

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

Larissa Oliveira Hendler

MICROBIOTA E MICOTOXINAS DE FEIJÃO COMUM PRETO

Porto Alegre, 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

Larissa Oliveira Hendler

MICROBIOTA E MICOTOXINAS DE FEIJÃO COMUM PRETO

Trabalho de conclusão do curso de graduação
apresentado ao Curso de Nutrição da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
como requisito parcial para a obtenção do grau
de Bacharel em Nutrição

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Juliane Elisa Welke

Coorientador: Dr. Flávio Fonseca Veras

Porto Alegre, 2022

CIP - Catalogação na Publicação

Hendler, Larissa Oliveira
MICROBIOTA E MICOTOXINAS DE FEIJÃO COMUM PRETO /
Larissa Oliveira Hendler. -- 2022.
43 f.
Orientador: Juliane Elisa Welke.

Coorientador: Flávio Fonseca Veras.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade
de Medicina, Curso de Nutrição, Porto Alegre, BR-RS,
2022.

1. Fungos toxigênicos. 2. Feijão Preto. 3.
Aspergillus. 4. Penicillium. 5. Umidade. I. Welke,
Juliane Elisa, orient. II. Veras, Flávio Fonseca,
coorient. III. Título.

Microbiota e Micotoxinas de Feijão Comum Preto

Trabalho de conclusão do curso de graduação
apresentado ao Curso de Nutrição da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
como requisito parcial para a obtenção do grau
de Bacharel em Nutrição

BANCA EXAMINADORA:

MSc. Athos Aramis Tópor

MSc. Rafaela Diogo Silveira

Orientadora – Prof^a. Dr^a. Juliane Elisa Welke

Coorientador – Dr. Flávio Fonseca Veras

AGRADECIMENTOS

À minha família que sempre me ofereceu todo suporte necessário, amor e carinho. E principalmente por serem tão presentes na minha vida.

À minha orientadora Professora Dra. Juliane Welke pela oportunidade, confiança e contribuição especial na minha formação.

Ao meu co-orientador Dr. Flávio Veras, pela sua disposição em me ensinar, pelas orientações brilhantes e pela paciência que teve durante todo o trajeto.

Ao Prof. Dr. Caciano Pelayo Zapata Noreña pela ajuda na avaliação da atividade de água das amostras de feijão.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) pela oportunidade de fazer o curso de Nutrição.

RESUMO

O feijão preto pode ser contaminado por fungos toxigênicos, como algumas espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, que são responsáveis pela ocorrência de micotoxinas em diversos alimentos. Aflatoxinas e ocratoxina A estão entre as micotoxinas de maior preocupação, sendo associadas à hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, imunossupressão e carcinogenicidade. O controle do crescimento fúngico é a melhor forma para evitar a ocorrência destes compostos tóxicos, seja durante o manejo dos grãos no campo, no armazenamento ou na comercialização. Neste caso, pontos críticos de controle estão relacionados à exposição inadequada do grão à umidade e temperatura ao longo das etapas de beneficiamento do feijão. O objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de fungos e micotoxinas em feijão comum preto provenientes de dois municípios do Rio Grande do Sul, propondo uma relação entre a presença de fungos com a atividade de água e umidade do grão, além de avaliar os metabólitos secundários tóxicos produzidos pelos isolados fúngicos. Nenhuma das amostras de feijão corresponderam ao teor de umidade seguro, todas foram superior ao teor de 12-13% de umidade, indicando condições inadequadas durante o armazenamento dos grãos. Todos os lotes de feijão avaliados mostraram-se infectados, o número de colônias fúngicas encontradas por lote variou de 18 a 31, atingindo um total de 145 fungos isolados. Três gêneros fúngicos foram identificados a partir das amostras de feijão: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus*. Além disso, os feijões com maior teor de umidade apresentaram também maior percentual de grãos infectados. Embora nenhum dos fungos tenha se mostrado produtor de aflatoxinas e ocratoxina A), a presença de isolados que pertencem aos gêneros dos principais fungos toxigênicos pode ser um indicativo de possíveis riscos de ocorrência de micotoxinas no feijão brasileiro durante o armazenamento, visto que existem condições favoráveis de umidade para o crescimento fúngico.

PALAVRAS-CHAVE: Fungos toxigênicos, Feijão Preto, *Aspergillus*, *Penicillium*, Umidade, Armazenamento.

ABSTRACT

Beans can be contaminated by toxigenic fungi, such as *Aspergillus* and *Penicillium*, which are responsible for the occurrence of mycotoxins in various foods. Aflatoxins and ochratoxin A are among the mycotoxins greatest concern due to their hepatotoxicity, nephrotoxicity, immunosuppression and carcinogenicity. The fungal growth control is the best way to avoid contamination of these toxic compounds, whether during grain handling in the field, during storage or commercialization. In this case, critical control points are related to inadequate grain exposure to humidity and temperature throughout the bean processing stages. This study aimed to evaluate the occurrence of fungi and mycotoxins in common black beans from two municipalities in Rio Grande do Sul, proposing a relationship between the occurrence of fungi and the water activity and moisture of the grain, in addition to evaluating the secondary metabolites toxic compounds produced by fungal isolates. None of the bean samples corresponded to the safe moisture content, all were higher than the 12 to 13% moisture content, indicating uncontrolled conditions during grain storage. All lots of beans sampled were infected, the number of fungal colonies found per lot ranged from 18 to 31, reaching a total of 145 isolated fungi. Three genera of fungi were identified from the bean samples: *Aspergillus*, *Penicillium* and *Rhizopus*. In addition, beans with higher moisture content also had a higher percentage of infected beans. Although none of the fungi was considered to be a producer of the mycotoxins investigated (aflatoxin B1 and ochratoxin A), the isolate presence which belong to the main toxigenic fungi genera would indicate a greater risk of mycotoxins in Brazilian beans, since there are conditions favorable for fungal growth.

KEY WORDS: Toxigenic Fungi, Black Beans, *Aspergillus*, *Penicillium*, Moisture, Storage.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Quantidade de feijão produzida nos estados do Brasil.

Figura 2. Cultivar de Feijão comum preto e Carioca.

Figura 3. Estruturas químicas das aflatoxinas.

Figura 4. Estrutura química da Ocratoxina A.

Figura 5. Distribuição (A) e porcentagem total (B) de fungos identificados a nível de gênero após isolamento em feijão comum preto proveniente dos municípios de Ivoti e São Borja - RS (2018).

Figura 6. Ilustração das principais características macroscópicas e microscópicas de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus* (A), *Penicillium* (B) e *Rhizopus* (C) isolados de feijão comum preto proveniente dos municípios de Ivoti e São Borja - RS (2018). Imagens das colônias se referem ao cultivo em MEA a 25 °C durante 7 dias.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação da composição nutricional do feijão comum preto e carioca.

Tabela 2 - Fungos encontrados no feijão (*Phaseolus vulgaris* L.).

Tabela 3 - Limites Máximos Tolerados (LMTs) da presença de micotoxinas em Feijão.

Tabela 4 - Identificação das amostras de feijão preto destinadas às análises físico-químicas, microbiológicas e toxicológicas.

Tabela 5 - Teor de atividade de água e umidade das amostras de feijão comum preto provenientes dos municípios de Ivoti e São Borja - RS coletados em 2018.

Tabela 6 - Perfil de infecção fúngica de grãos de feijão comum preto provenientes dos municípios de Ivoti e São Borja - RS colhidos no ano de 2018.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	10
JUSTIFICATIVA	12
OBJETIVOS	13
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
4.1 Aspectos gerais do feijão	14
4.2 Beneficiamento e armazenamento do feijão	16
4.3 Fungos	17
4.4 Micotoxinas	20
4.5 Legislação para micotoxinas em feijão	22
MATERIAIS E MÉTODOS	24
5.1 Amostras	24
5.2 Análises físico-químicas	25
5.2.1 Atividade de água	25
5.2.2 Umidade	25
5.3 Avaliação da microbiota do feijão	25
5.3.1 Isolamento de fungos	25
5.3.2 Caracterização dos isolados fúngicos	26
5.3.3 Avaliação do potencial toxigênico dos fungos isolados	26
5.4 Ocorrência de micotoxinas no feijão	27
RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
6.1 Atividade de água e Umidade	29
6.2 Ocorrência de fungos no feijão preto	30
6.3 Potencial toxigênico e micotoxinas no feijão	35
CONCLUSÕES	37
REFERÊNCIAS	38

1. INTRODUÇÃO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é a principal leguminosa consumida pela população brasileira, independentemente do nível de renda. A produção dessa espécie é bastante difundida em todo o território nacional, tornando o Brasil o terceiro maior produtor de feijão no mundo, de acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 2020). Os grãos *Carioca* e *Preto* correspondem a cerca de 85% do mercado brasileiro de feijão (RIBEIRO et al., 2014).

