



**INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CCQA**

VINICIUS SANCHES ROSA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA MICROBIOTA DA PIMENTA-PRETA (*Piper
Nigrum*) COMERCIALIZADA NO BRASIL**

CAMPINAS

2025

VINICIUS SANCHES ROSA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA MICOBIOTA DA PIMENTA-PRETA
(*Piper nigrum*) COMERCIALIZADA NO BRASIL**

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

Aluno: Vinicius Sanches Rosa

Orientador: Josué José da Silva

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação defendida pelo aluno
Vinicius Sanches Rosa e orientado pelo Prof. Dr. Josué José da Silva

CAMPINAS

2025

Agência(s): O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ).

Nº do proc.: FAPESP – 2023/04445-9 e CNPQ - 130871/2023-0

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha elaborada pela bibliotecária Vangri de Oliveira Camargo CRB/8 6919-0 - Núcleo de Documentação Científica do Instituto Agrônomo

R789c Rosa, Vinícius Sanches
Caracterização molecular da micobiota da pimenta-preta (*Piper Nigrum*) comercializada no Brasil. / Vinícius Sanches Rosa.
Campinas, 2025. 82 fls.

Orientador: Josué José da Silva
Dissertação (Mestrado) em Ciência e Tecnologia de Alimentos–ITAL

1. Pimenta-preta. 2. Micobiota. I. Silva, Josué José da
II. Título.

CDD. 633.841

Título em inglês: Molecular characterization of the mycobiota of black pepper (piper nigrum) commercialized in Brazil

Key-words: Black pepper; Mycobiota; Multilocus; Aspergillus; Fusarium.

Titulação: Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Banca Examinadora: Josué José da Silva; Beatriz Thie Iamanaka; Mariana Corrêa de Souza

Data da Defesa: 05/05/2025

Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida por Vinicius Sanches Rosa, aprovada pela Comissão Julgadora em 05/05/2025.

Prof.(a) Dr.(a) Josué José da Silva
ITAL - CCQA - (Presidente)

Prof.(a) Dr.(a) <nome do co-orientador(a)>
<unidade> - (co-orientador(a))

Dr.(a) Beatriz Thie Iamanaka
ITAL - CCQA (titular)

Dr.(a) Mariana Corrêa de Souza
ITAL - CCQA (titular)

Dr.(a) Adriana Raquel Persson da Silva
ITAL - CCQA (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.

RESUMO

A pimenta-preta (*Piper nigrum* L.) é a especiaria de maior importância econômica e a mais utilizada em todo o mundo. O Brasil é o segundo maior produtor mundial de pimenta-preta e o maior produtor no Ocidente. A pimenta-preta brasileira enfrenta uma preocupante contaminação por fungos toxigênicos e deteriorantes, representando riscos à saúde pública e prejuízos ao setor produtivo. Uma investigação detalhada de sua micobiota, com o uso de metodologias moleculares avançadas, é essencial para identificar riscos e potenciais microrganismos benéficos, suprimindo a lacuna deixada por estudos anteriores. Este estudo tem como objetivo quantificar o nível de contaminação fúngica em amostras de pimenta-preta e investigar sua diversidade microbiológica por meio de análises filogenéticas multilocus. Foram coletadas 47 amostras de pimenta em mercados localizados nos estados de São Paulo, Espírito Santo e Pará, a partir das quais foram isoladas 749 cepas fúngicas. Nas amostras de pimenta moída, foi observada uma média de contaminação fúngica de $1,0 \times 10^5$ UFC/g. Já nas amostras de pimenta em grãos, 27% apresentaram infecção por fungos. Este estudo revelou uma ampla diversidade de fungos associados à pimenta-preta. Foram sequenciadas 222 cepas fúngicas, com predomínio dos gêneros *Aspergillus* e *Fusarium*, resultando na identificação de 51 espécies. Dentre elas, destacam-se espécies toxigênicas como *Aspergillus flavus*, *A. pseudocaelatus*, *A. parasiticus* e *A. agricola* (produtoras de aflatoxinas), além de *A. niger*, *A. welwitschiae* e *A. carbonarius* (produtoras de ocratoxina A). A presença de *A. fumigatus*, patógeno prioritário segundo a OMS, reforça a necessidade de monitoramento rigoroso. Diversas espécies foram reportadas pela primeira vez nesse substrato, destacando a importância da investigação da diversidade. Notavelmente, duas espécies fúngicas inéditas foram isoladas e propostas como *Penicillium pipericola* sp. nov. e *Syncephalastrum brasiliensis* sp. nov.

Palavras-chave: Pimenta-preta; Micobiota; Multilocus; *Aspergillus*; *Fusarium*.

ABSTRACT

Black pepper (*Piper nigrum* L.) is the most economically important spice and the most widely used worldwide. Brazil is the world's second largest producer of black pepper and the largest producer in the Western Hemisphere. Brazilian black pepper faces a worrying contamination by toxigenic and spoilage fungi, representing risks to public health and losses to the production sector. A detailed investigation of its mycobiota, using advanced molecular methodologies, is essential to identify risks and potential beneficial microorganisms, filling the gap left by previous studies. This study aims to quantify the level of fungal contamination in black pepper samples and investigate their microbiological diversity through multilocus phylogenetic analyses. Forty-seven pepper samples were collected from markets located in the states of São Paulo, Espírito Santo and Pará, from which 749 fungal strains were isolated. In the ground pepper samples, an average fungal contamination of 1.0×10^5 CFU/g was observed. In the pepper grain samples, 27% presented fungal infection. This study revealed a wide diversity of fungi associated with black pepper. A total of 222 fungal strains were sequenced, with a predominance of the genera *Aspergillus* and *Fusarium*, resulting in the identification of 51 species. Among them, toxigenic species such as *Aspergillus flavus*, *A. pseudocaelatus*, *A. parasiticus* and *A. agricola* (producers of aflatoxins), in addition to *A. niger*, *A. welwitschiae* and *A. carbonarius* (producers of ochratoxin A) stand out. The presence of *A. fumigatus*, a priority pathogen according to the WHO, reinforces the need for rigorous monitoring. Several species were reported for the first time in this substrate, highlighting the importance of investigating diversity. Notably, two novel fungal species were isolated and proposed as *Penicillium pipericola* sp. nov. and *Syncephalastrum brasiliensis* sp. nov.

Key words: Black pepper; Mycobiota; Multilocus; *Aspergillus*; *Fusarium*.

SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT	v
SUMÁRIO.....	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
Objetivo principal	3
Objetivos específicos.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
3.1 Pimenta-preta	3
3.2 Contaminação Fúngica	6
3.2.1 <i>Aspergillus</i>	7
3.2.2 <i>Fusarium</i>	9
3.2.3 <i>Penicillium</i>	9
3.2.4 <i>Syncephalastrum</i>	12
3.3 Micotoxinas.....	13
4 MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 Amostragem	16
4.2 Contagem e incidência fúngica.....	16
4.3 Análise da atividade de água das amostras	17
4.4 Caracterização molecular da micobiota	17
4.4.1 Purificação e preparo de isolados para extração de DNA	17
4.4.2 Extração de DNA genômico.....	18
4.4.3 Amplificação via PCR, sequenciamento (Sanger) e análises filogenéticas .	18
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
5.1 CAPÍTULO 1.....	19

5.1.1 Contagem e incidência fúngica.....	19
5.2 Análise filogenética.....	23
6 CAPITULO 2.....	30
RESUMO.....	31
INTRODUÇÃO	31
MATERIAIS E MÉTODOS	34
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS	45
7 CONCLUSÕES GERAIS.....	50
8 REFERÊNCIAS	50
APÊNDICES.....	69

1. INTRODUÇÃO

A pimenta-preta ou pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) representa a especiaria de maior importância econômica além de ser a mais utilizada em todo o mundo. Fruto nativo da Índia, pertencente à família Piperaceae, sendo cultivada especialmente em regiões tropicais possui grande valorização devido ao seu sabor pungente atribuído ao alcaloide piperina (Srinivasan, 2007; Nair, 2020).

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de *P. nigrum* e, no Ocidente, é líder nesse setor produzindo uma média 89,87 milhões de toneladas entre os anos de 2015 e 2021 (Faostat, 2021). Conforme a *International Pepper Community* (IPC), o país também ocupa a posição de segundo maior exportador global de pimenta-preta, ficando atrás apenas do Vietnã. Esses dois países são responsáveis por aproximadamente 80% das exportações mundiais desse produto. Os maiores importadores da pimenta-preta brasileira são Alemanha, Estados Unidos, Marrocos e o próprio Vietnã (IPC, 2020).

No Brasil, há legislações que estabelecem padrões microbiológicos para alimentos prontos para o consumo, esses padrões definem a aceitabilidade de um alimento, baseado na ausência/presença e contagem de microrganismos, na concentração das suas toxinas ou metabólitos, por unidade de massa, volume, área ou lote (Brasil, 2022).

De acordo com a Resolução RDC nº 724/22 e sua Instrução Normativa nº 161, de 01 de julho de 2022, os alimentos não podem conter microrganismos patogênicos, toxinas ou metabólitos em quantidades que causem dano para a saúde humana. Os setores envolvidos na cadeia produtiva de alimentos são responsáveis por assegurar, durante todo o prazo de validade, que os alimentos cumpram com esses padrões microbiológicos (Brasil, 2022a). Segundo a instrução normativa nº 10, de 15 de maio de 2006 que estabelece um regulamento técnico de identidade e qualidade da pimenta-do-reino é proibida a comercialização de lotes com mais de 2% de grãos mofados (Mapa, 2006).

Embora o Brasil tenha legislação equiparável ao padrão internacional (EUR-LEX, 2005; Australian Government, 2021), fungos toxigênicos na pimenta-

preta parecem ser um problema frequente na cadeia nacional de produção, sendo importante ressaltar que as legislações atuais não apresentam limites toleráveis para bolores na pimenta-preta.

Alguns estudos demonstraram uma preocupante contaminação neste substrato por fungos toxigênicos como os trabalhos de Freire; Kozakiewicz e Paterson (2000); Mandeel et al. (2005); Garcia et al. (2015); Silva (2017) e Veloso et al. (2022), esses trabalhos apresentaram contaminações na pimenta-preta de isolados de espécies como *Aspergillus niger* e *A. flavus*, espécies potencialmente produtoras de ocratoxina A e aflatoxinas, respectivamente.

Diante desse cenário, torna-se essencial aprofundar as investigações sobre a presença de fungos toxigênicos na pimenta-preta produzida no Brasil, considerando seus potenciais riscos à saúde pública e à qualidade do produto. A ausência de limites específicos para bolores nessa especiaria evidencia a necessidade de revisões regulatórias e de estratégias de monitoramento mais eficazes ao longo da cadeia produtiva. Assim, estudos que avaliem a diversidade fúngica são fundamentais para embasar políticas de controle e mitigar possíveis impactos na segurança alimentar e na competitividade do produto no mercado internacional.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL

Caracterizar filogeneticamente, com base em abordagem multilocus, a micobiota da pimenta-preta e identificar a incidência de espécies potencialmente toxigênicas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Mensurar quantitativamente a infecção fúngica em amostras de pimenta-preta comerciais.
- Caracterizar a micobiota da pimenta-preta através de abordagem molecular multilocus.
- Mensurar a incidência de espécies potencialmente toxigênicas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Pimenta-preta

A pimenta-preta, popularmente chamada de pimenta-do-reino, é um fruto originário da Índia que foi introduzido no Brasil no século XVII. Tornou-se popular e é amplamente conhecida pelo seu aroma e sabor pungente (Srinivasan, 2007; De-Lemos et al. 2011).

Os frutos de *Piper nigrum* podem ser processados para se tornarem pimenta-preta ou pimenta-branca. No caso da pimenta-preta, os grãos imaturos são secos integralmente e podem ser utilizados como tempero em diversos pratos. Além disso, são empregados nas indústrias farmacêutica, medicinal, cosmética e de alimentos processados (Srinivasan, 2007; Nair, 2020), onde compostos como piperina, resinas e óleos essenciais são extraídos de seus grãos. Por outro lado, a pimenta-branca é obtida a partir de grãos maduros de *P. nigrum*, com a remoção da polpa e da pele, sendo utilizada exclusivamente como tempero (Nair, 2020).

No Brasil, a pimenta-preta é classificada em três tipos: Brasil Asta, Brasil 1 e Brasil 2. Essa classificação leva em consideração fatores de qualidade, como a incidência de impurezas e materiais estranhos, a presença de grãos chochos e mofados, além da densidade mínima. A categoria "Brasil Asta" refere-se à pimenta comercializada com o menor percentual de grãos chochos, impurezas, matérias estranhas e grãos mofados, sendo a de melhor qualidade no mercado. A "Brasil 1" permite uma porcentagem de até 2% de matérias estranhas e impurezas, 5% de grãos chochos e 2% de grãos mofados. Já a "Brasil 2" é considerada de qualidade inferior às demais, sendo permitidos limites de até 5% de impurezas e 25% de grãos chochos (MAPA, 2006).

De acordo com a Instrução Normativa nº 10, de 15 de maio de 2006, que estabelece um regulamento técnico de identidade e qualidade da pimenta-do-reino, é proibida a comercialização de lotes com mais de 5% de impurezas e matérias estranhas, 25% de grãos chochos e 2% de grãos mofados (MAPA, 2006).

Em 2023, o Brasil produziu cerca de 126.548 toneladas de pimenta-preta em uma área de aproximadamente 41 mil hectares, conforme o IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). O estado do Espírito Santo foi o maior produtor do país, com uma produção de 77.681 toneladas, seguido pelo Pará, que contribuiu com 38.102 toneladas, gerando um lucro de mais de 1,5 bilhões de reais (IBGE, 2023).

A colheita da pimenta-preta é realizada praticamente o ano todo nos estados do Espírito Santo e da Bahia. Já no Pará, a colheita ocorre entre os meses de junho e novembro. A colheita é feita manualmente, com a retirada das espigas, que são acondicionadas em sacos de polipropileno para transporte (Duarte; Albuquerque, 2004; De Lemos; Tremacoldi; Poltronieri, 2014).

As espigas são debulhadas para que os grãos sejam submetidos à secagem. Nessa etapa, as espigas podem ser debulhadas manualmente ou com o auxílio de um debulhador mecânico. Os grãos são então levados para secagem, podendo ser dispostos em lonas, jirais ou secadores mecânicos. A etapa de secagem é fundamental para garantir a perda de umidade dos grãos e reduzir as chances de contaminação por microrganismos. No entanto, métodos de secagem como os realizados em lonas ou jirais apresentam desvantagens, pois deixam os grãos expostos e suscetíveis ao contato com insetos e animais, que podem

introduzir microrganismos indesejáveis nos grãos (Duarte; Albuquerque, 2004; De Lemos; Tremacoldi; Poltronieri, 2014; Alves, 2015; Vinha et al., 2021).

Na secagem em lona ou em terreiro (Figura 1a), as lonas previamente limpas e higienizadas são estendidas nos terreiros, onde os grãos de pimenta são espalhados e expostos ao sol por cerca de 3 a 5 dias. Durante esse período, os frutos devem ser mexidos cerca de quatro vezes ao dia com o auxílio de um rodo de madeira para garantir uma secagem uniforme, evitando o acúmulo de umidade e a presença de insetos entre os frutos (Duarte; Albuquerque, 2004; De Lemos; Tremacoldi; Poltronieri, 2014).



Figura 1: métodos de secagem dos grãos de pimenta-preta. (a) secagem em terreiro, (b) secagem em jirau, (c) secagem mecânica (Agência Pará, 2021, Queiroga et al. 2023).

Também é possível utilizar técnicas como a secagem em jirau (Figura 1b), na qual é construída uma estrutura a cerca de 80 cm do solo, com a finalidade de impedir o contato dos frutos com animais e com o calçado dos trabalhadores.

Na secagem mecânica (Figura 1c), utiliza-se lenha como fonte de calor, e o equipamento mantém os grãos em movimento em uma temperatura de aproximadamente 50°C a 70°C, por um período de 8 a 10 horas (Duarte; Albuquerque, 2004).

Após a secagem, a pimenta-preta deve ser ventilada para a remoção de pedaços de folhas, talos e grãos chochos. Em seguida, é embalada em sacos de polipropileno de 50 kg e armazenada em armazéns, idealmente limpos, sem umidade e livres de animais, prevenindo assim a contaminação dos grãos (Duarte; Albuquerque, 2004; De Lemos; Tremacoldi; Poltronieri, 2014).

3.2 Contaminação Fúngica

As especiarias, como a pimenta-preta, são consideradas produtos não perecíveis quando armazenadas em condições adequadas (Ascensão; Filho, 2013). No entanto, em condições inadequadas, podem se tornar substratos altamente suscetíveis à contaminação microbiana, especialmente por fungos de armazenamento, como *Aspergillus* e *Penicillium* (Yogendrarajah et al., 2014; Pickova et al. 2020; Syamilah et al. 2022). O crescimento desses fungos em especiarias pode provocar alterações em suas propriedades organolépticas, levando à desvalorização no mercado. Além disso, há preocupação com a possibilidade de formação de micotoxinas (Syamilah et al. 2022).

Mandeel (2005) analisou 17 amostras de especiarias importadas, obtendo 665 isolados fúngicos. Neste estudo, a pimenta-preta foi considerada uma das especiarias com maior contaminação, apresentando 1.027 UFC/g e 78 isolados, identificados como *A. flavus*, uma espécie potencialmente produtora de aflatoxinas. Além disso, foi a especiaria analisada com maior diversidade de espécies isoladas. Neste estudo foi feita a classificação das espécies a nível morfológico não utilizando tecnologias moleculares.

Veloso et al. (2022), analisaram 30 amostras de especiarias comercializadas na região metropolitana de Recife, incluindo pimenta-preta, colorífico e orégano. Todas as amostras apresentaram contaminação fúngica, chegando a $1,75 \times 10^8$ UFC/g no orégano, $8,0 \times 10^6$ UFC/g na pimenta-preta e $2,17 \times 10^2$ UFC/g no colorífico.

Garcia (2015) analisou 200 amostras de oito tipos diferentes de especiarias, coletadas de supermercados e de uma empresa beneficiadora da cidade de Santa Maria – RS, identificando uma média de contaminação fúngica de $2,5 \times 10^5$ UFC/g na pimenta-preta. Neste estudo, observou-se a presença de 22 gêneros fúngicos, incluindo *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Cladosporium*, além de 51 espécies, como *A. flavus*, *A. niger*, *A. parasiticus*, *A. carbonarius* e *A. ochraceus*, que são potencialmente produtoras de micotoxinas, como aflatoxinas e ocratoxina A (OTA). Contudo, os autores não utilizaram metodologias moleculares para a confirmação das espécies obtidas.

3.2.1 *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* é comumente encontrado em especiarias e produtos alimentícios, sendo um dos principais gêneros responsáveis pela deterioração de alimentos. Algumas de suas espécies são toxigênicas, ou seja, capazes de produzir micotoxinas (Sheikh-Ali et al. 2014; Garcia et al. 2015).

A contaminação por *Aspergillus* é motivo de preocupação devido à presença de micotoxinas. A aflatoxina, por exemplo, pode ser produzida por espécies do grupo *Aspergillus* section *Flavi*: como *A. flavus* e *A. parasiticus*, enquanto a OTA pode ser sintetizada por algumas espécies do grupo *Aspergillus* section *Nigri*, como: *A. niger* e *A. carbonarius* (De Oliveira; Oliveira; Meneghello, 2013; Arruda; Beretta, 2019).

A ocorrência de *Aspergillus* section *Flavi* em pimenta-preta tem sido frequentemente reportada. *A. flavus* foi citado como uma das espécies predominantes em pimenta-preta comercializada no Bahrein (Mandeel, 2005), no Brasil (Freire et al. 2000; Garcia et al. 2018) e na Malásia (Reddy; Farhana; Salleh, 2011). No entanto, a maioria desses estudos não utilizou abordagens polifásicas para a identificação das espécies, baseando-se exclusivamente em características morfológicas, o que pode ser insuficiente para a discriminação de muitas espécies de *Aspergillus* (Samson et al., 2014; Silva et al. 2022a).

Recentemente, Frisvad et al. (2019) revisaram profundamente a taxonomia de *A. section Flavi*, utilizando fortemente o método de Reconhecimento de Espécies Filogenéticas por Concordância Genealógica (GCPSR), que compara a genealogia de diferentes loci. Essa revisão resultou na descrição de novas espécies, bem como na reclassificação e sinonimização de outras. Ao final da revisão de Frisvad et al. (2019), *A. section Flavi* passou a abrigar 33 espécies.

Com a popularização das análises genotípicas, especialmente aquelas associadas à concordância genealógica, a delimitação das espécies tornou-se mais refinada, tornando a taxonomia desse grupo mais dinâmica. Após a revisão de Frisvad et al. (2019), sete novas espécies de *A. section Flavi* foram propostas:

Aspergillus agricola e *Aspergillus toxicus* (Singh et al. 2020), *Aspergillus krugeri* e *Aspergillus magaliesburgensis* (Visagie; Houbroken, 2020), *Aspergillus burnetii* (Gilchrist et al. 2020) e, mais recentemente, nosso grupo de pesquisa descreveu *Aspergillus annui* e *Aspergillus saccharicola* (Silva et al. 2022a).

A capacidade de produção de micotoxinas pelas espécies de *A. section Flavi* também foi reavaliada por Frisvad et al. (2019). Entre os destaques, está o reconhecimento da produção de aflatoxinas do tipo G (G1 e G2) por algumas cepas de *A. flavus*, além da introdução de duas novas espécies capazes de produzir OTA: *A. neoalliaceus* e *A. vandermerwei*.

Algumas espécies de *Aspergillus* da seção *Flavi* são utilizadas na produção de enzimas industriais, como lipases, amilases e lactases. Entre elas, destacam-se *A. flavus*, *A. tamarii* e *A. oryzae*, sendo esta última amplamente empregada também na fermentação de alimentos, especialmente em produtos tradicionais da culinária asiática (Brito, 2017; Houbroken et al. 2020; Monteiro, 2024).

Garcia, Mallmannb e Copettia (2018) e Silva et al. (2020) descreveram a presença de espécies de *Aspergillus section Nigri* produtoras de OTA como *A. niger*, *A. carbonarius* e *A. welwitschiae* em amostras de pimenta-preta.

