



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE
PERNAMBUCO**

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
FITOPATOLOGIA**

Tese de Doutorado

Diversidade e controle alternativo de fungos associados a grãos de feijão-caupi comercializados no Nordeste brasileiro

ErasmO Ribeiro da Paz Filho

**Recife – PE
2023**

ERASMO RIBEIRO DA PAZ FILHO

**DIVERSIDADE E CONTROLE ALTERNATIVO DE FUNGOS ASSOCIADOS A
GRÃOS DE FEIJÃO-CAUPI COMERCIALIZADOS NO NORDESTE BRASILEIRO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Fitopatologia.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador: Prof. Dr. André Angelo Medeiros Gomes (UFRPE)

Coorientador: Prof. Dr. Olinto Liparini Pereira (UFV)

Coorientador: Prof. Dr. Luís Roberto Batista (UFLA)

**RECIFE - PE
MARÇO - 2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos
pelo(a) autor(a)

- P348d Paz Filho, Erasmo Ribeiro da
Diversidade e controle alternativo de fungos associados a grãos de feijão-caupi comercializados no
Nordeste brasileiro / Erasmo Ribeiro da Paz Filho. - 2023.
77 f.
- Orientador: Andre Angelo
Medeiros . Inclui referências.
- Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em
Fitopatologia, Recife, 2023.
1. Aspergillus tamarii. 2. fungos toxigênicos. 3. Vigna unguiculata. I. , Andre Angelo Medeiros, orient.
II. Título

CDD 632

**DIVERSIDADE E CONTROLE ALTERNATIVO DE FUNGOS ASSOCIADOS A
GRÃOS DE FEIJÃO-CAUPI COMERCIALIZADOS NO NORDESTE BRASILEIRO**

ERASMO RIBEIRO DA PAZ FILHO

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 04/03/2023.

ORIENTADOR:

Prof. Dr. André Angelo Medeiros Gomes (UFRPE)

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Rejane Rodrigues da Costa e Carvalho (UFRPE)

Profa. Dra. Cristina Maria de Souza Motta (UFPE)

Profa. Dra. Elineide Barbosa de Souza (PPGF-UFRPE)

Prof. Dr. Delson Laranjeira (PPGF-UFRPE)

**RECIFE – PE
ABRIL – 2023**

Antônia Maria da Rocha (*In memoriam*),
Laiane Silva de Carvalho (*In memoriam*)
À minha família.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), especialmente ao Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, e o seu corpo de professores.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro durante o período de Doutorado.

A minha família por todo amor, suporte, carinho e orações para que eu finalize essa etapa profissional.

Aos meus amigos Karen, Nara, Remedios, Larisse, Iasnaia, Valdeir, Renato, Antônio pela força e estímulos para trilhar essa jornada.

Aos amigos da Pós-Graduação: Larissa, Bruno, Felipe, Jadson, Ana Flávia, Roselane, Ruthe, Jackeline, Bia, Ingryd, André, e ao meu amigo Plínio que me fez conhecer o que Recife tem de melhor.

Aos amigos e companheiros do laboratório LPPC: Suzi, José Marques, Athayse, Waligson e Lobo por toda amizade e ajuda nessa jornada. Em especial a Suzi pelas conversas, risadas, idas ao RU, pelas saídas para assistir filmes e conhecer a cidade.

Aos meus orientadores da graduação Profa. Dra. Beatriz Barguil, Prof. Dr. Cicero Nicolini, Dr. Cândido Athayde, e da Pós-Graduação Profa. Dra. Maria de Fátima, Prof. Dr. André Angelo, por todo conhecimento compartilhado.

A banca examinadora pelas sugestões e contribuição para melhoria da Tese.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia-UFRPE pelos ensinamentos, em especial aos professores Jonas Rios, Elineide Barbosa, Lilian Guimarães, Humberson Rocha, Alexandre Machado por serem professores fantásticos na docência.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

página

RESUMO GERAL	VII
GENERAL ABSTRACT	VIII
CAPÍTULO I	09
INTRODUÇÃO GERAL	11
1. A cultura do feijão-caupi	12
2. Principais problemas fitossanitários em feijão-caupi	12
3. Espécies de fungos toxigênicos associados a grãos de feijão-caupi	14
4. Fatores que influenciam a presença de fungos toxigênicos e produção de micotoxinas	17
5. O gênero <i>Aspergillus</i>	18
6. Manejo de fungos toxigênicos associados a grãos	19
REFERÊNCIAS	22
CAPÍTULO II	32
RESUMO	32
1. INTRODUÇÃO	34
2. MATERIAL E MÉTODOS	35
3. RESULTADOS	36
4. DISCUSSÃO	42
5. CONCLUSÃO	45
6. REFERÊNCIAS	45
CAPÍTULO III	59
RESUMO	59
1 INTRODUÇÃO	61
2 MATERIAL E MÉTODOS	64
3. RESULTADOS	65
4. DISCUSSÃO	71
5. REFERÊNCIAS	73
CAPÍTULO III	77
CONCLUSÕES GERAIS	78

RESUMO GERAL

Grãos de feijão-caupi apresentam importante papel na dieta humana, sendo uma das principais fontes de proteínas para famílias das regiões Norte e Nordeste do Brasil, podendo ser consumidos na forma de grãos verdes ou secos. Este trabalho, objetivou estudar a diversidade de fungos associados a deterioração de grãos de feijão-caupi comercializados na região Nordeste do Brasil e avaliar o uso de eugenol, extrato de própolis, OE de citronela e OE de capim-limão no controle de espécies de *Aspergillus* e de fungos associados aos grãos de feijão-caupi. Para isso, realizaram coletas de grãos de feijão-caupi, de tegumento marrom, comercializados em seis estados da Região Nordeste (Pernambuco, Alagoas, Piauí, Maranhão, Ceará e Paraíba). Para cada amostra foi realizado teste de sanidade de sementes com um total de 400 grãos por amostra. Estruturas fúngicas emergindo dos grãos foram quantificados e identificadas a nível de gênero. Quando observado a presença de estruturas semelhantes às do gênero *Aspergillus* procedeu-se com o isolamento. Foi constatada a presença de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Macrophomina* em grãos de feijão-caupi comercializados nos seis estados da região Nordeste do Brasil. A identificação molecular dos isolados de *Aspergillus*, revelou a presença de *A. tamarii* (n=06), *A. niger sensu stricto* (n=18) e a presença de isolados que não tiveram a identificação molecular acurada, agrupando com isolados-tipos de *A. flavus* e *A. oryzae* (n=23). Foram realizados ensaios *in vitro* e *in vivo* com a finalidade de avaliar o efeito fungitóxico de eugenol, extrato de própolis, óleo essencial de citronela e óleo essencial de capim-limão sobre quatro isolados de *Aspergillus* e sobre a frequência de fungos associados aos grãos de feijão-caupi. No ensaio *in vitro* foram testadas as concentrações de 0,0 (testemunha), 15,62, 31,25, 62,50 e 125 µL/L para o eugenol e 0, 25, 50, 75, e 125 µL/L para extrato de própolis, OE de citronela e OE de capim-limão na inibição de *Aspergillus* spp. No teste *in vivo* 200 grãos de feijão-caupi proveniente do estado Ceará foram imersos em soluções de eugenol, extrato de própolis, OE de citronela, OE de capim-limão e em seguida incubadas de acordo com o teste de sanidade de sementes. Os resultados indicaram que todos os compostos testados têm atividade fungitóxica para isolados de *Aspergillus* e podem ser uma alternativa para o tratamento de fungos associados aos feijão-caupi. No teste *in vivo* (grãos) todos os tratamentos testados diminuíram a frequência de fungos associados aos grãos de feijão-caupi em até 40% comparado com a testemunha. O eugenol, extrato de própolis, OE de citronela e OE de capim-limão são uma alternativa para o tratamento de grãos de feijão-caupi com infestação natural de fungos.

Palavras-chaves: *Aspergillus tamarii*; fungos toxigênicos; *Vigna unguiculata*.

GENERAL ABSTRACT

Cowpea grains play an important role in the human diet, being one of the main sources of protein for families in the North and Northeast regions of Brazil, and can be consumed in the form of green or dry grains. In addition to the nutritional aspect, the cultivation of cowpea is a source of employment and income for needy populations. The present work aimed to study the diversity of fungi associated with the deterioration of cowpea grains sold in the Northeast region of Brazil and to evaluate the use of eugenol, propolis extract, citronella essential oil and lemongrass essential oil, in the control of *Aspergillus* species associated with cowpea grains. For this, collections of cowpea grains, with brown tegument, sold in six states of the Northeast Region (Pernambuco, Alagoas, Piauí, Maranhão, Ceará and Paraíba) were carried out. For each sample, a seed health test was carried out with a total of 400 grains per sample. Fungal structures emerging from the grains were quantified and identified at the genus level. When the presence of structures similar to those of the genus *Aspergillus* was observed, isolation was carried out. The presence of fungi belonging to the genera *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* and *Macrophomina* was verified in cowpea grains sold in six states of the Northeast region of Brazil. Molecular identification of *Aspergillus* isolates revealed the presence of *A. tamarii* (n=06), *A. niger sensu stricto* (n=18) and the presence of isolates that did not have accurate molecular identification, grouping with isolates-types of *A. flavus* and *A. oryzae* (n=23). *In vitro* and *in vivo* tests were carried out in order to evaluate the fungitoxic effect of eugenol, propolis extract, citronella essential oil and lemongrass essential oil on *Aspergillus* isolates and on the frequency of fungi associated with bean grains, cowpea. In the *in vitro* assay, concentrations of 0.0 (control), 15.62, 31.25, 62.50, 125 µL/L for eugenol and 0, 25, 50, 75, and 125 µL/L for eugenol were tested. propolis extract, citronella EO and lemongrass EO. In the *in vivo* test, 200 cowpea grains from the state of Ceará were immersed in solutions of eugenol, propolis extract, citronella EO, lemongrass EO and then incubated according to the seed health test. The results indicate that all tested compounds have fungitoxic activity for *Aspergillus* isolates and may be an alternative for the treatment of fungi associated with cowpea. In the *in vivo* test (grains) all tested treatments reduced the frequency of fungi associated with cowpea grains by up to 40% compared to the control, constituting an alternative for the treatment of cowpea grains with natural fungal infestation.

