com média de 72,61µg/kg e variação de 31,73 a 223µg/kg. Dentre as amostras acima do limite de contaminação por ocratoxina A, 29 (87,88%) foram amostras à granel e 4 (12,12%) foram amostras embaladas.

A alta frequência de fungos section *Nigri* nas amostras coincide com a alta porcentagem e níveis de contaminação por ocratoxina A. Porém, embora a contaminação por fungos toxigênicos e ocratoxina A seja alta, nenhuma cepa das 937 testadas foram produtoras de ocratoxina A. Este fato pode ser explicado pela morte dos fungos produtores e permanência da ocratoxina A nas amostras, ou ainda, pela técnica de diluição utilizada para isolamento e contagem dos fungos e pela técnica utilizada para avaliação do potencial de produção dos isolados. A técnica de diluição apresenta a limitação de quantificar esporos e não a real contaminação da amostra e é possível que as espécies produtoras tenham sido suprimidas e desconsideradas na contagem. A outra questão é método de avaliação do potencial de produção de ocratoxina A pelos isolados, baseado na detecção por cromatografia de camada delgada, que apresenta maior limite de detecção e é menos sensível quando comparada com CLAE. Neste caso, alguns isolados produtores podem ter sido desconsiderados.



## 6. DISCUSSÃO GERAL

Os fungos com maior predominância nas amostras de páprica foram dos grupos *Aspergillus* section *Nigri* e *Flavi*, coincidindo com trabalhos já publicados que não reportaram as espécies mas sim o gênero *Aspergillus* como o mais comum encontrado em amostras de pimentas do gênero *Capsicum* e páprica (GHERBAWY *et al.*, 2015; HASHEM *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2011; ALMELA *et al.*, 2007; ERDOGAN, 2004). A predominância do gênero *Aspergillus* nas amostras de páprica é preocupante por se tratar de um gênero amplamente distribuído em países tropicais, como o Brasil, e conhecido por apresentar espécies toxigênicas.

A alta frequência desse grupo pode estar relacionada com as condições ambientais típicas de países tropicais, como temperatura e umidade relativa elevadas. Além de favorecer o desenvolvimento fúngico, as condições ambientais dos países tropicais podem também favorecer a produção de micotoxinas por esses fungos (KABAK *et al.*, 2017). Para o processamento da páprica, na qual é realizada a secagem dos frutos e estes são expostos à luz solar em ambientes abertos, este produto fica susceptível à contaminação por fungos e às condições climáticas, podendo acarretar uma secagem ineficiente (BOKHARI, 2007; KIM, 2017).

Além das condições ambientais, o desenvolvimento fúngico pode estar relacionado com processos inadequados durante o processamento e armazenamento, além de métodos inadequados no manuseio e más práticas de higiene por parte dos funcionários (DUARTE & ALBUQUERQUE, 2005; ABOU-ARAB *et al.*, 1999).

O gênero *Aspergillus* sp. (*Eurotium*) também foram frequentes nas amostras avaliadas, principalmente *Aspergillus chevalieri*, sendo isolado tanto nas amostras à granel quanto nas embaladas. Segundo TANIWAKI *et al.* (2016), os fungos desse grupo estão entre os fungos xerofílicos com maior ocorrência em condimentos. A baixa atividade de água após a secagem favorece a morte das demais espécies que não são xerofílicas e a sobrevivência destas espécies. A presença destas espécies não está relacionada com o risco à saúde uma vez que até o momento não há relatos de produção de micotoxinas com relevância por estas espécies.