Segundo os dados mais atuais da Companhia Nacional de Abastecimento, em 2020/21 o consumo de feijão foi de 2,9 milhões de toneladas. Neste período, a produção brasileira de feijão comum preto superou, pela primeira vez, o consumo interno. A colheita na safra 2021/22 está estimada em 613,7 mil toneladas, uma diferença de aproximadamente 94 mil toneladas (CONAB, 2021). Esses dados ressaltam que o país, além de ser um dos maiores produtores, é também um dos maiores consumidores mundiais de feijão, visto que a população brasileira combina a tradicional dieta à base de arroz e feijão. Na Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF 2017-2018), o consumo alimentar médio de feijão *per capita* foi de 142,2 g ao dia. Logo, trata-se de um alimento tradicional, com representatividade social e de extrema importância na nutrição do Brasil.

A cultura do feijoeiro pode ser acometida por inúmeros organismos, incluindo insetos, nematoides, fungos, bactérias e vírus, resultando em uma redução significativa da produtividade. Além disso, o manejo durante a colheita e o armazenamento dos grãos, são descritos como pontos críticos relacionados à ocorrência de fungos, devido à exposição inadequada à umidade e temperatura (SCUSSEL, 2000). A presença de fungos é preocupante, não apenas pela contaminação das sementes devido ao crescimento fúngico, mas também por afetar a qualidade do feijão em razão da produção de metabólitos secundários tóxicos, os quais causam efeitos tóxicos em animais e humanos (DOMELLO e MACDONALD 1997; PERAICA et al., 1999), impactando diretamente na saúde humana.

Fungos toxigênicos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* são os principais produtores de micotoxinas. Esses fungos têm sido isolados de diversos substratos alimentares, principalmente em cereais. Todavia, são limitados os dados sobre a contaminação fúngica e seu potencial toxigênico, bem como a ocorrência de micotoxinas em leguminosas no Brasil, incluindo o feijão (COSTA, 2000).

A ocorrência de fungos toxigênicos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foi relatada em sementes de feijão cultivadas em 13 municípios da Croácia (DOMIJAN et al., 2005). Este estudo mostrou a associação da ocorrência desses gêneros fúngicos com a produção de ocratoxina A (OTA), a qual foi encontrada em 17 de 45 amostras (38%). No Brasil, a presença de 87 cepas de *Aspergillus* spp. foi relatada por Santos-Ciscon et al. (2019). Neste caso, os autores analisaram 35 lotes de feijão cultivados de 5 estados diferentes do Brasil: Ceará (CE), Bahia (BA), Minas Gerais (MG), São Paulo (SP) e Rio Grande do Sul (RS). Os resultados revelaram que a produção de aflatoxinas por algumas cepas de *Aspergillus flavus* e a produção de fumonisinas por isolados de *Aspergillus niger* constituem os maiores riscos de micotoxinas no feijão brasileiro (SANTOS-CISCON et al., 2019). Especialmente no Brasil, onde essa leguminosa constitui diariamente a alimentação da população, há o aumento das chances de ingestão de micotoxinas, o que reforça a necessidade de monitorar fungos toxigênicos em feijoeiros brasileiros.

2. JUSTIFICATIVA

Considerando que há carência de informações sobre a ocorrência de fungos em feijão, torna-se indispensável avaliar a presença destes microrganismos, bem como verificar a capacidade de produção de micotoxinas. Esta leguminosa constitui a dieta básica da população brasileira, e pode ser uma forma de exposição às micotoxinas levando a problemas de saúde pública.

Fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* apresentam maior potencial toxigênico, pois a presença desses fungos pode indicar que há riscos potenciais de ocorrência de aflatoxinas (AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2) e ocratoxina A (OTA). As aflatoxinas são classificadas pela Agência Internacional de Pesquisas Sobre o Câncer (IARC) no grupo I, como carcinogênicas para humanos (IARC, 2012). A OTA é classificada no grupo 2B, sendo possível carcinogênica para humano (IARC, 1993).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a ocorrência de fungos e micotoxinas em feijão comum preto provenientes de dois municípios do Rio Grande do Sul .

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar os gêneros fúngicos presentes nas amostras;
- Avaliar os metabólitos secundários tóxicos produzidos pelos isolados fúngicos;
- Verificar a atividade de água e umidade do grão;
- Investigar a ocorrência de micotoxinas em feijão.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Aspectos gerais do feijão

O feijão constitui-se em uma das mais importantes fontes proteicas na dieta humana. O maior consumo deste produto ocorre nas Américas (41,7%), seguindo-se a Ásia (34,2%), a África (18,6%), a Europa (3,8%) e a Oceania (0,1%) (FAO, 2010). As principais variedades de feijão estão agrupadas nas espécies botânicas *Phaseolus vulgaris* (I) e *Vigna unguiculata* (II). No entanto, a classe identifica os grãos de acordo com suas cores de casca: preto, branco ou cores mistas. A variedade de semente Carioca pertence ao grupo I, na qual é considerada a mais consumida, respondendo por aproximadamente 70% do total de feijão consumido, seguida pelo feijão comum preto (EMBRAPA, 2012).

Uma variedade de grãos de diferentes grupos e classes de mercado são cultivados por todo território brasileiro (Figura 1). O plantio do feijão comum preto representa 21% da área produtora de feijão do Brasil, tem maior consumo nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, sul e leste do Paraná, Rio de Janeiro, sudeste de Minas Gerais e sul do Espírito Santo. No restante do país, este tipo de grão tem pouco ou quase nenhum valor comercial ou aceitação. As variedades de feijão carioca são aceitas em praticamente todo o Brasil, por isso, 52% da área cultivada é semeada com este tipo de grão (PERES et al., 2015).

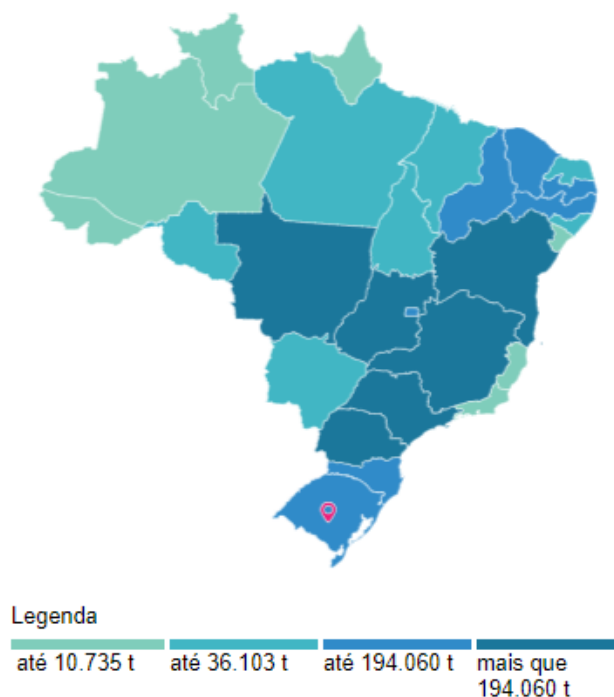


Figura 1. Quantidade de feijão produzida nos estados do Brasil.

Fonte: IBGE, Produção Agrícola Municipal 2020. Rio de Janeiro: IBGE, 2021

No Brasil, o cultivo dessa leguminosa é realizado em três safras, sendo a primeira denominada “safra das águas”, a segunda “safra da seca” e a terceira “safra de outono/inverno”. No Rio Grande do Sul, a variedade de feijão preto corresponde a 80% do cultivo de feijão no estado, pois, tradicionalmente, é a variedade do grão mais consumida na região sul do país. Em 2020 foram produzidas 81.176 toneladas de feijão apenas no estado do Rio Grande do Sul. (IBGE, 2020).

Nutricionalmente, os principais tipos de grãos consumidos (Figura 2), não possuem grandes diferenças no valor nutricional (Tabela 1). Ambos são fontes de proteína, fibras, vitaminas do complexo B e minerais, como ferro, zinco e cálcio. Além disso, o alto teor de fibras e a quantidade moderada de calorias por grama conferem a esses alimentos alto poder de saciedade (Guia Alimentar para a população brasileira, 2014).