Keywords: *Aspergillus tamarii*; toxigenic fungi; *Vigna unguiculata*.

CAPÍTULO I

Introdução Geral

DIVERSIDADE E CONTROLE ALTERNATIVO DE FUNGOS ASSOCIADOS A GRÃOS DE FEIJÃO-CAUPI COMERCIALIZADOS NO NORDESTE BRASILEIRO

INTRODUÇÃO GERAL

1.1. A cultura do feijão-caupi

O feijão-caupi é uma Angiosperma da classe Dicotyledonea, ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Faboideae, tribo Phaseoleae, subtribo Phaseolineae, gênero *Vigna*, subgênero *Vigna*, secção Catyang, espécie *Vigna unguiculata* e subespécie *unguiculata* (FREIRE FILHO *et al.*, 2011).

A cultura, também conhecida como caupi, feijão-de-corda, feijão-macassa, feijão fradinho e feijão-miúdo é de origem africana, sendo introduzida no Brasil na segunda metade do século XVI pelos colonizadores portugueses no estado da Bahia (FREIRE FILHO *et al.*, 1983). Diferentemente dos demais feijões cultivados no Brasil, o feijão-caupi não pertence à espécie *Phaseolus vulgaris* (L.) e sim à espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp., sendo o segundo feijão mais consumido no país (EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, 2022).

O feijão-caupi é considerada uma cultura rústica devido à sua resistência ao calor e à seca, bem como sua capacidade de crescer em solos com baixo teor de matéria orgânica e fertilidade (FREIRE FILHO *et al.*, 2011). Apresenta grãos ricos em nutrientes que podem ser utilizados na dieta da população, evitando deficiências causadas pela falta de minerais, como ferro e zinco, principalmente em cultivares biofortificados (DIAS-BARBOSA *et al.*, 2021). O grão do feijão-caupi é apontado pela FAO (Food and Agriculture Organization) como uma das melhores alternativas para o aumento de oferta de proteína derivada de plantas (PHILLIPS *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2019).

De acordo com dados da FAO (2021), a Nigéria se destaca como principal país produtor de feijão-caupi com cerca de 3.410 milhões de toneladas anuais, respondendo por 42% da produção mundial, seguida pelo Níger com aproximadamente 1.959 milhões de toneladas e o Brasil com cerca de 788 mil toneladas sendo esses três países responsáveis por aproximadamente 73% da produção mundial de grãos secos de feijão-caupi em todo o mundo.

No Brasil, apesar de sua expansão para a região Nordeste e Norte e mais recente para o Centro-oeste, o feijão-caupi é predominantemente cultivado no Nordeste, especialmente em áreas semiáridas onde outras culturas leguminosas anuais, em razão da irregularidade das

chuvas e das altas temperaturas, não se desenvolvem satisfatoriamente. De acordo com a CONAB (2022), estimou-se para a safra de 2021/2022 a produção de 810 mil toneladas de grãos de feijão-caupi em todo o território nacional, com destaque para os estados do Ceará, Piauí, Bahia e Pernambuco como com os principais produtores dessa leguminosa.

O feijão-caupi tem uma grande importância, tanto como alimento quanto como gerador de emprego e renda. Pelo seu valor nutritivo, o feijão-caupi é cultivado principalmente para a produção de grãos, secos ou verdes, para o consumo humano, *in natura*, na forma de conserva ou desidratado. Os grãos são uma excelente fonte de proteínas e apresentam todos os aminoácidos essenciais, carboidratos, vitaminas e minerais, além de possuir grande quantidade de fibras dietéticas, baixa quantidade de gordura e não conter colesterol, constituindo-se um alimento básico para as populações rurais e urbanas, especialmente no Nordeste brasileiro (FREIRE FILHO *et al.*, 2011).

Dentre as várias cultivares/genótipos comercializadas no Brasil, as cultivares BRS Juruá, BRS Aracê, BRS Xiquexique e BRS Tumucumaque vem ganhando destaque por serem conhecidas como cultivares biofortificadas com altos teores de ferro e zinco em sua composição, com destaque para a BRS Xiquexique, que apresenta os maiores teores (FREIRE FILHO *et al.*, 2011; ROCHA; DAMASCENO-SILVA; MENEZES-JÚNIOR, 2017).

A cultura do feijão-caupi é considerada estratégica para muitas regiões tropicais e subtropicais no mundo, pois apresenta alta rusticidade e adaptação às condições adversas, como baixa disponibilidade de água e solos de baixa fertilidade natural (FREIRE FILHO; COSTA, 2020).

O potencial produtivo do feijão-caupi para o Nordeste brasileiro é indiscutível, mas a produtividade é baixa quando comparadas as obtidas nas regiões Norte (722 kg/ha^{-1}) e Centro-Oeste (1.095 kg/ha^{-1}) (EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, 2022). Vários fatores vêm contribuindo para essa baixa produtividade da cultura, destacando-se a baixa ocorrência de chuvas, o baixo emprego de tecnologia, a utilização de cultivares com potencial genético reduzido e principalmente a ocorrência de doenças e pragas (ATHAYDE SOBRINHO, 2016; SILVA; ROCHA; MENEZES JUNIOR, 2016).

1.2 Principais problemas fitossanitários em feijão-caupi

Dentre os vários fatores bióticos que podem causar perdas e prejuízos na cultura do feijão-caupi e provocar perdas na qualidade e no rendimento dos grãos estão os fungos, bactérias, vírus e nematoides (ATHAYDE SOBRINHO *et al.*, 2016). Devido às condições climáticas do

Brasil, perdas em áreas de cultivo de feijão-caupi por doenças causadas por fungos, podem alcançar um patamar elevado, principalmente onde se emprega baixa tecnologia fitossanitária no cultivo (POLTRONIERI; TRINDADE; SILVA, 1994).

No campo várias doenças são consideradas importantes na cultura, podendo causar grandes danos, destacando-se a mela (*Rhizoctonia solani* Kühn); a antracnose causada por *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Biosi e Cavara; a mancha-café causada por *Colletotrichum truncatum* (Schewin.) Andrus e Moore; cercosporiose (*Pseudocercospora cruenta* (Sacc.) Deigtom); a murcha-de-fusarium (*Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* Schltdl) e a mancha bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. *vignicola* (Burkholder) Dye) e a pústula-bacteriana (*Xanthomonas* sp.) (PIO-RIBEIRO; ASSIS FILHO; ANDRADE, 2016; ATHAYDE SOBRINHO; VIANA; SANTOS, 2005; NECHET; HALFELD-VIEIRA, 2006). Entre as principais fitonematoses responsáveis pela redução de produção ou pela depreciação da qualidade do produto a ser comercializado destacam-se os nematoides-das-galhas, principalmente *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) e *M. javanica* (Treub) Chitwood, os quais possuem extensa disseminação em áreas de cultivo de feijão-caupi. Os nematoides-das-lesões-radiculares (gênero *Pratylenchus*) e o nematoide reniformes da espécie *Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira também são importantes na cultura (PONTE, 1988; SILVA, 2005; ATHAYDE SOBRINHO., 2016).

Dentre os vírus que infectam a cultura do feijão-caupi merecem destaque, pela severidade e pela ampla ocorrência, respectivamente o *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) e o *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), os quais causam mosaicos (BARROS *et al.*, 2013; ATHAYDE SOBRINHO., 2016). São as doenças mais importantes na cultura do feijão-caupi, facilmente reconhecidas em campo (NEVES *et al.*, 2011).

Os principais fungos de armazenamento presentes nas sementes de feijão-caupi pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Phomopsis*, *Colletotricum*, *Phoma*, entre outros (RODRIGUES, MENEZES, 2002; HOUSSOU *et al.*, 2009). Esses fungos são favorecidos, especialmente, pelas condições de colheita tardia, quando as sementes permanecem em campo por longos períodos de exposição a esses agentes, bem como pelas condições inadequadas de transporte, de beneficiamento e de estocagem, sobretudo quando elas são armazenadas com alta umidade ou em ambientes com temperatura e umidade elevadas (ATHAYDE SOBRINHO; SANTOS, SILVA., 2020). Alguns fungos de armazenamento são toxigênicos e produzem micotoxinas, as quais podem trazer danos aos grãos e ao consumidor.

1.3 Espécies de fungos toxigênicos associados a grãos de feijão-caupi

Assim como ocorre para outras culturas destinadas à alimentação humana e animal, principalmente na produção de grãos, o ataque por microrganismos fúngicos pode causar perdas de produção e colocar em risco a saúde de consumidores quando ocorre a ingestão de grãos ou derivados contaminados com micotoxinas. A ingestão de grãos e derivados contaminados com micotoxinas é preocupante, devido à sua associação com diversas doenças no homem e em animais (GELDERBLOM *et al.*, 1991; UENO *et al.*, 1997).

O termo micotoxina é derivado da palavra grega “*mykes*” que significa fungo e do latim “*toxican*” que significa toxinas. Este termo é usado para designar um grupo de compostos produzidos por fungos durante seu crescimento, que podem causar doenças ou morte quando ingeridas pelo homem ou animais. As micotoxinas são contaminantes naturais de difícil controle em alimentos. Estima-se que cerca de 25% de todos os produtos agrícolas do mundo estejam contaminados por tais substâncias (BENETT; KLICH, 2003; IAMANAKA; OLIVEIRA, TANIWAKI., 2010).

A síntese de micotoxinas depende do crescimento fúngico e pode variar em função de diferentes fatores, tais como: presença de isolados produtores de micotoxinas, condições climáticas (especialmente temperatura e umidade), período do ano, estágio de desenvolvimento da cultura e principalmente devido a fatores relacionados às etapas de colheita, processamento, armazenamento e comercialização dos grãos. No entanto, o crescimento do fungo e a presença de micotoxinas não são sinônimos, isto porque nem todos os fungos produzem micotoxinas. Por outro lado, as micotoxinas podem permanecer no alimento mesmo após a destruição dos fungos que as produziram. Os gêneros de fungos mais frequentemente associados com a ocorrência natural de micotoxinas, são *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (IAMANAKA; OLIVEIRA, TANIWAKI., 2010)..