Das 60 amostras à granel analisadas, 53 (88,33%) apresentaram contaminação por fungos, totalizando 19 espécies/grupos distintos, e das 20 amostras embaladas, apenas 5 (25%) apresentaram contaminação, com 7 espécies/grupos distintos. Essa diferença na contaminação entre amostras à granel e embaladas pode estar relacionada com a falta de controle das condições de comercialização das amostras vendidas à granel e/ou a utilização de técnicas de irradiação nas amostras embaladas. É de conhecimento que os

produtos vendidos à granel são armazenados por longos períodos de tempo e expostos com frequência ao ambiente externo, sem controle de umidade ou temperatura, podendo ocasionar não somente a contaminação por fungos, mas também seu desenvolvimento e produção de micotoxinas (CHOURASIA, 1995; GNONLONFIN *et al.*, 2013; DOMSCH *et al.*, 1980). A baixa contaminação das amostras embaladas e a ausência de fungos podem estar relacionadas com a utilização de técnicas para reduzir o desenvolvimento fúngico. É importante a adoção de técnicas que não promovam perda significativa do sabor, aroma e cor do produto, uma vez que a qualidade da páprica é medida com base nas suas características organolépticas. A técnica mais indicada para especiarias é a irradiação, que promove a redução de microrganismos e destruição de insetos sem afetar as características organolépticas (ICGFI, 1992).

Das amostras de páprica foram isolados os grupos *Aspergillus* section *Nigri*, *Flavi* e *Circumdati*, potencialmente toxigênicos. *Aspergillus* section *Nigri* e *Flavi* foram isolados tanto das amostras à granel quanto das amostras embaladas, enquanto *Aspergillus* section *Circumdati* foi isolado apenas das amostras à granel. BOKHARI (2007) também encontrou a predominância do gênero *Aspergillus*, principalmente de *A. niger* e *A. flavus* enquanto estudava amostras de pimentas do gênero *Capsicum*. Em um estudo em pimentas vermelhas da Arábia Saudita realizado por HASHEM & ALAMRI (2010) também foram encontrados fungos toxigênicos dos grupos *A. section Nigri*, *Flavi* e *Circumdati*.

Todas as cepas isoladas pertencentes à esses grupos foram testadas quanto à produção de micotoxinas. Nenhuma das cepas de *Aspergillus* section *Nigri* e *Circumdati* foi produtora de ocratoxina, enquanto 63 (46%) cepas classificadas como *A. flavus* foram produtoras de aflatoxinas do grupo B.

A presença de aflatoxinas, em especial a aflatoxina B<sub>1</sub>, e a ocratoxina A em alimentos é preocupante, por causa dos efeitos hepatotóxicos e nefrotóxicos que possuem. Segundo a RDC N° 07/2011 da ANVISA, o limite máximo para aflatoxinas totais é de 20µg/kg e para ocratoxina A é de 30µg/kg. O limite estabelecido pela Comissão Européia é de 10µg/kg para aflatoxinas totais, 5µg/kg para aflatoxina B<sub>1</sub> e 15µg/kg para ocratoxina A.

Das 80 amostras analisadas, 77 (96,25%) apresentaram contaminação por aflatoxinas. Todas apresentaram contaminação dentro do limite estabelecido pela ANVISA, com média de 3,57µg/kg e variação de 0,01 a 17,83µg/kg para as amostras à granel e média de 1,27µg/kg e variação de não detectado a 5,57µg/kg para as amostras embaladas. Um estudo realizado por BIRCAN *et al.* (2005) também evidenciou a diferença de contaminação por aflatoxinas em amostras a granel e embaladas. Estes encontraram contaminação por aflatoxinas em pimenta pretas em 40% das amostras à granel, e apenas

20% nas amostras embaladas. A menor contaminação nas amostras embaladas pode estar relacionada com o maior controle de qualidade por parte das empresas alimentícias, enquanto as amostras à granel não costumam passar por um controle de qualidade rígido. Outro ponto que pode aumentar a contaminação das amostras à granel é a exposição diária das amostras ao ambiente externo, sem controle de temperatura ou umidade (CHOURASIA, 1995; GNONLONFIN *et al.*, 2013; DOMSCH *et al.*, 1980).