Aspergillus section Nigri é composta por pelo menos 37 espécies fúngicas, distribuídas em cinco séries: *Nigri*, *Carbonarii*, *Heteromorphi*, *Japonici* e *Homomorphi*, e classificada no subgênero *Circumdati*. Trata-se de uma seção com grande capacidade de produção de metabólitos secundários, totalizando até 176 tipos diferentes. Algumas de suas espécies, como *A. niger*, *A. welwitschiae*, *A. sclerotioniger* e *A. carbonarius*, são produtoras de OTA, sendo *A. carbonarius* considerada a maior produtora dessa micotoxina dentro da seção *Nigri*. *A. niger* e *A. welwitschiae* também são produtoras de fumonisinas (Pardo et al. 2004; Frisvad et al. 2011; Hong, 2013; Houbroken et al. 2020; Wang et al. 2023).

Esta é uma seção muito explorada e utilizada na biotecnologia, *A. niger* é utilizado na fermentação de alimentos e na produção de enzimas, tais como: α -amilases, celulasas e pectinases. Além disso, é largamente utilizada para produção de ácido cítrico, compostos bioativos de interesse da indústria alimentícia, de cosméticos e farmacológica. Outras espécies desta seção também são utilizadas na indústria, tais como *A. brasiliensis* e *A. tubingensis* (Nielsen et al. 2009; Pandya et al. 2012; Frisvad et al. 2018; Abdelshafy et al. 2024).

3.2.2 *Fusarium*

O gênero *Fusarium* é um dos mais importantes gêneros fúngicos patogênicos de plantas, sendo dividido em complexos de espécies, como *Fusarium solani* (FSSC), *Fusarium fujikuroi* (FFSC), *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC), *Fusarium oxysporum* (FOC), *Fusarium graminearum* (FGSC), *Fusarium verticillioides* (FVC) e *Fusarium proliferatum* (FPC) (Aparecido; Rosa, 2020; Crous et al., 2021).

Na agricultura, *Fusarium* spp. pode gerar grandes perdas à lavoura, pois causa a fusariose, uma doença provocada principalmente pelo complexo de espécies FSSC. Essa doença acomete as raízes das plantas, sendo considerada a principal doença em plantações de pimenta-preta (Cruz et al., 2020; Gomes Filho; Santos; Amorim, 2020). De acordo com De Lemos, Tremacoldi e Poltronieri (2014), a fusariose causa um prejuízo anual de 10 milhões de dólares e também reduz a vida útil da plantação de 12 anos para 5 ou 6 anos.

Outra doença fúngica causada por *Fusarium* na plantação de pimenta é a murcha-amarela, associada a *Fusarium oxysporum*, que acomete os vasos condutores da planta, impedindo a distribuição de água e nutrientes, causando amarelamento e queda das folhas (Tremacoldi, 2010; De Lemos; Tremacoldi; Poltronieri, 2014).

O gênero *Fusarium* possui espécies produtoras de micotoxinas, como *F. equiseti* e *F. culmorum*, produtores de tricotecenos e zearalenona; *F. oxysporum*, produtor de ácido fusárico e *F. verticillioides*, *F. sacchari*, *F. fujikuroi* e *F. proliferatum* produtores de fumonisinas, a principal classe de micotoxinas do gênero *Fusarium*. (Rheeder, Marasas; Vismer, 2002; Alisaac; Mahlein, 2023; Gao et al. 2023).

3.2.3 *Penicillium*

A primeira descrição do gênero *Penicillium* foi feita há mais de dois séculos por Link (1809), que descreveu três espécies: *P. candidum*, *P. glaucum* e *P. expansum* (Abdel-Azeem et al. 2021).

Penicillium é um gênero fúngico amplamente distribuído em diversos substratos e frequentemente descrito como fungo de armazenamento. É predominante em ambientes edáficos, sendo que espécies como *P. glabrum*, *P. lividum*, *P. spinulosum* e *P. citrinum* são comumente isoladas do solo. Muitos pesquisadores, ao analisarem amostras de solo, o descrevem como o gênero de maior frequência (Barbosa et al. 2020; Syamilah, 2022; Visagie; Yilmaz, 2023).

Em um estudo recente, Visagie e Yilmaz (2023) detectaram 95 cepas de *Penicillium* em amostras de solo, obtendo representantes das seções *Sclerotiorum*, *Citrina*, *Canescencia* e *Aspergilloides*, entre outras, demonstrando uma grande diversidade de espécies de *Penicillium* presentes no solo, incluindo espécies ainda não identificadas anteriormente.

Algumas de suas espécies são toxigênicas, como *Penicillium verrucosum*, produtor de OTA, *P. expansum*, produtor de patulina, e *P. citrinum*, produtor de citrinina. Muitas outras espécies do gênero também estão envolvidas na produção dessas micotoxinas (Sweeney; Dobson, 1998).

Além de ser um gênero com espécies deteriorantes, *Penicillium* tem um papel importante nas indústrias médica, agrícola, alimentícia e biotecnológica (Kubátová et al. 2019; Visagie et al. 2024). Como *Penicillium chrysogenum* utilizado na produção de penicilina, antibiótico pertencente a classe dos β -lactâmicos (Fleming, 1929; Van Den Berg, 2011; Barreiro; García-Estrada, 2019). *P. italicum*, *P. janthinellum* e *P. purpurogenum* são utilizados na produção de lipase para obtenção de ácidos graxos, pré-tratamento de efluentes da indústria alimentícia e na produção de biocombustíveis (Marotti et al. 2017). *Penicillium* spp. também são utilizados na produção de queijos como o *P. roqueforti* na produção de queijo roquefort, *Penicillium camemberti* e *P. candidum* usados na produção de queijo Camembert (Perry, 2004; Sismer et al. 2024).

Penicillium é classificado em dois subgêneros e possui 553 espécies identificadas, empregadas em 32 seções (Kubátová et al. 2019; Visagie et al. 2024).

Uma dessas seções é a seção *Paradoxa*, composta por duas séries denominadas *Atramentosa* e *Paradoxa*, que juntas são representadas por nove espécies. Essas séries são filogeneticamente distintas: a série *Paradoxa* apresenta um tipo de morfologia assexuada característica de *Aspergillus*, enquanto a série *Atramentosa* é típica de *Penicillium*. A série *Atramentosa* é composta por

Penicillium atramentosum, *P. balearicum*, *P. fimosum*, *P. ibericum*, *P. magnielliptisporum* e *P. mexicanum*, enquanto a série *Paradoxa* inclui as espécies *Penicillium crystallinum*, *P. malodorum* e *P. paradoxum* (Frisvad; Samson, 2004; Houbraken et al. 2020).

As espécies correspondentes à série *Paradoxa*, como *P. crystallinum* e *P. malodorum*, foram descritas na região da Costa Rica em amostras de solo. *P. crystallinum* é produtor de extrólitos como ácido crisofânico, crisogina, meleagrina e paquibasina, enquanto *P. malodorum* produz andrastina A, oxalina e meleagrina. *P. paradoxum* foi identificado em diversas regiões, incluindo Holanda, Dinamarca e Nova Zelândia, em amostras de esterco. Essa espécie produz extrólitos como brefeldina A, pseurotina e sorbicilinas. De modo geral, as espécies da série *Paradoxa* apresentam colônias com cheiro desagradável, crescimento rápido e conidióforos semelhantes aos de *Aspergillus*, sendo bisseriados, com parede lisa ou rugosa, e geralmente encontradas em esterco (Visagie et al. 2014; Houbraken et al. 2020).

A série *Atramentosa* é constituída por seis espécies, sendo a maioria isolada de esterco. Guevara-Suarez et al. (2020) listaram algumas espécies da seção *Paradoxa* e seus substratos de origem, como *P. balearicum*, encontrado em esterco nas Ilhas Baleares, Espanha; *P. atramentosum*, em esterco em Castela e Leão, Espanha; *P. fimosum*, *P. ibericum* e *P. magnielliptisporum*, em esterco na Catalunha, Espanha. Essa série apresenta extrólitos como meleagrina, oxalina, andrastina A, haenamindol, roquefortina C e D e rugulovasina A e B, além de colônias com crescimento rápido, reverso marrom e textura aveludada; seus conidióforos são predominantemente terverticilados (Visagie et al. 2014; Guevara-Suarez et al. 2020; Houbraken et al. 2020).

P. crystallinum foi citado por Acosta (2023) em isolados fúngicos da Amazônia peruana. *P. balearicum* foi observado em cepas coletadas de estrume na África (Visagie; Houbraken; Yilmaz, 2024). Rai, Tewari e Mukerji (1964) descreveram a presença de cepas de *P. paradoxum* em amostras de solo na Índia.

Visagie et al. (2014) descreveram a espécie *Penicillium mexicanum* no México em amostras de poeira doméstica. *P. mexicanum* pertence a seção *Paradoxa* e a série *atrmentosa* e está intimamente relacionado as espécies de *P. atramentosum* *P. magnielliptisporum*. De acordo com a descrição de Visagie et al.

(2014) suas colônias apresentam crescimento lento chegando a 22mm em CYA, com coloração verde-acinzentada, com grande presença de exsudatos, textura velutinoso, micélio branco e uma esporulação moderada densa.

P. mexicanum tem sido encontrado em amostras de ar na Coreia (Lee et al., 2023); e amostras de solo coletado de minas de ouro em Portugal (Trovão et al., 2024).

3.2.4 *Syncephalastrum*

O gênero *Syncephalastrum* é pertencente a ordem Mucorales e a família *Syncephalastraceae*. A ordem Mucorales apresenta espécies patogênicas com fungos oportunistas que podem levar a morte de pacientes imunossuprimidos, ou com comorbidades como diabetes mellitus ou malignidades hematológicas. Os membros do gênero *Syncephalastrum* são distinguidos pela formação de esporos em aglomerados característicos, dispostos em estruturas que lembram cachos ou massas, e são comumente encontrados no solo e na matéria orgânica em decomposição (Pavlović; Bulajić, 2006; Mousavi et al. 2019).

Syncephalastrum possuem espécies patogênicas para humanos, que podem causar onicomicose, infecções cutâneas e podem gerar infecções respiratórias em pacientes imunocomprometidos (Irshad et al. 2020). Mathuram, Mohanraj e Mathews (2013) reportaram um caso de infecção rino-orbital-cerebral causado por *Syncephalastrum racemosum* em um paciente com diabetes que acabou vindo a óbito; Mamali et al. (2022) também reportou um caso de infecção por *Syncephalastrum* onde o paciente apresentou uma infecção fúngica necrosante da pele e dos tecidos moles, decorrente de uma fratura exposta da tíbia causada por uma cepa de *Syncephalastrum* sp.

Kabtani et al. (2024) descreveram a espécie *Syncephalastrum massiliense* isolada de amostras de escarro de um paciente imunossuprimido. Os autores descreveram *S. massiliense* como um fungo que apresenta hifas curtas, vesículas grandes cercadas por merosporângios cilíndricos e colônias de aspecto algodinoso. Além disso, observaram que seu crescimento é inibido em temperaturas abaixo de 4°C e acima de 40°C.

Elshafie et al. (2002) analisaram sete diferentes especiarias coletadas em Omã para investigar a microbiota fúngica e a presença de aflatoxinas. No estudo, isolaram cepas de *Syncephalastrum racemosum* em seis das sete especiarias avaliadas, incluindo cominho, canela, cardamomo, gengibre, coentro e pimenta-preta. No entanto, a identificação das espécies foi realizada sem o uso de metodologias moleculares.

3.3 Micotoxinas

As micotoxinas são metabólitos fúngicos tóxicos para a saúde humana e animal. Dentre essas substâncias, as mais preocupantes em especiarias são as aflatoxinas (B e G) e a OTA (Pickova et al. 2020).

As aflatoxinas podem ser produzidas por várias espécies fúngicas que colonizam diferentes substratos ao redor do mundo. A contaminação por aflatoxinas tem sido reportada principalmente em amendoim, milho, especiarias, nozes (amêndoas, pistaches, avelãs, noz-pecã e castanha-do-Brasil) e leite (Marroquin-Cardona et al. 2014; Weidenbörner, 2018). A Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC) classificou as aflatoxinas (*AFB1*, *AFB2*, *AFG1*, *AFG2*, *AFM1* e *AFM2*) no Grupo 1, como cancerígenas para humanos. Além disso, a exposição a essas micotoxinas tem sido associada à imunossupressão, hepatotoxicidade e outros efeitos patológicos (Lewis et al. 2005; IARC, 2012; Mohsenzadeh et al. 2016). A *AFB1* é o carcinogênico natural mais potente e também o tipo mais comumente encontrado (Wu et al. 2012).

A seção *Flavi* do gênero *Aspergillus* abriga a maioria das espécies produtoras de aflatoxinas. Atualmente, 22 espécies desse grupo são reconhecidas como aflatoxigênicas (Frisvad et al. 2019; Visagie et al. 2014; Singh et al. 2020; Silva et al. 2022a).

A ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina de risco potencial em pimenta-preta. Esse metabólito é produzido principalmente por *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus westerdijkiae*, *Aspergillus steynii*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus niger*, *Penicillium verrucosum* e *Penicillium nordicum* (Varga et al. 2015; Yang et al. 2022).

A IARC classificou a OTA como possivelmente cancerígena para humanos, no Grupo 2B (Varga et al., 2015). Além disso, a OTA apresenta atividade

nefrotóxica, hepatotóxica, imunotóxica e neurotóxica. Ela possui alta resistência térmica, podendo suportar temperaturas de até 250 °C, o que impede sua total eliminação nos processos de cocção e torrefação (Kabak et al. 2009; Zhai et al. 2021).

Recentemente, Da Silva et al. (2021) investigou a contaminação por OTA e a ocorrência de espécies ocratoxigênicas em pimenta-preta produzida no Brasil. Cerca de 55% das amostras analisadas apresentaram contaminação por OTA, com níveis variando de 0,05 a 13,15 µg/kg. Além disso, Da Silva et al. (2021) identificaram espécies potencialmente ocratoxigênicas, incluindo *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae*, *A. carbonarius*, *A. niger* e *A. welwitschiae*.

Dentre as espécies da seção *Nigri*, *A. niger*, *A. welwitschiae*, *A. carbonarius*, *A. sclerotium* e *A. sclerotium carbonarius* são reportadas como potenciais produtoras de OTA (Varga et al. 2015). *Aspergillus carbonarius* é uma das espécies ocratoxigênicas de maior destaque, sendo considerada o principal agente causal da contaminação por OTA em uvas e seus derivados. *Aspergillus section Circumdati* é o grupo com maior número de espécies produtoras de OTA com cerca de 20 espécies como *A. steynii*, *A. westerdijkiae* e *A. ochraceus* (Visconti et al. 2008; Rousseaux et al. 2014; Visagie et al. 2014; Freire et al. 2017).

As fumonisinas são micotoxinas produzidas principalmente por espécies do gênero *Fusarium*, como *Fusarium verticillioides*, *F. sacchari*, *F. fujikuroi* e *F. proliferatum*. Essa classe de micotoxinas compreende 28 análogos, sendo um dos mais importantes a fumonisina do tipo B, que inclui os subtipos B₁, B₂ e B₃. Essas toxinas são classificadas pela IARC no grupo 2B, como possivelmente cancerígenas para humanos. Estudos demonstraram efeitos tóxicos no fígado, rins e órgãos reprodutivos de diversos animais, incluindo cavalos, porcos e aves, em humanos as fumonisinas podem causar câncer hepático e esofágico além de efeitos neurotóxicos (Rheeder, Marasas; Vismer, 2002; Mendes et al. 2022; Gao et al. 2023).

Waskiewicz et al. (2013) analisaram 21 especiarias comercializadas na Polônia, incluindo pimenta-preta, e detectaram a presença de fumonisinas em 13 das amostras avaliadas. A pimenta-preta foi a segunda especiaria com maior nível de contaminação, ficando atrás apenas da pimenta-caiena.

Estudos semelhantes também relataram a presença de fumonisinas em especiarias, como os de Kong et al. (2012), que investigaram especiarias e ervas comercializadas na China; Al Ayoubi et al. (2021), que analisaram especiarias utilizadas na culinária libanesa; e Chalyy et al. (2023), que avaliaram especiarias consumidas na Rússia.

No que diz respeito à legislação sobre micotoxinas, a RDC nº 722 e a IN 160, Anexo II, de 1º de julho de 2022, da Anvisa, estabelecem os Limites Máximos Tolerados (LMT) de contaminantes, incluindo micotoxinas, em alimentos prontos para consumo. Esse regulamento se aplica às empresas que importam, produzem, distribuem e comercializam diferentes categorias de bebidas, alimentos e matérias-primas. Para a categoria de alimentos "especiarias", os LMTs estabelecidos são de 20 µg/kg para aflatoxinas *B1*, *B2*, *G1* e *G2*, e de 30 µg/kg para OTA, já para fumonisinas (*B1* + *B2*) e zearalenona não há limites máximos tolerados para especiarias na legislação brasileira, apesar de ser implementada uma nova Instrução normativa cuja qual refere-se sobre em seu texto sobre as fumonisinas IN Nº 351, de 18 de março de 2025, não houve citação de limites máximos tolerados para fumonisinas em especiarias apenas para milho e seus subprodutos (Brasil, 2022b; Brasil, 2022c; Brasil, 2025).

Na União Europeia, o regulamento (CE) nº 1881/2006 da Comissão, de 19 de dezembro de 2006, estabelece os teores máximos de certos contaminantes nos gêneros alimentícios. Para aflatoxinas em pimenta-preta, o limite é de 10 µg/kg para AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2. Para fumonisinas há apenas limites máximos estabelecidos para produtos a base de milho já para especiarias não há limites estabelecidos, o mesmo ocorre com a zearalenona (EUR-LEX, 2006). Já para OTA, o regulamento (UE) nº 105/2010 da Comissão, de 5 de fevereiro de 2010, altera o regulamento (CE) nº 1881/2006 e fixa o limite máximo de 30 µg/kg para OTA na categoria de especiarias, incluindo pimenta-preta (EUR-LEX, 2010).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostragem

Foram coletadas um total de 47 amostras de pimenta-preta comercializadas nos estados de São Paulo, Pará e Espírito Santo, com aproximadamente 200 g cada. No estado de São Paulo, foram obtidas 36 amostras, enquanto no Pará, 6 amostras foram coletadas. Em ambos os estados, 50% das amostras eram de grãos e 50% de pimenta moída. No Espírito Santo, foram coletadas 5 amostras de pimenta-preta em grãos.

4.2 Contagem e incidência fúngica

Para as amostras em grãos foi realizado o plaqueamento direto com desinfecção da superfície da amostra de acordo com Pitt e Hocking (2009). Cinquenta grãos por amostra foram desinfectados superficialmente com hipoclorito de sódio 0,4% durante 2 minutos e distribuídos em 5 placas de Petri contendo o meio Dichloran 18% Glycerol Agar (DG18). As placas foram incubadas a 25 °C por 5 dias, e a contaminação fúngica total foi expressa em porcentagem de grãos mofados.

Para as amostras de pimenta-preta em pó foi utilizado o método de diluição e plaqueamento em superfície. Vinte e cinco gramas de amostra foram homogeneizados em Stomacher com 225 mL de água peptonada a 0,1%, por 1 minuto. Foram realizadas diluições seriadas e retiradas alíquotas de 0,1 mL de cada diluição para plaqueamento em superfície em meio DG18. As placas foram incubadas a 25 °C por 5 dias. Foram selecionadas placas contendo entre 15 a 150 UFC (Unidades Formadoras de Colônia) e os resultados foram expressos em UFC/g de amostra (Pitt; Hocking, 2009).

Foi realizada uma análise morfológica para fins de triagem para análise molecular. Os grupos fúngicos presentes foram isolados em meio CYA (Czapek Yeast Autolysate agar) a 25 °C por 7 dias, caracterizados e agrupados morfolologicamente conforme seus morfotipos, segundo características descritas por

Samson e Pitt (2000) e Klich (2002) para *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. Os demais grupos fúngicos foram caracterizados de acordo com Pitt e Hocking (2009) e Samson et. al. (2010).

4.3 Análise da atividade de água das amostras

A análise de atividade de água foi realizada no aparelho Aqualab, modelo 4TE (Meter, USA), conforme recomendação do fabricante. As leituras foram realizadas em triplicatas a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

4.4 Caracterização molecular da micobiota

4.4.1 Purificação e preparo de isolados para extração de DNA

Representantes dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e outros grupos fúngicos (*miscellaneous fungi*), mais frequentes e agrupados conforme características morfológicas, foram inoculados em meio CYA para obtenção de colônias monospóricas.

As cepas purificadas foram cultivadas em meio YESA (*Yeast Extract Sucrose Agar*) a 25°C por três dias, até a formação de uma película micelial. A biomassa fúngica foi coletada por raspagem, com o auxílio de uma alça estéril, e depositada em um microtubo de 2 mL contendo microesferas estéreis (2 mm).

A esse material, foram adicionados 3 mL de solução de lise, composta por 6 mL de água Milli-Q, 2 mL de Tris-HCl bimolar (pH 8,0), 1 mL de SDS, 0,5 mL de EDTA e 0,5 mL de NaCl 5M. A amostra foi submetida ao disruptor por 6 minutos e, em seguida, incubada em banho-maria TE-056 mag (Tecnal, Brasil) a 70°C por 10 minutos, seguida por mais uma etapa no Digital Disruptor Genie SI-DD38 (Scientific Industries, EUA) por 5 minutos.

Posteriormente, procedeu-se à extração do DNA genômico conforme descrito no item 4.4.2.

4.4.2 Extração de DNA genômico

Para a obtenção do DNA genômico de fungos, foi utilizado o kit Gel DNA Purification (Mebep Bioscience, China), conforme o protocolo recomendado pelo fabricante.

A quantificação do DNA foi inicialmente determinada por espectrofotometria em um NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific, EUA) e, posteriormente, confirmada em gel de agarose a 1,0%, corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL). A confirmação foi feita por comparação da fluorescência sob luz UV entre as bandas de DNA obtidas e um padrão comercial de peso molecular conhecido, *Lambda DNA* (Thermo Fisher Scientific, EUA).

Após a quantificação, as amostras foram armazenadas a -20 °C.

4.4.3 Amplificação via PCR, sequenciamento (Sanger) e análises filogenéticas

Para a identificação molecular dos isolados fúngicos, foram utilizados diferentes loci, a escolha dos melhores loci para cada grupo foi analisada conforme a literatura e contexto taxonômico atual. A amplificação do barcode universal de fungos, região ITS (*rRNA*), foi feita com base no par de primers its1/its4 descritos em White et al. (1990); para amplificação do fator de alongamento da tradução (*TEF-1α*), utilizamos o par de primers EF-1/EF-2 descritos em O'donnell et al. (1998). Parte do gene da calmodulina (*CaM*) foi amplificado utilizando os pares de primers cmd5/cmd6 (Hong et al. 2006) ou CF1/CF4 (Peterson et al. 2005). O gene da beta- tubulina (*BenA*) foi amplificado com base nos primer Bt2a e Bt2b (Glass; Donaldson, 1995). O locus da segunda maior subunidade da RNA polimerase II (*RPB2*), foi amplificado com base nos primers 5Feur/7CReur, descritos em Houbraken et al. (2012).