Espécies do gênero *Aspergillus* podem contaminar alimentos com micotoxinas e algumas também são patógenos de plantas e animais (SOUZA *et al.*, 2020; HOUBRAKEN *et al.*, 2020). As contaminações causadas por espécies desse gênero acarretam enormes perdas para a economia, por ocorrerem em diferentes estágios da produção agrícola, incluindo a pré e pós-colheita, processamento e estocagem. *A. niger* Tieghem, *A. ochraceus* Wilhelm e *A. carbonarius* (Bainier) são frequentemente associados a contaminação de grãos em diversos armazéns de manutenção (feijão, café, arroz, trigo e nozes), vinícolas e frutos de interesse comercial como maçã, pera, pêssego, morango e melão (PERRONE *et al.*, 2007).

É reconhecido que as espécies produtoras de aflatoxinas são *A. flavus* Link, produtores de

aflatoxinas do grupo B e algumas vezes ácido ciclopiazônico (CPA), *A. parasiticus* Speare e *A. nomius* Kurtzman, produtores de aflatoxinas do grupo B e G e não produtoras de CPA (KLICH, PITT, 1988; PITT, 1993; SAITO *et al.*, 1989; KURTZMAN *et al.*, 1987).

O gênero *Penicillium* está distribuído mundialmente sendo encontrado em uma variedade de habitats, no solo, ar, água, alimentos e vegetação (WANG *et al.*, 2017). Esse gênero fúngico ficou mundialmente conhecido em 1928 com a descoberta da penicilina, pelo médico microbiologista escocês Alexander Fleming. A penicilina produzida por *P. chrysogenum* Thom (renomeado *P. rubens*) foi o primeiro antibiótico utilizado no tratamento contra infecções bacterianas (GAYNES, 2017).

Espécies de *Penicillium* produzem uma grande variedade de metabólitos secundários tóxicos à saúde humana encontrados principalmente em alimentos. Essas micotoxinas causam grande prejuízo na agricultura e na indústria de alimentos, contaminando principalmente as culturas de cereais como trigo, nozes, milho e amendoim e alimentos como queijo, presunto, embutidos e enlatados (GREEFF-LAUBSCHER, 2020). O consumo contínuo de micotoxinas pode levar a efeitos carcinogênicos, neurotóxicos, nefrotóxicos ou imunossupressores (FIGUEIREDO *et al.*, 2020).

Dentre as espécies de *Penicillium*, *P. verrucosum* Dierckx é a maior fonte de ocratoxina A, sendo esta espécie mais comum em países de climas temperados e frios, enquanto que *A. ochraceus*, *A. carbonarius* e outras espécies do grupo *A. niger* são mais comuns em climas tropicais e quentes. Outra espécie de *Penicillium* produtora de ocratoxina A é *P. nordicum* Dragoni & Cantoni (IAMANAKA; OLIVEIRA, TANIWAKI., 2010).

Por muito tempo a espécie *P. expansum* Link, que causa podridão em maçã, pêra, cereja e outras frutas, foi conhecida como a principal produtora de patulina, uma importante micotoxina que é responsável por cerca de 70 a 80% da deterioração de frutas armazenadas, em especial maçã (LEGGOTT, SHEPHARD, 2001). Essa micotoxina é comum em sucos de frutas (especialmente maçã e pêssego), trigo, pó de cacau, queijo, salame, feijão, soja, milho, cevada, presunto, amendoim, plantas forrageiras e para silagem e pode ser produzida por várias espécies de *Penicillium*, *Aspergillus*, *Paecilomyces* e *Byssosclamyces* (PUDEL *et al.*, 2010). A produção de patulina pelo fungo ocorre nas partes danificadas do fruto, sendo que a intensidade de difusão dessa micotoxina é de 2 cm em direção ao tecido sadio em maçã (RYCHLIK, SCHIEBERLE, 2001).

Fungos do gênero *Fusarium* destacam-se como uns dos mais importantes em termos de perdas globais devido a micotoxicoses (SMITH; SEDDON, 1998). Isso se deve ao fato desse gênero ter a capacidade de produzir uma variedade de micotoxinas, sendo as mais importantes

as fumonisinas, tricotecenos, a zearalenona e o ácido fusárico (MELO, 2011). Dentre as espécies de *Fusarium* que são conhecidas como produtoras de micotoxinas, as mais importantes são: *F. verticillioides* (Sacc.), *F. graminearum* Schwabe, *F. culmorum* (Wm.G. Sm.) Sacc., *F. equiseti* (Corda) Sacc, *F. roseum* Link, *F. subglutinans* (Wollenw & Reinking) e *F. proliferatum* (Matsush.) (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

As principais micotoxinas encontradas em alimentos são: aflatoxinas (B, B2, G1, G2 e M1), ácido fusárico, fumonisinas (B1e B2), fumonisinas, ocratoxinas (A, B e C), patulina, citrinina, zearalenona e tricotecenos (MAZIEIRO; BERSOT, 2010).

As aflatoxinas, produzidas por espécies do gênero *Aspergillus*, podem ser encontradas em frutas secas e cereais sob condições ideais de umidade e temperaturas elevadas e constituem um risco a saúde humana e animal, devido aos seus efeitos tóxicos imediatos, imunossupressores, mutagênicos, teratogênicos e carcinogênicos (MAZIEIRO; BERSOT, 2010). Este grupo de micotoxinas tem recebido grande atenção em comparação com as demais, devido aos efeitos carcinogênicos que podem provocar em animais, efeito agudo tóxico em seres humanos e por representarem o grupo de micotoxinas com mais resultados positivos já relatados em alimentos (PEREIRA *et al.*, 2002).

Até recentemente a produção de ocratoxina A estava restrita à *A. ochraceus* e espécies relacionadas pertencentes à *Aspergillus* seção *Circumdati* e à espécie *P. verrucosum*. Recentemente, o número de trabalhos sobre a produção de ocratoxina A pelos membros de *Aspergillus* seção *Nigri* tem aumentado, desde a sua primeira publicação em 1994 por Abarca *et al.* (1994). Estas espécies são muito comuns em alimentos de várias partes do mundo, mas principalmente em regiões com temperaturas mais quentes (IAMANAKA; OLIVEIRA, TANIWAKI, 2010).

Estudos envolvendo a presença de micotoxinas em grãos vêm sendo amplamente conduzidos em todo o mundo para diversas culturas de importância econômica, como o amendoim (ROSSETTO; SILVA, ARAÚJO, 2005; GONÇALEZ *et al.*, 2008), arroz (KATSURAYAMA; TANIWAKI, 2017), feijão-comum (COSTA; SCUSSEL, 2002; AMARAL *et al.*, 2013), milho (MELO, 2011; BENTO *et al.*, 2012; VALMORBIDA *et al.*, 2018), e soja (GARCIA *et al.*, 2016) entre outras. Na cultura do feijão-caupi, detectou-se a presença de fumonisinas em grãos produzidos na África do Sul, sendo estas sintetizadas por várias espécies do gênero *Fusarium* (RITZINGER *et al.*, 2003) e a presença de aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2) em grãos produzidos na Tanzânia e Zimbábue (SEENAPPA; KESWANI; KUNDYA, 1983; MARINGE *et al.*, 2016). Na Nigéria foi detectado a presença de aflatoxinas B1 (AFB1), aflatoxina B2 (AFB2), aflatoxina M1 (AFM1) em grãos de feijão-caupi (AFOLABI

et al., 2019), no entanto, são escassos os estudos direcionados ao potencial risco de contaminação com micotoxinas em grãos de feijão-caupi no Brasil (SANTOS-CISCON *et al.*, 2019).

1.4 Fatores que influenciam a presença de fungos toxigênicos e produção de micotoxinas

A contaminação por micotoxinas pode ocorrer no campo ou durante armazenagem ou, ainda, após o processamento (ONO *et al.*, 2006). Muitos fatores podem contribuir para a contaminação dos grãos por micotoxinas como: genótipo, condições ambientais, momento de colheita, danos mecânicos, tempo entre colheita, secagem e armazenagem e condições de armazenagem (PATERSON, LIMA, 2010). Os fatores intrínsecos dos fungos são específicos dos isolados e variam de acordo à disponibilidade de substratos nos quais os fungos crescem (MARROQUÍN-CARDONA *et al.*, 2014).

A temperatura é um fator determinante primário que modula o crescimento fúngico e a produção de micotoxinas. Por exemplo, o crescimento de *Fusarium* é mais comum em climas temperados com temperaturas variando de 26 a 28° C e atividade de água (A_w) > 0,88, enquanto *Aspergillus* cresce melhor em temperaturas quentes. De acordo com as especificidades de cada isolado e do substrato, a temperatura ótima para produção de aflatoxinas pode variar de 24 a 30°C (KLICH, 2007).

A atividade de água (A_w) é outro fator importante que modula o crescimento fúngico e a produção de aflatoxinas. Estudos avaliando o efeito de A_w e temperatura na produção de aflatoxinas por *A. flavus* mostram que as maiores concentrações de aflatoxinas foram encontradas em arroz integral e polido inoculado sob intervalos de A_w de 0,9–0,92 a 21 °C após 21 dias de incubação (MOUSA *et al.*, 2013). O crescimento ótimo dos fungos foi alcançado maior A_w (ou seja, 0,92, 0,90) e 20 °C, houve um aumento na produção de aflatoxinas no arroz polido em comparação com o arroz integral.

Outro fator ambiental importante associado a presença e produção de micotoxinas em alimentos e grãos é a precipitação pluvial. Na Índia, o sorgo cultivado na estação chuvosa durante os anos de 2006–2007 resultou em níveis mais altos de aflatoxinas em comparação com outros anos (RATNAVATHI *et al.*, 2012). Isso ocorre devido a elevada precipitação pluviométrica durante esses anos no local de estudo.