A contaminação das amostras por ocratoxina A foi frequente e teve maior média de contaminação quando comparada à contaminação por aflatoxinas. Das 80 amostras no total analisadas, 33 (41,25%) apresentaram contaminação acima do limite estabelecido pela ANVISA, com média de 72,61µg/kg e variação de 31,73 a 223µg/kg. Resultados semelhantes foram obtidos por SANTOS *et al.*, (2010). Estes avaliaram 64 amostras de pimentas do gênero *Capsicum* e encontram a presença de aflatoxinas em 59% das amostras, em níveis variando de não detectado a 7,25µg/kg, enquanto a presença de ocratoxina A foi constatada em 98% das amostras, em níveis variando de não detectado a 281µg/kg. A diferença nos níveis de contaminação de páprica por aflatoxinas e ocratoxina A também pode ser observada no estudo realizado por SHUNDO *et al.*, (2009) com 70 amostras de páprica, na qual a contaminação por ocratoxina foi predominante, estando presente em 85,7% das amostras, em níveis variando de 0,2 a 97,2µg/kg, enquanto aflatoxinas esteve presente em 61,4% das amostras, em níveis variando de 0,5 a 7,3µg/kg. A contaminação da páprica por micotoxinas, principalmente ocratoxina A é preocupante pois os níveis encontrados excedem os níveis considerados seguros e estabelecidos na legislação.

É importante a realização de estudos como este que visam o acompanhamento da qualidade microbiológica da páprica consumida no Brasil. Com os dados obtidos à partir é possível adotar medidas preventivas que visam reduzir a contaminação da páprica por fungos e a produção de micotoxinas, em toda a cadeia produtiva, diminuindo os riscos à saúde humana.

## 7. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi constatada a presença de 19 espécies e grupos distintos de fungos filamentosos, sendo os de maior ocorrência: *Aspergillus* section *Nigri*, *Aspergillus* section *Flavi*, *Aspergillus chevalieri* e *Rhizopus oryzae*. E dentre os fungos de maior ocorrência estão os potencialmente toxigênicos, como os *Aspergillus* section *Nigri* e *Flavi* e a presença destas espécies indica um sério risco à saúde, devido à capacidade de produção de micotoxinas.

Das 80 amostras analisadas, 77 apresentaram contaminação por aflatoxinas, dentro do limite de 20µg/kg estabelecido pela Anvisa. Todas as amostras apresentaram contaminação por ocratoxina A, e 33 apresentaram níveis acima do limite de 30 µg/kg estabelecido pela ANVISA. Esta alta incidência de amostras contaminadas e os níveis elevados encontrados, principalmente por ocratoxina A, é um alerta para tomada de medidas que visem o controle e a redução destes contaminantes em páprica.

É importante, portanto, que sejam adotadas boas práticas de fabricação e higiene, nas etapas pré e pós-colheita, desde o campo até a comercialização, além de um rigoroso controle do teor de umidade do produto durante toda a cadeia produtiva. O atendimento a estes requisitos poderá acarretar o controle do desenvolvimento de espécies toxigênicas e garantia da qualidade e segurança aos consumidores.

#### 4. REFERÊNCIAS

ABARCA, M. L.; BRAGULAT, M. R.; SASTELLÁ, G.; CABAÑES, F. G. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 2650–2652, 1994.

ABOU-ARAB, A. A. K.; KAWTHER, M. S.; EL TANTAWY, M. E.; BADEAA, R. I.; KHAYRIA, N. Quantity estimation of some contaminants in commonly used medicinal plants in the Egyptian market. **Food Chemistry**, v. 67, n. 4, p. 357-363, 1999.

ADE-OMOWAYE, B. I. O.; RASTOGI, N. K.; ANGERSBACH, A.; KNORR, D. Osmotic dehydration of bell peppers: influence of high intensity electric field pulses and elevated temperature treatment. **Journal of Food Engineering**, p. 5435-5443, 2002.

AHN, J.; KIM, D.; JANG, H.; KIM, Y.; SHIM, W.; CHUNG, D. Occurrence of ochratoxin A in Korean red paprika and factors to be considered in prevention strategy. **Mycotoxin Research**, v. 26, p. 279-286, 2010.