As condições de amplificação foram as mesmas descritas em Silva et al. (2020) e/ou Watanabe et al. (2011).

Os produtos de PCR foram purificados usando ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup reagente (Thermo Fisher Scientific, EUA) de acordo com o protocolo do

fabricante. Os amplicons foram sequenciados em ambas as direções (direto e reverso) usando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, EUA) em um analisador SeqStudio Genetic Analyzer (Applied Biosystems, EUA).

As sequências obtidas foram comparadas através de alinhamento local utilizando a ferramenta BLAST (Altschul et al. 1990) contra os bancos de dados do NCBI [<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>]. Adicionalmente, árvores filogenéticas e/ou árvore de espécies de máxima verossimilhança (ML) foram construídas no programa MEGA 11 (Tamura et al. 2021); o melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi selecionado para cada alinhamento com base no Akaike Information Criteria (AIC) (Burnham; Anderson, 1992), previamente calculado em jModelTest2 (Darriba et al. 2012). A análise de bootstrap foi executada com 1,000 réplicas para estimar o nível de suporte estatístico dos ramos das árvores ML.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CAPÍTULO 1

5.1.1 Contagem e incidência fúngica

A análise da atividade de água (A_w) demonstrou uma variação de 0,5341 a 0,6911, com uma média de 0,5874 nas amostras de pimenta em grãos. Já nas amostras de pimenta moída, a variação ficou entre 0,4781 e 0,6432, com média de 0,5656 (Apêndice 1).

Das 47 amostras analisadas, 85% apresentaram contaminação fúngica, ao passo que apenas sete apresentaram ausência de contaminação fúngica, sendo duas amostras de grãos do estado de São Paulo, duas amostras de grãos e uma moída do Pará e duas amostras de grãos do Espírito Santo. Os índices de infecção variaram de 0% a 100% de grãos infectados, com uma média de 27% (Tabela 1). Nas amostras de pimenta-preta em pó, os níveis de contaminação variaram de $1,0 \times 10^2$ a $6,7 \times 10^5$ UFC/g, com média de $1,0 \times 10^5$ UFC/g (Tabela 2).

Silva (2017) apresentou dados sobre infecção em pimenta-preta coletadas nos estados de São Paulo, Maranhão e Rio Grande do Sul, com médias de 5,1% de amostras contaminadas em grãos e $1,4 \times 10^3$ UFC/g em amostras moídas, valores significativamente mais baixos do que os encontrados neste estudo. Outros trabalhos, como o de Oliveira et al. (2017), também relataram alta incidência fúngica nas análises de pimenta-preta adquiridas em feiras livres de Cuiabá e Mato Grosso. Além disso, Veloso et al. (2022) apresentaram dados de contaminação na pimenta-preta comercializada na região metropolitana de Recife – PE, variando de $5,4 \times 10^1$ UFC/g a $8,0 \times 10^6$ UFC/g, índices que superam os níveis de infecção encontrados neste estudo.

A variação no índice de infecção fúngica apresentado pode sugerir que a infecção pode ser proveniente de fatores como a qualidade do armazenamento, o tipo de manejo agrícola, os métodos utilizados para secagem da pimenta-preta, condições de comercialização e/ou local de coleta.

Tabela 1 - Porcentagem de infecção das amostras de pimenta-preta em grãos

Origem	Amostra	% de grãos infectados
São Paulo	A	68%
São Paulo	B	18%
São Paulo	E	26%
São Paulo	F	2%
São Paulo	G	60%
São Paulo	H	64%
São Paulo	I	54%
São Paulo	J	90%
São Paulo	k	100%
São Paulo	O	10%
São Paulo	P	10%
São Paulo	R	12%
São Paulo	T	16%
São Paulo	AE	8%
São Paulo	AF	22%
São Paulo	AG	56%
São Paulo	AI	0%
São Paulo	AJ	0%
Pará	CO	0%
Pará	CP	0%
Pará	CR	61%
Espirito Santo	FF	2%

Espirito Santo	FG	2%
Espirito Santo	FH	10%
Espirito Santo	FI	0%
Espirito Santo	FJ	12%

Tabela 2 - Contagem fúngica (UFC/g) das amostras de pimenta-preta moída

Origem	Amostras	UFC/g
São Paulo	C	$6,2 \times 10^4$
São Paulo	D	$2,9 \times 10^3$
São Paulo	L	$1,1 \times 10^5$
São Paulo	M	$1,0 \times 10^2$
São Paulo	N	$7,7 \times 10^3$
São Paulo	Q	$1,2 \times 10^5$
São Paulo	S	$2,9 \times 10^2$
São Paulo	U	$5,6 \times 10^3$
São Paulo	V	$3,9 \times 10^5$
São Paulo	W	$6,7 \times 10^5$
São Paulo	X	$6,9 \times 10^4$
São Paulo	Y	$4,0 \times 10^3$
São Paulo	Z	$1,4 \times 10^4$
São Paulo	AA	$6,8 \times 10^4$
São Paulo	AB	$1,3 \times 10^4$
São Paulo	AC	$2,7 \times 10^3$
São Paulo	AD	$7,5 \times 10^4$
São Paulo	AH	$2,5 \times 10^4$
Pará	CN	300(est)
Pará	CQ	<100
Pará	CS	$5,3 \times 10^5$

Das 47 amostras coletadas, foram isoladas 749 cepas, das quais 222 foram selecionadas de acordo com suas características morfológicas e, posteriormente, submetidas à análise molecular.

Com base na macromorfologia das cepas isoladas, foi possível distribuí-las em cinco grupos principais: *Aspergillus* (73,43%), *Fusarium* (8,45%), leveduras (5,50%), *Penicillium* (0,40%) e *Miscellaneous fungi* (12,22%) (*Cladosporiaceae*, *Mucoraceae*, *Myrmecridiaceae*, *Phaeosphaeriaceae*, *Rhizopodaceae*, *Sporidiobolaceae* e um grupo de cepas que não pôde ser classificado) (Figura 2).

Dentro do grupo *Aspergillus*, foi possível identificar seis subgrupos, classificados de acordo com as seções do gênero: *Aspergillus* sect. *Nigri* (42,60%),

A. sect. Aspergillus (29,80%), *A. sect. Flavi* (11,88%), *A. sect. Fumigati* (6,76%), *A. sect. Nidulantes* (8,22%) e *A. sect. Circumdati* (0,73%), com predominância das seções *Nigri* e *Aspergillus* (Figura 3).

Da Cunha Neto, Silva e Machado (2013) analisaram seis diferentes tipos de especiarias, entre elas a pimenta-preta, que foi relatada como a especiaria com maior presença de bolores, com 178 cepas, sendo o gênero *Aspergillus* o de maior incidência. Freire, Kozakiewicz e Paterson (2000) analisaram amostras de pimenta-preta obtendo uma taxa de 43% de cepas de *A. flavus* e 16% de *A. niger*, sendo estas duas espécies as predominantes neste estudo.

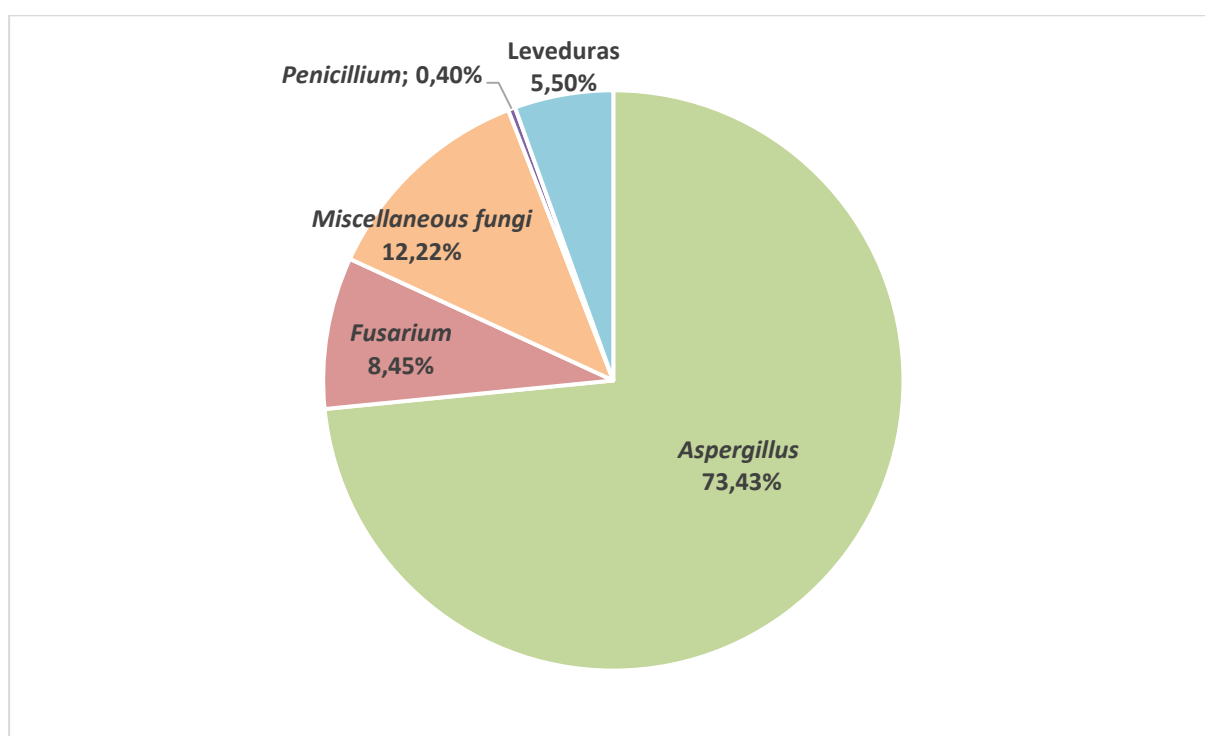


Figura 2: Incidência dos grupos fúngicos baseada em suas características macromorfológicas.

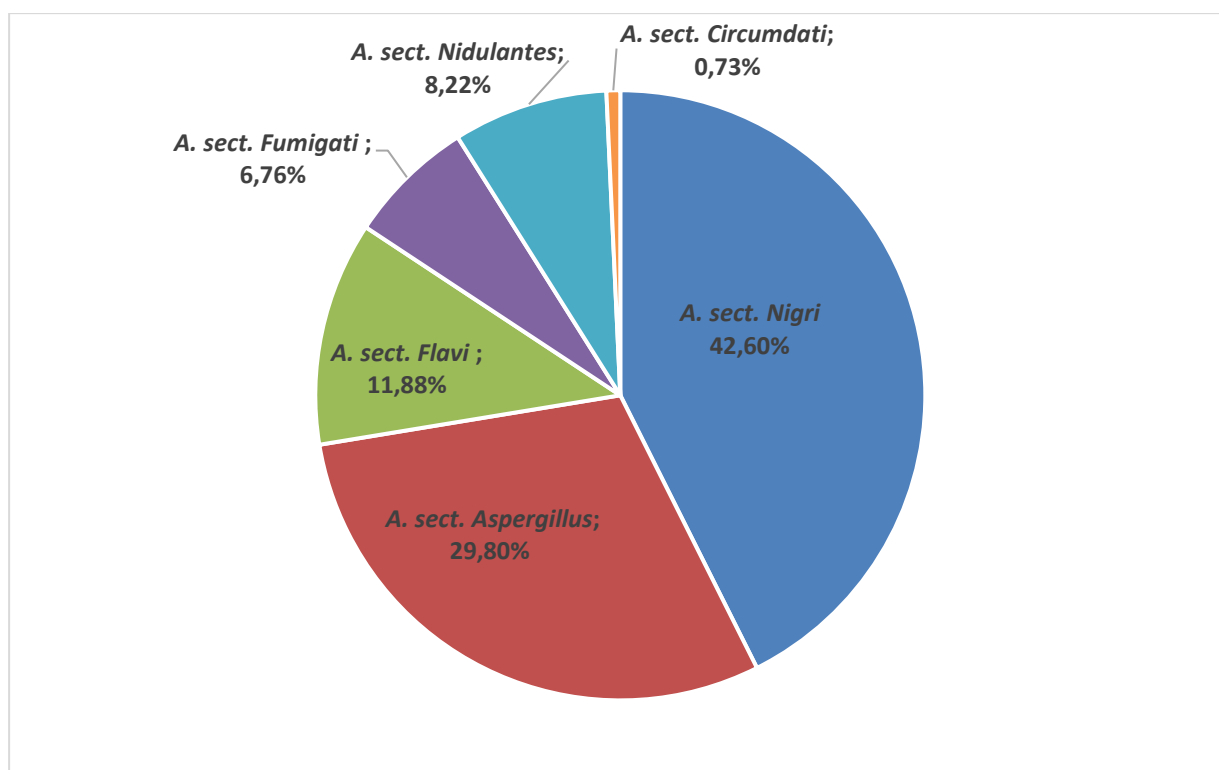


Figura 3: Incidência dos grupos fúngicos de *Aspergillus* baseada em suas características macromorfológicas.

5.2 Análise filogenética

Com a análise molecular das 222 cepas selecionadas, baseada nas árvores de máxima verossimilhança (disponíveis nos Apêndices 2 a 13), identificamos uma diversidade de 13 gêneros fúngicos e 51 espécies, das quais 24 pertencem ao gênero *Aspergillus* (Figura 4 e Tabela 3). Esse gênero apresentou a maior incidência, o que também foi relatado por Da Cunha Neto, Silva e Machado (2013) em amostras de Pimenta do reino, canela, colorífero e orégano, em feiras livres e permanentes de Cuiabá - MT. As espécies predominantes em pimenta-preta foram *A. niger* (n=24 cepas) e *A. nidulans* (n=20 cepas) (Figura 4 e Tabela 3).

As demais espécies encontradas neste substrato pertencem aos gêneros *Fusarium* (Figura 5 e Tabela 4) o segundo gênero de maior predominância. Além de outras espécies com menor incidência (Tabela 5 e Figuras do apêndice de 2 a 13).

Diversos estudos demonstraram a presença de fungos toxigênicos em especiarias (Freire, Kozakiewicz; Paterson, 2000; Gatti et al. 2003; Kong et al. 2014; Teixeira-Loyola et al. 2014; Silva et al. 2021). Entre as espécies identificadas por

meio do sequenciamento, foram observadas algumas potencialmente toxigênicas. Dentre elas, *Aspergillus niger*, *A. welwitschiae* e *A. carbonarius* são produtores de OTA; *A. flavus*, *A. pseudocaelatus*, *A. parasiticus* e *A. agricola* produzem aflatoxinas; *Fusarium proliferatum* é produtor de fumonisinas; e *F. caatingaense* produz zearalenona. Essas micotoxinas representam um risco significativo à saúde do consumidor, devido aos seus efeitos neurotóxicos, nefrotóxicos e potencialmente cancerígenos.

Dentre as espécies identificadas no gênero *Aspergillus*, houve um número significativo de cepas de *A. fumigatus* (Tabela 3 e Fig. 4), uma espécie potencialmente patogênica, frequentemente associada a casos de aspergilose pulmonar invasiva. A Organização Mundial da Saúde (OMS) incluiu *A. fumigatus* em seu Grupo Crítico na "Lista de Patógenos Fúngicos Prioritários da OMS para Orientar Pesquisa, Desenvolvimento e Ação em Saúde Pública" (World Health Organization, 2022).

Tabela 3 - Espécies identificadas do gênero *Aspergillus*

Espécies	Nº de cepas identificadas
<i>A. agricola</i>	1
<i>A. brunneoviolaceus</i>	5
<i>A. carbonarius</i>	7
<i>A. chevalieri</i>	10
<i>A. flavus</i>	13
<i>A. fumigatus</i>	13
<i>A. austroafricanus</i>	1
<i>A. luchuensis</i>	16
<i>A. montevicensis</i>	14
<i>A. neoniger</i>	4
<i>A. nidulans</i>	20
<i>A. niger</i>	24
<i>A. parasiticus</i>	1
<i>A. olivimuriae</i>	1
<i>A. pallidofulvus</i>	2
<i>A. pseudocaelatus</i>	1
<i>A. pseudoglaucus</i>	3
<i>A. puniceus</i>	1
<i>A. ruber</i>	6
<i>A. sublatatus</i>	1

<i>A. sydowii</i>	7
<i>A. tamarii</i>	11
<i>A. terreus</i>	1
<i>A. welwitschiae</i>	4

Tree scale: 0.1

Colored ranges

- A. SECTION NIGRI
- A. SECTION EUROTIIUM
- A. SECTION FUMIGATI
- A. SECTION FLAVI
- A. SECTION USTI
- A. SECTION FLAVIPEDES
- A. SECTION TERREI
- A. SECTION CIRCUMDATI
- A. SECTION NIDULANTES

bootstrap

- 0.6
- 0.7
- 0.8
- 0.9
- 1



Figura 4: Árvore de máxima verossimilhança da *Aspergillus* spp. com base em sequências de conjuntos de dados combinados (CaM+BenA). Os haplótipos obtidos neste estudo são indicados pela letra H. Apenas bootstraps $\geq 60\%$ são mostrados. *Talaromyces allahabadensis* é o grupo externo.

Tabela 4 - Espécies identificadas do gênero *Fusarium*

Espécies	Nº de cepas identificadas
<i>F. sulawesiense</i>	1
<i>F. pernambucanum</i>	2
<i>F. triseptatum</i>	6
<i>F. gossypinum</i>	3
<i>F. proliferatum</i>	3
<i>F. mangiferae</i>	1
<i>F. caatingaense</i>	1
<i>F. persenicum</i>	1
<i>F. nanum</i>	1
<i>F. lacertarum</i>	2
<i>Neocosmospora crassa</i>	3
<i>Neocosmospora sp.</i>	3
<i>Bisifusarium dimerum</i>	3
<i>Fusarium aff. Delphinoides</i>	1

Tabela 5 - Espécies identificadas de morfogrupos menos incidentes (leveduras, *Penicillium* e *Miscellaneous fungi*).

Espécies	Nº de cepas identificadas
<i>Cladosporium Cladosporioides Species Complex</i>	5
<i>Gilbertella persicaria</i>	1
<i>Mucor ramosissimus</i>	1
<i>Mymecridium flexuosum</i>	1
<i>Papiliotrema laurentii</i>	2
<i>Penicillium citrinum</i>	2
<i>Penicillium sp.</i>	3
<i>Phaeosphaeria chinensis</i>	1
<i>Rhizopus sexualis</i>	1
<i>Rhodotorula diobovata</i>	1
<i>Rhodotorula paludigena</i>	1
<i>Syncephalastrum sp.</i>	3
<i>Trichomonascus ciferri</i>	1
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	1

Teixeira-Loyola et al. (2014) relataram a incidência de alguns gêneros fúngicos em especiarias, incluindo *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Rhodotorula*, *Mucor*, *Chrysosporium* e *Candida tropicalis*.

Garcia et al. (2018) analisaram sete especiarias, demonstrando a presença de uma grande diversidade de fungos. Dentre as espécies encontradas, algumas

corroboram com a microbiota descrita neste estudo, como *A. carbonarius*, *A. chevalieri*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. montevicensis*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. pseudoglaucus*, *A. ruber*, *A. sydowii*, *A. tamarii* e *A. terreus*.

Da Cunha Neto, Silva e Machado (2013) analisaram diferentes especiarias e identificaram uma diversidade de 17 gêneros fúngicos entre as 356 cepas isoladas, com grande predominância do gênero *Aspergillus*, incluindo espécies como *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. parasiticus*, *A. terreus*, *A. nidulans* e *A. flavus*, além de outros gêneros, como *Penicillium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Cladosporium* e *Syncephalastrum*. A pimenta-preta foi a especiaria com maior incidência de fungos isolados, totalizando 178 cepas.

Silva et al. (2021) analisaram 60 amostras de pimenta-preta, com foco nas seções *Nigri* e *Circumdati*, e relataram uma alta presença de espécies pertencentes à seção *Nigri*, como *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. niger* e *A. welwitschiae*.

Garcia, Mallmann e Copetti (2018) reportaram a presença de *A. carbonarius*, *A. flavus*, *A. niger complex*, *A. nomius*, *A. ochraceus* e *A. parasiticus* em amostras de pimenta-preta e pimenta-branca. No entanto, não foi identificada a presença de OTA ou aflatoxinas nas amostras de pimenta-preta analisadas.

A maioria dos estudos reporta uma alta incidência de fungos filamentosos, especialmente do gênero *Aspergillus* spp. No entanto, no presente estudo, também foram identificadas leveduras, incluindo *Papiliotrema laurentii*, *Rhodotorula diobovata*, *Rhodotorula paludigena*, *Trichomonascus ciferrii* e *Wickerhamomyces anomalus*.

A presença dessas leveduras na pimenta-preta pode estar relacionada à microbiota natural do produto, ou a condições inadequadas de armazenamento. Algumas delas podem indicar deterioração quando presentes em alta quantidade. No entanto, embora as leveduras possam desempenhar papéis ecológicos relevantes na pimenta-preta, são necessárias mais pesquisas para compreender suas funções específicas e suas possíveis implicações para a saúde das plantas e na segurança alimentar.

Em conclusão, a presente investigação demonstrou uma expressiva diversidade fúngica em amostras de pimenta-preta, com predominância do gênero *Aspergillus*, seguido por *Fusarium*. No total, 51 espécies foram identificadas, com

destaque para *A. niger* e *A. nidulans* como as mais prevalentes. A detecção de espécies toxigênicas, incluindo *A. flavus*, *A. pseudocaelatus*, *A. parasiticus* e *A. agricola* (produtoras de aflatoxinas), bem como *A. niger*, *A. welwitschiae* e *A. carbonarius* (produtoras de OTA), evidencia riscos significativos para a segurança alimentar. Além disso, a presença de *A. fumigatus*, patógeno incluído na lista de prioridade da OMS, reforça a necessidade de monitoramento rigoroso na cadeia produtiva.

A identificação de leveduras como *Papiliotrema laurentii*, *Rhodotorula diobovata*, *Rhodotorula paludigena*, *Trichomonascus ciferrii* e *Wickerhamomyces anomalus* sugere interações ecológicas relevantes, possíveis processos de deterioração e implicações no armazenamento. Estudos complementares são necessários para elucidar seu impacto na qualidade e estabilidade do produto.