Novas estratégias para monitorar e prever a contaminação por micotoxinas em alimentos específicos ou em regiões geográficas são de desenvolvimento recente e podem ser úteis no futuro. Essas tecnologias visam identificar e prever as condições ambientais presentes em

regiões que podem favorecer a proliferação de micotoxinas. Nesse sentido, alguns modelos foram criados para prever aflatoxinas para pistache (MARÍN *et al.*, 2012), arroz (MOUSA *et al.*, 2013), amendoim (BOKEN *et al.*, 2008) e outras culturas (MASUOKA *et al.*, 2010).

1.5 O gênero *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* pertence ao Domínio Eukarya, Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Eurotiomycetes, Ordem Eurotiales e à Família Aspergillaceae. Este gênero surgiu há aproximadamente 81,7 milhões de anos, no período Cretáceo, é filogeneticamente relacionado com o gênero *Penicillium* e é taxonomicamente dividido em seis subgêneros (*Aspergillus*, *Circumdati*, *Cremeri*, *Fumigati*, *Nidulantes* e *Polypaecilum*) e 27 seções que abrigam, atualmente, 458 espécies (MYCOBANK, 2023).

O nome *Aspergillus* foi introduzido pelo padre Pier Antonio Micheli em 1729, para descrever fungos assexuais cujos conidióforos se assemelhavam a um aspergillum, um objeto utilizado para dispersar água benta em rituais religiosos (SOUZA *et al.*, 2020). Em 1768 o gênero *Aspergillus* foi validado por Haller e sancionado por Fries em 1832. Aproximadamente 20 anos depois De Bary (1854) descreveu o gênero sexual *Eurotium*, o primeiro teleomorfo ligado a *Aspergillus* (SAMSON *et al.*, 2014).

Espécies do gênero *Aspergillus* são amplamente distribuídas na natureza e apresentam grande versatilidade de crescimento em diferentes condições de temperatura, pH, salinidade e umidade. Espécies desse gênero possuem grande diversidade metabólica, toleram ampla variação climática e são encontrados em diversos ambientes como florestas, mares, rios, desertos e Antártica, colonizando diferentes substratos como solo, rochas e matéria orgânica em decomposição (LEVIĆ *et al.*, 2013; ABDEL-AZEEM *et al.*, 2019).

O gênero *Aspergillus* possui um importante papel na manutenção e equilíbrio ecológico, participando, principalmente, na dinâmica da reciclagem da matéria orgânica e disponibilização de nutrientes, afetando tanto a produtividade da cadeia alimentar como a qualidade do solo (CRAY *et al.*, 2013; FRAÇ *et al.*, 2018).

Ao longo de vários anos, muitas espécies do gênero *Aspergillus* foram encontradas e descritas de acordo com caracteres morfológicos e fisiológicos. Baseando-se nesses caracteres morfofisiológicos, Thom e Raper (1945) aceitaram 77 espécies, com 10 variedades em 14 grupos para o gênero. No ano de 1965, Raper e Fennell publicaram uma das principais literaturas em que aceitavam 150 espécies pertencentes ao gênero e desconsideraram nomes teleomorfos, usando apenas o nome *Aspergillus* com o intuito de evitar confusão nomenclatural.

Pitt *et al.*, (2000) aceitaram 184 nomes de *Aspergillus* e 70 nomes teleomorfos associados de acordo com estudos baseados na morfologia das espécies.

A introdução do conceito ‘um fungo, um nome’ foi estabelecido na Seção de Nomenclatura do Congresso Internacional de Botânica em 2011 (TAYLOR, 2011). Essa mudança no Código Internacional de Nomenclatura para algas, fungos e plantas resultou na transição para um único nome por espécie, assim o nome *Aspergillus* foi mantido e seus nominais teleomorfos foram abandonados (TAYLOR, 2011).

A classificação infragenérica do gênero *Aspergillus*, foi tradicionalmente baseada em critérios morfológicos. Como o número e a variação de caracteres morfológicos é limitado o conceito de espécie usado era muito amplo e não representava a real extensão da divergência evolutiva do gênero (GAUTIER; NORMAND; RANQUE, 2016). A incorporação da filogenia molecular na taxonomia e sistemática de *Aspergillus* contribuiu para resolver esse problema e, como consequência, promoveu uma reorganização taxonômica do gênero (SOUZA *et al.*, 2020 HOU BRAKEN *et al.*, 2020).

Para a filogenia molecular do gênero *Aspergillus* os marcadores mais indicados são regiões dos genes que codificam a β -tubulina (*BenA*), calmodulina (*CaM*) e os genes da segunda subunidade maior da RNA polimerase II (RPB2) (SAMSON *et al.*, 2014). Estes marcadores são capazes de discriminar, inclusive, espécies crípticas. São consideradas crípticas duas ou mais espécies classificadas como uma única espécie nominal por apresentarem características morfológicas indistinguíveis. Espécies crípticas são frequentes em fungos porque o processo de especiação nestes organismos nem sempre é acompanhado por mudanças morfológicas (GAUTIER; NORMAND; RANQUE, 2016).

1.6 Manejo de fungos toxigênicos associados a grãos

O controle de fungos geralmente é realizado por aplicação de fungicidas na produção de sementes e utilização das práticas de manejo agrícolas no campo. Porém, o desenvolvimento de maior resistência dos fungos perante os fungicidas tende a aumentar com o passar dos anos, e com isso as formas de controles precisam ser melhoradas (HAWKINS *et al.*, 2018).

A contaminação das culturas agrícolas por fungos depende de fatores como região geográfica, colheita, e condições climáticas que podem ser prejudiciais como temperatura, chuva e umidade relativa (VALMORBIDA, 2016), isto pode ocasionar maior risco de ocorrência de doenças e diminuir a produtividade e a qualidade dos cultivos agrícolas. Assim também, práticas no manejo pós-colheita são cruciais uma vez que invasão de espécies como

Fusarium e *Aspergillus* em diversas culturas podem começar no campo e a situação pode piorar devido às más práticas pós-colheita (MARINGE *et al.*, 2017; BERTUZZI *et al.*, 2019).

A questão ambiental é determinante na proliferação de fungos e na produção de micotoxinas. Eles são favorecidos pela umidade e não se multiplicam em substratos devidamente secos (EMBRAPA, 2006). Por esse motivo, o processo de secagem dos grãos deve ser realizado preferentemente dentre as 48 horas após colheita e devem ser controladas as condições de armazenamento, temperatura e umidade relativa do ar e vetores (DORN; JACKSONZIEMS, 2013; VALMORBIDA, 2016).

Outra prática agrícola utilizada para o manejo de fungos toxigênicos associados a grãos é na etapa de beneficiamento desses grãos. O beneficiamento oferece uma maior segurança as sementes, pois durante as suas etapas, grãos não sadios e sujidades são eliminados, diminuindo também as chances de contaminação (TROGELLO, 2013; VIEIRA, 2013).

A utilização de compostos oriundos de plantas com extratos vegetais e óleos essenciais, ou composto majoritário presentes nesses metabólitos secundários das plantas e sua aplicabilidade vem sendo atualmente pesquisado e tem mostrado vários efeitos sobre fungos contaminantes de alimentos e grãos. Em um estudo realizado por Brandão *et al.* (2023) avaliando a eficiência *in vitro* e *in vivo* de embalagem ativa de nanofibras de PLA (Polylactic acid) com óleos essenciais de *Ocimum basilicum* L. e *O. gratissimum* L. contra *A. carbonarius* e *A. niger* em uvas de mesa. Nos resultados encontrados pelos autores a embalagem ativa com óleos essenciais controlaram a proliferação dos fungos em uvas de mesa.

Em um estudo conduzido por Brandão *et al.*, (2021) avaliando óleo essencial de *Lippia origanoides* avaliando o efeito antifúngico e antimicotoxigênico sobre *A. carbonarius*, *A. flavus* e *A. ochraceus* observaram alterações morfológicas e danos à integridade da membrana da célula fúngica.

Alguns compostos vêm ganhando destaque nos resultados promissores sobre fungos toxigênicos como eugenol, extratos de própolis, óleo essencial de citronela e óleo essencial de capim-limão. O eugenol (C₁₀H₁₂O₂) é um óleo claro a amarelo pálido extraído como um componente principal (aproximadamente 85%) de brotos e folhas de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry). Esse composto tem demonstrado atividade fungistática sobre *A. niger*, *A. terreus*, *P. expansum*, *P. glabrum* e *P. italicum* (CAMPANIELLO; CORBO; SINIGAGLIA, 2010).

A própolis é um material resinoso produzido pela abelhas de resinas vegetais e sua função é garantir estabilidade da colméia e da proteção contra patógenos ou invasores (INOUE *et al.*, 2007). A própolis tem sido relatada como inibidora do crescimento e desenvolvimento

de fungo que causa a cercosporiose em café (*Cercospora coffeicola* Berk & Cooke (PEREIRA *et al.*, 2013), bem como antracnose em feijoeiro causado por *Colletotrichum lindemuthianum* Briosi & Cavara (PEREIRA *et al.*, 2014), ferrugem e mancha foliar na videira (*Phakopsora euvtis* Ono e *Pseudocercospora vitis* Speg) (MARINI *et al.*, 2012). Em um estudo conduzido por Lorini *et al.*, (2018) avaliando a atividade antimicrobiana e verificaram o efeito na germinação de *A. flavus* utilizando extrato de própolis.

Citronela é um óleo essencial extraído de *Cymbopogon nardus* e possui vários compostos, principalmente monoterpenos ($\pm 80\%$), que inclui principalmente citronelal, citronelol e geraniol, embora também sejam encontrados sesquiterpenos (BENETI *et al.*, 2011). Com relação a fungos toxigênicos, um estudo conduzido por Li *et al.*, (2013) avaliou o efeito antifúngico de citronela sobre *A. niger* isolado ATCC 16404 e concluiu que citronela causou várias alterações nas hifas e conídios mostrando-se eficiente.

O capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf), pertencente à família das Poaceae, é uma planta aromática cultivada para produção comercial de óleo essencial, o qual geralmente apresenta como constituintes majoritários os monoterpenos citral e o mirceno (GUIMARÃES *et al.*, 2011). O óleo essencial de capim-limão vem sendo testado e estudos comprovaram sua atividade antifúngica contra vários fungos de importância agrícola (GUIMARÃES *et al.*, 2011). Estudo conduzido por Nakada-Freitas *et al.*, (2022) conclui que óleo essencial de capim-limão na concentração de 1,9 % teve efeito fungistático contra *A. flavus* em sementes de couve-flor.