ALMELA L; RABE V; SÁNCHEZ B; TORRELLA F; PÉREZ J.P.L; GABALDÓN J.A; GUARDIOLA L. Ochratoxin A in red paprika: Relationship with the origin of the raw material. **Food Microbiology**, v. 24, n. 4, p. 319-327, 2007.

ASTA - **American Spice Trade Association**. Official Analytical Methods. New Jersey: ASTA, 1985.

ANVISA- **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução RDC nº 07, de 18 de fevereiro de 2011.

BATTILANI, P.; PIETRI, A.; BERTUZZI T.; LANGUASCO, L.; GIORNI, P.; KOZAKIEWICZ, Z. Occurrence of ochratoxin A – Producing fungi in grapes grown in Italy. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 4, p. 633-636, 2003.

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

BENNETT, Joan W. An overview of the genus *Aspergillus*. **Aspergillus: molecular biology and genomics**, p. 1-17, 2010.

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

BIRCAN, C.; BARRINGER, S. A.; ULKEN, U.; PEHLIVAN, R. Aflatoxins levels in dried figs, nuts and paprika for export from Turkey. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, p. 1492-1498, 2008.

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

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

BONTEMPO, M. **Pimenta e seus benefícios**. São Paulo: Alaúde, 2007.

BUSBY, W. F.; WOGAN, G. N. Aflatoxins. **Chemical carcinogens**, v. 2, p. 945-1136, 1984.

CALDERARI, T. O.; IAMANAKA, B. T.; FRISVAD, J. C.; PITT, J. I.; SARTORI, D.; PEREIRA, J. L.; FUNGARO, M. H. P.; TANIWAKI, M. H. The biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in brazil nuts: from rainforest to consumer. **International Journal of Food Microbiology**, v. 160, n. 3, p. 267-272, 2013.

CALVO, A. M.; DABROWSKI, W. A.; SIKORSKI, Z. E. Mycotoxins. **Toxins in Food**. London: CRC Press, p. 219-240, 2005.

CANTABRANA, I.; PERISE, R.; HERNÁNDEZ, I. Uses of *Rhizopus oryzae* in the kitchen. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 2, n. 2, p. 103-111, 2015.

CASALI, V. W. D.; COUTO, F. A. A. Origem e botânica de *Capsicum*. **Informe Agropecuário** (Belo Horizonte), v. 10, p. 8-10, 1984.

CHOURASIA, H. K. Mycobiota and mycotoxin in herbal drugs of Indian pharmaceutical industries. **Mycological Research**, v.99, p.697-703, 1995.

CHUNG, S. K.; SHIN, J. C.; CHOI, J. U. Effect of blanching on dry rates and color of red pepper. **Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition**, v. 21, p. 64-69, 1992.

CIEGLER, A. Bioproduction of ochratoxin A and penicillic acid by members of the *Aspergillus ochraceus* group. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 631-636, 1972.

COULOMBE, R.A. Aflatoxins. In: Sharma, R.P. & Salunkhe, D.K. Mycotoxins and phytoalexins. **CRC Press**, p.103-43, 1991

DENTER, J.; REHM, H. J.; BISPING, B. Changes in the contents of fat-soluble vitamins and provitamins during tempe fermentation. **Journal of Food Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 129-134, 1998.

DINESH BABU, P.; BHAKYARAI, R.; VILDHYALAKSHMI. A low-cost nutritious food “tempeh” – a review. **World Journal of Dairy & Food Sciences**, v. 4, n. 1, p. 222-227, 2009.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. K. Compendium of soil fungi. **London: Academic Press**, v.2, 405p, 1980.

DOYMAZ, I.; PALA, M. Hot-air drying characteristics of red pepper. **Journal of Food Engineering**, v. 55, p. 331-335, 2002.

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

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Pimentas do Gênero *Capsicum* no Brasil. **Embrapa Hortaliças**, ISSN 1415-2312, 2006

ERDOGAN, Ahmet. The aflatoxin contamination of some pepper types sold in Turkey. **Chemosphere**, v. 56, n. 4, p. 321-325, 2004.