Além disso, diversas espécies foram identificadas pela primeira vez na pimenta-preta, incluindo *Aspergillus agricola*, *Gilbertella persicaria*, *Mucor ramosissimus*, *Phaeosphaeria chinensis*, *Rhizopus sexualis* e *Mymecridium flexuosum*. Esses achados reforçam a importância da adoção de boas práticas de armazenamento e controle microbiológico para mitigar riscos de contaminação e garantir a segurança e qualidade da pimenta-preta no mercado.

Além das espécies mencionadas, foram isoladas duas espécies candidatas que, com base na análise filogenética, correspondem a táxons ainda não descritos. Uma delas é do gênero *Penicillium*, classificada na seção *Paradoxa*, série *Atramentosa*, e a outra pertence ao gênero *Syncephalastrum*. A cepa de *Penicillium* será inicialmente nomeada como *Penicillium pipericola* sp. nov., enquanto a cepa de *Syncephalastrum* será chamada *Syncephalastrum brasiliensis* sp. nov. A descrição detalhada desses novos espécimes será apresentada no **Capítulo 2**.

6 CAPÍTULO 2

Espécies fúngicas recentemente descobertas na pimenta-preta brasileira: ***PENICILLIUM PIPERICOLA* SP. NOV.** e ***SYNCEPHALASTRUM BRASILIENSIS* sp. nov.**

RESUMO

Pimenta-preta (*Piper nigrum* L.) é uma importante *commodity* agrícola para o Brasil, que é o maior produtor do Hemisfério Ocidental. Neste estudo, descrevemos duas novas espécies de fungos associadas à pimenta-preta no Brasil. A primeira, *Penicillium pipericola* sp. nov., é categorizada sob o subgênero *Penicillium*, seção *Paradoxa*, série *Atramentosa*. A segunda nova espécie, *Syncephalastrum brasiliensis* sp. nov., pertence à ordem Mucorales, família Syncephalastraceae e gênero *Syncephalastrum*. Ela exhibe características únicas de crescimento não documentadas anteriormente em seu parente mais próximo, *Syncephalastrum massiliense*. A análise filogenética, combinada com observações morfológicas, apoia a classificação desses fungos como novas espécies. A descoberta de *P. pipericola* e *S. brasiliensis* aumenta nossa compreensão da diversidade fúngica na cadeia produtiva da pimenta-preta e pode ter implicações tanto na qualidade microbiológica da especiaria quanto em suas interações ecológicas dentro do agroecossistema.

INTRODUÇÃO

A pimenta-preta (*Piper nigrum* L.), frequentemente chamada de “rainha das especiarias”, tem importância econômica e cultural significativa como a especiaria mais consumida no mundo. Nativa da Índia e pertencente à família Piperaceae, esta planta tropical é cultivada em diversas regiões do mundo, com o Brasil se destacando como o segundo maior produtor e o principal exportador do Hemisfério Ocidental (Srinivasan, 2007; Nair, 2020; FAOSTAT, 2021). Ela contém vários compostos bioativos, incluindo alcaloides, terpenoides, fenóis e flavonoides, sendo a piperina um componente-chave (Yadav et al. 2021; Pop et al. 2024).

A produção brasileira está concentrada nos estados do Espírito Santo e Pará, que juntos respondem por mais de 90% da produção nacional (IBGE, 2023). Os frutos de *P. nigrum* são processados em pimenta preta ou branca, servindo a diversos propósitos nas indústrias culinária, farmacêutica, cosmética e alimentícia devido aos seus óleos essenciais, resinas e teor de piperina (Nair, 2020).

Apesar de sua proeminência global, a produção e o processamento da pimenta-preta enfrentam desafios significativos em relação à contaminação microbiana. Durante o manuseio e pós-colheita, incluindo secagem, armazenamento e embalagem, o produto é exposto a condições ambientais e de manuseio propícias ao crescimento microbiano. Particularmente por fungos dos gêneros associados ao armazenamento, como *Aspergillus* e *Penicillium*, são contaminantes frequentes capazes de alterar propriedades organolépticas, reduzir o valor de mercado e, o mais alarmante, produzir metabólitos secundários tóxicos conhecidos como micotoxinas (Yogendrarajah et al. 2014; Pickova et al. 2020). Entre elas, as aflatoxinas e a ocratoxina A (OTA) são particularmente preocupantes devido à sua potencial carcinogenicidade, efeitos imunossupressores e hepatotoxicidade (IARC, 2012; Mohsenzadeh et al. 2016). A diversidade inicial de contaminação fúngica desempenha um papel crucial na qualidade final dos produtos de pimenta (Weil et al. 2020).

A estrutura regulatória brasileira está em pé de igualdade com os padrões internacionais ao estabelecer limites microbiológicos e de micotoxinas rigorosos para garantir a segurança alimentar (BRASIL, 2022a; FDA, 2024). No entanto, a conformidade continua sendo um desafio contínuo, pois a contaminação é frequentemente relatada na cadeia de produção. Isso destaca a importância de intervenções em práticas agrônomicas e estratégias avançadas de monitoramento e controle microbiano. Além da contaminação, a diversidade microbiana associada à pimenta-do-reino pode oferecer uma perspectiva distinta para examinar a ecologia e a taxonomia fúngica. Especiarias são um nicho pouco explorado que contém uma ampla diversidade de táxons fúngicos, incluindo espécies não descritas anteriormente. Estudos recentes demonstraram a alta diversidade da ecologia microbiana associada às especiarias. A pimenta-preta é comumente relatada como tendo altos níveis de contaminação microbiana e fungos potencialmente toxigênicos (Geeta & Kulkarni, 1987; Weil et al. 2020; Mir et al. 2024). *Aspergillus* foi relatado como o gênero predominante na pimenta-preta, especialmente a seção *Nigri*, além disso, a seção *Circumdati* também foi relatada, ambos os grupos abrigam espécies potencialmente produtoras de micotoxinas (Garcia et al. 2018; Silva et al. 2021). Embora os níveis de contaminação fúngica sejam altos, as concentrações de micotoxinas são geralmente menores do que os

padrões regulatórios (Weil et al. 2020). No entanto, dado o potencial de produção dessas espécies, é importante adotar medidas rigorosas de controle de qualidade para conter a produção de micotoxinas.

Avanços crescentes em técnicas moleculares revolucionaram a taxonomia e a identificação de fungos. Abordagens de taxonomia integrativa, combinando dados genotípicos e fenotípicos, melhoraram significativamente a delimitação de espécies e a compreensão da biodiversidade fúngica (Stengel et al. 2022). Ferramentas ômicas, como proteômica, transcriptômica e metabolômica, fornecem insights abrangentes sobre o potencial biotecnológico dos fungos, desde a segurança alimentar até o desenvolvimento de medicamentos (Wijayawardene et al. 2023). Essas tecnologias ajudam a entender a estruturação da diversidade fúngica, ao mesmo tempo que facilitam a descrição de novos táxons.

Neste estudo, relatamos duas novas espécies de fungos associados à pimenta-preta produzida no Brasil. A primeira espécie é denominada *Penicillium pipericola* sp. nov. e pertence ao subgênero *Penicillium* sect. *Paradoxa* Ser. *Atramentosa*. O gênero *Penicillium* é altamente diverso e distribuído globalmente, com muitas espécies frequentemente isoladas do solo, resíduos orgânicos e uma variedade de produtos alimentícios. A seção *Paradoxa* acomoda espécies que são isoladas principalmente de material vegetal e são notáveis por seu rico metabolismo secundário, que pode incluir a produção de compostos bioativos (Nicoletti et al. 2014; Visagie et al. 2014; Nielsen et al. 2017).

A segunda espécie, *Syncephalastrum brasiliensis* sp. nov., é classificada dentro da ordem Mucorales, família Syncephalastraceae, gênero *Syncephalastrum*. Os membros do gênero *Syncephalastrum* são distinguidos pela formação de esporos em aglomerados característicos, dispostos em estruturas que lembram cachos ou massas, e são comumente encontrados no solo e na matéria orgânica em decomposição (Pavlović & Bulajić, 2006). A ocorrência de *S. brasiliensis* na pimenta-preta é, portanto, uma descoberta intrigante, pois esse gênero não pertence aos grupos típicos de microrganismos associados às culturas de especiarias. Descobrir membros deste grupo dentro da cadeia de produção da pimenta-preta levanta questões sobre seu papel ecológico e potenciais interações com outros microrganismos ou mesmo com a própria planta de pimenta.

Este estudo teve como objetivo descrever com base em abordagem polifásica duas novas espécies de fungos, obtidas de pimenta-preta produzida no Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostragem

As cepas das duas espécies candidatas foram isoladas de amostras de pimenta-preta coletadas em comércios da cidade de Campinas, estado de São Paulo. O isolamento foi realizado conforme Pitt e Hocking (2009).

Análise morfológica

Os fungos foram avaliados com base em suas características macroscópicas. Todos os isolados fúngicos (n = 676) foram purificados e semeados em três pontos equidistantes em ágar extrato de levedura Czapek (CYA) e ágar extrato de malte (MEA) a 25 °C e deixados para incubar por 5 dias.

Os grupos fúngicos foram caracterizados morfollogicamente de acordo com as chaves taxonômicas de Samson e Pitt (2000), Klich (2002) e Pitt e Hocking (2009), suplementados por outras fontes quando necessário. A identificação morfológica foi limitada ao nível de gênero/grupo fúngico (morfogruppo) e subsequentemente combinada com análise molecular.

Além disso, para as cepas das espécies candidatas, um protocolo mais aprofundado foi executado para dar suporte à descrição e delimitação das espécies. Para a análise de *P. pipericola* sp. nov., estudos morfológicos foram realizados de acordo com a metodologia proposta por Visagie et al. (2014). Para avaliar as características macroscópicas, cepas de espécies candidatas foram semeadas em diferentes meios: em Czapek Yeast Autolysate Agar (CYA), Malt Extract Agar (MEA), Creatine Sacarose Agar (CREA), Di-chloran Glycerol Agar 18% (DG18) e Yeast Extract Sacarose Agar (YESA). A incubação foi realizada no escuro a 25 °C por 7 dias. Além disso, as cepas foram testadas em meio CYA a 30 °C e 37 °C por 7 dias. Enquanto para *S. brasiliensis*, análises morfológicas foram realizadas em meio MEA, PDA e Sacarose Dextrose Chloramphenicol Agar (SDCA)

em temperaturas (5°C, 25°C, 35°C e 40°C) ao longo de 7 dias. Todos os experimentos foram realizados em triplicata para garantir a precisão.

Para análise microscópica, lâminas foram preparadas usando ácido láctico de colônias cultivadas em meio MEA por 7 dias a 25 °C. Características micromorfológicas, incluindo o tamanho de conidióforos, estipes, vesículas, conídios, métula e fiáldes, foram quantificadas usando o software Carl Zeiss™ AxioVision Release 4.8.2.

Análise molecular

Para extração de DNA genômico, cepas purificadas foram cultivadas em meio de sacarose de levedura líquida (YES) a 25 °C por 3 dias até que as membranas miceliais fossem formadas e então maceradas com nitrogênio líquido. Este material foi usado para obter DNA genômico de acordo com o protocolo do fabricante (PureLink Mini Kit, Invitrogen, EUA). O DNA foi quantificado usando espectrofotometria (NanoDrop®, Thermo Scientific).

Diferentes loci foram usados para identificação molecular de isolados fúngicos. Os melhores loci para cada grupo foram selecionados de acordo com a literatura e o contexto taxonômico atual. A amplificação do código de barras fúngico universal, região ITS (rRNA), foi realizada usando o par de primers its1/its4 descrito em White et al. (1990); para amplificação do fator de alongamento da tradução (*TEF-1α*), usamos o par de primers EF-1/EF-2 descrito em O'donnel et al. (1998). Parte do gene da calmodulina foi amplificada usando o par de primers CF1/CF4 (Peterson et al. 2005). O gene da beta-tubulina (*BenA*) foi amplificado usando os primers Bt2a e Bt2b (Glass e Donaldson, 1995). O locus da segunda maior subunidade da RNA polimerase II (RPB2) foi amplificado usando os primers 5Feur/7CReur, descritos em Houbraken et al. (2012). As condições de amplificação foram as mesmas descritas em Silva et al. (2020) e/ou Watanabe et al. (2011).

Após a amplificação, os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose (1% p/v), corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta. Após a amplificação, a purificação do produto de PCR foi realizada usando ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup (Thermo Fisher Scientific, Santa Clara, CA, EUA). Os fragmentos de PCR foram então submetidos ao sequenciamento

direto usando o método descrito por Sanger et al. (1977). O sequenciamento foi realizado bidirecionalmente (direto e reverso) usando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) em um SeqStudio Genetic Analyzer® (Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA).

O alinhamento da sequência foi realizado usando ClustalW no BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.1.3.0. A concatenação dos loci foi realizada usando DnaSP v.6 DNA Sequence Polymorphism.

Árvores de máxima verossimilhança (ML) foram construídas separadamente para cada locus e para o conjunto de dados combinados. O alinhamento de sequência foi realizado com as sequências de cepas tipo ou neotipo de espécies formalmente aceitas dentro de cada grupo taxonômico (*Penicillium* ou *Syncephalastrum*) usando ClustalW.

Para a construção da árvore ML, o modelo de substituição de nucleotídeos ideal foi determinado usando jModelTest2 com base no critério de informação de Akaike (AIC). As árvores ML foram construídas usando MEGA 11, usando 1.000 réplicas bootstrap, sua visualização final ocorreu por meio da plataforma ITOL (Interactive Tree of Life - <https://itol.embl.de/itol.cgi>).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As espécies candidatas *Penicillium pipericola* sp. nov. (Fig.1) e *Syncephalastrum brasiliensis* sp. nov. (Fig.3) foram identificadas como linhagens evolutivas independentes, cada uma formando grupos monofiléticos robustos, conforme indicado pela concordância genealógica.

Penicillium é um gênero fúngico grande e diverso, com mais de 350 espécies distribuídas pelo mundo em diferentes matrizes ambientais, entre as quais se destacam solos, plantas e produtos alimentícios (Ropars et al. 2016; Perrone e Susca, 2017; Fernández Bunster, 2021). Esses fungos são importantes decompositores, mas também são capazes de deteriorar alimentos e produzir micotoxinas, como ocratoxina A e patulina (Perrone e Susca, 2017; Fernández Bunster, 2021). No entanto, aplicações industriais para *Penicillium* são notórias, como na fabricação de queijo e salame e na produção de metabólitos farmacêuticos importantes, incluindo penicilina (Ropars et al. 2016; Fernández Bunster, 2021).

Estudos genômicos recentes estão fornecendo alguns *insights* sobre os mecanismos de adaptação e transferência horizontal de genes em espécies de *Penicillium* (Ropars et al. 2016). Além disso, esses fungos são promissores em suas aplicações biotecnológicas, como biorremediação, produção de biocombustíveis e fermentação de alimentos (Akaniro et al. 2023). A versatilidade das espécies de *Penicillium* as torna objetos valiosos para pesquisas sobre mecanismos de adaptação e prospecção de metabólitos de interesse.

Algumas espécies de *Penicillium* demonstraram aumentar o crescimento das plantas, bem como a resistência a patógenos. Os filtrados da cultura de *Penicillium* aumentaram a germinação das sementes e melhoraram o crescimento das raízes e brotos em tomate e trigo (Mushtaq et al. 2012; Khokhar et al. 2013). A melhoria no conteúdo de clorofila, proteína e níveis de aminoácidos foi associada a algumas cepas de *Penicillium* em plantas de gergelim (Radhakrishnan et al. 2014). Foi demonstrado que esses fungos têm efeitos protetores contra o estresse salino, bem como patógenos fúngicos, como *Fusarium* spp. (Radhakrishnan et al. 2014). Foi demonstrado que a cepa GP15-1 de *Penicillium* spp. melhora as plantas de pepino e as protege do tombamento causado por *Rhizoctonia solani*, bem como da antracnose causada por *Colletotrichum orbiculare* (Hossain et al. 2014). As habilidades de promoção do crescimento vegetal de *Penicillium* spp. têm sido atribuídas à produção de metabólitos benéficos, colonização eficiente da raiz e indução de resistência sistêmica em plantas hospedeiras (Mushtaq et al. 2012; Hossain et al. 2014). O isolamento de *P. pipericola* sp. nov. da pimenta-preta desperta interesse em investigar seu papel ecológico na cadeia de produção da pimenta-preta, suas interações microbianas com outros microrganismos ou com a própria planta hospedeira.

Morfologicamente, *P. pipericola* exibe características distintas em comparação com seu parente mais próximo, *Penicillium mexicanum*. Essas diferenças incluem padrões de crescimento mais amplos, coloração única e microestruturas específicas não observadas em *P. mexicanum* (Fig.2). A análise combinada de dados fenotípicos e genotípicos justifica a classificação de *P. pipericola* como uma nova espécie, situada no subgênero *Penicillium*, seção *Paradoxa*, série *Atramentosa*.

O gênero *Syncephalastrum* está incluído no grupo de zigomicetos, que desempenham diferentes papéis ecológicos. Descritas pela primeira vez por Thaxter em 1897 (Thaxter, 1897), as espécies *Syncephalastrum* são geralmente conhecidas como fungos ambientais e contaminantes de laboratório (Kabtani et al. 2024). O gênero é caracterizado por hifas irregulares, ramificadas e aseptadas com vesículas terminais cercadas por merosporângios cilíndricos (Kabtani et al. 2024).

O gênero *Syncephalastrum* pertence à ordem Mucorales e tem sido cada vez mais relatado em infecções humanas, especialmente em indivíduos imunocomprometidos (Mangaraj et al. 2014; Kabtani et al. 2024). Duas espécies recentemente descritas, *S. massiliense* e *S. timonearum*, foram isoladas de amostras clínicas e apresentaram características fenotípicas e genotípicas únicas (Kabtani et al. 2024). *Syncephalastrum racemosum* é outro membro deste gênero implicado em infecções, conhecido por causar mucormicose subcutânea altamente invasiva (Mangaraj et al. 2014). A partir de *insights* fornecidos pela filogenética molecular e genômica, um campo que remodelou significativamente nossa compreensão da evolução fúngica, agora sabemos que muitos fungos tradicionalmente colocados dentro de zigomicetos, incluindo *Syncephalastrum*, são parafiléticos em relação a *Ascomycota* e *Basidiomycota* (Spatafora et al. 2017). *S. brasiliensis* sp. nov. é filogeneticamente próximo de *S. massiliense*, o que incita a uma investigação mais aprofundada sobre seu potencial como patógeno em humanos.

Da mesma forma, *S. brasiliensis* sp. nov. também mostra diferenças morfológicas claras de seu parente mais próximo, *Syncephalastrum massiliense* e *Syncephalastrum simplex*. Essas diferenças incluem a capacidade de crescer a 40 °C, microestruturas menores (como vesículas e mesosporângios) e a presença de micélio branco, características não compartilhadas por *S. massiliense*. A análise de dados fenotípicos e genotípicos confirma que *S. brasiliensis* é uma nova espécie dentro da ordem Mucorales, família Syncephalastraceae e gênero *Syncephalastrum*.

Portanto, as descrições detalhadas dessas novas espécies, *P. pipericola* sp. nov. e *S. brasiliensis* sp. nov., são baseadas em uma sólida base filogenética e na observação de características morfológicas únicas que as diferenciam definitivamente de táxons relacionados.

Taxonomia

***Penicillium pipericola* sp. nov.** Rosa, V.S.; Silva, J.J. **Figura 1 e 2.**

Etimologia: O epíteto específico se refere ao substrato do qual foi isolado, pimenta-do-reino, *Piper nigrum*.

Em *Penicillium* subgen. *Penicillium* sect. *Paradoxa* ser. *Atramentosa*.

Tipificação: BRASIL. Estado de São Paulo, Cidade de Campinas, 22°54'06.7"S 47°03'37.2"W, em pimenta-preta, 10 de abril de 2024, isolado por Rosa, V.S, holótipo ITAL-3JA.

Barcode de DNA: *BenA* (PV022467), *CaM* (PV022465), *RPB2* (PV022466), *ITS* (PV007905).

Diam. da colônia: 7 dias, 25 °C: CYA 38,3–43,0 mm, MEA 30,0–33,0 mm, YESA 47,0–51,0 mm; DG18 19,0–26,0 mm; CREA 19,6–21,0 mm; CYA 30 °C 28,0–33,0 mm.

Diagnóstico: Morfologicamente, *P. pipericola* pode ser diferenciada de *P. mexicanum* por seu crescimento significativamente mais rápido em vários meios: CYA, YESA, MEA e CREA. Sua morfologia de colônia também é notavelmente distinta; a superfície da colônia de *P. pipericola* é mais aveludada com uma estrutura radial, enquanto *P. mexicanum* tende a ter colônias profundas e altamente sulcadas (veja a descrição de *P. mexicanum* [Visagie et al., 2014]). Filogeneticamente, *P. pipericola* sp. nov. é facilmente distinguido de *P. mexicanum* e outras espécies na ser. *Atramentosa*. Os principais caracteres diferencias em relação à cepa tipo de *P. mexicanum* (CBS H-21805) são: 9 snips (Single-nucleotide polymorphism) para o locus *BenA*; 16 snips para o locus *RPB2*; 24 snips para o locus *CaM*; e 2 snips para o locus ITS. Quando as genealogias *CaM+ITS+RPB2+BenA* são combinadas, *P. pipericola* sp. nov. forma uma linhagem evolutiva independente (IEL) com bom suporte estatístico (bootstrap = 90%) (Figura 1).

Características da colônia: Em CYA 25 °C, colônias verdes, com bordas brancas, esporulação abundante, superfície aveludada com sucros radiais, exsudatos presentes; pigmentos solúveis e escleródios ausentes. Em MEA 25 °C, 7 dias:

Colônias pequenas com centro branco e um gradiente de marrom a verde em direção às bordas. Bordas irregulares e finas, superfície lisa. Pigmentos e escleródios ausentes. Em YESA 25 °C, 7 dias: Colônias grandes com centro acastanhado com gradiente de tons verdes em direção às bordas; aparência aveludada; sulcos radiais abundantes e ordenados com centro enrugado. Pigmentos solúveis, exsudatos e escleródios ausentes. Em DG18 25 °C, 7 dias, Colônias pequenas e planas com aparência aveludada, bordas brancas; cor verde uniforme em toda a colônia. Pigmentos solúveis, exsudatos e escleródios ausentes. Em CREA 25 °C, 7 dias, colônias pequenas, de coloração verde, centro pronunciado com aparência cerebrospectral, bordas arredondadas e lisas, sem produção de ácido.