O presente trabalho teve como objetivo estudar a diversidade de fungos associados a deterioração de grãos de feijão-caupi comercializados na região Nordeste do Brasil e avaliar o uso de eugenol, extrato de própolis, óleo essencial de citronela e óleo essencial de capim-limão no controle de espécies de *Aspergillus* associados a grãos de feijão-caupi.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABDEL-AZEEM, A M.; ABDEL-AZEEM, M. A.; KHALIL, W. *Aspergillus*: Biodiversity, Ecological Significances, and Industrial Applications. In: **Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi**. Springer, Cham, 2019. p. 121-179.

AFOLABI, C. G.; CHIBUNDU C. G.; EZEKIEL, N.; E. A.; OLUFEMI, O.; OLUWADAIRI, J.; SULTYOK, M.; RUDOLF KRSKA, R. Fungi and mycotoxins in cowpea (*Vigna unguiculata* L) on Nigerian markets. **Food Additives & Contaminants**, Part B, p. 1-7, 2019.

AMARAL, C. L.; CHIERICATTI, C.; BASÍLICO, J. C.; FERREIRA, N.C.A.; ANTUNES, A.E.C. Fungos potencialmente micotoxigênicos em feijões (*Phaseolus vulgaris* L.) de diferentes marcas comerciais. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, v.24, n.2, p. 69-77, dez., 2013.

ATHAYDE SOBRINHO, C. Principais doenças do feijão-caupi no Brasil. In: BASTOS, E.A. (ed.). **A cultura do feijão-caupi no Brasil**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2016. p. 44-66.

ATHAYDE SOBRINHO, C.; VIANA, F. M. P.; SANTOS, A. A. dos. Doenças fúngicas e bacterianas. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. de A.; RIBEIRO, V. Q. (Ed.). **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2005. Cap. 12, p. 461-484.

BARROS, G. B.; NOGUEIRA, M. S. R.; OLIVEIRA, C. R. R.; FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; VEIGA, C. F. M.; BRIOSSO, P. S. T.; EIRAS, M. Obtenção de plantas de feijão-caupi resistentes ao *Cowpea severe mosaic virus* e ao *Cowpea aphid-borne mosaic virus*. **Summa Phytopatologica**, v. 39, p. 130-136, 2013.

BENETI, S. C.; ROSSET, E.; CORAZZA, M. L.; FRIZZO, C. D.; LUCCIO, M. D.; OLIVEIRA, J.V. Fractionation of citronella (*Cymbopogon winterianus*) essential oil and concentrated orange oil phase by batch vacuum distillation. **Journal of Food Engineering**, v. 102, p. 348–354, 2011.

BENTO, L. F.; CANEPPELE, M. A. B.; ALBUQUERQUE, M. C. F.; KOBAYASTI, L.; CANEPPELE, C.; ANDRADE, P. J. Ocorrência de fungos e aflatoxinas em grãos de milho. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 1, p. 44-49, 2012.

BERTUZZI, T.; ROMANI, M.; RASTELLI, S.; GIORNI, P. Mycotoxins and Related Fungi in Italian Paddy Rice During the Growing Season and Storage. **Toxins**, v.11, n.3, p. 151, 2019.

BRANDÃO, R. M.; BATISTA, L. R.; J. E.; BARBOSA, R. B.; NELSON, D. L.; CARDOSO, M.G. *In vitro* and *in vivo* efficacy of poly(lactic acid) nanofiber packaging containing essential oils from *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum gratissimum* L. against *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus niger* in table grapes. **Food Chemistry**, v. 400, p. 134087, 2023.

BRANDAO, R. M.; FERREIRA, V. R. F.; BATISTA, L. R.; ALVES, E.; SANTIAGO, W. D.; BARBOSA, R. B.; CAETANO, A. R. S.; NELSON, D. L.; CARDOSO, M. G. Antifungal activity and the effect of the essential oil of *Lippia origanoides* Kunth on *Aspergillus* mycotoxins production. **Australian Journal of Crop Science** (online), v. 15, p. 1005-1012, 2021.

CAMPANIELLO; D.; CORBO, M. R.; SINIGAGLIA. M. Antifungal Activity of Eugenol against *Penicillium*, *Aspergillus*, and *Fusarium* Species. **Journal of Food Protection**, v.73, n. 6, p. 1124–1128, 2010.

CRAY, J.A.; BELL, A. N.; BHAGANNA, P.; MSWAKA, A.Y.; TIMSON, D. J.; HALLSWORTH, J. E. The biology of habitat dominance; can microbes behave as weeds? **Microbial biotechnology**, v. 6, n. 5, p. 453-492, 2013.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). Acompanhamento da safra brasileira de grãos. 7º Levantamento Grãos Safra 2021/22 - dezembro 2022. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>. Acesso em: 10 de janeiro de 2023.

COSTA, L. L. F. C.; SCUSSEL, V. M. Toxigenic fungi in beans (*Phaseolus vulgaris* L.) classes black and color cultivated in the state of Santa Catarina, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 138-144, 2002.

DIAS-BARBOSA, C. Z. M. C. et al. Selection of cowpea elite lines for iron and zinc biofortification. **Current Nutrition & Food Science**, v. 17, p. 48-58, 2021.

DORN, T.W.; JACKSON-ZIEMS, T.A. Grain Storage Management to Minimize Mold and Mycotoxins. **Papers in Plant Pathology**, v.538, p. 14–15, 2013.

EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. Dados conjunturais da produção de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) no Brasil (1985 a 2021): área, produção e rendimento. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2022. Disponível em: <http://www.cnpaf.embrapa.br/socioeconomia/index.htm>.

EMBRAPA. Dezembro, 2006. **Doenças na cultura do milho**. Circular Técnica 83, ISSN 16791150. Sete Lagoas – MG.

FRĄC, M.; HANNULA, S. E.; BELKA, M.; JEDRYCZKA, M. Fungal biodiversity and their role in soil health. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 707, 2018.

FIGUEIREDO, C. N.; SOUZA, H. G.; CRUZ-MAGALHÃES, V.; SALES, L. S.; SANTANA NETO, D.; SOUZA, J. T.; ANDRADE, J. P.; MARBACH, P. A. S.; Diversidade taxonômica e identificação de *Penicillium*. In: SOARES, A. C. F.; EVANGELISTA-BARRETO, N. S.; MARBACH, P. A. S. **Tópicos em microbiologia agrícola**. Cruz das Almas, BA: EDUFRB, 2020. 276p.; il. – (Coleção Pesquisas e Inovações Tecnológicas na Pós-Graduação da UFRB; volume 8).

FREIRE FILHO, F. R.; CARDOSO, M. J.; ARAÚJO, A. G. de. Caupi: nomenclatura científica e nomes vulgares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 18, n. 12, p. 1369-1372, dez. 1983.

FREIRE FILHO, F.R. RIBEIRO, V.Q.; ROCHA, R.R.; SILVA, K.J.D. NOGUEIRA, M.S.R.; RODRIGUES, E.V. **Feijão caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011, 84 p.

FREIRE FILHO, F.R.; COSTA A.F. Feijão-caupi: classificação botânica e importância. **Cadernos do Semiárido**, n. 17, p. 17-20, 2020.

GARCIA, P. L.; SAVI, G. D.; KAROLINA SANTOS, K.; SCUSSEL, V. M. Fumonisin and fungi in dry soybeans (*Glycine max* L.) for human consumption, **Food Additives & Contaminants**, Part B, 2016.

GAUTIER, M.; NORMAND, A. C.; RANQUE, S. Previously unknown species of *Aspergillus*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 8, p. 662-669, 2016.

GAYNES, R. The discovery of Penicillin—New insights after more than 75 years of clinical use. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 5, p. 849-853, 2017.

GELDERBLOM, W.C.A., KRIEK, N.P.J., MARASAS, W.F.O., THIEL, P.G., Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B1 in rats. **Carcinogenesis**, v.12, p. 1247-1251, 1991.

GONÇALEZ, E.; SILVA, J.L.; REIS, T.A.; NAKAI, V.K.; J, J.D.; CORRÊA, F.B. Produção de aflatoxinas e ácido ciclopiazônico por cepas de *Aspergillus flavus* isoladas de amendoim. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.80, n.3, p. 312-317, 2013.

GONÇALEZ, E.; SOUZA, T.N.; ROSSI, M.H.; FELICIO, J.D.; CORRÊA, B. Avaliação da micoflora e ocorrência de micotoxinas em cascas de amendoim em diferentes estágios de maturação da vagem. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, n.5 p.1380-1386, 2008.

GREEFF-LAUBSCHER, M. R.; BEUKESB, I.; GERT, J.; JACOB, M. K. Mycotoxin production by three different toxigenic fungi genera on formulate da balone feed and the effect of an aquatic environment on fumonisins. **Mycology**, v. 11, n. 2, p. 105–117, 2020.

GUIMARÃES, L. G. L.; CARDOSO, M. G.; PAULO ESTEVÃO DE SOUSA, P. E.; JULIANA DE ANDRADE, J.; VIEIRA, S. S. Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 2, p. 464-472, abr-jun, 2011.

HAWKINS, N.J.; BASS, C.; DIXON, A.; NEVE, P. 2018. The evolutionary origins of pesticide resistance. **Biological Reviews**, v. 94, n. 1, p. 135-155, 2018.

HOUBRAKEN, J.; KOCSUBÉ, S.; VISAGIE, C. M.; YILMAZ, N.; WANG, X. C.; MEIJER, M.; KRAAK, B.; HUBKA, V.; BENSCH, K.; SAMSON, R. A.; FRISVAD, J.C.

Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): an overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. **Studies in Mycology**, v.95, p. 5-169, 2020.

HOUSSOU, P. A.; AHOHUENDO, B. C.; FANDOHAN, P.; KPODO, K.;

HOUNHOUIGAN, D. J.; JAKOBSEN, M. Natural infection of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) by toxigenic fung and mycotoxin contamination in Benin, West Africa. **Journal of Stored Products Research**, v. 45, p. 40–44, 2009.