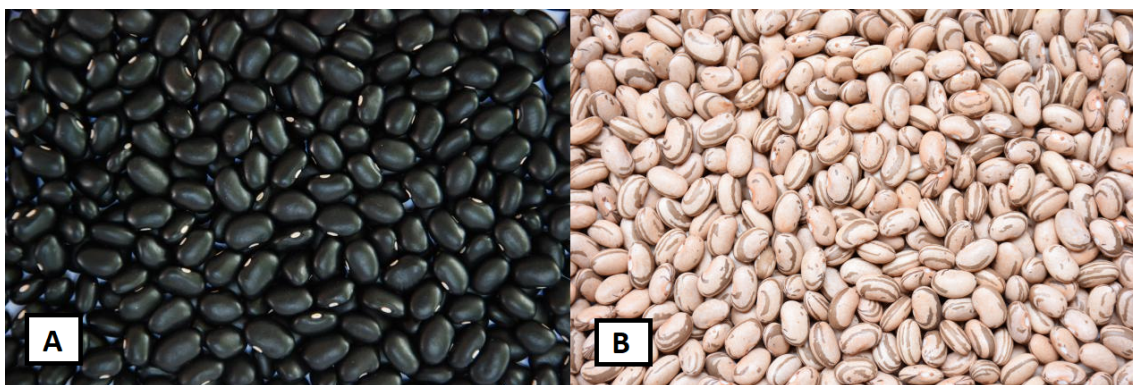


Figura 2. Cultivar de Feijão comum preto (A) e Carioca (B) (EMBRAPA, 2022)

Fonte: Embrapa, 2022. Por: ARAÚJO, Sebastião José de.

Tabela 1. Comparação da composição nutricional do feijão comum preto e carioca.

Tipo de Feijão	Energia (kcal)	Proteínas (g)	Carboidratos (g)	Fibra Alimentar (g)	Ferro (mg)	Zinco (mg)	Cálcio (mg)
Preto	77	4,5	14,0	8,4	1,5	0,7	29
Carioca	76	4,8	13,6	8,5	1,3	0,7	27

*Composição de alimentos por 100 gramas cozido.

Fonte: TACO, 2011

4.2 Beneficiamento e armazenamento do feijão

O beneficiamento é uma operação que visa garantir a padronização e classificação dos grãos, conferindo a qualidade fisiológica e sanitária. As sementes passam por uma série de equipamentos, desde a recepção na unidade até a embalagem e distribuição dos grãos. Primeiramente, o grão passa por uma pré-limpeza após a colheita para remoção de resíduos “grosseiros”, tais como torrões, pedras, restos vegetais e outros. Após isso, se verifica a necessidade da secagem, quando necessária, as sementes seguem

para os secadores, com rígido controle da temperatura, a qual não deve ultrapassar 45 °C para não ocorrer danos mecânicos. Seguindo no beneficiamento, as sementes passam pela máquina de limpeza, na qual se operam com máquinas de ar e peneiras. Após essa etapa, a mesa de gravidade (densimétrica) é um equipamento de acabamento, que separa as sementes leves, daquelas sementes bem formadas, intactas e mais pesadas. Por fim, é realizado o processo de ensaque (PEREIRA et al., 2012).

O armazenamento compreende a etapa após o beneficiamento, na qual os grãos aguardam a comercialização. O metabolismo do feijão é influenciado pela temperatura e pela umidade relativa. Altas temperaturas e umidade relativa aumentam a taxa respiratória da semente; conseqüentemente, o consumo de substâncias de reserva será maior, o que favorece o crescimento de fungos e micotoxinas. Normalmente, as sementes são armazenadas em grandes armazéns, onde não há controle de temperatura e umidade relativa em seu interior. A condição ideal de armazenamento para sementes é um ambiente com baixa umidade, não podendo ser superior a 13%, para não oferecer risco à qualidade fisiológica do grão. O tratamento da semente tem a finalidade de evitar que fungos, principalmente espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, comprometam a qualidade da semente durante o período de armazenamento. Os grãos não são comercializados logo após o processamento, logo se faz necessário o controle adequado do armazenamento (INCAPER, 2010).

4.3 Fungos

Os fungos são organismos eucarióticos, heterótrofos e com reserva energética de glicogênio. Por habitarem diferentes ecossistemas, também são encontrados em vegetais (como endofíticos e/ou patógenos), inclusive no feijão. O feijoeiro-comum é acometido por diversos fungos nas fases de pré-colheita, pós-colheita e armazenamento. Os principais gêneros causadores das doenças fúngicas do solo são *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*; *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*; *Macrophomina phaseolina*; *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum* (EMBRAPA, 2018).

Por outro lado, os fungos descritos como toxigênicos são produtores de metabólitos secundários, chamados de micotoxinas, as quais representam risco para a saúde humana e animal. Do ponto de vista da contaminação dos alimentos, as espécies mais relevantes pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. A contaminação de uma matriz alimentar com diferentes cepas fúngicas pode significar o acúmulo de mais de uma micotoxina. Além disso, uma única cepa fúngica pode ser capaz de produzir um amplo espectro de micotoxinas estruturalmente diferentes (PATRIARCA et al., 2017).

O crescimento de fungos e a produção de micotoxinas são marcadamente afetados por fatores ambientais, especialmente temperatura e umidade. Assim, o acúmulo de micotoxinas antes e depois da colheita reflete amplamente as condições climáticas. (SCUSSEL et al., 2018). Entre os fungos toxigênicos de maior ocorrência em feijão, destacam-se algumas espécies de *Aspergillus*, que podem produzir principalmente aflatoxinas (B1, B2, G1, G2) e ocratoxina A. A Tabela 2 apresenta os principais fungos relatados na literatura encontrados no feijão em diferentes países.

Tabela 2. Fungos encontrados no feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)

País	Parte da planta	Fungos identificados	Referência
Brasil	Grão (de agricultores)	<i>A. niger</i> ; <i>A. flavus</i> .	Santos-Ciscon et al. (2019)
Tunísia	Raízes e folhas	<i>Fusarium</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Macrophomina</i> , <i>Phoma</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Ascomycota</i> .	Sendi et al. (2019)
Brasil	Grãos (de agricultores)	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., <i>Curvularia</i> sp., <i>Monilinia</i> sp., <i>Macrophomina</i> <i>phaseolina</i> , <i>Colletotrichum</i> <i>truncatum</i> ,	Mota et al. (2017)

		<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Fusarium udum</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> .	
Nicarágua	Sementes (colhidas no campo)	<i>Fusarium</i> spp., <i>Lasiodiplodia theobromae</i> , <i>phaseolina</i> , <i>Penicillium citrinum</i> , <i>Colletotrichum capsici</i> , <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Diaporthe</i> sp.	Marcenaro e Valkonen (2016)
Irã	Sementes (colhidas no campo)	<i>F. solani</i> , <i>R. solani</i> , <i>M. phaseolina</i> , <i>oxysporum</i> , <i>Alternaria</i> spp., <i>Arthrotrichum</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., <i>S. sclerotiorum</i> , <i>Ulocladium atrum</i> .	Naseri e Mousavi (2015)
Brasil	Grãos (de supermercado)	<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Eurotium</i> , <i>Rhizopus</i> .	Amaral et al. (2013)
Croácia	Grãos (de agricultores)	<i>Cladosporium</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Botrytis</i> , <i>Trichothecium</i> , <i>Chaetomium</i> .	Domijan et al. (2005)
Japão	Grãos	<i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Wallemia</i> .	Hitokoto et al. (1981)

4.4 Micotoxinas

As micotoxinas pertencem à categoria de metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos filamentosos. Os gêneros frequentemente associados à produção de micotoxinas são *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, enquanto as principais micotoxinas produzidas por estes fungos incluem as aflatoxinas, ocratoxina A (OTA), desoxinivalenol (DON) e zearalenona (ZEA). Tais compostos apresentam efeitos nocivos à saúde humana e animal como hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, problemas reprodutivos, imunossupressão e carcinogenicidade (AGRIPOULOU et al., 2020). Quando presentes nos alimentos, não possuem odor característico e não alteram as características organolépticas dos mesmos (VIDAL et al., 2013; WINTER, 2019).