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

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

EUROPEAN COMMISSION REGULATION N. 1881/2006, December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. In Official Journal European Union, 364, 5-24.

FACTFISH DATA, **Market Reports 2019**. Recuperado em:

<<http://www.factfish.com/statistic/chillies+and+peppers,+green,+production+quantiy>>

FAO - **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. Food and Nutrition paper, n. 81, 2004.

FILTENBORG, O. L. E., FRISVAD, J. C., & SVENDSEN, J. A. Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. **Simple Screening Method for Molds Producing Intracellular Mycotoxins in Pure Cultures**, v. 45 n. 2, p. 581–585, 1983.

FRAIFE FILHO, G. A.; LEITE, J. B. V.; RAMOS, J. V. **Pimenta-do-reino**. CEPLAC - Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira, 2015.

FRISVAD, J. C.; HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R. A. *Aspergillus* species and aflatoxin production: a reappraisal. **Foundation Food Micro**, v. 99, p. 125–126, 1999.

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

FRISVAD, J. C.; THRANE, U.; SAMSON, R. A.; PITT, J. I. Important mycotoxins and the fungi which produce them. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 571, p. 3-31, 2006.

FRISVAD, J. C.; SKOUBOE, P.; SAMSON, R. A. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B<sub>1</sub>, sterigmatocystin, and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambelley* sp. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, p.442-453., 2006.

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

GARCIA, A. J. V. El Aji (*Capsicum chinense* Jacq.), patrimonio cultural y filogenético de las culturas Amazônicas. **Colombia Amazônica**, v. 5, p. 161-185, 1991.

GHERBAWY, Y. A.; SHEBANY, Y. M.; HUSSEIN, M. A.; MAGHRABY, T. A. Molecular detection of mycobiota and aflatoxin contamination of chili. **Archives of Biological Sciences**, v. 67, n. 1, p. 223-234, 2015.

GNONLONFIN, G. J. B.; ADJOVI, Y. C.; TOKPO, A. F.; AGBEKPONOU, E. D.; AMEYAPOH, Y.; SOUZA, C.; BRIMER, L.; SANNI, A. Mycobiota and identification of aflatoxin gene cluster in marketed spices in West Africa. **Food Control**, v.34, p.115-120, 2013.

GONZÁLEZ, M. G. M.; ROMERO, S. M.; ARJONA, M.; LARUMBE, A. G.; VAAMONDE, G. Microbiological quality of Argentinian paprika. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 49, n. 4, p. 339-346, 2017.



GRÉGIO, A. M. T.; FARIAS, M. M.; GOMES, M. C. B.; AZEVEDO, L. R.; LIMA, A. A. S; MACHADO, M. A. N. Capsaicina e suas aplicações em odontologia. **Arquivos em odontologia**, v. 44, n. 1, p. 45-48, 2008.

HAM, H.; KIM, S.; KIM, M.; LEE, S.; HONG, S. K.; RYU, J.; LEE, T. Mycobiota of ground red pepper and their aflatoxigenic potential. **Journal of Microbiology**, v. 54, n. 12, p. 832-837, 2016.

HAN, K.; JEONG, H. J.; SUNG, J.; KEUM, Y. S.; CHO, M. C.; KIM, J. H.; KANG, B.C. Biosynthesis of capsinoid is controlled by the Pun1 locus in pepper. **Molecular breeding**, v. 31, n. 3, p. 537-548, 2013.

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

HEISER, C. B.; SMITH, P. G. The cultivated *Capsicum* peppers. **Economic Botany**, v. 7, p. 214-227, 1953.

HENZ, G. P.; RIBEIRO, C. S. C.; LOPES, C. A.; CARVALHO, S. I. C.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. Mercado e comercialização: Pimentas *Capsicum*. **Embrapa Hortaliças**, p. 15-24, 2008.