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

INOUE, H. T.; SOUSA E.A. de; ORSI, R. de O.; FUNARI, S.R. C.; BARRETO, L. M. R. C.; DIB, A.P. da S. Produção de própolis por diferentes métodos de coleta. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, v. 15, n. 2, p. 65-69, 2007.

KATSURAYAMA, A. M.; TANIWAKI, M. H. Fungos e aflatoxinas no arroz: ocorrência e significado na saúde do consumidor. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, e2017006, 2017.

KLICH, M.A.; PITT, J.I. Differentiation of *Aspergillus flavus* from *A. parasiticus* and other closely related species. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 91, p. 99–108, 1988.

KURTZMAN, C.P., HORN, B.W. & HESS ELTINE, C.W. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 53, p. 147–158, 1987.

LEGGOTT, N. L.; SHEPHARD, G. S. Patulin in South African commercial apple products. **Food Control**, v. 12, p. 73–76, 2001.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. The Fusarium laboratory Manual. Sydney. Blakwell. 2006. 388 p.

LEVIĆ, J.; GOŠIĆ-DONDO, S.; IVANOVIĆ, D.; STANKOVIĆ, S.; KRNJAJA, V.; BOČAROV-STANČIĆ, A.; STEPAN, A. An outbreak of *Aspergillus* species in response to environmental conditions in Serbia. **Pesticidi fitomedicina**, v. 28, n. 3, p. 167-179, 2013.

LI, W. R.; SHI, S. Q.; YOU-SHENG OUYANG, S. Y.; YI-BEN CHEN, B. Y.; DUAN, S. S. Antifungal effects of citronella oil against *Aspergillus niger* ATCC 16404. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 7483–7492, 2013.

LORINI, A.; WOBETO, C.; BONALDO, S. M.; BOTELHO, S. C. C.; SINHORIN, A.P. Composição química e atividade antifúngica de própolis sobre *Aspergillus flavus*. **Bioscience Journal**, v. 34, n. 5, p. 1298-1307, 2018.

MARINGE, D. T.; CHIDEWE, C.; BENHURA, M. A.; MVUMI, B. M.; MURASHIKI, T. C.; DEMBEDZA, M. P.; SIZIBA, L.; NYANGA, L. K. Natural postharvest aflatoxin occurrence in food legumes in the smallholder farming sector of Zimbabwe. **Food Additives & Contaminants**, Part B, v. 10, n. 1, p. 21-26, 2017.

MARINI, D. MENSCH, R.; FREIBERGER, M.B.; DARTORA, J.; FRANZENER G.; GRACIA, R. C.; STANGARLIN, J. R. Efeito antifúngico de extratos alcoólicos de própolis sobre patógenos da videira. **Arquivo do Instituto de Biologia**, v. 79, n. 2, p. 305-308, 2012.

MAZIERO, M.T.; BERSOT, L.S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.12, p. 89-99, 2010.

MELO, M.P. **Deteção de espécies de *Fusarium* potencialmente produtoras de micotoxinas em grãos de milho no Nordeste Brasileiro**. 2011. 63 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE, 2011.

MYCOBANK. **Fungal databases**: nomenclature and species bank [online]. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Center, 2023. Disponível em:

<<http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&Page=200&ViewMode=Basic>> Acesso em: 06 de fevereiro de 2023.

NAKADA-FREITAS, P. G.; SANTOS, C. A.; MAGALHÃES, T. H.; BUSTAMONTE, S. S.; SANTOS, D. C.; CARDOSO, A. I. I.; AMADOR, T. S.; LANNA, N. B. L.; BARDIVIESSO, E. M.; CATÃO, H. C. R. M. 2022. Effect of thyme, lemongrass and rosemary essential oils on *Aspergillus flavus* in cauliflower seeds. **Horticultura Brasileira**, v. 40, p. 071-075, 2022.

NECHET, K. L.; HALFELD-VIEIRA, B. A. Caracterização de isolados de *Rhizoctonia* spp., associados à mela do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), coletados em Roraima. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 505-508, 2006.

NEVES, A. C.; CÂMARA, J. A. S.; CARDOSO, M. J.; SILVA, P. H. S.; ATHAYDE SOBRINHO, C. **Cultivo do Feijão-caupi em Sistema Agrícola Familiar**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011. 15p. (Circular técnica 51).

ONO, E.Y.S.; BIAZON, L.; SILVA, M. da; VIZONI, E.; SUGIURA, Y.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. Fumonisin in corn: correlation with *Fusarium* sp. count, damaged kernels, protein and lipid content. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, p. 63-71, 2006.

PATERSON, R.R.M.; LIMA, N. How will climate change affect mycotoxins in food?. **Food Research International**, v. 43, p. 1902-1914, 2010.

PEREIRA, C. S.; MAIA, L. F. P.; PAULA, F. S. de. Aplicação de extrato etanólico de própolis no crescimento e produtividade do feijoeiro comum. **Revista Ceres**, v. 61, n. 1, p. 98-104, 2014.

PEREIRA, C. S.; SOUZA, F. L. F. de.; GODOY, C. A. Extrato etanólico de própolis no controle da cercosporiose e no desenvolvimento de mudas de cafeeiro. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 8, n.1, p. 170-178, 2013.

PEREIRA, M.L.G.; CARVALHO, E.P.; PRADO, G. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.20, n.1, p.141-156, 2002.

PERRONE, G. et al. Biodiversity of *Aspergillus* species in some importante agricultural products. **Studies in Mycology**, v. 59, p. 53-66, 2007.

PHILLIPS, R. D.; MCWATTERS, K. H.; CHINNAN, M. S.; HUNG, Y.-C.; BEUCHAT, L. R.; SEFA-DEDEH, S.; SAKYI-DAWSON, E.; NGODDY, P.; NNANYELUGO, D.; ENWERE, J.; KOMEY, N. S.; LIU, K.; MENSA-WILMOT, Y.; NNANNA, I. A.; OKEKE, C.; PRINYAWIWATKUL, W.; SAALIA, F. K. Utilization of cowpeas for human food. **Field Crops Research**, v. 82, n. 2-3, p. 193-213, 2003.

PIO-RIBEIRO, G.; ASSIS FILHO, F. M.; ANDRADE, G. P. Doenças do caupi. In: KIMATI, H.; AMORIM, J.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.F.A. **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2016. v. 2, p. 215-222.

PITT J.I., SAMSON R.A., FRISVAD J.C. List of accepted species and their synonyms in the family Trichocomaceae. In: Samson R.A., Pitt J.I., editors. **Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification**. Harwood Academic Publishers; Amsterdam: 2000. p. 9–79.

PITT, J.I. Corrections to species names in physiological studies on *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Journal of food Protection**, v.56, p. 265–269, 1993.

POLTRONIERI, L. S.; TRINDADE, R. S.; SILVA, J. F. A. F. **Principais doenças do caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) no Pará e recomendações de controle**. Belém: Embrapa/CPATU, 1994. 24 p. (Documentos, 75).

PONTE, J. J. Nematoides do caupi. In: ARAÚJO, J. P. P.; WATT, E. E. (Org.). **O caupi no Brasil**. Brasília: IITA/Embrapa, 1988. cap. 11, p. 591-601.

PUEL, O.; GALTIER, P.; OSWALD, I. Biosynthesis and toxicological effects of patulin. **Toxins**, v. 2, p. 613–631, 2010.

RODRIGUES, A. A. C.; MENEZES, M. Detecção de fungos endofíticos em sementes de caupi provenientes de Serra Talhada e de Caruaru, Estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 532-537, 2002.

ROSSETO, C. A.V.; SILVA, O. F.; ARAÚJO, A. E. S. Influência da calagem, da época de colheita e da secagem na incidência de fungos e aflatoxinas em grãos de amendoim armazenados. **Ciência Rural**, v. 35, n. 2, p. 309-315, 2005.

SAITO, M.; TSURUTA, O.; SIRIACHA, P.; MANABE, M. Atypical strains of *Aspergillus flavus* isolated in maize fields. **Japan Agricultural Research Quarterly**, v. 23, p. 151–154, 1989.

SAMSON, R. A. et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 78, p. 141-173, 2014.

SANTOS-CISCON, B. A.; DIEPENINGENB, A. V.; MACHADO, J. C.; DIAS, A. I. E.; CEES, W. *Aspergillus* species from Brazilian dry beans and their toxigenic potential. **International Journal of Food Microbiology**, v. 292, p. 91–100, 2019.

SILVA, A. C.; SANTOS, D. C.; TEIXEIRA JR, D. L.; SILVA, P. B.; SANTOS, R. C.; SIVIERO, A. Cowpea: A strategic legume species for food security and health. In: JIMENEZ-LOPEZ, J. C. e CLEMENTE, A. (Ed.). **Legume seed nutraceutical research: IntechOpen**, 2019.

SILVA, G. S. Nematoides. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. (Eds.). **Feijão-caupi: Avanços tecnológicos**. 1. ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. cap. 13, p. 487-497.

SILVA, K.J.D.; ROCHA, M.M.; MENEZES JÚNIOR, J.A.N. Socioeconomia. In: BASTOS, E. A. (ed.). **A cultura do feijão-caupi no Brasil**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2016, p. 6-12.

SMITH, T. K.; SEDDON, I.R. Synergism demonstrated between *Fusarium* mycotoxins. **Feedstuffs**, v. 22, p. 12-17, 1998.

SOUZA, H. G.; SALES, L. S.; FIGUEREDO, C. N.; SANTANA NETO, D.; CRUZ-MAGALHÃES, V.; SOUZA, J. T.; MARBACH, P. A. S.; ANDRADE, J. P. Diversidade taxonômica e identificação de *Aspergillus*. In: SOARES, A. C. F.; EVANGELISTA-BARRETO, N. S.; MARBACH, P. A. S. **Tópicos em microbiologia agrícola**. Cruz das Almas, BA: EDUFRB, 2020. 276p.; il. – (Coleção Pesquisas e Inovações Tecnológicas na Pós-Graduação da UFRB; volume 8).

TAYLOR, J. W. One fungus = one name: DNA and fungal nomenclature twenty years after PCR. **IMA fungus**, v. 2, n. 2, p. 113-120, 2011.