A produção destas micotoxinas depende de fatores determinantes, como a cepa fúngica, as técnicas de cultivo, o solo, a umidade relativa do ar, a temperatura e a atividade de água do alimento. A formação do composto tóxico pode ocorrer antes da colheita, no pós-colheita ou durante o processamento e armazenamento. Vários fatores afetam tanto o crescimento fúngico quanto a produção de micotoxinas, incluindo temperatura, umidade, ambiente, pH, atividade de água (a_w), nutrientes, nível de inoculação, natureza do substrato, estado fisiológico e interações microbianas. É a interação entre alguns ou todos esses fatores que determinam se a contaminação aumenta e as micotoxinas são produzidas (MILANI, 2013; AGRIPOULOU et al., 2020).

As aflatoxinas, produzidas por *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius*, ocorrem principalmente em regiões quentes e úmidas. Estas micotoxinas apresentam-se em diferentes formas químicas (Figura 3), como aflatoxina B1, B2, G1, G2 e M1. As aflatoxinas são teratogênicas, imunossupressoras e classificadas como carcinogênicas para humanos (grupo 1) pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC, 2002), sendo que especificamente a aflatoxina M1 é considerada um possível carcinógeno para humanos. A aflatoxina B1 (AFB1) é considerada a micotoxina mais tóxica devido ao seu potencial genotóxico e por estar associada ao carcinoma hepatocelular. Além disso, inúmeros casos de aflatoxicose aguda foram

registrados em países em desenvolvimento. As manifestações clínicas associadas à infecção aguda são: vômitos, dores abdominais, edema pulmonar, necrose hepática e até morte (ROCHA et al., 2014; WU et al., 2014).

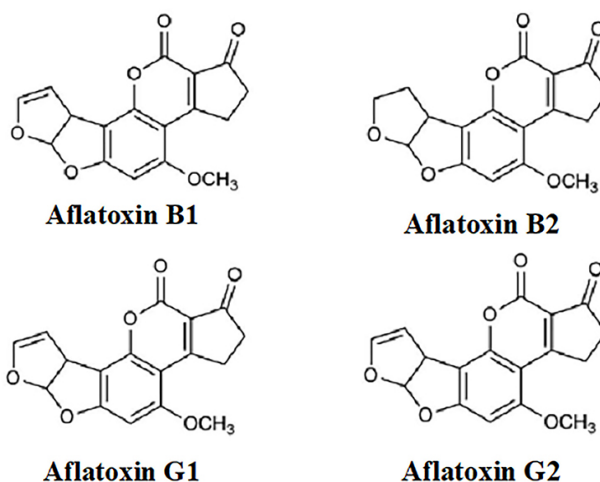


Figura 3. Estruturas químicas das aflatoxinas.

Fonte: FREIRE et al. (2007)

A OTA foi descoberta como metabólito de *Aspergillus ochraceus* em 1965. Posteriormente, descobriu-se que várias espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* também poderiam sintetizar essa toxina, tais como *Aspergillus alliaceus*, *Aspergillus auricomus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus melleus*, *A. niger* e *Penicillium verrucosum* entre outras. Sua estrutura química (Figura 4) apresenta uma molécula de cloro, o que a caracteriza, além de potencializar seu caráter tóxico (KRN et al., 2010). A contaminação por OTA pode ocorrer, principalmente em cereais como trigo, milho, arroz, centeio, aveia, cevada, e também em amendoim e frutos secos. A OTA também está presente em alimentos como vinho, café e cerveja, comprovando sua relativa estabilidade química durante o processamento (SCUDAMORE et al., 2003; PATRIARCA et al., 2017). Os efeitos tóxicos mais importantes associados ao consumo de alimentos contaminados por OTA são

danos nos rins, fígado e ação imunossupressora, sendo classificada no grupo 2B da IARC, ou seja, como um possível carcinógeno para humanos (IARC, 1993).

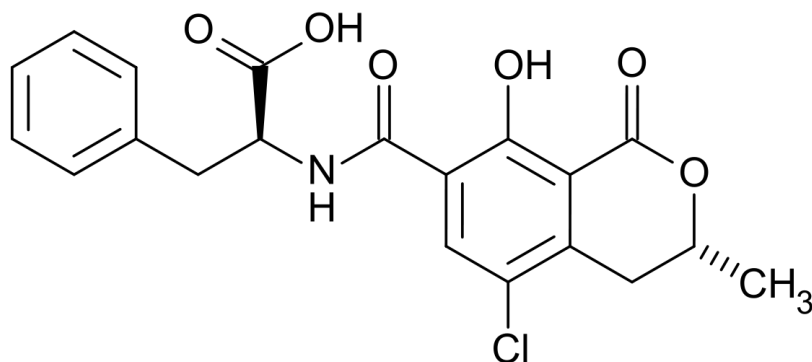


Figura 4. Estrutura química da ocratoxina A.

Fonte: MURPHY et al. (2006).

4.5 Legislação para micotoxinas em feijão

A presença de micotoxinas nos alimentos é difícil de ser evitada, órgãos regulamentadores estabelecem valores para manter a contaminação em níveis mais baixos possível. Os limites regulatórios em níveis significativos de micotoxinas em alimentos e rações são estabelecidas por várias autoridades em todo o mundo, como nos Estados Unidos Estados (EUA) pela *Food and Drug Administration* (FDA), na Europa pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA, *European Food Safety Authority*) (AGRIPOULOU et al., 2020) e no Brasil pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) (Brasil, 2022).

Os limites máximos tolerados (LMT) para aflatoxinas em alimentos destinados ao consumo humano foram primeiramente regulados no país em 1976 (CNNPA n° 34), com limites para o somatório de AFB1 e AFG1 (30µg/kg)

para alimentos de maneira geral. Em 2002, a RDC n° 274 incluiu limites para AFM1 em leite e seus derivados (5µg/kg) e as AFB2 e AFG2 nos limites máximos para alimentos (20µg/kg; Brasil, 2002).

Atualmente os LMT para micotoxinas no Brasil são regulamentados pela Anvisa, por meio da Instrução Normativa (IN) N° 160/2022 (01/07/2022; Brasil, 2022). Encontram-se parâmetros de limite máximo tolerado de aflatoxinas (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2) e OTA para feijão e outras sementes secas das leguminosas (Tabela 3), além de regulamentação para outras micotoxinas e alimentos. Comparando com a Legislação Europeia e Norte-americana, ambas não possuem LMT especificamente para feijões, somente são regulamentados valores específicos para esse grupo alimentar na legislação brasileira.

Tabela 3. Limites Máximos Tolerados (LMTs) da presença de micotoxinas em Feijão.

Aplicação	Micotoxina	LMT (µg kg⁻¹)
RDC N°7 IN N°160/2022	Aflatoxina (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2)	5
	OTA	10

A avaliação do risco da exposição humana às micotoxinas na dieta é um processo de base científica. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é responsável pela condução de avaliação do risco da exposição humana a contaminantes em alimentos. Internacionalmente, procedimentos de avaliação do risco são conduzidos pelos comitês científicos da OMS e da FAO para subsidiar o estabelecimento de padrões alimentares pelo Codex Alimentarius. O JECFA (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*) avalia questões relativas a aditivos alimentares, contaminantes e drogas veterinárias.

Dentre os parâmetros de ingestão crônica segura estimados para o homem estão a ingestão diária aceitável (IDA), a ingestão diária tolerável máxima provisória (PMTDI, do inglês: *Provisional Maximum Tolerable Daily Intake*), a ingestão tolerável semanal provisória (PTWI, do inglês: *Provisional Tolerable Weekly Intake*) e a ingestão tolerável mensal provisória (PTMI, do inglês: *Provisional Tolerable Monthly Intake*). Esses parâmetros representam a quantidade da substância presente no alimento que pode ser ingerida diariamente ao longo da vida sem que ocorram efeitos adversos à saúde. O JECFA estabelece para a OTA parâmetros de ingestão crônica segura, de PTWI 112 ng/kg pc/semana. Para as aflatoxinas não é estabelecido um valor de ingestão tolerável, tendo como recomendação a redução a níveis tão baixos quanto razoavelmente possível (WHO, 2007; WHO 1999)

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Amostras

Foram analisados 6 lotes (F06, F07, F08, F21, F25 e F27) de feijão comum preto provenientes de dois municípios do Rio Grande do Sul: Ivoti e São Borja (Tabela 4) colhidos no ano de 2018.

Tabela 4. Identificação das amostras de feijão preto destinadas às análises físico-químicas, microbiológicas e toxicológicas.