Micromorfologia: Conidióforos triverticilados; Estipes de parede lisa, 31,2 x 3,1 µm; Metulae, 10,6 x 3,0 µm (7,7-16,5 x 2,9-3,5); Phialides ampuliformes, 10,0 x 2,4 µm (9,9-12,5 x 2,2-3,5); Conídios lisos e elipsoidais 3,3 x 2,9 µm (2,9-4,7 x 2,7-3,0).

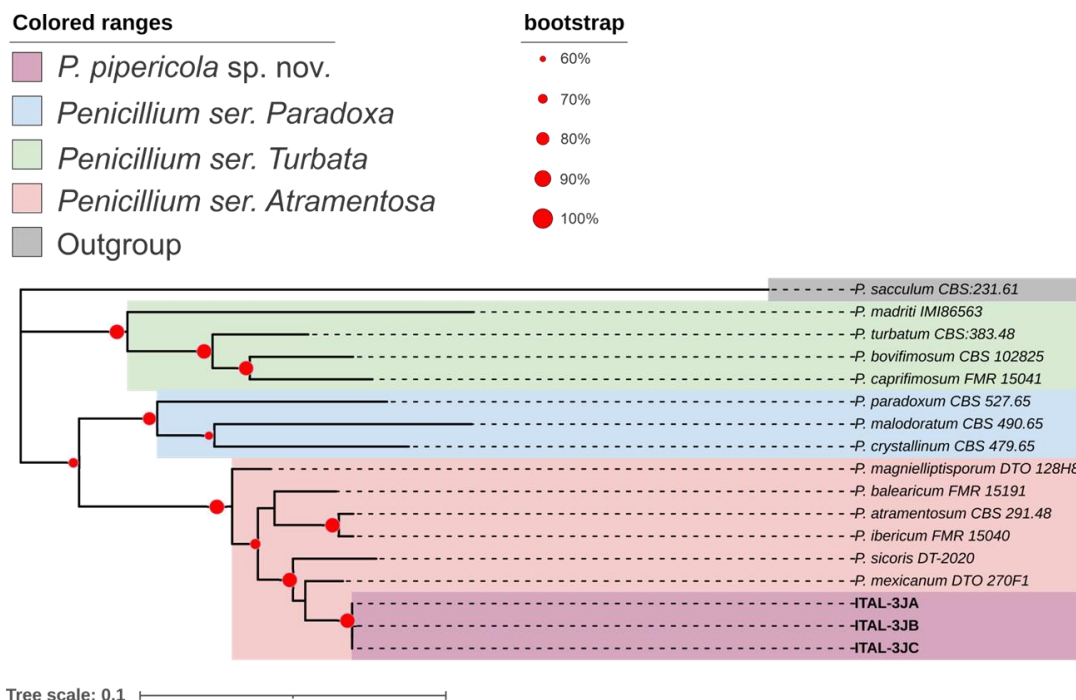


Figura 1. Árvore de máxima verossimilhança (GTR+G+I) da série *Penicillium*: *Paradoxa*, *Atramentosa* e *Turbata* com base em sequências de conjuntos de dados combinados (*CaM*+*BenA*+*RPB2*+*ITS*). Apenas bootstraps $\geq 60\%$ são mostrados. *Penicillium sacculum* é o grupo externo.

Macromorphology

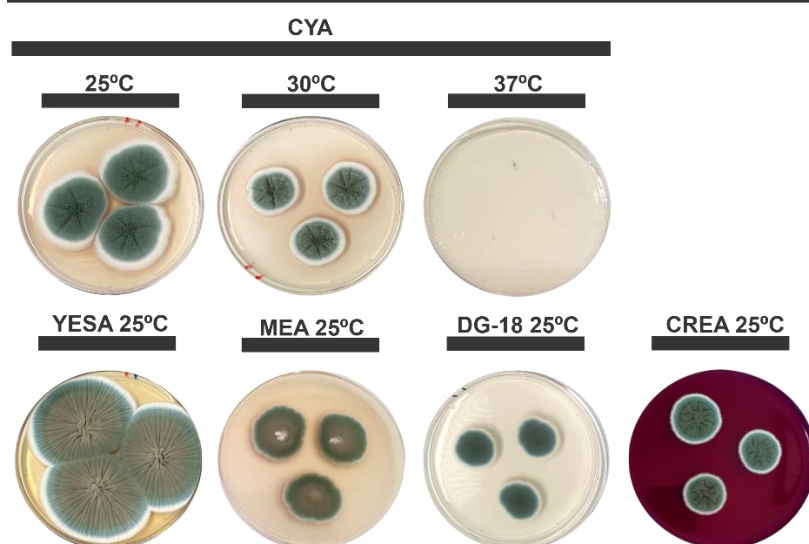


Figura 2. Caracteres morfológicos de *Penicillium pipericola* sp. nov. (ex-tipo ITAL-3JA). Colônias A da esquerda para a direita (linha superior) CYA (25°C, 30°C e 37 °C); (linha inferior) YESA, MEA, DG18 e CREA (25 °C).

***Syncephalastrum brasiliensis* sp. nov.** Silva, J.J., Rosa, V.S. **Figuras 3 e 4.**

Etimologia: Nomeado em homenagem ao seu local de isolamento, Brasil.

Em gen. *Syncephalastrum* fam. Syncephalastraceae ordo. Mucorales cl. Mucoromycetes subdiv. Mucoromycotina div. Mucoromycota subreg. Mucoromyceta.

Tipificação: BRASIL. Estado de São Paulo, Cidade de Campinas, 22°54'06.7"S 47°03'37.2"W, em pimenta-do-reino, 10 de abril de 2024, isolado por Rosa, V.S, holótipo ITAL-36NA.

Códigos de barras de DNA: *ITS* (PV007760); *LSU* (PV015155).

Diam. da colônia: 7 dias, 25 °C: CYA 38,3–43,0 mm, MEA 30,0–33,0 mm, YESA 47,0–51,0 mm; DG18 19,0–26,0 mm; CREA 19,6–21,0 mm; CYA 30 °C 28,0–33,0 mm.

Diagnóstico: Morfologicamente, *S. brasiliensis* pode ser distinguido de *S. massiliense* principalmente por seu bom crescimento a 40 °C (cresce a 45 °C), tamanho do esporangiósporo e coloração da colônia (veja a descrição de *S. massiliense* (Kabani et al., 2024)). Ele difere de *S. simplex* pela textura e coloração da colônia, bem como pelo formato da vesícula (veja a descrição de *S. simplex* (Zhao et al., 2023)). Filogeneticamente, os principais caracteres diferencias em relação à cepa tipo de *S. massiliense* (CBS H-21805) são: 6 snips (Single-nucleotide polymorphism) e 1 INDEL (INsertion/DELetion) para o locus *ITS* e 5 INDEL's para o locus *LSU*. Quando as genealogias *ITS+LSU* são combinadas, *S. brasiliensis* sp. nov. forma uma linhagem evolutiva independente (IEL) com bom suporte estatístico (bootstrap = 82%) (Figura 3).

Caracteres da colônia: Em MEA 25 °C, crescimento rápido e expansivo, cobrindo toda a placa em 5 dias; coloração homogênea de branco a creme, algumas linhagens podem desenvolver tons acinzentados a partir do quinto dia; textura algodoadada e aérea, típica de fungos Mucorales, com hifas longas e difusas, margem indistinta, crescimento difuso sem delimitação clara. reverso da placa pálido, colônias entre 40-68 mm. Cresce bem a 40 °C, mas não há crescimento a 5 °C. Em PDA 25 °C, crescimento rápido e expansivo, cobrindo toda a placa em 5 dias, coloração branca a cinza claro, com centro ligeiramente mais escuro, sugerindo

início de esporulação. Textura algodoada e densamente aérea, com micélio difuso e filamentosos; margem difusa e irregular, com crescimento radial homogêneo; reverso da placa pálido a marrom amarelado. Colônias entre 44-67 mm. Cresce bem a 40 °C, mas não cresce a 5 °C; exsudatos são produzidos. Em SDA+cloranfenicol 25 °C, colônia de rápido crescimento cobrindo quase toda a superfície da placa; predominantemente branca a acinzentada, com leve escurecimento no centro. Textura escamosa, densamente filamentosa, com aparência aveludada ou algodoada. Margens bem definidas, que podem ser ligeiramente difusas devido à rápida expansão do micélio. Reverso da placa pálido a claro, colônias de 41-70 mm, com hifas aéreas. Cresce bem a 40 °C, mas não cresce a 5 °C.

Micromorfologia: Esporangióforos eretos, ramificados ou simples, esporângios de formato variável, principalmente subglobosos, nascidos de hifas aéreas, cenocíticas, lisas e hialinas. Merosporângio presente com vesícula globosa a subglobosa coberta radialmente por merosporângios cilíndricos alinhados na superfície da vesícula. Esporangiósporos com superfície lisa, elípticos, globosos e subglobosos, individuais ou em cadeias de até 7 esporangiósporos. Zigósporos e clamidósporos não observados. Esporângios, 41-70 µm; hifas 11-24 µm de largura; merosporângios 6-11 µm; esporangiósporos, 4-7 µm.

Tree scale: 0.1

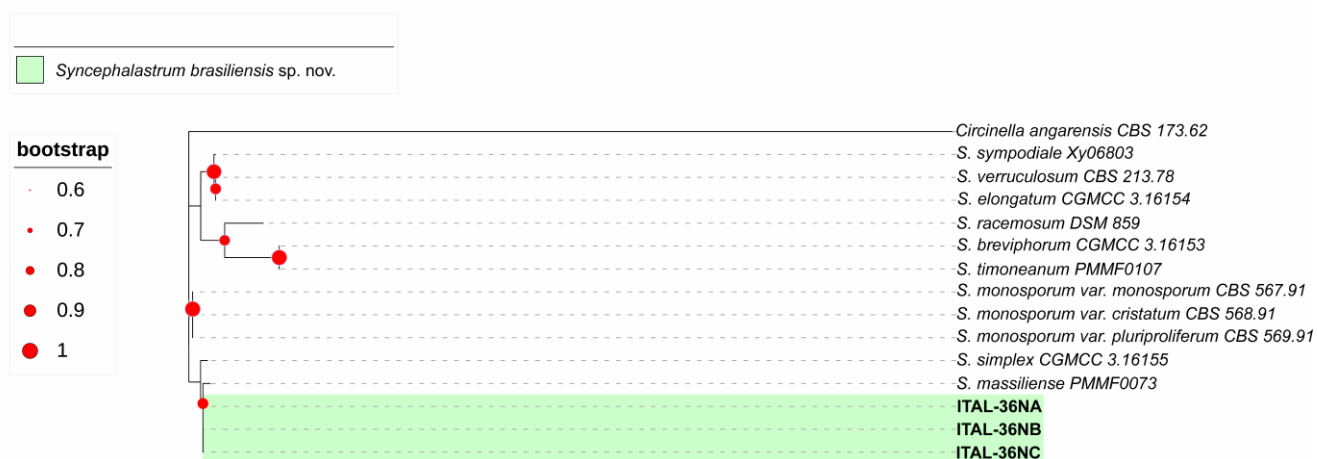
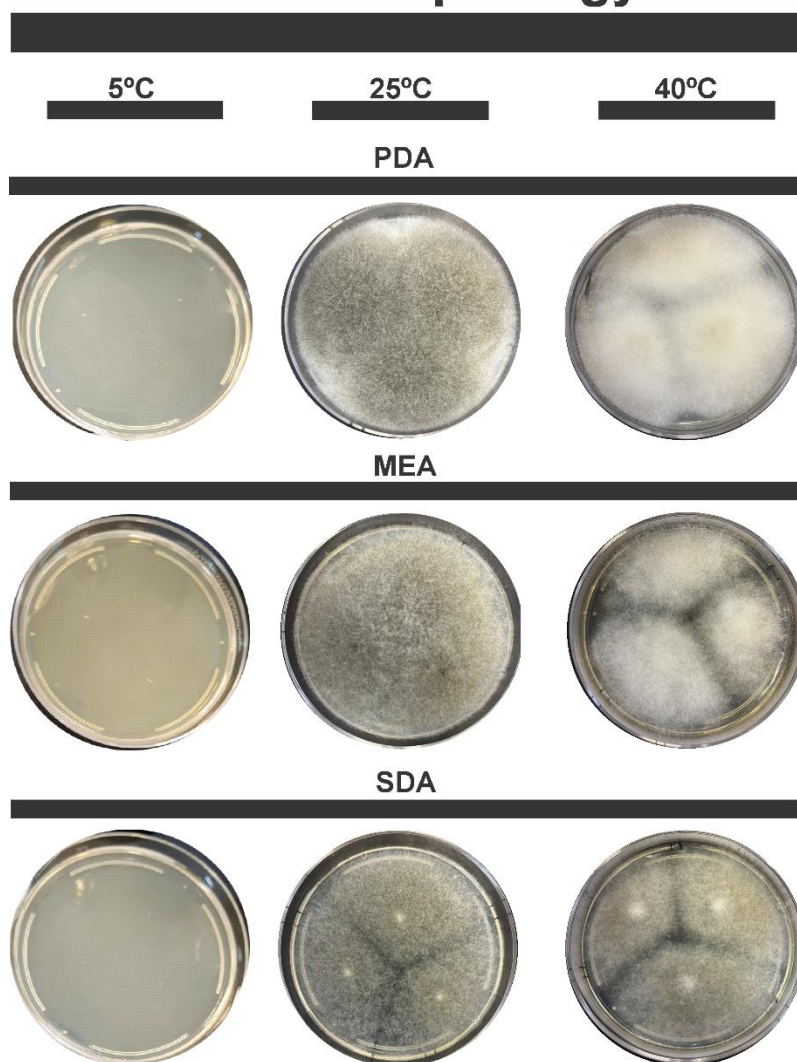


Figura 3. Árvore de máxima verossimilhança (T93+G) do gênero *Syncephalastrum* com base em sequências de conjuntos de dados combinados (LSU+ITS). Apenas bootstraps $\geq 60\%$ são mostrados. *Circinella angarensis* é o grupo externo.

Macromorphology



Micromorphology

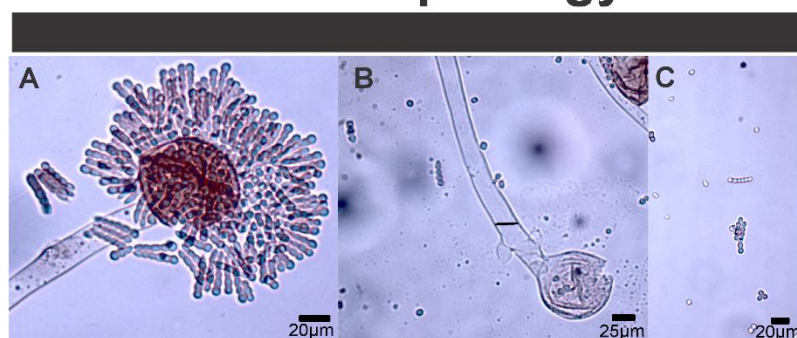


Figura 4. Caracteres morfológicos de *Syncephalastrum brasiliensis* sp. nov. (ex-tipo ITAL-36N). As colunas da esquerda para a direita representam diferentes temperaturas: 5°C, 25°C e 40°C; As linhas de cima para baixo representam diferentes meios: CYA, MEA e SDA.

CONCLUSÃO

Este estudo descreve duas novas espécies fúngicas associadas à pimenta-preta no Brasil: *Penicillium pipericola* sp. nov. e *Syncephalastrum brasiliensis* sp. nov. A caracterização morfológica e a análise filogenética confirmam sua identidade como táxons distintos, expandindo o conhecimento sobre a diversidade fúngica nesse substrato. A presença desses fungos na cadeia produtiva da pimenta-preta ressalta a importância do monitoramento microbiológico, tanto para a segurança alimentar quanto para o entendimento de interações ecológicas e potenciais aplicações biotecnológicas. Estudos futuros devem avaliar o impacto dessas espécies na qualidade do produto e seu possível papel na dinâmica microbiana do agroecossistema.

REFERÊNCIAS

Akaniro, I. R. et al. *Penicillium* species as chassis for biomanufacturing and environmental sustainability in the modern era: Progress, challenges, and future perspective. ***Fungal Biology Reviews***, v. 46, p. 100326, 2023.

Baldrian, Petr. Production of lignocellulolytic enzymes by mushrooms. ***Fungal Biology Reviews***, v. 25, n. 4, p. 180-206, 2011.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Instrução Normativa nº 161, de 1º de julho de 2022. Estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 6 jul. 2022a. Disponível em:

http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/IN_161_2022_.pdf/b08d70cb-add6-47e3-a5d3-fa317c2d54b2. Acesso em: 13 mar. 2023.

FDA - Food and Drug Administration. *Mycotoxins*. Disponível em: <<https://www.fda.gov/food/natural-toxins-food/mycotoxins>>. Acesso em: 27 mar. 2025.

Fernandez-Bunster, Guillermo. Diversity, Phylogenetic Profiling of Genus *Penicillium*, and Their Potential Applications. In: Industrially Important Fungi for

Sustainable Development: Volume 1: Biodiversity and Ecological Perspectives. Cham: **Springer International Publishing**, 2021. p. 335-361.

Garcia, M. V. et al. Fungi in spices and mycotoxigenic potential of some *Aspergilli* isolated. **Food microbiology**, v. 73, p. 93-98, 2018.

Glass, N. Louise; Donaldson, Gary C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied and environmental microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1323-1330, 1995.

Geeta, H.; Kulkarni, P. R. Survey of the microbiological quality of whole, black pepper and turmeric powder sold in retail shops in Bombay. **Journal of food protection**, v. 50, n. 5, p. 401-403, 1987.

Hong, Seung-Beom et al. Novel *Neosartorya* species isolated from soil in Korea. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 56, n. 2, p. 477-486, 2006.

Hossain, Md Motaher et al. The plant growth-promoting fungus *Penicillium* spp. GP15-1 enhances growth and confers protection against damping-off and anthracnose in the cucumber. **Journal of oleo science**, v. 63, n. 4, p. 391-400, 2014.

Houbraken, J. et al. New penicillin-producing *Penicillium* species and an overview of section *Chrysogena*. **Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 29, n. 1, p. 78-100, 2012.

IARC. **International Agency for Research on Cancer**. Chemical agents and related occupations. A review of human carcinogens. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, v. 100, p. 224-248, 2012.

IBGE - **Instituto Brasileiro De Geografia e Estatística**. Pimenta-do-reino. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/pimenta-do-reino/br> Acesso em: 24 set. 2024.

Kabtani, jihane et al. *Syncephalastrum massiliense* sp. nov. and *Syncephalastrum timoneanum* sp. nov. isolated from clinical samples. **Journal of Fungi**, v. 10, n. 1, p. 64, 2024.

Hokhar, Ibatsam et al. Effect of *Penicillium* species culture filtrate on seedling growth of wheat. **International Research Journal of Agricultural Science and Soil Science**, v. 3, n. 1, p. 24-29, 2013.

Klich, Maren A. Identification of common *Aspergillus* species. **Centraalbureau voor Schimmelcultures**, 2002.

Lima, A. et al. Qualidade microbiológica de pimenta preta produzida e comercializada em São Mateus, Espírito Santo, Brasil. **Enciclopédia Biosfera**, v. 16, n. 30, p. 470-482, 2019.

Mangaraj, S. et al. A rare case of subcutaneous mucormycosis due to *Syncephalastrum racemosum*: Case report and review of literature. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 32, p. 448-451, 2014.

Mir, M. Amin; ASHRAF, M. Waqar; ANDREWS, Kim. Assessment of heavy metals and fungi contamination of spices available in Saudi Arabian food cuisines. **Food Chemistry Advances**, v. 4, p. 100694, 2024.

Mohsenzadeh, Mahdiah Sadat et al. Immunosuppression following dietary aflatoxin B1 exposure: a review of the existing evidence. **Toxin Reviews**, v. 35, n. 3-4, p. 121-127, 2016.

Moreira, Wendel Ko et al. Production chain of black pepper in Brazil. **Nucleus**, v. 18, n. 2, 2021.

Mushtaq, Sobia et al. Effects of *Penicillium* extracts on germination vigour in subsequent seedling growth of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 45, n. 8, p. 932-937, 2012.

Nair, Kodoth Prabhakaran. The geography of black pepper (*Piper nigrum*): the "King" of Spices – Volume 1. **Springer Nature**, 2020.

Nicoletti, Rosario et al. Endophytism of *Penicillium* species in woody plants. **Open Mycology Journal**, v. 8, p. 1-26, 2014.

Nielsen, Jens Christian et al. Global analysis of biosynthetic gene clusters reveals vast potential of secondary metabolite production in *Penicillium* species. **Nature Microbiology**, v. 2, n. 6, p. 1-9, 2017.

O'donnell, Kerry et al. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 5, p. 2044-2049, 1998.

Pavlovic, Milos D.; Bulajic, Nina. Great toenail onychomycosis caused by *Syncephalastrum racemosum*. **Dermatology online journal**, v. 12, n. 1, 2006.

Perrone, Giancarlo; SUSCA, Antonia. *Penicillium* species and their associated mycotoxins. **Mycotoxigenic Fungi: Methods and Protocols**, p. 107-119, 2016.

Peterson, Stephen W. et al. *Penicillium coffeae*, a new endophytic species isolated from a coffee plant and its phylogenetic relationship to *P. fellutanum*, *P. thiersii* and *P. brocae* based on parsimony analysis of multilocus DNA sequences. **Mycologia**, v. 97, n. 3, p. 659-666, 2005.

Pickova, D. et al. A review on mycotoxins and microfungi in spices in the light of the last five years. **Toxins**, v. 12, p. 789, 2020.

Pitt, J. I.; Hocking, A. D. *Fungi and food spoilage*. **Springer Science Business Media**: New York, 2009.

Pop, Adina Simona et al. Therapeutic Insights into Black Pepper (*Piper nigrum*): Phytochemical Composition, Bioactive Properties, and Health Benefits. **Hop and Medicinal Plants**, v. 32, n. 1-2, p. 139-152, 2024.

Radhakrishnan, Ramalingam et al. Characterization of plant growth-promoting traits of *Penicillium* species against the effects of high soil salinity and root disease. **Journal of Plant Interactions**, v. 9, n. 1, p. 754-762, 2014.

Ropars, Jeanne et al. Diversity and mechanisms of genomic adaptation in *Penicillium*. **Aspergillus and Penicillium in the post-genomic era**, 2016.

Samson, Robert A.; Pitt, John I. **Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification**. CRC Press, 2003.

Sanger, Frederick; Nicklen, Steven; COULSON, Alan R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

Silva, Josué J. da et al. Diversity within *Aspergillus niger* Clade and Description of a New Species: *Aspergillus vinaceus* sp. nov. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 371, 2020.