THOM, C.; RAPER, K. B. A **Manual of the Aspergilli**. LWW, 1945.

TROGELLO, E.; NOBRE, D.A.C.; KOLLING, E.M; MODOLO, A.J.; TROGELLO, A.G. Acompanhamento de uma Unidade Beneficiadora de Sementes de Milho – Estudo de Caso. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 12, n. 2, p. 193-201, 2013.

UENO, Y.; IJIMA, K.; WANG, S.; SUGIURA, Y.; SEKIJIMA, M.; TANAKA, T.; CHEN, C.; YU, S.Z. Fumonisin as a possible contributory risk factor for primary liver cancer. A 3-year study of corn harvested in Haimen, China, by HPLC and ELISA. **Food and Chemical Toxicology**, v. 35, p. 1143-1150, 1997.

VALMORBIDA, R. **Fungos e micotoxinas em grãos de milho (*Zea mays* L.) e seus derivados produzidos no estado de Rondônia, Região Norte do Brasil**. 2016. Dissertação de mestrado, Programa de pós-graduação em Ciência dos alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

WANG, X. C.; CHEN, K.; ZENG, Z. Q.; ZHUANG, W. Z. Phylogeny and morphological analyses of *Penicillium* section *Sclerotiora* (Fungi) lead to the discovery of five new species. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2017.

YCHLIK, M.; SC HIEBERLE, P. Model studies on the diffusion behavior of the mycotoxin patulin in apples, tomatoes, and wheat bread. **European Food Research and Technology**, v. 212, p. 274–278, 2001.

Capítulo II

Diversidade fúngica e identificação molecular de *Aspergillus* associados a grãos de feijão-caupi no Nordeste do Brasil

A ser submetido para **European Journal of Plant Pathology**

Diversidade fúngica e identificação molecular de *Aspergillus* associados a grãos de feijão-caupi no Nordeste do Brasil

Erasmu R. Paz Filho • Alexandre R. Machado • Cristina M. Souza-Motta • André A. M. Gomes

Accepted: / Published online:

E. R. Paz Filho • A. A. M. Gomes

Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 36570-000, Recife, PE, Brazil

A. R. Machado • C. M. Souza-Motta

Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-600, Recife, PE, Brazil

E. R. Paz Filho

e-mail: erasmoribeiro91eng@gmail.com

ORCID <https://orcid.org/0000-0003-4760-5739>

A. A. M. Gomes

e-mail: andreangelomg@gmail.com

ORCID <https://orcid.org/0000-0001-5873-5286>

A. R. Machado

e-mail: alexanderm.agro@yahoo.com.br

ORCID <http://orcid.org/0000-0001-7440-3097>

C. M. Souza-Motta

e-mail: cristina.motta@ufpe.br

ORCID <https://orcid.org/0000-0002-0964-8271>

Resumo O feijão-caupi é uma planta leguminosa com enorme importância na alimentação humana no Brasil, principalmente para a população de baixa renda. Seus grãos apresentam grande valor nutricional, sendo, excelente fonte de proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais. Além do consumo *in natura* o feijão-caupi pode ser utilizado como substituto de farinha de trigo no preparo de biscoitos e acarajés. Os grãos, após serem colhidos no campo, podem sofrer deterioração durante o armazenamento. A deterioração pode ser acelerada devido às condições do ambiente de armazenamento bem como à ação de microrganismos. Os fungos são conhecidos pela sua capacidade de proliferar em condições de baixa umidade, o que favorece sua associação com sementes e grãos armazenados. Além disso, estes microrganismos são importantes produtores de micotoxinas, podendo constituir um problema de ordem fitossanitária e de segurança alimentar. Com o presente trabalho, objetivou-se estudar a diversidade de fungos associados a grãos de feijão-caupi comercializados na Região Nordeste do Brasil e realizar a identificação molecular de isolados de *Aspergillus*. Foram amostrados grãos de feijão-caupi de tegumento marrom nos estados de Pernambuco (Recife), Alagoas (Maceió), Piauí (José de Freitas), Maranhão (Codó), Ceará (Icó) e Paraíba (Campina Grande). Foram coletados duas amostras em cada estado. Um total de 400 grãos de cada amostra foram utilizados para o teste de sanidade de sementes. Gêneros fúngicos emergindo dos grãos foram quantificados e quando observado a presença de estruturas semelhantes às do gênero *Aspergillus* procedeu-se com o isolamento. Procedeu-se a identificação molecular de 47 isolados representativos obtidos em cada estado definidos de acordo com características morfoculturais. Foi verificado a presença de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Macrophomina* em grãos de feijão-caupi comercializados em seis estados da região Nordeste do Brasil. Existe uma baixa diversidade de fungos associados aos grãos de feijão-caupi sendo o gênero *Aspergillus* o que possui a maior riqueza e diversidade associada. A identificação molecular de isolados de *Aspergillus* revelou a presença de *A. tamarii* (n=06), *A. niger sensu stricto* (n=18) e de isolados que não tiveram a identificação molecular acurada, agrupando com isolados-tipos de *A. flavus* e *A. oryzae* (n=23). Os gêneros fúngicos *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Macrophomina* estão associados aos grãos de feijão-caupi comercializados na Região Nordeste do Brasil.. A espécie *Aspergillus tamarii* está associada aos grãos de feijão-caupi constituindo esse o primeiro relato no Brasil.

Palavras-chaves: *Aspergillus tamarii* • Micotoxinas • *Penicillium* • *Vigna unguiculata*

Diversity fungal and molecular identification of *Aspergillus* isolates associated with cowpea grains in Northeast Brazil

Abstract Cowpea is a legume that is of great importance in human nutrition, especially in the low-income population, due to its nutritional quality, as an excellent source of proteins, carbohydrates, vitamins and minerals. It can also be used as a substitute for wheat flour in the preparation of biscuits and acarajé. The study of cowpea seeds during storage can be accelerated due to the conditions of the storage environment as well as the action of microorganisms. Fungi are known for their ability to proliferate in low humidity conditions, which favors their association with stored seeds and grains. In addition, these fungi are important producers of mycotoxins, constituting a phytosanitary and food safety problem. The present work aimed to study the diversity of fungi associated with cowpea grains sold in the Northeast of Brazil and to perform a molecular identification of *Aspergillus* isolates from the *Flavi* and *Nigri* section. Cowpea grains were sampled in the states of Pernambuco, Alagoas, Piauí, Maranhão, Ceará and Paraíba. Two samples were collected in each state. A total of 400 grains from each sample were used for the seed health test. For molecular identification, the β -tubulin gene region was used. Cowpea grains marketed in six states in the Northeast region of Brazil were analyzed qualitatively and showed the marked presence of fungi belonging to the genera *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* and *Macrophomina*. Molecular identification of *Aspergillus* isolates revealed the presence of *A. tamarii* (n=06), *A. niger* sensu stricto (n= 18) and the presence of isolates that did not have an accurate molecular identification, grouping with *A. flavus* and *A. oryzae* (n=23). The fungal genera *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* and *Macrophomina* are associated with cowpea grains sold in Northeast Brazil. There is a low diversity of fungi associated with cowpea grains, with the genus *Aspergillus* having the greatest richness and diversity. The *Aspergillus tamarii* species is associated with cowpea grains, constituting the first report in Brazil.

Keywords: *Aspergillus tamarii* • Mycotoxins • *Penicillium* • *Vigna unguiculata*

Introdução

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), feijão-de-corda ou feijão macassar é uma planta originária da África que foi introduzida no Brasil no século XVI. Essa planta pode ser caracterizada como herbácea, anual, de estações quentes e necessita de uma temperatura mínima de 18°C para se desenvolver bem, com crescimento ótimo na temperatura em torno de 28°C (Freire Filho et al. 2011). É uma cultura com boa capacidade de fixação biológica de nitrogênio, boa tolerância às condições de baixa disponibilidade de água nos solos, altas temperaturas e relativa tolerância à salinidade, condições comumente encontradas em regiões semiáridas do Nordeste do Brasil (Freire Filho et al., 2011; Damasceno-Silva; Menezes-Júnior, 2016).

Essa espécie tem enorme importância na alimentação humana, principalmente para a população de baixa renda, devido à sua qualidade nutricional, como excelente fonte de proteínas (17 - 18% em média), carboidratos (64- 68%, em média), vitaminas e minerais (Martins et al., 2023).

O feijão-caupi pode ser utilizado na alimentação como grão seco, grão verde, vagem verde, além de poder ser utilizado como substituto de farinha de trigo para preparação de biscoitos e acarajé (Frota et al., 2008). Os restos culturais podem ser usados na alimentação animal, principalmente quando a proporção de folhas é maior que a de ramos (Cardoso et al., 2017), e como visto na África do Sul a utilização de feno de feijão-caupi tem mostrado resultados satisfatórios na alimentação de caprinos como suplemento proteico para pastagens de baixa qualidade (Katsande et al., 2016).

Segundo registros da FAO (2021) a produção mundial de feijão-caupi foi de aproximadamente 7,23 milhões de toneladas, com produtividade de 578,84 kg.ha⁻¹ em uma área plantada de 12,5 milhões de hectares. Os três maiores produtores são Nigéria com cerca de 2,6 milhões de toneladas, seguido de Níger com aproximadamente 1,0 milhão de toneladas e Burkina Faso com cerca de 414,7 mil toneladas.

A produção nacional na safra 2020/2021 foi estimada 712,6 mil toneladas, com área plantada de 1.307.800 ha. O Ceará é o estado com maior área plantada, chegando a 380,4 mil hectares, porém com produtividades de 305 kg.ha⁻¹, inferiores às do Centro-Sul e Região Norte que chegam a 1376 kg.ha⁻¹. É o segundo feijão mais cultivado, ficando atrás apenas no feijão-comum, e tem sua safra concentrada no Nordeste brasileiro, com maiores produtividades principalmente no Piauí e Bahia. O maior produtor da última safra foi o estado de Mato Grosso com produção de 135,4 mil toneladas (CONAB, 2022). Entre os países que importaram feijão-caupi do Brasil, os maiores compradores são: Índia, Egito, Paquistão, Vietnã e Indonésia. O preço médio do feijão-caupi exportado está entre 650 e 700 dólares por tonelada de grãos, gerando uma receita superior a 77,5 milhões de dólares ao Brasil (Silva; Rocha, Menezes-Júnior, 2016).