Amostra	Endereço	Data
F06	São Borja-RS	Setembro/2018
F07	São Borja-RS	Setembro/2018
F08	São Borja-RS	Junho/2018
F21	Ivoti-RS	Setembro/2018
F25	Ivoti-RS	Agosto/2018
F27	Ivoti-RS	Agosto/2018

5.2 Análises físico-químicas

5.2.1 Atividade de água

A análise de atividade de água (Aw) foi realizada utilizando um higrômetro digital (Aqualab, 3TE-Decagon, Pullman, EUA), o qual permite equilibrar a água livre da amostra com o espaço livre de uma pequena câmara fechada e a medida da umidade relativa desse espaço livre (VUAT AZ et al., 2010).

5.2.2 Umidade

A determinação da umidade dos grãos foi feita a partir do método de secagem baseado na remoção da água pelo aquecimento da amostra (100 gramas) em estufa (105 °C) (CECCHI, 2003).

5.3 Avaliação da micobiota do feijão

5.3.1 Isolamento de fungos

Foram analisados 30 grãos de cada lote, distribuídos em 5 placas de Petri. Para o isolamento fúngico, 6 grãos de feijão foram colocados em placas de Petri contendo ágar Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol suplementado com 1% de cloreto de sódio (NaCl). Tal suplementação é necessária para reduzir a germinação dos grãos segundo protocolo do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2009). As placas foram incubadas a 25 °C por 7 dias. As colônias fúngicas foram isoladas em ágar malte sob as mesmas condições.

5.3.2 Caracterização dos isolados fúngicos

A caracterização dos fungos isolados do feijão foi realizada na tentativa de identificação em nível de gênero de acordo com as chaves de classificação propostas por Pitt e Hocking (2009). Para isso, os fungos foram cultivados em Ágar Extrato de Malte (MEA) e Ágar Czapeck Extrato de Levedura (CYA) a 25 e 37 °C durante 7 dias. Após esse período, as características morfológicas de cada isolado fúngico foram observadas.

Para a avaliação macroscópica, características como coloração e tamanho da colônia, e formação de exsudato foram registradas. Na avaliação microscópica dos fungos, foram observadas em microscópio óptico as estruturas de reprodução assexuada, incluindo o tipo de conidióforos, o formato dos conídios, os aspectos das paredes dos conídios, o formato das vesículas e a presença de métula nos conidióforos.

5.3.3 Avaliação do potencial toxigênico dos fungos isolados

A capacidade dos fungos em produzir metabólitos secundários tóxicos foi avaliada após o cultivo fúngico em meio de cultura, seguido de extração em metanol dos compostos produzidos e análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS). Basicamente, as colônias fúngicas previamente caracterizadas em meio CYA foram repicadas em placas contendo Ágar Extrato de Levedura (YES) por 21 dias, oscilando a temperatura da seguinte forma: 25 °C durante 7 dias; incubação à 37 °C por 1 dia; 30 °C durante 6 dias e finalizando em 25 °C por 7 dias. Posteriormente, foram feitos três cortes circulares de diferentes regiões do cultivo fúngico e colocados em tubo Falcon contendo 5 mL de acetonitrila acidificada com 1.5% de ácido acético. Em seguida, as amostras foram submetidas à agitação em vórtex por 2 minutos e, posteriormente, em agitador orbital (shaker) a 200 rpm por 60 minutos sob temperatura ambiente. O extrato obtido foi filtrado e transferido para tubo Falcon contendo 0,1 g de C18 e 0,225 g de MgSO₄ e novamente agitado em vórtex por 1 minuto. Logo após, a amostra foi centrifugada a 3000 g por 5 minutos a 4 °C. As amostras foram transferidas para frascos âmbar e evaporadas em banho-maria a 75 °C. Após evaporação, as amostras foram ressuspensas em 1 mL de fase móvel A+B (Fase A: água ultrapura/ácido fórmico 0,1% + Fase B: acetonitrila/ácido fórmico 0,1%), para em seguida serem filtradas e injetadas no LC-MS/MS. A análise dos resultados foi realizada através do software Data analysis.

5.4 Ocorrência de micotoxinas no feijão

A verificação da ocorrência de micotoxinas no feijão foi realizada segundo metodologia previamente otimizada e validada em estudo prévio (LAGO et al. 2020). Cinco gramas de feijão previamente triturados foram transferidos para um tubo Falcon de 50 mL contendo 15 mL de solvente de extração composto por acetonitrila/água Milli-Q (75:25, v/v), o qual foi agitado em vórtex por 1 minuto. Em seguida, 2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 1 g de NaCl foram adicionados ao tubo Falcon. A mistura foi agitada por 1 minuto e sonicada por 3 minutos, seguido por centrifugação por 6 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi submetido à extração em fase sólida dispersiva em um tubo contendo 450 mg de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 150 mg de C18, agitado por 1 minuto e centrifugado por 5 minutos a 3000 rpm. As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido (Shimadzu, Kyoto, Japão) acoplado à espectrometria de massas do tipo quadrupolo-tempo de voo (Bruker Daltonics, modelo micrOTOF-Q III, Bremen, Alemanha). As micotoxinas foram separadas em coluna C18 (Kinetex Core-Shell Technology 2.6 μm F5 100 A, EUA) a 35 °C, taxa de fluxo de 0,4 mL min⁻¹, empregando água ultrapura (fase A) e acetonitrila (fase B) como fase móvel. Ambas as fases continham ácido acético 0,1% e acetato de amônio 4 mM em um gradiente linear de 60:40 a 44,6:55,4 em 4 minutos, a 63:37 em 9 minutos, a 80:20 em 14 minutos e a 40:60 em 19 minutos das fases móveis orgânica e aquosa, respectivamente.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Atividade de água e Umidade

Os resultados referentes à atividade de água e teor de umidade das amostras de feijão podem ser observados na Tabela 5. A média do teor de umidade encontrado nas amostras foi de 18,45%, sendo o valor mínimo expressado na amostra F06 de 16,14% e o valor máximo encontrado na amostra F25 de 20,03%. Nenhuma das amostras de feijão corresponderam ao teor de umidade considerado seguro, todas foram superior ao teor de 12 a 13% de umidade, indicando condições descontroladas durante o armazenamento dos grãos (SENAR, 2018). É importante mencionar que após a colheita pode-se observar maiores concentrações de aflatoxinas nos grãos, quando comparados com grãos do campo, isso ocorre devido ao armazenamento inadequado, com teores de umidade e temperatura inadequados. Se o grão é rapidamente seco e armazenado em condições apropriadas, os fungos aflatoxigênicos não possuem bom crescimento (CAST, 2003).

A avaliação da atividade de água (A_w) dos grãos é importante, já que esse é um fator que influencia no crescimento fúngico. Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* requerem um valor mínimo de A_w de 0,75–0,85 e crescem bem na faixa de 0,93–0,98. O crescimento ativo é a fase em que o fungo cresce em altas taxas no micélio. São descritos com crescimento ativo em A_w de 0,73 e 0,78–0,80, para *Aspergillus* e *Penicillium*, respectivamente (RODRIGUES et al., 2012). A maior porcentagem de A_w foi observada na amostra F21, com o resultado no valor de 0,759, apresentando uma condição favorável para o crescimento dos gêneros citados acima.

Tabela 5. Teor de atividade de água e umidade das amostras de feijão comum preto provenientes dos municípios de Ivoti e São Borja - RS coletados em 2018.

Amostra	Aw	Teor de Umidade %
F06	0,645- 0,645	16,15
F07	0,686- 0,683	17,28
F08	0,682- 0,687	17,59
F21	0,759- 0,756	19,91
F25	0,756- 0,755	20,03
F27	0,753- 0,754	19,76

Como consequência das diferentes adaptações ecofisiológicas dos fungos, ocorrem mudanças desde os primeiros dias de desenvolvimento no campo até o final do armazenamento do grão. Por exemplo, é incomum encontrar estudos relatando altas frequências de isolamento de *Fusarium* em amostras de campo, havendo uma tendência à sua diminuição durante o armazenamento acompanhada pelo aumento gradual nas frequências de *Aspergillus* e *Penicillium*. Esta especificação dos fungos em relação a maior ocorrência no campo ou no armazenamento foi baseada em alguns estudos realizados em climas temperados. Todavia, em regiões de climas subtropicais, como no estado do Rio Grande do Sul, é possível a contaminação das espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* em sementes desde o início do campo (CAST, 2003; RODRIGUES et al., 2012).