Silva, Josué J. da et al. Diversity within *Aspergillus niger* Clade and Description of a New Species: *Aspergillus vinaceus* sp. nov. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 371, 2020.

Singh, Raj et al. Assessment of enzymatic potential of soil fungi to improve soil quality and fertility. **Asian Journal of Biological and Life Sciences**, v. 9, n. 2, p. 163-168, 2020.

Spatafora, Joseph W. et al. The fungal tree of life: from molecular systematics to genome-scale phylogenies. **The fungal kingdom**, p. 1-34, 2017.

Srinivasan, K. Black pepper and its pungent principle-piperine: a review of diverse physiological effects. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 47, n. 8, p. 735-748, 2007.

Stengel, Ashley et al. Improving taxonomic delimitation of fungal species in the age of genomics and phenomics. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 847067, 2022.

Thaxter, Roland. New or peculiar Zygomycetes. 2. Syncephalastrum and Syncephalis. **Botanical Gazette**, v. 24, n. 1, p. 1-15, 1897.

Urquhart, Andrew S.; Idnurm, Alexander. Syncephalastrum contaminatum, a new species in the Mucorales from Australia. **Mycoscience**, v. 61, n. 3, p. 111-115, 2020.

Visagie CM et al. Identification and nomenclature of the genus Penicillium. **Studies in mycology** vol. 78: 343-71, 2014.

Watanabe, M. et al. Molecular phylogeny of the higher and lower taxonomy of the Fusarium genus and differences in the evolutionary histories of multiple genes. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, p. 322, 2011.

Weil, Mathieu et al. Effect of processing on microbial safety of wild pepper (Piper borbonense) from Reunion Island. **Food Control**, v. 111, p. 107061, 2020.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR protocols: a guide to methods and applications, **Academic Press**, p. 315-322, 1990.

Wijayawardene, Nalin N. et al. OMICS e outras tecnologias avançadas em aplicações micológicas. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 6, p. 688, 2023.

Yadav, Sheel et al. Comparative transcriptome profiling of fruit tissue provides novel insights into piperine biosynthesis in black pepper (Piper nigrum L.). **Scientia Horticulturae**, v. 322, p. 112451, 2023.

Yogendrarajah, P. et al. Mycological quality and mycotoxin contamination of Sri Lankan peppers (Piper nigrum L.) and subsequent exposure assessment. **Food Control**, v. 41, n. 1, p. 219-230, 2014.

7 CONCLUSÕES GERAIS

Este estudo permitiu a identificação dos fungos que compõem a micobiota da pimenta-preta comercializada nos estados de São Paulo, Espírito Santo e Pará. A aplicação de uma abordagem molecular multilocus proporcionou uma identificação mais precisa das espécies, revelando uma micobiota diversificada nesse substrato. Foram detectadas espécies potencialmente patogênicas, ocratoxigênicas e aflatoxigênicas, além da descrição de dois novos fungos pertencentes aos gêneros *Penicillium* e *Syncephalastrum*. Esses resultados ressaltam a importância de uma investigação detalhada ao longo de toda a cadeia produtiva dessa especiaria, visando identificar os principais pontos de contaminação e compreender a diversidade fúngica em todas as etapas de produção, garantindo maior segurança para a saúde dos consumidores.

8 REFERÊNCIAS

Abdel-azeem, ahmed m. et al. **Industrially important fungi for sustainable development**. Springer International Publishing, 2021.

Abdelshafy, Asem Mahmoud et al. Hydrogen peroxide from traditional sanitizer to promising disinfection agent in food industry. **Food Reviews International**, v. 40, n. 2, p. 658-690, 2024.

Acosta, María Elena Bendayán. Diversidad de hongos filamentosos en dos tipos de bosques del arboretum el huayo Loreto 2021. 2023. Tese de Doutorado. **Universidad Nacional de la Amazonía Peruana**.

Agência Pará. Tomé-Açu mantém a liderança na produção de pimenta-do-reino no estado, 2021. Disponível em: <https://www.agenciapara.com.br/noticia/31119/tome-acu-mantem-a-lideranca-na-producao-de-pimenta-do-reino-no-estado>. Acesso em: 27 dez. 2024.

Akaniro, Ifunanya R. et al. Penicillium species as chassis for biomanufacturing and environmental sustainability in the modern era: Progress, challenges, and future perspective. **Fungal Biology Reviews**, v. 46, p. 100326, 2023.

Al Ayoubi, Manar et al. Risk of exposure to aflatoxin B1, ochratoxin A, and fumonisin B1 from spices used routinely in Lebanese cooking. **Food and Chemical Toxicology**, v. 147, p. 111895, 2021.

Alisaac, elias; mahlein, anne-katrin. Fusarium head blight on wheat: biology, modern detection and diagnosis and integrated disease management. **Toxins**, v. 15, n. 3, p. 192, 2023.

Altschul, s. F.; gish, w.; miller, w.; myers, e. W.; lipman, d. J. Basic local alignment searchtool. **Journal of molecular biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

Alves, Danilo Aparecido Serafim. Secagem de pimenta-do-reino preta (piper nigrum l.) em secador de leito fixo. 2015.

Aparecido, C. C.; Rosa, E. C. Avaliação morfologia e molecular para identificação de Fusarium sp. 2020.

Arruda, Adriana Dias; Beretta, A. L. R. Z. Micotoxinas e seus efeitos à saúde humana: revisão de literatura. **RBAC**, v. 51, n. 4, p. 286-9, 2019.

Ascensão, V. L.; filho, V. E. M. Extração, caracterização química e atividade antifúngica de óleoessencial *Syzygium aromaticum* (Cravo da Índia). **Cadernos de Pesquisa**, v. 20, p. 137-144, 2013.

Australian Government. Food Standards Code – Schedule 27 – **Microbiological limits in food**, 2021. Disponível em:<
<https://www.legislation.gov.au/Series/F2015L00453>>. Acesso em: 20 set. 2022.

Barbosa, Renan do Nascimento et al. Brazilian tropical dry forest (Caatinga) in the spotlight: an overview of species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* (Eurotiales) and the description of *P. vascosobrinhou* sp. nov. **Acta Botanica Brasilica**, v. 34, p. 409-429, 2020.

Barreiro, Carlos; García-Estrada, Carlos. Proteomics and *Penicillium chrysogenum*: Unveiling the secrets behind penicillin production. **Journal of Proteomics**, v. 198, p. 119-131, 2019.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Instrução Normativa nº 161, de 1º de julho de 2022. Estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 6 jul. 2022a. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/IN_161_2022_.pdf/b08d70cb-add6-47e3-a5d3-fa317c2d54b2. Acesso em: 13 mar. 2023.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Instrução Normativa nº 160, de 1º de julho de 2022. Estabelece os limites máximos tolerados (LMT) de contaminantes em alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2022c. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-in-n-160-de-1-de-julho-de-2022-413367081>. Acesso em: 13 mar. 2023.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução RDC nº 722, de 1º de julho de 2022. Dispõe sobre os limites máximos tolerados (LMT) de contaminantes em alimentos, os princípios gerais para o seu estabelecimento e os métodos de análise para fins de avaliação de conformidade. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 6 jul. 2022b. p. 1-5. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_722_2022_.pdf/15cda9ff-74a4-456e-9fd3-6610125adb75. Acesso em: 13 mar. 2023.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. *Instrução normativa - nº 351, de 18 de março de 2025*. Altera a Instrução Normativa - IN nº 160, de 1º de julho de 2022, que estabelece os limites máximos tolerados (LMT) de contaminantes em alimentos. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2025. Disponível em:

https://anvisa.gov.br/legis/datalegis.net/action/ActionDatalegis.php?acao=abrirTextoAto&link=S&tipo=INM&numeroAto=00000351&seqAto=000&valorAno=2025&orgao=DC/ANVISA/MS&codTipo=&desItem=&desItemFim=&cod_modulo=310&cod_menu=9434. Acesso em: 25 mar. 2025.

Brito, Ricardo Gomes de. Produção de amilase por *Aspergillus flavus* isolado a partir da mandioca (*Manihot esculenta*). 2017.

Burnham, K. P.; Anderson, D. R. Information and likelihood theory: a basis for model selection and inference. Model selection and inference: A practical information-theoretic approach, 2nd ed., **Springer-Verlag**, New York, 1998, p. 49-97, 1992.

Chalyy, zakhar A. et al. Mycotoxins in spices consumed in Russia. **Voprosy Pitaniia**, v. 92, n. 2, p. 26-34, 2023.

Crous, Pieter Willem et al. Fusarium: more than a node or a foot-shaped basal cell. **Studies in mycology**, v. 98, p. 100116, 2021.

Cruz, Eleandro Silva Da et al. Crescimento inicial de plantas de pimenta do reino: substratos, regimes de irrigação e biocontrole de *Fusarium* spp. com *Trichoderma* spp. 2020.

Da Cunha Neto, Adelino; Da Silva, Fabrícia Vieira; Machado, Alexandre Paulo. Incidência de espécies fúngicas potencialmente toxigênicas em especiarias. **Ensaio e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde**, v. 17, n. 1, 2013.

Darriba, D.; Taboada, G. L.; Doallo, R.; Posada, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature methods**, v. 9, n. 8, p. 772, 2012.

De Lemos, O. F. et al. Conservação e melhoramento genético da pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) em associação com as técnicas de biotecnologia. 2011.

De Lemos, Oriel Filgueira; Tremacoldi, Célia Regina; Poltronieri, Marli Costa. Boas práticas agrícolas para aumento da produtividade e qualidade da pimenta-do-reino no estado do Pará. 2014.

De Oliveira, Janaina Nicolau; Oliveira, Alessandra Valéria; Meneghello, Eline Ramos. Análise Molecular de Espécies de *Aspergillus* Contaminantes de Uvas Vendidas no Comércio de Maringá-PR. **Iniciação Científica CESUMAR**, v. 15, n. 2, 2013.

Da Silva, Adriana Raquel Persson et al. Ochratoxin A and related fungi in Brazilian black pepper (*Piper nigrum* L.). **Food Research International**, v. 142, p. 110207, 2021.

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, 2004.

Elshafie, Abdulkadir E. et al. Fungi and aflatoxins associated with spices in the Sultanate of Oman. **Mycopathologia**, v. 155, p. 155-160, 2002.

EUR-LEX. **Comissão Europeia**. Regulamento (CE) n. o 1881/2006 da Comissão, de 19 de dezembro de 2006. que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. Disponível em: < <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=celex:32006R1881> >. Acesso em: 17 set. 2024.

EUR-LEX. **Comissão Europeia**. Regulamento (CE) n.o 2073/2005 da Comissão de 15 de novembro de 2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. Disponível em: < <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:02005R2073-20190228&from=SV> >. Acesso em: 20 jan. 2023.

EUR-LEX. **Comissão Europeia**. Regulamento (UE) n.º 105/2010 da Comissão, de 5 de fevereiro de 2010, que altera o Regulamento (CE) n.º 1881/2006 que fixa teores máximos para certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios no que se refere à ocratoxina A. Disponível em: < [https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2010/105\(1\)/oj](https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2010/105(1)/oj) >. Acesso em: 17 set. 2024.

FAOSTAT. Crops and livestock products. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, 2015-2021. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>. Acesso em: 10 jan. 2023.

Fernandez-Bunster, Guillermo. Diversity, Phylogenetic Profiling of Genus *Penicillium*, and Their Potential Applications. In: industrially important fungi for sustainable development: volume 1: biodiversity and ecological perspectives. Cham: **Springer International Publishing**, p. 335-361. 2021.

FDA - **Food and Drug Administration**. *Mycotoxins*. Disponível em: <<https://www.fda.gov/food/natural-toxins-food/mycotoxins>>. Acesso em: 27 mar. 2025.

Fleming, Alexander. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. **British journal of experimental pathology**, v. 10, n. 3, p. 226, 1929.

Freire, Francisco das Chagas O.; KOZAKIEWICZ, Zofia; PATERSON, R. Russell M. Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. **Mycopathologia**, v. 149, n. 1, p. 13-19, 2000.

Freire, I.; Passamani, F.R.F.; Thomas, A.B.; Nassur, R.C.M.R.; Silva, I. M.; Paschoal, F.N.; Pereira, G.e.; Prado, G.; Batista, L.R. Influence of physical and chemical characteristics of wine grapes on the incidence of *Penicillium* and *Aspergillus* fungi in grapes and ochratoxin A in wines. **International Journal of Food Microbiology**, v. 241, p. 181–190, 2017.

Frisvad, J. C.; Hubka, V.; Ezekiel, C. N.; Hong, S. B.; Nováková, A.; Chen, A. J.; Arzanlou, M.; Larsen, T. O.; Sklenář, F.; Mahakarnchanakul, W.; Samson, R. A.; Houbraken, J. Taxonomy of *Aspergillus* section Flavi and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. **Studies in Mycology**, v. 93, p. 1-63, 2019.

Frisvad, Jens C. et al. Safety of the fungal workhorses of industrial biotechnology: update on the mycotoxin and secondary metabolite potential of *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, p. 9481-9515, 2018.

Frisvad, Jens C. et al. Fumonisin and ochratoxin production in industrial *Aspergillus niger* strains. **Plos one**, v. 6, n. 8, p. e23496, 2011.

Frisvad, Jens C.; Samson, Robert A. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. **Studies in mycology**, v. 49, n. 1, p. 1-174, 2004.

Gao, Zhicheng et al. The natural occurrence, toxicity mechanisms and management strategies of Fumonisin B1: A review. **Environmental Pollution**, v. 320, p. 121065, 2023.

Garcia, M. V.; Parussolo, G.; Moro, C. B.; Bernardi, A. O.; Copetti, M. V. Fungi in spices and mycotoxigenic potential of some *Aspergilli* isolated. **Food microbiology**, v. 73, p. 93-98, 2018.

Garcia, Marcelo Valle et al. Contaminação fúngica de especiarias e potencial micotoxigênico dos isolados. 2015

Garcia, Marcelo Valle; MALLMANN, Carlos Augusto; COPETTI, Marina Venturini. Aflatoxigenic and ochratoxigenic fungi and their mycotoxins in spices marketed in Brazil. **Food Research International**, v. 106, p. 136-140, 2018.

Gatti, M. J. et al. Mycological survey for potential aflatoxin and ochratoxin producers and their toxicological properties in harvested Brazilian black pepper. **Food additives and contaminants**, v. 20, n. 12, p. 1120-1126, 2003.

Gilchrist, C. L. M.; Lacey, H. J.; Vuong, D.; Pitt, J. I.; Lange, I.; Lacey, e.; Pilgaard, B.; Chooi, Y.; Piggott, A. M. Comprehensive chemotaxonomic and genomic profiling of abiosynthetically talented Australian fungus, *Aspergillus burnettii* sp. nov. **Fungal Genetics and Biology**, v. 143, p. 103435, 2020.

Glass, N.I.; Donaldson, G.C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous *Ascomycetes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p. 1323–1330, 1995.

Gomes Filho, José; Santos, Elton Benedito dos Santos; AMORIM, Edna Peixoto da Rocha. Controle da fusariose (*Fusarium solani* f. sp. *piperis*) em pimenta-do-reino cv. Bragantina com extratos brutos aquosos e fungicida. **Summa Phytopathologica**, v. 46, p. 49-52, 2020.

Guevara-Suarez, M. et al. Species diversity in *Penicillium* and *Talaromyces* from herbivore dung, and the proposal of two new genera of penicillium-like fungi in Aspergillaceae. **Fungal Systematics and Evolution**, v. 5, n. 1, p. 39-76, 2020.

Hf, Link. Observationes in ordines plantarum naturales. Dissertatio I. **Mag Ges Naturf Freunde Berlin**, v. 3, p. 3-42, 1809.

Hong, S.B.; Cho, H.S.; Shin, H.D.; Frisvad, J.C.; Samson, R.A. Novel *Neosartorya* species isolated from soil in Korea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 477–486, 2006.

Hong, Seung-Beom et al. *Aspergillus luchuensis*, an industrially important black *Aspergillus* in East Asia. **PloS one**, v. 8, n. 5, p. e63769, 2013.

Hossain, Md Motaher et al. The plant growth-promoting fungus *Penicillium* spp. GP15-1 enhances growth and confers protection against damping-off and anthracnose in the cucumber. **Journal of oleo science**, v. 63, n. 4, p. 391-400, 2014.

Houbraken, J. et al. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. **Studies in mycology**, v. 95, p. 5-169, 2020.

Houbraken, J. et al. New penicillin-producing *Penicillium* species and an overview of section *Chrysogena*. **Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 29, n. 1, p. 78-100, 2012.

IARC. **International Agency for Research on Cancer**. Chemical agents and related occupations. A review of human carcinogens. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, v.100, p. 224-248, 2012.

IBGE - **Instituto Brasileiro De Geografia e Estatística**. Pimenta-do-reino. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/pimenta-do-reino/br> Acesso em: 24 set. 2024.

IPC - **International Pepper Community**. Crop Position Report: All Countries - 2020. Proceedings of the International Pepper Conference, 2020.

Disponível em: https://internationalpepperconference.com/report/index?product=10&year=2019&report_type=10&member=&graph=20. Acesso em: 10 jan. 2023.

Irshad, Memoona et al. Infecção pulmonar invasiva por espécies de *Syncephalastrum*: dois relatos de caso e revisão da literatura. **IDCases**, v. 21, p. e00913, 2020.

Kabak, B. The Fate of Mycotoxins during thermal food processing. **Journal of Science and Food Agriculture**, v. 89, p. 549-554, 2009.

Kabtani, Jihane et al. *Syncephalastrum massiliense* sp. nov. and *Syncephalastrum timoneanum* sp. nov. isolated from clinical samples. **Journal of Fungi**, v. 10, n. 1, p. 64, 2024.

Khokhar, Ibatsam et al. Effect of *Penicillium* species culture filtrate on seedling growth of wheat. **International Research Journal of Agricultural Science and Soil Science**, v. 3, n. 1, p. 24-29, 2013.

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

Kong, Weijun et al. Analysis of fumonisins B 1 and B 2 in spices and aromatic and medicinal herbs by HPLC-FLD with on-line post-column derivatization and positive confirmation by LC-MS/MS. **Analyst**, v. 137, n. 13, p. 3166-3174, 2012.

Kong, Weijun et al. Occurrence of toxigenic fungi and determination of mycotoxins by HPLC-FLD in functional foods and spices in China markets. **Food chemistry**, v. 146, p. 320-326, 2014.

Kubátová, Alena et al. Taxonomic revision of the biotechnologically important species *Penicillium oxalicum* with the description of two new species from acidic and saline soils. **Mycological Progress**, v. 18, p. 215-228, 2019.

Lee, Jung-Min et al. *Penicillium mexicanum*: An Unrecorded Fungal Species Isolated from Air Samples Collected in Korea. **The Korean Journal of Mycology**, v. 51, n. 2, p. 127-133, 2023.

Lewis, Lauren et al. Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in eastern and central Kenya. **Environmental health perspectives**, v. 113, n. 12, p. 1763-1767, 2005.

Mamali, Vasiliki et al. Necrotizing skin and soft tissue infection due to *Syncephalastrum* species and *Fusarium solani* species complex following open tibia fracture. **Diagnostics**, v. 12, n. 5, p. 1163, 2022.

Mandeel, Q. A. Fungal contamination of some imported spices. **Mycopathologia**, v. 159(2), p. 291–298, 2005.

Mangaraj, S. et al. A rare case of subcutaneous mucormycosis due to *Syncephalastrum racemosum*: Case report and review of literature. **Indian J. Med. Microbiol**, v. 32, p. 448-451, 2014.

MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Instrução Normativa nº 10, de 15 de maio de 2006. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade da Pimenta-do-reino. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2006. Disponível em: <https://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?m>

Marotti, Braz S. et al. Screening of species from the genus *Penicillium* producing cell bound lipases to be applied in the vegetable oil hydrolysis. **Química Nova**, v. 40, p. 427-435, 2017.

Marroquín-Cardona, A. G.; Johson, N. M.; Phillips, T. D.; Hayes, A. W. Mycotoxins in a changing global environment—a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 69, p. 220-230, 2014.

Mathuram, Alice J.; Mohanraj, Promila; Mathews, Mary S. Rhino-orbital-cerebral infection by *Syncephalastrum racemosum*. **J Assoc Physicians India**, v. 61, n. 5, p. 339-40, 2013.

Mendes, Simone Martins et al. Effect Of Earworm Injuries On Fumonisin Production In Bt And Non-Bt Maize. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 21, 2022.

Mir, M. Amin; ASHRAF, M. Waqar; ANDREWS, Kim. Assessment of heavy metals and fungi contamination of spices available in Saudi Arabian food cuisines. **Food Chemistry Advances**, v. 4, p. 100694, 2024.

Mohsenzadeh, Mahdieh Sadat et al. Immunosuppression following dietary aflatoxin B1 exposure: a review of the existing evidence. **Toxin Reviews**, v. 35, n. 3-4, p. 121-127, 2016.

Monteiro, João Paulo Silva. Isolamento e identificação de *Aspergillus* seções Cremei, Circumdati e Flavi, em alho. 2024.

Mousavi, Bitā et al. Occurrence and species diversity of human-pathogenic Mucorales in commercial food-stuffs purchased in Paris area. **Medical Mycology**, v. 57, n. 6, p. 739-744, 2019.

Mushtaq, Sobia et al. Effects of *Penicillium* extracts on germination vigour in subsequent seedling growth of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **Archives of phytopathology and plant protection**, v. 45, n. 8, p. 932-937, 2012.

Nair, Kodoth Prabhakaran. The Geography of Black Pepper (*Piper nigrum*): The "King" of Spices– Volume 1. **Springer Nature**, 2020.

Nicoletti, Rosario et al. Endophytism of *Penicillium* species in woody plants. **Open Mycol. J**, v. 8, p. 1-26, 2014.

Nielsen, Jens Christian et al. Global analysis of biosynthetic gene clusters reveals vast potential of secondary metabolite production in *Penicillium* species. **Nature microbiology**, v. 2, n. 6, p. 1-9, 2017.

Nielsen, Kristian Fog et al. Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 395, p. 1225-1242, 2009.

O'donnell, K.; Kistler, H. C.; Cigelnik, E.; Ploetz, R. C. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from

nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Applied Biological Sciences**, v. 95, n. 5, p. 2044-2049, 1998.

Oliveira, J.O; Vilela, L.T.O; Silva, L.H.O; Nascimento, T.S; Magalhães, F.A.C; Vivi, V.K; Análise microbiológica de especiarias desidratadas comercializadas em feiras livres de Cuiabá, Mato Grosso. **Journal Health NPEPS**, 2017.