HESELTIME, C. W.; VANDEGRAFT, E. E.; FENNELL, D. I.; SMITH, M.; SHOTWELL, O. Aspergilli as ochratoxin producers. **Mycologia**, v. 64, p. 539-550, 1972.

HIERRO, J. M. H; VILLANOVA, R. J. G; TORRERO, P. R; FONSECA, I. M. T. Aflatoxins and Ochratoxin A in Red Paprika for Retail Sale in Spain: Occurrence and Evaluation of a Simultaneous Analytical Method. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 56, n. 3, p. 751-756, 2008.

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

IARC - International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Some Naturally Occurring 12 Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. **IARC Press**, Lyon, vol. 56, 1993.

ICGFI – **International Consultative Group on Food Irradiation**. Irradiation of spices, herbs and other vegetable seasonings: A compilation of technical data for its authorization and control, 1992.

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

JESWAL, P.; KUMAR, D. Mycoflora and mycotoxins contamination in spices cultivated in Bihar (India). **Agricultural Science, Engineering and Technology Research**, v. 1, n. 5, p. 70-77, 2013.

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

KABAK, B.; DOBSON, A. D. W. Mycotoxins in spices and herbs—An update. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 1, p. 18-34, 2017.

KHOURY, A.; RIZK, T.; LTEIF, R.; AZOURI, H.; DELIA, M. L.; LEBRIHI, A. Fungal contamination and Aflatoxin B1 and Ochratoxin A in Lebanese wine—grapes and musts. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 2244–2250, 2008.

KIM, S.; LEE, S.; NAM, T. G.; SEO, D.; YOO, M. Comparison of a newly developed liquid chromatography with tandem mass spectrometry method and enzyme-linked immunosorbent assay for detection of multiple mycotoxins in Red pepper powder. **Journal of Food Protection**, v. 80, n. 8, p. 1347-1354, 2017.

KLICH, M. A.; PITT, J. I. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their Teleomorphs. **CSIRO Division of Food Science and Technology**, Sydney, Australia, 1988.

KLICH, M. A. **An identification of common *Aspergillus* species**. Netherlands: CBS, 2002.

KROGH, P.; HALD, B.; PEDERSEN, E. J., Occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals associated with mycotoxic porcine nephropathy, **Acta Pathology and Microbiology Scandinavia B**, v. 81, p. 689 – 695, 1973.

KROGH, P. Ochratoxins: Occurrence, biological effects and causal role in disease. **Natural Toxins**, Oxford, p. 673 – 680, 1980.

KUIPER-GOODMAN, T.; SCOTT, P. M. Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. **Biomedical Environmental Science**, v. 2, p. 179-248, 1989.

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

LAZARIDES, H. N.; FITO, P.; CHIRALT, A.; GEKAS, V.; LENART, A. Advances in osmotic dehydration. **Processing foods: Quality optimization and process assessment**. Editora Oliveira ARF and Oliveira JC, Londres, 1999.

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

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

LUND, F.; NIELSEN, A. B.; SKOUBOE, P. Distribution of *Penicillium commune* isolates in cheese dairies mapped using secondary metabolite profiles, morphotypes, RAPD and AFLP fingerprinting. **Food Microbiology**, v. 20, p. 725–734, 2003.

MARTINS, M. L.; MARTINS, H. M.; BERNARDO, F. Aflatoxins in spice marketed in Portugal. **Food Additives and Contaminants**, v. 18, n. 4, p. 315-319, 2001.

MARQUARDT, R. R.; FROHLICH, A. A. A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 3.968-3.988, 1992.

MILLQVIST, E.; BENDE, M. Role of the upper airway in patients with chronic cough. **Current Opinion in Allergy Clinical Immunology**, v. 6, n. 7, p. 11, 2006.

MOZSIK, G.; SZOLCSANYI, J.; RACZ, I. Gastroprotection induced by capsaicin in healthy human subjects. **World Journal of Gastroenterology**, v. 11, p. 4, 2005.

NETO, N.L. **Dicionário Gastronômico: Pimentas com suas receitas**. São Paulo: Bocato, 2004.