6.2 Ocorrência de fungos no feijão preto

Com base no isolamento fúngico, todos os lotes de feijão amostrados mostraram-se infectados. Na tabela 6, a porcentagem de grãos infectados variou de 63,3% a 93,3% conforme o lote avaliado. Destes, o lote mais suscetível ao crescimento de fungos foi o F25, no qual foram observados 28

grãos infectados de 30 grãos avaliados (93,3%). Curiosamente, o lote F25 também foi o lote com maior percentual de umidade (20,03%), conforme descrito anteriormente, compondo uma relação direta do maior valor de umidade e o maior percentual de grãos infectados. Esses valores afirmam condições favoráveis para o crescimento fúngico. Além disso, o número de colônias fúngicas encontradas por lote variou de 18 a 31, atingindo um total de 145 fungos isolados.

Três gêneros de fungos foram identificados a partir das amostras de feijão: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus*, correspondendo a 36,0, 36,0 e 5,0%, respectivamente, dos fungos encontrados (Figura 5). Cerca de 23% dos fungos isolados não produziram estruturas de reprodução assexuada (conidióforos e conídios) nas condições avaliadas, e foram nomeados como fungos não esporulados, não sendo possível verificar sua identificação em nível de gênero.

Tabela 6. Perfil de infecção fúngica de grãos de feijão comum preto provenientes dos municípios de Ivoti e São Borja - RS colhidos no ano de 2018.

Lote	Grãos infectados	Porcentagem de grãos infectados*	Número de colônias fúngicas
F06	18	66,6	18
F07	22	73,3	23
F08	19	63,3	19
F21	21	70,0	25
F25	28	93,3	31
F27	27	90,0	29

*Total de 30 grãos avaliados para cada lote.

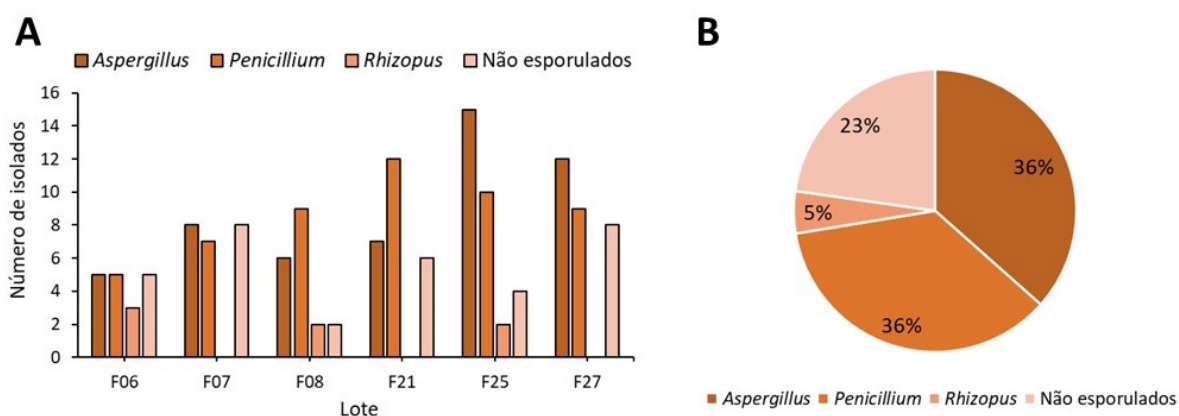


Figura 5. Distribuição (A) e porcentagem total (B) de fungos identificados a nível de gênero após isolamento em feijão comum preto proveniente dos municípios de Ivoti e São Borja - RS (2018).

As principais características morfológicas observadas permitiram a identificação em nível de gênero desses isolados (PITT E HOCKING, 2009). A Figura 6 ilustra alguns representantes dos isolados fúngicos obtidos no presente estudo. Neste caso, os fungos descritos como pertencentes ao gênero *Aspergillus* apresentaram colônias com diâmetro médio acima de 40 mm, indicando crescimento relativamente rápido, e coloração variando de verde a amarelo-oliva quando cultivados em condições padrões (CYA e MEA, incubados a 25 ou 37 °C). Além disso, foi possível observar características microscópicas como formação de conidióforos com estipes grandes e de paredes pesadas e ápices dilatados, denominadas vesículas, geralmente esféricas ou globosas. Tais vesículas continham fiálides e/ou métulas, as quais sustentavam os conidióforos. Santos-Ciscon et al. (2019) relataram a ocorrência de fungos nos tipos mais populares de feijão no Brasil, incluindo o feijão comum preto. Os autores verificaram que as colônias de *Aspergillus* eram predominantemente de coloração verde, pertencendo à seção *Flavi*, estando presentes em 34 dos 35 lotes de sementes testados (97%), enquanto os isolados de coloração preta, descritos como pertencentes à seção *Nigri*, foram encontrados em 27 (77%) lotes de feijão. Colônias de coloração amarela, geralmente atribuídas às seções *Circumdati* e *Cremeri*, estavam presentes em

10 (29%) lotes dos grãos avaliados. Os autores ainda realizaram o sequenciamento parcial dos genes da calmodulina e β -tubulina para determinar a identidade das espécies de todos os isolados. Entre os fungos agrupados na seção *Flavi*, 97,5% (n=39) dos isolados foram identificados como *A. flavus* e apenas 2,5% (n=1) *Aspergillus pseudocaelatus*. Aqueles incluídos na seção *Nigri* foram descritos como *A. niger* e *Aspergillus luchuensis*, correspondendo a 70,6 (n=24) e 29,4% (n=10), respectivamente, dos isolados analisados. Ainda, os autores verificaram que 53,8% dos isolados das outras seções encontradas correspondiam às seguintes espécies: *Aspergillus westerdijkiae* (53,8%; n=7), *Aspergillus ostianus* (23,1%; n=3), *Aspergillus wentii* (15,4%; n=2) e *A. ochraceus* (7,7%; n =1).

Os representantes descritos como pertencentes ao gênero *Penicillium* no presente estudo produziram os conídios em estipes não dilatadas, com ou sem a presença de métulas (PITT E HOCKING, 2009). As fiáides eram ligadas diretamente a uma estipe ou através de um ou mais estágios de ramificação (monoverticilado, biverticilado ou triverticilado). Tais isolados ainda apresentaram como aspectos macroscópicos colônias com coloração variando de turquesa acinzentada a amarelo e diâmetro médio abaixo de 35 mm. Fungos do gênero *Penicillium* também são comuns em feijão. Castillo et al. (2004) avaliaram a micobiota de feijão preto cultivado na Argentina, verificando ocorrência de diferentes espécies desse gênero, incluindo *Penicillium citrinum*, *Penicillium glabrum*, *Penicillium restrictum*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium purpurogenum* e *Penicillium variable*. Da mesma forma, Costa e Scussel (2002) avaliaram diferentes amostras de feijão preto no estado de Santa Catarina, verificando maior porcentagem de isolados fúngicos do gênero *Penicillium* (44%) do que aqueles pertencentes ao gênero *Aspergillus* (22%). Os autores ainda constataram que todos os isolados foram identificados como *P. citrinum*. Tal espécie é bem conhecida por produzir citrinina, uma micotoxina com efeitos nefrotóxicos, destacando ainda sua capacidade em interagir sinergicamente com a ocratoxina A (ZHANG et al., 2021), porém essa toxina não foi investigada no presente estudo.