Pandya, Jagruti J.; Gupte, Akshaya. Production of xylanase under solid-state fermentation by *Aspergillus tubingensis* JP-1 and its application. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 35, n. 5, p. 769-779, 2012.

Pardo, E. et al. Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in green coffee from different origins. **Food Science and Technology International**, v. 10, n. 1, p. 45-49, 2004.

Pavlovic, Milos D.; BULAJIC, Nina. Great toenail onychomycosis caused by *Syncephalastrum racemosum*. **Dermatology online journal**, v. 12, n. 1, 2006.

Perrone, Giancarlo; Susca, Antonia. *Penicillium* species and their associated mycotoxins. **Mycotoxigenic Fungi: Methods and Protocols**, p. 107-119, 2016.

Perry, Katia SP. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química nova**, v. 27, p. 293-300, 2004.

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

Pickova, D.; Ostry, V.; Malir, J.; Toman, J.; Malir, F. A review on mycotoxins and microfungi in spices in the light of the last five years. **Toxins**, v. 12, p. 789, 2020.

Pitt, J. I.; Hocking, A. D. Fungi and food spoilage. **Springer Science Business Media: New York**, 2009.

Pop, Adina Simona et al. Therapeutic Insights into Black Pepper (*Piper nigrum*): Phytochemical Composition, Bioactive Properties, and Health Benefits. **Hop and Medicinal Plants**, v. 32, n. 1-2, p. 139-152, 2024.

Queiroga, Vicente de Paula et al. Pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.): Tecnologias de plantio e utilização. 1. ed. – **AREPB**, 2023. Disponível em: https://issuu.com/abarriguda/docs/livro_pimenta_do_reino_piper_nigrum_l._/s/17884632. Acesso em: 22 maio 2025.

Radhakrishnan, Ramalingam et al. Characterization of plant growth-promoting traits of *Penicillium* species against the effects of high soil salinity and root disease. **Journal of Plant Interactions**, v. 9, n. 1, p. 754-762, 2014.

Rai, 1J N.; Tewari, J. P.; Mukerji, K. G. Cultural and taxonomic studies on two rare species of *Aspergillus*—*A. Paradoxus* and *A. Aeneus*, and an interesting strain of *A. Variecolor* from Indian soils. **Mycopathologia et mycologia applicata**, v. 24, p. 369-376, 1964.

Reddy, K. R. N.; Farhana, N. I.; Salleh, B. Occurrence of *Aspergillus spp.* and Aflatoxin B1 in Malaysian Foods Used for Human Consumption. **Journal of Food Science**, v.76(4), p. T99–T104, 2011.

Rheeder, John P.; Marasas, Walter FO; VISMER, Hester F. Production of fumonisins analogs by *Fusarium* species. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2101-2105, 2002.

Ropars, Jeanne et al. Diversity and mechanisms of genomic adaptation in *Penicillium*. **Aspergillus and Penicillium in the post-genomic era**, 2016.

Rousseaux, Sandrine et al. Non-*Botrytis* grape-rotting fungi responsible for earthy and moldy off-flavors and mycotoxins. **Food microbiology**, v. 38, p. 104-121, 2014.

Samson, R. A.; Hoekstra, E. S.; Frisvad, J. C. Introduction to food-and airborne fungi. **Centraalbureau voor Schimmelcultures**, 2010.

Samson, R.A.; Pitt, J.I. Integration of Modern Taxonomic Methods for *Penicillium* and *Aspergillus* Classification, **London: CRC Press**, p. 524, 2000.

Samson, R.A.; Visagie, C.M.; Houbraken, J.; *et al.* Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 78, p. 141–173, 2014.

Sanger, Frederick; NICKLEN, Steven; COULSON, Alan R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

Sheikh-Ali, Sheikh Imranudin *et al.* The potential hazards of *Aspergillus* sp. in foods and feeds, and the role of biological treatment: A review. **Journal of Microbiology**, v. 52, p. 807-818, 2014.

Silva, Adriana Raquel Persson da; IAMANAKA, Beatriz Thie Orientador. Micobiota e Incidência de Aflatoxinas e Ocratoxina A em pimenta preta (*Piper nigrum* L.) comercializada no Brasil. 2017.

Silva, Josué J. *et al.* Deep Genotypic Species Delimitation of *Aspergillus* Section *Flavi* Isolated from Brazilian Foodstuffs and the Description of *Aspergillus annui* sp. nov. and *Aspergillus saccharicola* sp. nov. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 12, p. 1279, 2022.

Silva, Josué J. da *et al.* Diversity within *Aspergillus niger* Clade and Description of a New Species: *Aspergillus vinaceus* sp. nov. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 371, 2020.

Singh, Raj et al. Assessment of enzymatic potential of soil fungi to improve soil quality and fertility. **Asian Journal of Biological and Life Sciences**, v. 9, n. 2, p. 163-168, 2020.

Singh, Pummi et al. Molecular analysis of S-morphology aflatoxin producers from the United States reveals previously unknown diversity and two new taxa. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 1236, 2020.

Sismer, Ana Claudia et al. Aplicação de extratos naturais na inibição do fungo *Penicillium roqueforti*. **Revista JRG de Estudos Acadêmicos**, v. 7, n. 14, 2024.

Spatafora, Joseph W. et al. The fungal tree of life: from molecular systematics to genome-scale phylogenies. **The fungal kingdom**, p. 1-34, 2017.

Srinivasan, K. Black pepper and its pungent principle-piperine: a review of diverse physiological effects. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 47, n. 8, p. 735-748, 2007.

Steenwyk, Jacob L. et al. A robust phylogenomic time tree for biotechnologically and medically important fungi in the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. **MBio**, v. 10, n. 4, p. 10.1128/mbio.00925-19, 2019.

Stengel, Ashley et al. Improving taxonomic delimitation of fungal species in the age of genomics and phenomics. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 847067, 2022.

Sweeney, Michael J.; DOBSON, Alan DW. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **International journal of food microbiology**, v. 43, n. 3, p. 141-158, 1998.

Syamilah, N.; Nurul Afifah, S.; Effarizah, M.E.; Norlia, M. Mycotoxins and mycotoxigenic fungi in spices and mixed spices: a review. **Food Research**, v. 6, n. 4, p. 30-46, 2022.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. **Molecular biology and evolution**, v. 38, n. 7, p. 3022-3027, 2021.

Teixeira-Loyola, Ana Beatriz Alkmim et al. Análise Microbiológica de especiarias comercializadas em Pouso Alegre, Minas Gerais. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 6, n. 1, p. 515-529, 2014.

Thaxter, Roland. New or peculiar Zygomycetes. 2. Syncephalastrum and Syncephalis. **Botanical Gazette**, v. 24, n. 1, p. 1-15, 1897.

Tremacoldi, Célia Regina. Principais doenças fúngicas da pimenteira-do-reino no Estado do Pará e recomendações de controle. **Embrapa Amazônia Oriental. Documentos**, v. 367, 2010.

Trovão, João et al. Morpho-Molecular and Genomic Characterization of *Penicillium mexicanum* Isolates Retrieved from a Forsaken Gold Mine. **Applied Sciences**, v. 14, n. 22, p. 10600, 2024.

Van Den Berg, Marco Alexander. Impact of the *Penicillium chrysogenum* genome on industrial production of metabolites. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 92, n. 1, p. 45-53, 2011.

Varga, János et al. Mycotoxin producers in the *Aspergillus* genus: An update. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 59, n. 2, p. 151-167, 2015.

Veloso, Rodrigo Rossetti et al. Aspectos microbiológicos das especiarias comercializadas na Região Metropolitana do Recife/PE. **Conjecturas**, v. 22, n. 5, p. 397-410, 2022.

Vinha, M. B. et al. Influência Do Processo De Secagem Na Qualidade Microbiológica Da Pimenta-Do-Reino. p. 205–208, 2021.

Visagie CM et al. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in mycology** vol. 78 : 343-71, 2014.

Visagie, C. M. et al. Ochratoxin production and taxonomy of the yellow aspergilli (*Aspergillus* section *Circumdati*). **Studies in mycology**, v. 78, p. 1-61, 2014.

Visagie, C. M. et al. A review of recently introduced *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and other Eurotiales species. **Studies in Mycology**, v. 107, n. 1, p. 1-66, 2024.

Visagie, C. M.; Houbraken, Jos; Yilmaz, N. The re-identification of *Penicillium* and *Talaromyces* (Eurotiales) catalogued in South African culture collections. **Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, 2024.

Visagie, Cobus M.; HOUBRAKEN, J. Updating the taxonomy of *Aspergillus* in South Africa. **Studies in mycology**, v. 95, n. 1, p. 253-292, 2020.

Visagie, Cobus M.; Yilmaz, Neriman. Along the footpath of *Penicillium* discovery: Six new species from the Woodville Big Tree Forest Trail. **Mycologia**, v. 115, n. 1, p. 87-106, 2023.

Visagie, Cobus Meyer et al. *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* isolated from house dust samples collected around the world. **Studies in Mycology**, v. 78, p. 63-139, 2014.

Visconti, A.; Perrone, G.; Cozzi, G.; Solfrizzo, M. Managing ochratoxin A risk in the grape-wine food chain. Food additives & contaminants. Part A, **Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment**, v. 25, n. 2, p. 193–202, 2008.

Wang, Xinhui et al. Status atual das vias de metabólitos secundários ligadas aos seus clusters de genes biossintéticos relacionados em *Aspergillus* section *Nigri*. **Natural Product Reports** , v. 40, n. 2, p. 237-274, 2023.

Waśkiewicz, Agnieszka et al. Natural occurrence of fumonisins and ochratoxin A in some herbs and spices commercialized in Poland analyzed by UPLC–MS/MS method. **Food microbiology**, v. 36, n. 2, p. 426-431, 2013.

Watanabe, M. et al. Molecular phylogeny of the higher and lower taxonomy of the *Fusarium* genus and differences in the evolutionary histories of multiple genes. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, p. 322, 2011.

Weil, Mathieu et al. Effect of processing on microbial safety of wild pepper (*Piper borbonense*) from Reunion Island. **Food Control**, v. 111, p. 107061, 2020.

Weidenbörner, M. Mycotoxins in plants and plant products. **Springer Cham**, p. 583, 2018.

White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR protocols: a guide to methods and applications, **Academic Press**, p. 315-322, 1990.

Wijayawardene, Nalin N. et al. OMICS e outras tecnologias avançadas em aplicações micológicas. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 6, p. 688, 2023.

World Health Organization. WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. **World Health Organization**, 2022.

Wu, F.; GUCLU, H. Aflatoxin regulations in a network of global maize trade. **PLoS ONE**, 7(9), e45151, 2012.

Yadav, Sheel et al. Comparative transcriptome profiling of fruit tissue provides novel insights into piperine biosynthesis in black pepper (*Piper nigrum* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 322, p. 112451, 2023.

Yang, Q. et al. Unveiling ochratoxin a controlling and biotransformation molecular mechanisms: Opportunities to secure foodstuffs from OTA contamination. *Food and*

chemical toxicology: an **International Journal Published for The British Industrial Biological Research Association**, v. 169, p. 113437, 2022.

Yogendrarajah, P. et al. Mycological quality and mycotoxin contamination of Sri Lankan peppers (*Piper nigrum* L.) and subsequent exposure assessment. **Food Control**, v. 41, n. 1, p. 219-230, 2014.

Zhai, S. et al. Ochratoxin A: Its impact on poultrygut health and microbiota, an overview. **Poultry Science**, 100, 101037, 2021.

APÊNDICES

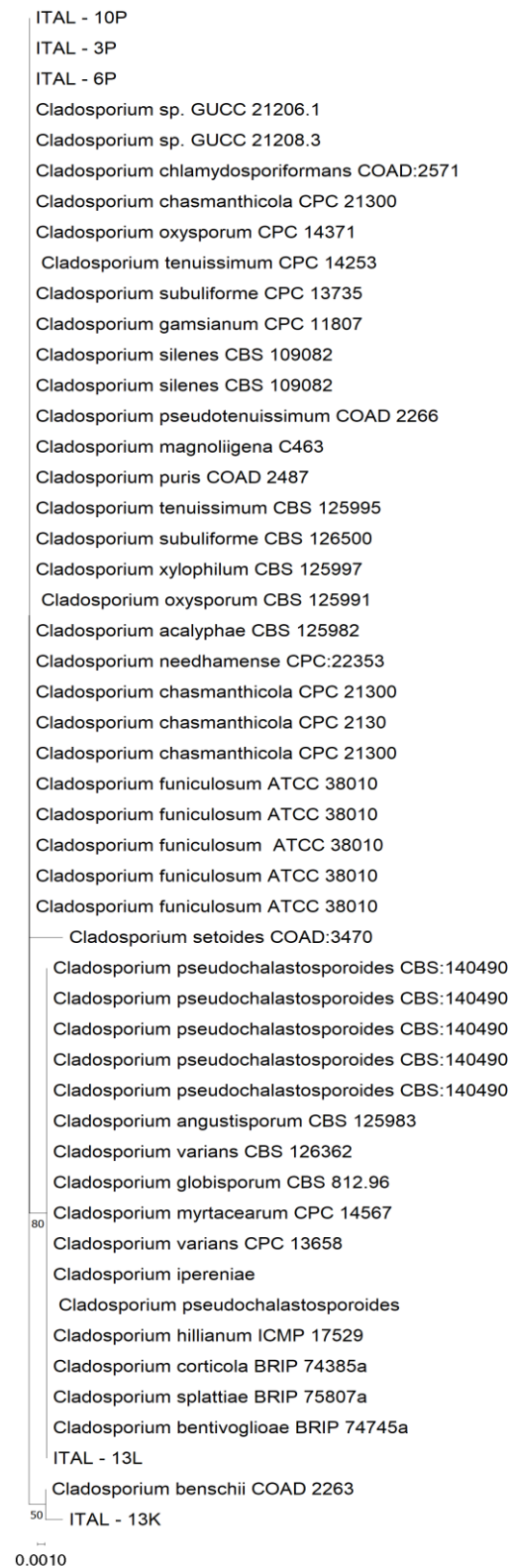
Apêndice 1: Dados de análise de atividade de água

	Código de amostra	Atividade de água*
Grãos	A	0,6207±0,0015
	B	0,6446±0,0021
	E	0,5494±0,0042
	F	0,5376±0,0001
	G	0,5418±0,0022
	H	0,5801±0,0017
	I	0,5871±0,0008
	J	0,5844±0,0239
	K	0,6463±0,0008
	O	0,6267±0,0039
	P	0,6911±0,0042
	R	0,5863±0,0002
	T	0,5728±0,0016
	AE	0,5975±0,0028
	AF	0,6197±0,0004
	AG	0,6166±0,0047
	AI	0,5774±0,0081
	AJ	0,5341±0,0019
	CO	0,5447±0,0015
	CP	0,5433±0,0024
	CR	0,5774±0,0012
	FF	0,5923±0,0027
	FG	0,5849±0,0030
	FH	0,5801±0,0059

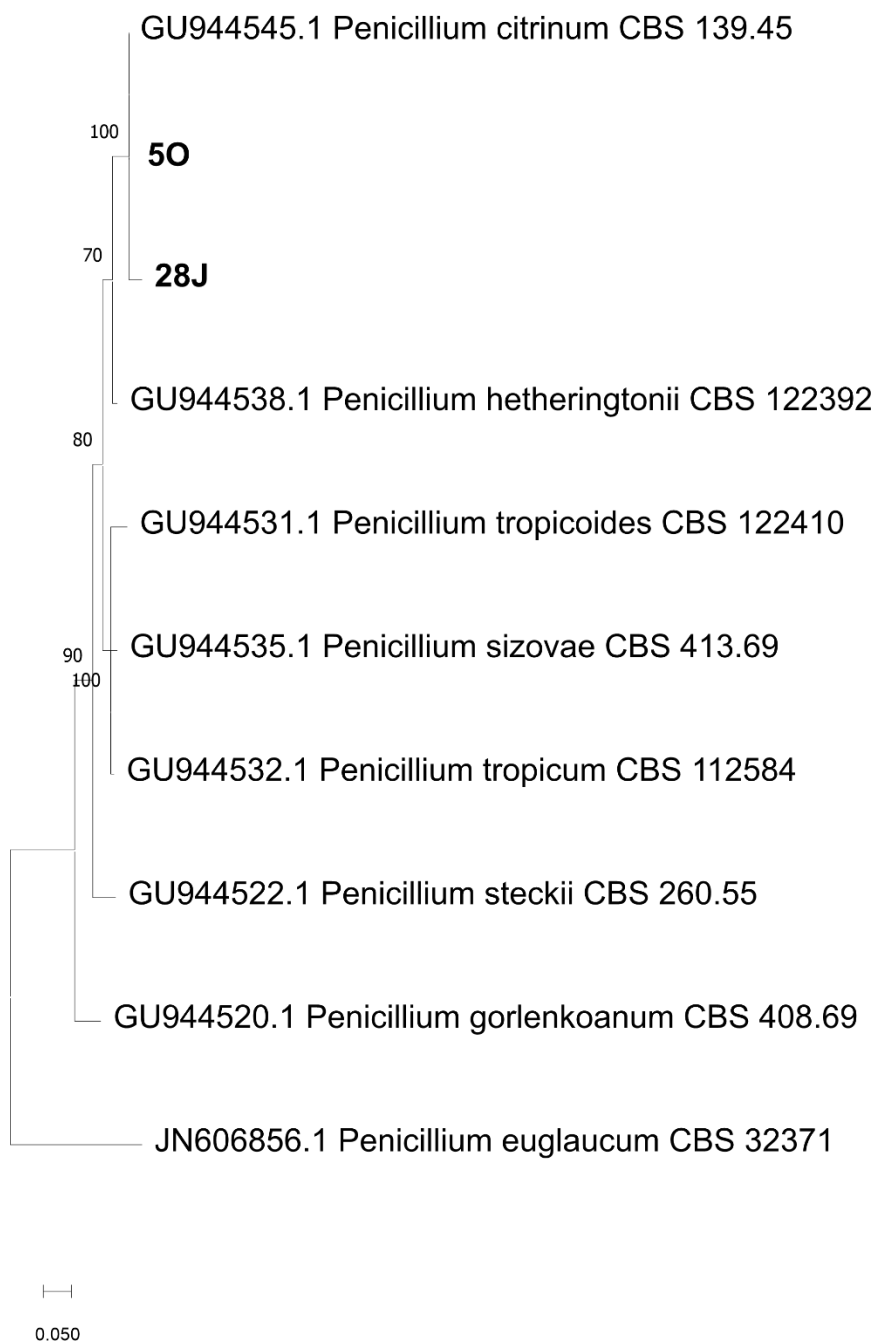
	FI	0,5838±0,0031
	FJ	0,5525±0,0043
	C	0,6022±0,0019
	D	0,6432±0,0009
	L	0,5032±0,0044
	M	0,5960±0,0017
	N	0,5619±0,0012
	Q	0,5983±0,0024
	S	0,5538±0,0018
	U	0,5497±0,0017
	V	0,5753±0,0034
	W	0,5866±0,0011
Moída	X	0,6276±0,0034
	Y	0,5736±0,0055
	Z	0,5276±0,0030
	AA	0,5194±0,0021
	AB	0,5639±0,0008
	AC	0,5719±0,0011
	AD	0,5872±0,0030
	AH	0,4781±0,0035
	CN	0,5713±0,0057
	CQ	0,5289±0,0013
	CS	0,5593±0,0032

(*) representa a média de atividade de água das amostras analisada e seu desvio padrão.

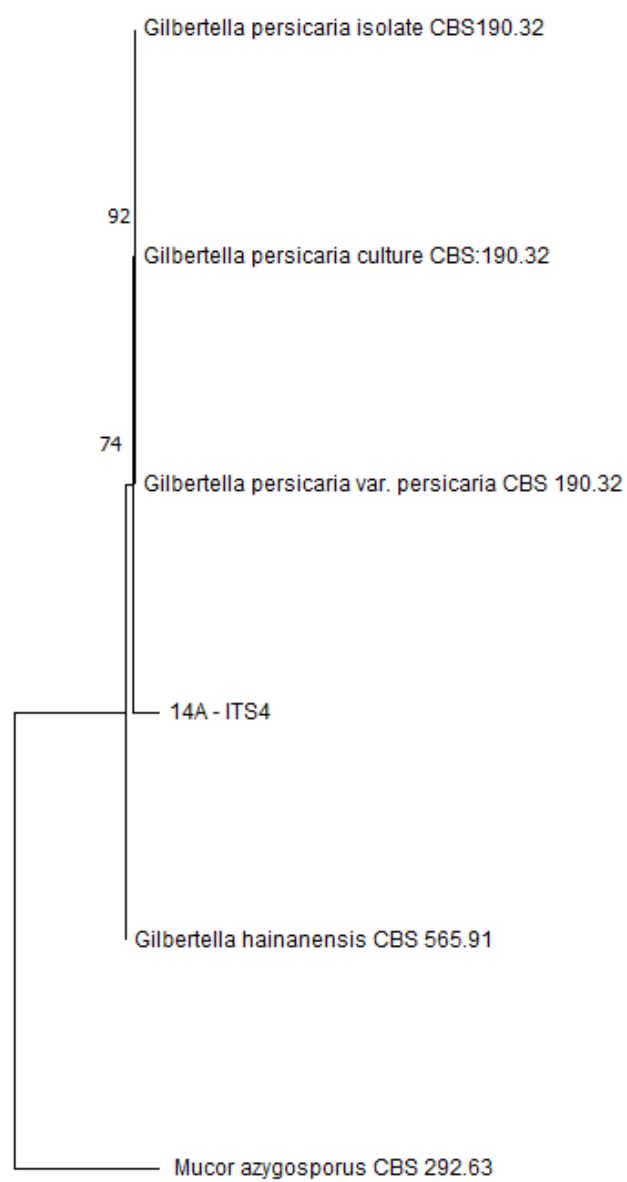
Apêndice 2: Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) baseada no locus ITS (*rDNA*) para os isolados de *Cladosporium* spp.



Apêndice 3: Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) baseada no locus ITS (*rDNA*) para os isolados de *Penicillium* spp.