NOGUEIRA, S.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Prevalência de ocratoxina A em alimentos e consequentes problemas de segurança alimentar. **Alimentação Humana**, v. 12, n. 2, 2006.

NUEZ, F.; DÍEZ, M. J.; RUIZ, J. J.; CORDOVA, P.; COSTA, J.; CATAIÁ, M. S.; GONZALEZ ; J. A.; RODRÍGUEZ, A. . Catálogo de semillas de pimiento. **Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación / Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria**. Madrid, p. 108, 1998.

OLSEN, M.; JOHANSSON P.; MÖLLER, T.; PALADINO, R.; LINDBLAD, M. *Aspergillus nomius*, na importante aflatoxin producer in Brazil nuts? **World Mycotoxin Journal**, v. 1, n. 2, p. 123-126, 2008.

PASTER, N.; CHET, I. Effects of environmental factors on growth and sclerotium formation in *Aspergillus ochraceus*. **Canadian Journal of Botany**, v. 58, p. 1844-1850, 1980.

PÉREZ-GÁLVEZ, A.; GARRIDO-FERNÁNDEZ, J.; LOZANO-RUIZ, M.; MONTERO-DE-ESPINOSA, V.; MÍNGUEZ-MOSQUERA, M. I. Influencia del secado lento a baja temperatura en el contenido carotenoide de dos variedades de pimiento (*Capsicum annuum* L.). Balance biosintético y/o degradativo en función de las condiciones de procesado. **Grasas y Aceites**, v. 52, p. 311–316, 2001.

PEREZ-GALVEZ, A.; HORNERO-MENDEZ, D.; MINGUEZ-MOSQUERA, M. I. Stability of paprika without supplementary antioxidants during storage under industrial controlled conditions. **Food Chemistry**, v. 57, p. 4718-4723, 2009.

PETERSON, S. W. Phylogenetic relationships in *Aspergillus* based on rDNA sequence analysis. **Harwood Publishers**, United Kingdom, p. 323-356, 2000.

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

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

PITT, J. I. The significance of potentially toxigenic fungi in food. **Food Technology Australia**, v. 36, p. 218-219, 1984.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. Mycotoxins and human health: dietary implications. **Proceedings of the Nutrition Society of Australia**, v. 11, p. 82-89, 1986.

PITT, J. I. *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and production of ochratoxin A. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 266–269, 1987.

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

PITT, J. I. & HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. New York. Springer, v. 3, 2009.

PLÉSTINA, R. Nephrotoxicity of ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, v. 13, p. 49-50, 1996.

POZZI, C. R.; ARCARO, J. R. P.; ARCARO JÚNIOR, I.; FAGUNDES, H.; CORRÊA, B. Aspectos relacionados à ocorrência e mecanismo de ação de fumonisinas. **Ciência Rural**, v. 32, n. 5, p. 901-907, 2002.

RAMOS, A. J.; LABERNIA, N.; MARÍN, S.; SANCHIS, V.; MAGAN, N. Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three *Aspergillus ochraceus* on a barley extract medium and on barley grains. **Journal of Food Microbiology**, v. 44, p. 133-140, 1998.

REIFSCHNEIDER, F. J. B. **Capsicum: pimentas e pimentões no Brasil**. Brasília: EMBRAPA, p. 113, 2000.

REINHOLDS, I.; PUGAJEVA, I.; BAVRINS, K.; KUCHOVSKA, G.; BARTKEVICS, V. Mycotoxins, pesticides and toxic metals in commercial spices and herbs. **Food Additives and Contaminants**, v. 10, n.1, p. 5-14, 2017.

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

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

SANTOS, C. C. M.; LOPES, M. R. V.; KOSSEKI, S. Y. Ocorrência de aflatoxinas em amendoim e produtos de amendoim comercializados na região de São José de Rio Preto/SP. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 60, n. 2, p. 153-157, 2001.