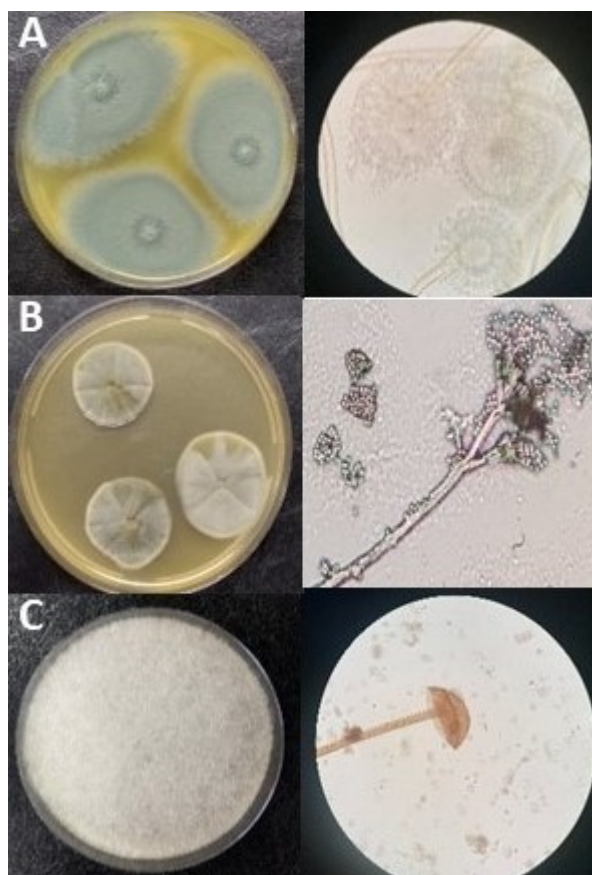


Figura 6. Ilustração das principais características macroscópicas e microscópicas de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus* (A), *Penicillium* (B) e *Rhizopus* (C) isolados de feijão comum preto proveniente dos municípios de Ivoti e São Borja - RS (2018). Imagens das colônias se referem ao cultivo em MEA a 25 °C durante 7 dias.

E por fim, os isolados que apresentaram esporos tipicamente carregados dentro de esporângios, além da presença de columela em forma de guarda-chuva no ápice das estipes indicaram a contaminação pelo gênero *Rhizopus* (PITT E HOCKING, 2009). O aspecto macroscópico desses isolados era de colônias flocosas de coloração preta ou acinzentada, com rápido crescimento, uma vez que preencheram a totalidade da superfície das placas em menos de 3 dias. Esse fungo tem grande capacidade saprofítica e sua incidência, em determinadas situações, pode constituir-se na mais destrutiva enfermidade de todos os patógenos de pós-colheita, ocasionando perdas de mais de 50% em alguns embarques (EMBRAPA, 2007). Embora seja

comumente relatado em feijoeiros, (DOMIJAN et al., 2005; MOTA et al., 2017; AMARAL et al., 2013; SENDI et al., 2019) não são descritos como produtores de micotoxinas.

Vale ressaltar que a identificação das características morfológicas desses isolados foi considerada uma análise preliminar uma vez que foi possível apenas a determinação dos principais gêneros encontrados, bem como não permitiu a identificação dos isolados descritos como não esporulados. Desta forma, uma abordagem polifásica, através da combinação de diferentes ferramentas de identificação, como análises morfológicas, moleculares e da produção de metabólitos (NORLIA et al., 2018; RAMOS-PEREIRA et al., 2019; RASHEED et al., 2019), se faz necessária e será objeto de futuros estudos sobre esses isolados para garantir e/ou solucionar problemas na identificação exata das espécies presentes no feijão.

6.3 Potencial toxigênico e micotoxinas no feijão

Os resultados obtidos demonstraram que nenhum dos fungos foi considerado produtor das principais micotoxinas investigadas (aflatoxinas e OTA). Além disso, as amostras de feijão analisadas estavam isentas de micotoxinas. A presença de *Aspergillus* em sementes de feijão foi relatada anteriormente (COSTA E SCUSSEL, 2002; DOMIJAN et al., 2005; SILVA et al., 2008; TSENG et al., 1995), mas na maioria dos estudos não foi realizada a identificação molecular a nível de espécie ou a capacidade de produzir micotoxinas. Santos-Ciscon et al. (2019) verificaram a presença de genes envolvidos na biossíntese de aflatoxina, ocratoxina e fumonisina, sendo identificados sete genes para a aflatoxina, quatro genes para a OTA e dez genes para fumonisina.

No Paquistão, Lutfullah e Hussain (2012) verificaram que 20% das amostras de feijão analisadas estavam contaminadas por aflatoxinas. No Brasil, Santos-Ciscon et al. (2019) relataram 17 cepas de *A. flavus*, as quais apresentaram genes de aflatoxinas em 15 dos 35 lotes de sementes analisadas

(43%). Existem poucos estudos disponíveis sobre a contaminação de micotoxinas em feijão, apesar de ter sido relatada uma alta incidência de aflatoxina nas análises realizadas até o momento (SILVA et al., 2002; SANTOS-CISCON et al., 2019). O estudo de Telles et al. (2017) sugere que os compostos fenólicos encontrados no feijão constituem um mecanismo de defesa contra o ataque de fungos e produção de aflatoxinas.

Em 1981, um estudo sobre a contaminação de OTA em feijão, foi realizado para fornecer mais evidências sobre a hipótese de que essa micotoxina estaria envolvida na etiologia da nefropatia endêmica dos Balcãs. Os feijões coletados na Bulgária revelaram uma alta concentração de OTA (até 285 mg/kg), bem como maior porcentagem de grãos contaminados, contendo >10 µg de OTA/kg (PETKOVA-BOCHAROVA E CASTEGNARO, 1985). No Brasil, *A. westerdijkiae* e *A. ochraceus* têm sido frequentemente relatados nas lavouras de café e videira como os principais agentes de contaminação por OTA em bebidas associadas. Santos-Ciscon et al. (2019) identificaram a presença destes gêneros nas amostras de feijão avaliadas. De 35 lotes, sete apresentaram a contaminação por *A. westerdijkiae* e apenas um por *A. ochraceus*. Domijan et al. (2005) introduziram um método sensível para análise de OTA em feijão com limite de detecção de 0,25 µg/kg. A OTA foi encontrada apenas em amostras contaminadas com *Penicillium* e *Aspergillus* spp. Foi possível verificar que 38% das amostras continham OTA, variando de 0,25 a 0,92 µg/kg.

É importante reconhecer a necessidade de maiores estudos com essa commodity para reconhecer os pontos críticos da contaminação desde o campo, armazenamento e comercialização. Futuros estudos também serão importantes para estimar o risco relacionado à exposição da população às micotoxinas através desse alimento que faz parte da dieta básica do brasileiro.

Embora o presente estudo não tenha identificado nenhum fungo produtor das micotoxinas investigadas, os resultados do teor de umidade e A_w caracterizam um ambiente favorável para o desenvolvimento dos mesmos. Portanto, ressalta-se a necessidade de mais estudos para esclarecimentos da

diversidade de fungos toxigênicos, na busca de contribuir para estratégias de prevenção da contaminação por micotoxinas em feijoeiros brasileiro.

7. CONCLUSÕES

O presente estudo revelou que espécies de fungos são frequentemente encontradas em feijão no Brasil. A presença acentuada de cepas de *Aspergillus* em feijão pode ser considerada a primeira indicação de um risco potencial de contaminação por micotoxinas. Outro aspecto que vale enfatizar, são as condições inadequadas de armazenamento em que os grãos se encontram, possibilitando um ambiente propício para a contaminação fúngica, afetando negativamente a qualidade e a segurança alimentar do grão.

Especialmente em grande parte do Brasil, essa leguminosa constitui a dieta básica da população, aumentando as chances de ingestão diária de micotoxinas, que pode ser exacerbada pelo baixo nível de tecnologia empregada pelos pequenos agricultores e pelas condições descontroladas de umidade e temperatura durante o armazenamento dos grãos. Portanto, se ressalta a demanda de futuras pesquisas para elucidar a diversidade de fungos toxigênicos presentes nos feijoeiros brasileiros e contribuir para estratégias sobre a prevenção da contaminação fúngica e produção de micotoxinas neste alimento básico da população.

REFERÊNCIAS

AGRIPOULOU, S. et al. Advances in Occurrence, Importance, and Mycotoxin Control Strategies: Prevention and Detoxification in Foods. *Foods*, v. 9. p 137, 2020.

AMARAL, C. et al. Potentially mycotoxigenic fungi in beans (*Phaseolus vulgaris* L.) of different commercial trademarks. *Revista Científica Eletrônica de Agronomia*, pp (2):69–77, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia alimentar para a população brasileira, Brasília, 2014. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-brasil/publicacoes-para-promocao-a-saude/guia_alimentar_populacao_brasileira_2ed.pdf/view. Acesso em: 11 jun. 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Regras para Análise de Sementes, Brasília, 2009. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/arquivos-publicacoes-insumos/2946_regras_analise_sementes.pdf. Acesso em 08 jun. 2021.

BOCHAROVA, P. T. et al. Ochratoxin A contamination of cereals in an area of high incidence of Balkan endemic nephropathy in Bulgaria, *Food Additives & Contaminants*, v. 2:4, p. 267-270, 1985.