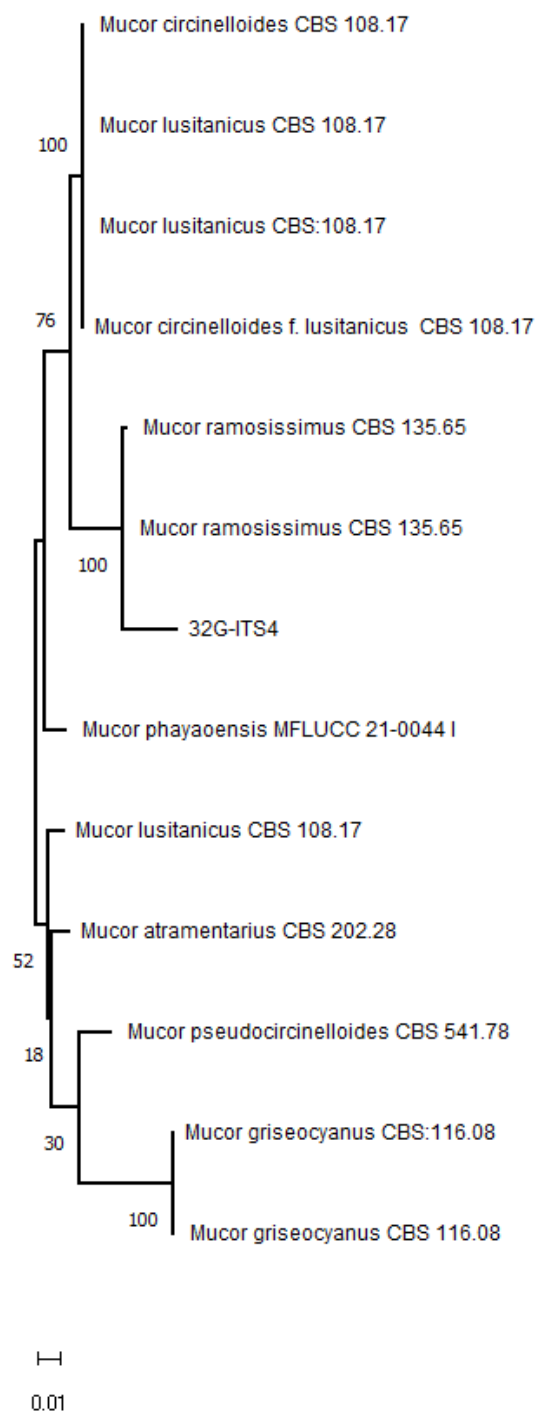


Apêndice 4: Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) baseada no locus ITS (*rDNA*) para os isolados de *Gilbertella*.

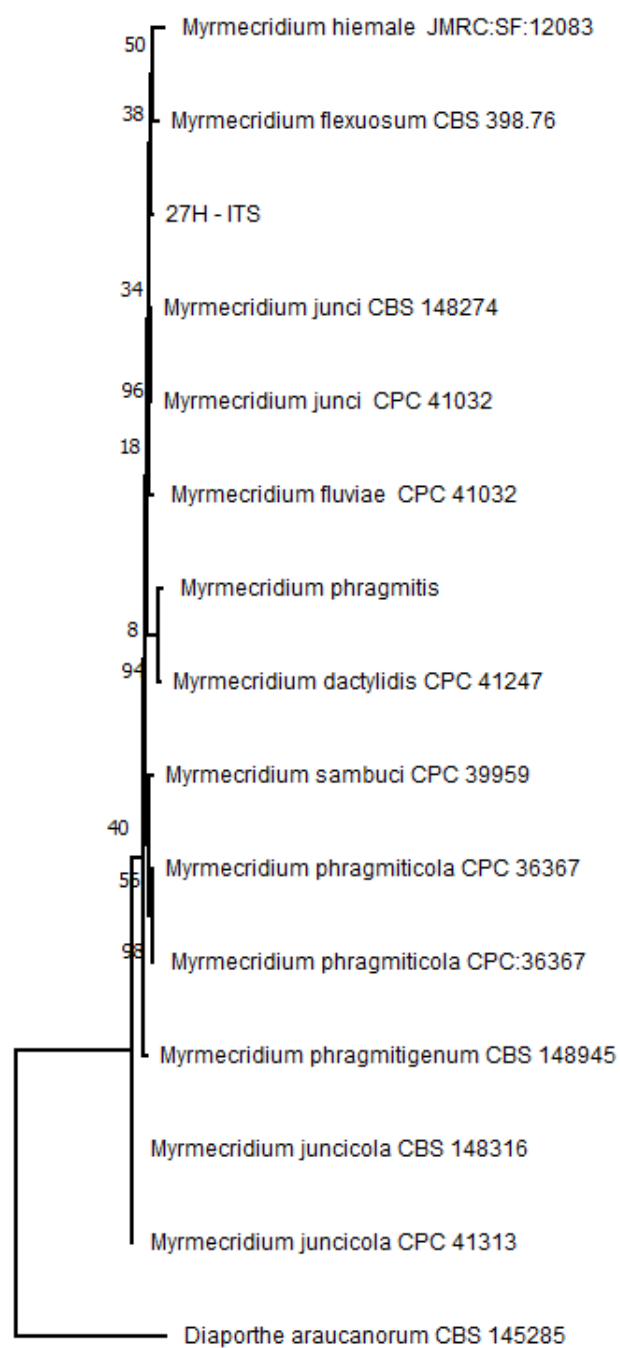


—|—
0.02

Apêndice 5: Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) baseada no locus ITS (*rDNA*) para os isolados de *Mucor*.

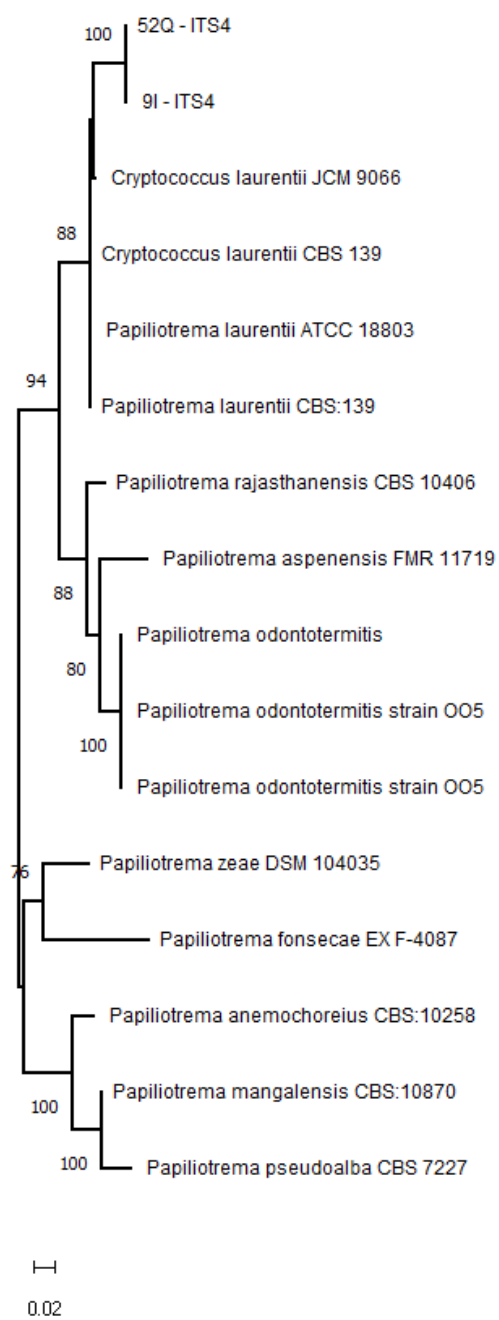


Apêndice 6: Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) baseada no locus ITS (*rDNA*) para os isolados de *Myrmecridium*.

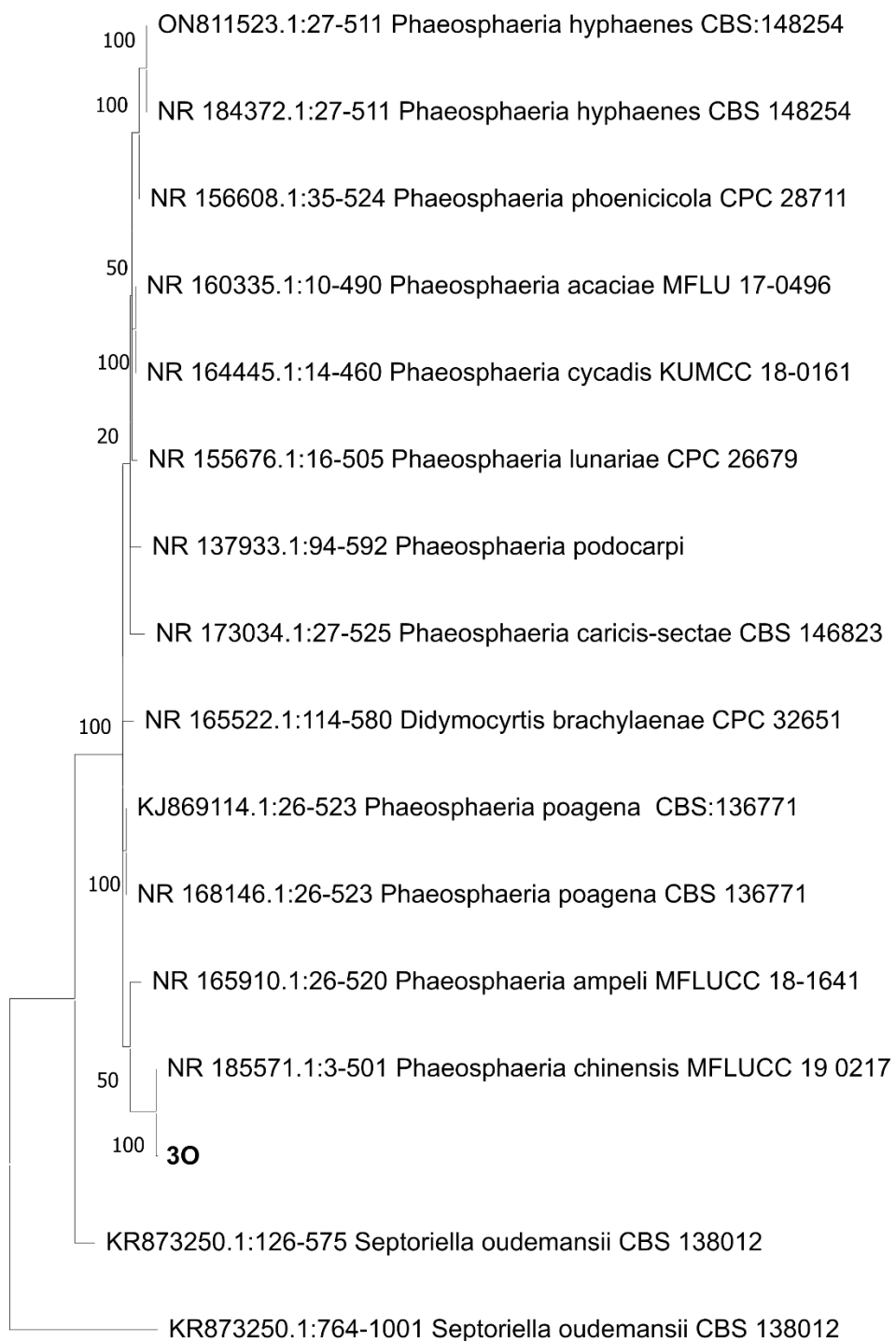


0.10

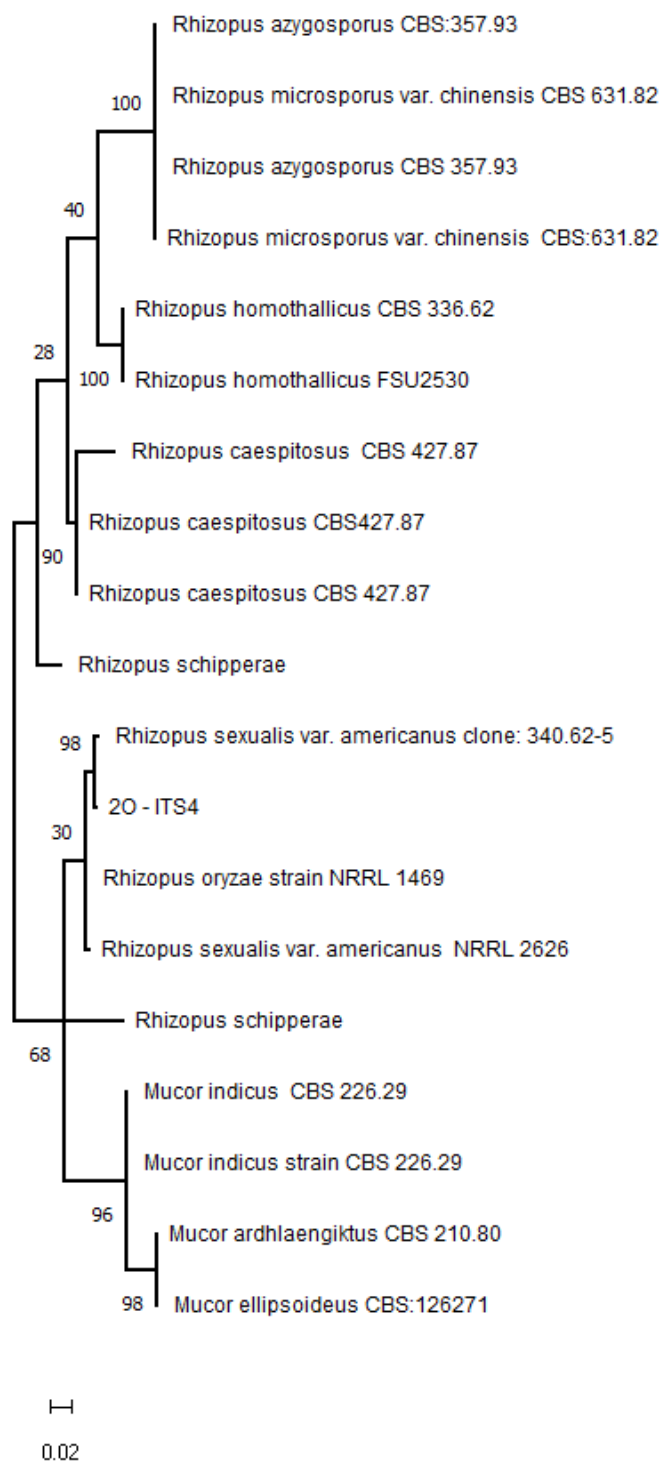
Apêndice 7: Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) baseada no locus ITS (*rDNA*) para os isolados de *Papiliotrema*.



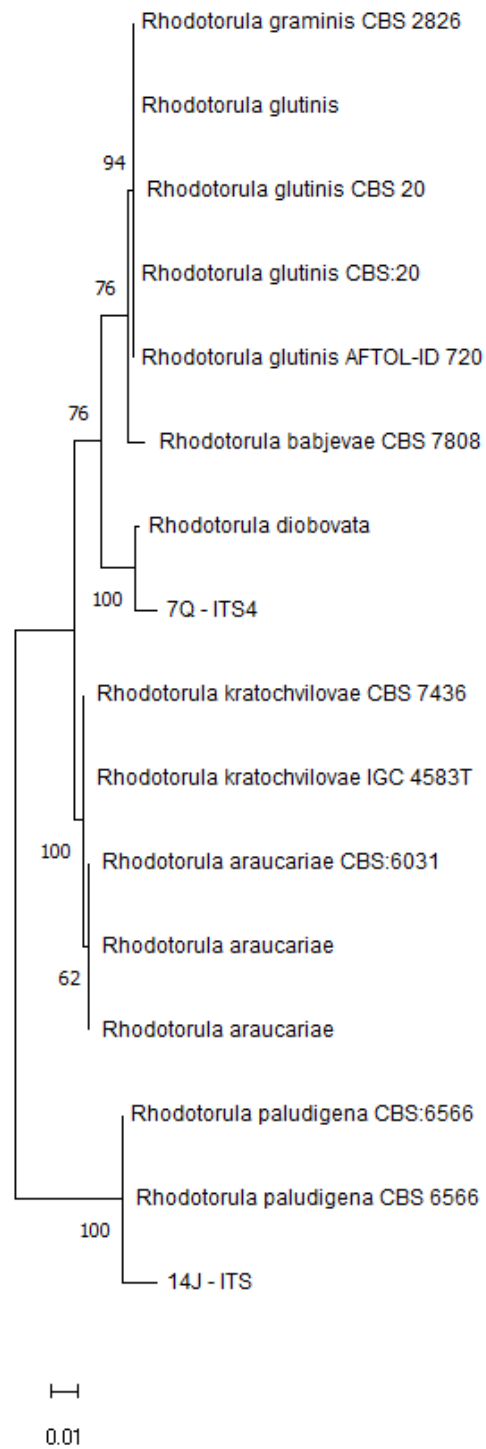
Apêndice 8: Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) baseada no locus ITS (*rDNA*) para os isolados de *Phaeosphaeria*.



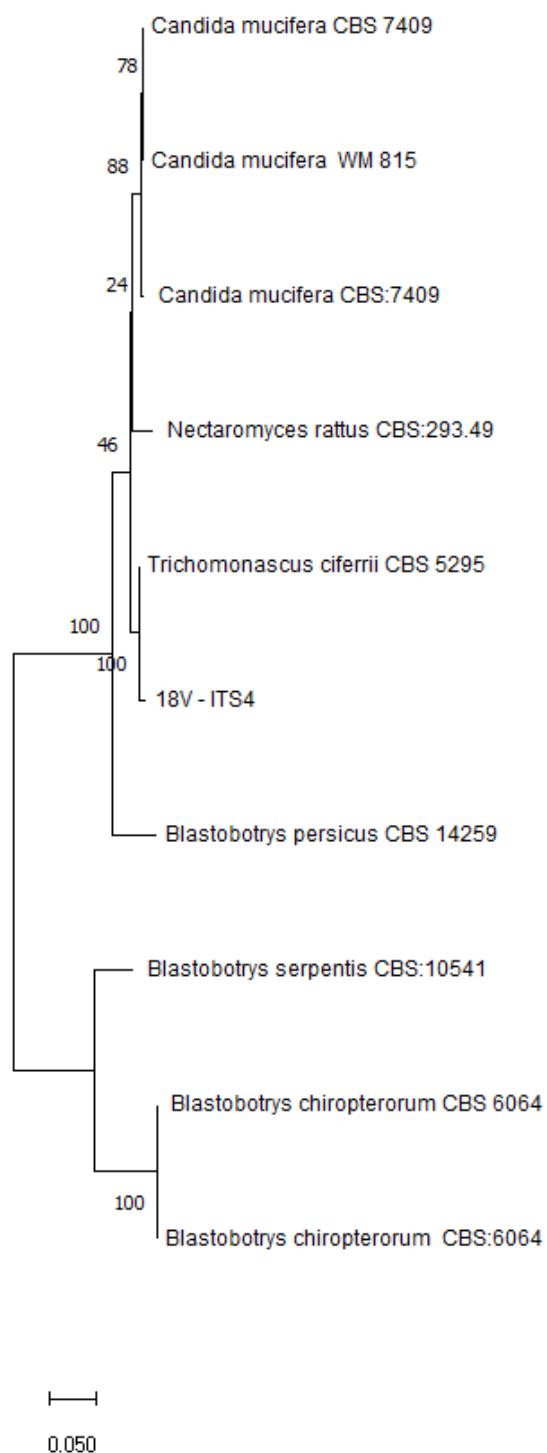
Apêndice 9: Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) baseada no locus ITS (*rDNA*) para os isolados de *Rhizopus*.



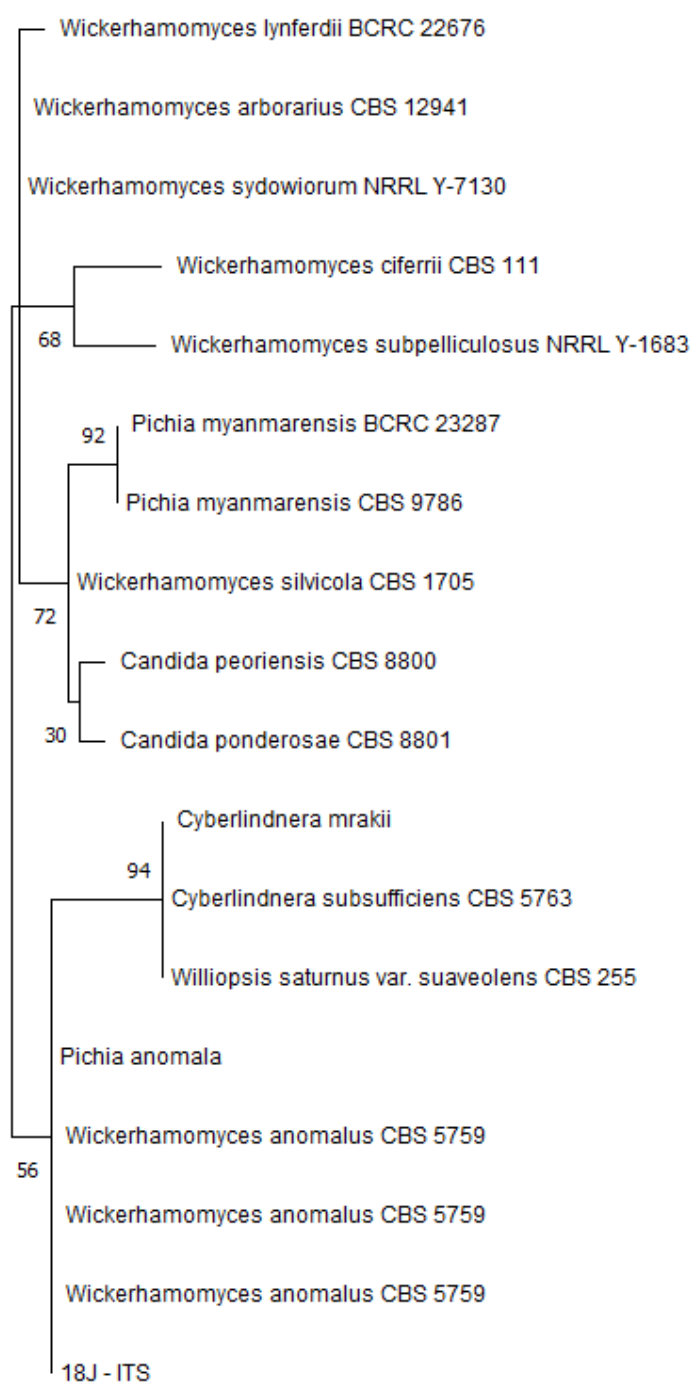
Apêndice 10: Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) baseada no locus ITS (*rDNA*) para os isolados de *Rhodotorula*.



Apêndice 11: Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) baseada no locus ITS (*rDNA*) para os isolados de *Trichomonascus*.



Apêndice 12: Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) baseada no locus ITS (*rDNA*) para os isolados de *Wickerhamomyces*.



0.01

Apêndice 13: Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) baseada no locus ITS (*rDNA*) para os isolados de *Papiliotrema*.