SANTOS, L.; MARÍN, S.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J. Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in *Capsicum* power samples available on the Spanish Market. **Food Chemistry**, v. 122, p. 826-830, 2010.

SANTOS, L.; MARÍN, S.; MATEO, E. M.; GIL-SERNA, J.; VALEE-ALGARRA, F. M.; PATIÑO, B.; RAMOS, A. J. Mycobiota and co-occurrence of mycotoxins in *Capsicum* powder. **International Journal of Food Microbiology**, v. 151, p. 270-276, 2011.

SCHLATTER, C.; STUDER-ROHR, J.; RÁSONYI, T. Carcinogenicity and kinetic aspects of ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, v. 13, p. 43-44, 1996.

SECEX – **Secretaria de Comércio Exterior**, 2012. Disponível em <<http://www.mdic.gov.br>> Acesso em 29/05/17

SHUNDO, L.; ALMEIDA, A. P.; ALABURDA, J.; LAMARDO, L. C. A.; NAVAS, S. A.; RUVIERI, V.; SABINO, S. Aflatoxins and ochratoxin A in Brazilian paprika. **Food Control**, v. 20, p. 1099-1102, 2009.

SOMOGYI, N.; PÉK, M.; MIHÁLY, A. Applied spice paprika (*Capsicum annuum* L. var. *Longum*) growing technologies and processing in Hungary. **XIVth International Symposium on Horticultural Economics 536**, p. 389-396, 2000.

STADEN, H. **Duas viagens ao Brasil**. São Paulo: Ed. da Universidade de São Paulo, p. 218, 1974.

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

SUJANI, N.G.; SRIRAMAN, P.K. Pathology of ochratoxicosis. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 1120 – 1122, 2000.

TABATA, S.; IBE, A.; OZAWA, H.; KAMIMURA, H.; YASUDA, K. Aflatoxin contamination in foods and foodstuffs in Tokyo: 1991-1996. **Journal of the Food Hygienic Society of Japan**, v. 39, n. 6, p. 444-447, 1998.

TANIWAKI, M. H.; PITT, J. I.; TEIXEIRA, A. A.; IAMANAKA, B. T. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formations in relation to processing methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, n. 2, p. 173-179., 2003.

TANIWAKI, M.H.; IAMANAKA, B.T.; SILVA, N. Fungos deterioradores de alimentos: ocorrência e detecção. Campinas: **Núcleo de Microbiologia/ITAL**, 2016.

TÉREN, J.; VARGA, J.; HAMARI, Z.; RINYU, E.; KEVEI, F. Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. **Mycopathologia**, v. 134, p. 171–176, 1996.

TOSUN, A.; OZDEN, S. Ochratoxin A in red pepper flakes commercialized in Turkey. **Food Additives and Contaminants**, v. 9, n. 1, p. 46-50, 2016.

URBANO, G. R.; TANIWAKI, M. H.; LEITÃO, M. F. F.; VICENTINI, M. C. Occurrence of ochratoxin A – Producing in raw Brazilian coffee. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 8, p. 1226-1230, 2001.

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

VARGA, J.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. **Studies in Mycology**, v. 69, p. 57- 80, 2011.

VARGAS, E. A.; SANTOS, E. A.; PITTET, A. Determination of ochratoxin A in green coffee by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatography collaborative study. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, v. 58, p. 773-779, 2005.

WALKER, S.; WALL, M. M.; BOSLAND, P. W. "NuMex Garnet" Paprika. **Hortscience**, v. 39, n. 3, p. 629-630, 2004.

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

WOGAN, G. N. Aflatoxin carcinogenesis: interspecies potency differences and relevance for human risk assessment. **Progress in Clinical Biological Research**, v. 374, p. 123-137, 1992.

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

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

ZINEDINE, A.; BRERA, C.; ELAKHDARI, S.; CATANO, C.; DEBEGNACH, F.; ANGELINI S. Natural occurrence of mycotoxins in cereals and spices commercialized in Morocco. **Food Control**, v. 17, p. 868-874, 2006.