CASTILHO, M. D. et al. Mycoflora and potential for mycotoxin production of freshly harvested black bean from the Argentinean main production area. *Mycopathologia*, v. 158, pp. 107–112, 2004.

CECCHI, Heloisa. *Fundamentos Teóricos E Práticos Em Análise De Alimentos*. 2 ed. Campinas, Editora da Unicamp, 2003.

Companhia Nacional de Abastecimento de Brasília (CONAB). Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos, Brasília, 2022. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>. Acesso em: 11 jun. 2022.

Council for Agricultural Science Technology (CAST). *Micotoxinas: Riscos em plantas, animais e sistemas humanos*. Relatório da Força Tarefa, Ames, Iowa, No. v. 139, pp. 1-199, 2003.

COSTA, L. et al.. Fungos toxigênicos em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) classes de preto e cor cultivadas no estado de Santa Catarina, Brasil. *Revista Brasileira de Microbiologia*, vol.33 no.2 São Paulo, abr/jun. 2002.

DOMIJAN, A. et al. Seed-borne fungi and ochratoxin A contamination of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Republic of Croatia. *Food and Chemical Toxicology*, v. 43(3), pp. 427–32, 2005.

DOMELLO, J. e MACDONALD, AMC. Mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*, v. 69, pp. 155-166, 1997.

FREIRE, F. et al. Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal, *Fortaleza*, v. 48, p. 110-120, 2007.

HITOKOTO, H. et al. Fungal contamination and mycotoxin-producing potential of dried beans. *Mycopathologia* v. 73 p. 33–8, 1981.

IARC - International Agency for Research on Cancer. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. Lyon: IARC, 1993.

IARC - International Agency for Research on Cancer. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. Lyon: IARC Press, v. 82, p. 171–274, 2002.

IBGE POF 2018 - Pesquisa de orçamentos familiares 2017-2018. Análise do consumo alimentar pessoal no Brasil, Rio de Janeiro, 2020. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/saude/24786-pesquisa-de-orcamentos-familiares-2.html?=&t=resultados>. Acesso em: 08 jun. 2022.

JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 2020. Disponível: <<http://www.who.int/foodsafety/chem/jecfa/publications>>. Acesso: 15 out 2020.

KNABBEN, C. C. Manual de classificação do feijão: Instrução Normativa nº 12, de 28 de março de 2008. Brasília, 2012.

KRN, R. et al. Uma visão geral da contaminação por micotoxinas em alimentos e suas implicações para a saúde humana *Toxin Rev*, p. 3-26, 2010.

LAGO, L. et al. A new approach using QuEChERS-LC-QTOFMS and matrix-matched calibration for the simultaneous determination of legislated and emerging mycotoxins in malted barley and beer. *Food Chemistry*, v. 345, 2020.

LUTFULLAH, G. et al. Estudos sobre o nível de contaminação de aflatoxinas em alguns cereais e feijões do Paquistão, *Food Control* , v. 23, pp . 32-36, 2012.

MILANI, J, M. Ecological conditions affecting mycotoxin production in cereals: a review. *Veterinari Medicina*. v. 58, n. 8, p. 405–411, 2013.

MOTA, J. et al. Fungal diversity in lima bean seeds. Seedborne pathogenic fungi in common bean (*Phaseolus vulgaris* cv. INTA Rojo) Brazilian Journal of Biosystems Engineering, Nicarágua, p. 79–87, 2017.

NASERI, B. et al. Root rot pathogens in field soil, roots and seeds in relation to common bean (*Phaseolus vulgaris*), disease and seed production. International Journal of Pest Management, v. 1, p. 60–7, 2015.

NORLIA, M. et al. Polyphasic approach to the identification and characterization of aflatoxigenic strains of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from peanuts and peanut-based products marketed in Malaysia. International Journal of Food Microbiology, v. 282, pp. 9–15, 2018.

PATRIARCA, A. et al. Prevalence of mycotoxins in foods and decontamination, Current Opinion in Food Science, Volume 14, p 50-60, 2017.

PERAICA, M., et al. Efeitos tóxicos das micotoxinas em humanos. Boletim da Organização Mundial de Saúde , v. 77, pp. 754 - 766, 1999.

PEREIRA, C. E. et al. A. Qualidade física e fisiológica de sementes de arroz ao longo da linha de beneficiamento. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 33, n. 1, p. 2995-3002, 2012.

PITT, J. I., & HOCKING, A. D. (2009). Fungi and Food Spoilage. 3rd ed. New York: Springer, 471p.

POSSE, S. et al. Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na região central-brasileira, Vitória, v. , p. 635.652, 2010. Disponível em: <https://biblioteca.incaper.es.gov.br/digital/bitstream/item/975/1/Livreto-Feijao-AI-NFO.pdf>. Acesso em: 22 jul. 2022.

RAMOS-PEREIRA, J. et al. Polyphasic identification of *Penicillium* spp. isolated from Spanish semi-hard ripened cheeses. Food Microbiology, 84, 103253, 2019.

RASHEED, U. et al. A polyphasic study of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from corn in Guangxi, China- a hot spot of aflatoxin contamination. International Journal of Food Microbiology, 310, 108307, 2019.

RIBEIRO, N. D. et al. Avaliação de linhas de grãos de grãos especiais para rendimento de grãos, tempo de cozimento e concentrações de minerais. Biotechnol, v. 14 (1), pp. 15 - 22, 2014.

RODRIGUES, P. et al.. Mycobiota and mycotoxins of almonds and chestnuts with special reference to aflatoxins. Food Res, v. 48, p. 76–90, 2012.

ROCHA, M. et al. Mycotoxins and their effects on human and animal Walt. Food Control. v. 36, p. 159- 65, 2014.

SANTOS-CISCON, B. et al. *Aspergillus* species from Brazilian dry beans and their toxigenic potential. International Journal of Food Microbiology, v. 292, p. 91-100, 2019.

Serviço Nacional de Aprendizagem Rural (SENAR). Grãos: armazenamento de milho, soja, feijão e café, Brasília, 2018. Disponível em: <https://www.cnabrazil.org.br/assets/arquivos/216-ARMAZENAMENTOS-GR%C3%83OS-NOVO.pdf>. Acesso em: 15 jun. 2022.

SENDI, Y. et al. Diversity and geographic distribution of fungal strains infecting field-grown common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Tunisia. *European Journal of Plant Pathology* v. 3, p. 947–55, 2019.

SCUDAMORE, K. A., GUY, R. C., KELLEHER, B., MCDONALD, S. J. Fate of the *Fusarium* mycotoxins, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone, during extrusion of wholemeal wheat grain. *Food Addit Contam.* v. 25, n. 3, p. 331–337, 2008.

Tabela brasileira de composição de alimentos / NEPA – UNICAMP.- 4. ed. rev. e ampl. Campinas, 2011. Disponível em: https://www.cfn.org.br/wp-content/uploads/2017/03/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf. Acesso em: 20 ago. 2022.

TELLES, A. et al. Composto fenólico em feijão como proteção contra micotoxinas. *Química Alimentar*, v. 214, pp. 293-299, 2017.

VIDAL, A., MARÍN, S., RAMOS, A. J., CANO-SANCHO, G., SANCHIS, V. Determination of aflatoxins, deoxynivalenol, ochratoxin A and zearalenone in wheat and oat based bran supplements sold in the Spanish market. *Food Chem Toxicol.* v. 53, p. 133–138, 2013.

VUATAZ G. et al. TG-DTA approach for designing reference methods for moisture content determination in food powders. *Food Chemistry*, v.122, n.2, p.436-442, 1998.

WENDLAND, A. Manual de identificação das principais doenças do feijoeiro comum, Brasília, 2018.

WINTER, G.; PEREG, L. A review on the relation between soil and mycotoxins: Effect of aflatoxin on field, food and finance. *Eur. J. Soil Sci.* v. 70, p. 882–897, 2019.

WU F., GROOPMAN, J. D., PESTKA, J. J. Public Health Impacts of Foodborne Mycotoxins. *Annual Review of Food Science and Technology.* v. 5, p. 351–72, 2014.

WHO. World Health Organization. Risk communication applied to food safety handbook. Report of a Joint FAO/WHO Consultation. Rome, 2016. Disponível: <http://www.who.int/foodsafety/publications/Risk-Communication/en>. Acesso: 19 out 2020.

ZHANG, H. et al. A review on citrinin: Its occurrence, risk implications, analytical techniques, biosynthesis, physiochemical properties and control. *Food Research International* v. 141, 110075, 2021.