A aceitação do feijão-caupi na região Nordeste se deve principalmente por ser uma cultura bem adaptada a regiões de climas tropicais e baixa necessidade de recursos hídricos, apresentando ciclo curto e rusticidade para se desenvolver em solos de baixa fertilidade. Na região Nordeste do país a cultura do feijão-caupi é geralmente cultivada por pequenos e médios produtores, com pouco uso de tecnologia e tem grande importância como alimento básico para as populações mais pobres, como também gera renda e emprego, estimulando a economia e fornecendo suprimento para uma cadeia produtiva que se desenvolve desde o agricultor familiar

ao empresarial até o consumidor final (Silva; Rocha, Menezes-Júnior, 2016).

Alguns fatores afetam negativamente sua qualidade principalmente fatores como temperatura, umidade, concentrações de O_2 e CO_2 , e com destaque, infestações de insetos e fungos que aceleram a respiração da massa de grãos, aumentando assim a degradação de carboidratos, proteínas e óleos (Lutz, Coradi., 2022). Os fungos são capazes de produzir em condições naturais metabólitos secundários tóxicos a humanos e animais. Esses metabólitos são excretados por meio de um conjunto de vias metabólicas, mas não essenciais para o crescimento e a sobrevivência desses fungos, recebendo o nome de micotoxinas (Visotto et al., 2008; Rocha et al., 2014).

A presença de fungos nos produtos alimentícios não é necessariamente um indicador da presença de micotoxinas. Por outro lado, a ausência de fungos visíveis não descarta a sua presença (Hussein; Brasel, 2001; Taniwaki et al., 2003; Terzi et al., 2014). Os fungos podem se desenvolver no campo, durante o cultivo, a colheita e a estocagem, por causa de fatores intrínsecos, ou seja, inerentes ao substrato, ou aqueles relacionados às condições que envolvem o substrato, como umidade e temperatura (Pitt, 2000; Ashiq et al., 2014).

De acordo com o Food and Agriculture Organization (FAO), estima-se que cerca de 25% das culturas mundiais estão contaminadas com micotoxinas (Pereira et al., 2014). As principais micotoxinas identificadas e estudadas são as aflatoxinas, produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*; ocratoxinas, produzidas por espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*; e fumonisinas, desoxinivalenol e zearalenona, produzidas por diversas espécies de fungos do gênero *Fusarium* (Jarvis; Miller., 2005).

Estudos envolvendo a presença de fungos toxigênicos e micotoxinas em grãos vêm sendo amplamente conduzidos em todo o mundo para diversas culturas de importância econômica, como o amendoim (*Arachis hypogaea* L.), arroz (*Oryza sativa* L.), feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.), milho (*Zea mays* L.), entre outras (Gonzalez et al., 2008; MELO., 2011; Amaral et al., 2013; Katsurayama; TaniwakI., 2017).

Existe muito poucas informações a respeito da contaminação natural por fungos toxigênicos em feijão-caupi e consequentemente, com micotoxinas. Foi detectado em países do continente africano como Nigéria, Tânzania e África do Sul, a presença de fumonisinas e aflatoxinas em grãos de feijão-caupi produzidos por espécies de *Aspergillus* e *Fusarium* (Seenappa; Keswani; Kundy, 1983; Ritzinger et al., 2003; Houssou et al., 2009; Afolabi et al., 2019), no entanto, são escassos os estudos direcionados ao potencial risco de contaminação por fungos toxigênicos em grãos de feijão-caupi no Brasil (Santos-Ciscon et al., 2019).

Diante do exposto o trabalho tem como objetivo avaliar a diversidade de fungos

associados a grãos de feijão-caupi comercializados na região Nordeste do Brasil e a identificação molecular de isolados de *Aspergillus*.

Material e Métodos

Grãos de feijão-caupi de tegumento de cor marrom foram amostrados em feiras ou em mercados públicos nos seguintes estados da região Nordeste do Brasil: Pernambuco, Alagoas, Piauí, Maranhão, Ceará e Paraíba. Os grãos foram embalados em sacos plástico, e encaminhados ao laboratório de Patologia Pós-Colheita da Universidade Federal Rural de Pernambuco (LPPC-UFRPE). Foram coletados duas amostras em cada estado. As amostras foram mantidas a $18\pm 2^{\circ}\text{C}$ até o processamento.

Para avaliar a diversidade de fungos utilizou-se do teste de sanidade de sementes (TSS) utilizado foi o método do papel filtro (Brasil, 2009). Um total de 400 grãos de cada amostra foram utilizados para o TSS. Os grãos foram imersos em hipoclorito de sódio a 1% durante 3 minutos, e em seguida lavados em água destilada autoclavada e mantidos sob papel filtro em temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 10 min. Posteriormente, os grãos foram depositados em caixas do tipo gerbox (16 grãos distribuídos equidistantemente por caixa), contendo três folhas de papel de filtro embebidas em água destilada esterilizada (ADE). As caixas gerbox contendo os grãos foram tampadas e incubadas por um período de sete dias à temperatura de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Após esse período, precedeu-se as avaliações, sendo os grãos foram examinados individualmente, com o auxílio de estereomicroscópio e de microscópio ótico para verificar a presença de estruturas fúngicas. Quando presentes, as estruturas fúngicas permitiram a identificação a nível de gênero dos fungos presentes nas amostras, através de comparações morfológicas e com o auxílio de chaves dicotômicas.

Foram estimados índices ecológicos para avaliar a diversidade e riqueza de fungos associados aos grãos de feijão-caupi. A riqueza específica foi analisada pelos índices de Shannon Weaver – H' , a dominância de espécies pelo índice de Simpson – λ e a equabilidade pelo índice de Pielou – J . Foi utilizado para as realizações dos cálculos dos índices ecológicos o software PAST (Hammer et al., 2001).

Estruturas fúngicas características do gênero *Aspergillus*, quando observadas sobre os grãos, foram capturadas com auxílio de uma alça de platina e depositado em placas de Petri contendo o meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA). As placas foram incubadas à 25°C , por um período de 7 dias. Os isolados obtidos foram preservados refrigerados em microtubos contendo água destilada autoclavada. Após a obtenção, os isolados passaram por um processo

de purificação das colônias através de repicagem de ponta de hifa. Para isso, hifas fúngicas emergindo dos fragmentos foram transferidas para uma outra placa de Petri contendo meio de cultivo Ágar-Água (AA). Após 24 horas de crescimento foi retirada uma única ponta de hifa de cada isolado e transferida para novas placas contendo meio de cultura BDA para dar início ao crescimento de colônias puras (Mello; Reis; Silva, 2011).

Para a identificação morfológica dos isolados de *Aspergillus*, foram observadas as características macromorfológicas das culturas de acordo com Klich, (2002). A identificação a nível de espécie dos isolados foi conduzida através de análises moleculares, com uso de sequências informativas do DNA em BLAST e análises filogenéticas.

Para extração do DNA foi utilizado o Wizard® Genomic DNA Purification Kit. Os isolados foram cultivados em meio BDA, durante sete dias. Fragmentos de micélio foram coletados e depositados em microtubos de 2 mL contendo 300µL de Nuclei Lysis Solution e 4 microesferas (Beads). Os microtubos foram incubados a 65°C por 15 minutos em banho seco, seguido pela adição de 3 µL de RNA Solution (RNAase), incubação 37°C por 15 minutos e freezer por 5 minutos a – 20°C.

Posteriormente foram adicionados 200 µL de Protein Precipitation Solution e misturado em vortex por 10 segundos. Os microtubos com as amostras foram centrifugadas durante 5 minutos a 14.000 rpm para a formação do precipitado (pellet) dos componentes celulares e proteínas. Em seguida, foram removidos 600 µL do sobrenadante (solução que continha o DNA) e transferidos para um microtubo de 1,5 mL contendo 600 µL de isopropanol resfriado. A solução foi misturada por aproximadamente 5 minutos invertendo-se os tubos e incubadas no freezer por 20 minutos. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 5 minutos para a formação de precipitado de DNA. Foi descartado o sobrenadante e realizada duas lavagens com etanol 70%. Para isso, foram adicionados 600 µL de etanol 70% resfriado e agitação durante 2 minutos, seguida por centrifugação a 14.000 rpm por 5 minutos. Após esse processo, o etanol foi removido e os tubos foram postos na posição horizontal com a tampa aberta sobre papel toalha para secagem do pellet. Por fim, adicionou-se 100 µL de DNA Rehydration Solution para ressuspender o pellet e reidratar o DNA. A solução foi misturada invertendo os tubos várias vezes. Por fim, as amostras foram incubadas a 65°C por uma hora no banho seco.

Após a extração do DNA, as amostras foram submetidas a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação das regiões de interesse do DNA. Foi amplificada a região β-tubulina, utilizando os primers Bt2a/Bt2b (Glass; Donaldson, 1995).

Todas as reações de PCR foram realizadas para um volume final de 12,5 µL, contendo:

6,25 µL de Dream Taq Master Mix, 0,5 µL de cada primers (forward e reverse), 4,25 µL de Water free nucleasse e 1 µL da amostra de DNA. As reações de PCR foram realizadas em termociclador Mastercycler® Nexus gradiente da empresa Eppendorf, sob as mesmas condições para ambos os primers: um ciclo de 95°C por 5 minutos (desnaturação inicial), seguido de 35 ciclos de 94°C por 45 segundos (desnaturação), 60 °C por 45 segundos (anelamento) e 72°C por 2 minutos (extensão), por fim, um ciclo de 10 minutos à 72°C (extensão final).

Após a amplificação, os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão 1-Tris- ácido acético EDTA (TAE) corados com sybr safe DNA gel stain e visualizados sob luz ultravioleta para confirmar as amplificações. Os produtos da PCR foram purificados com o Kit Exonuclease/Alkaline Phosphatase, de acordo com as instruções do fabricante e encaminhados para sequenciamento na plataforma de sequenciamento do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os primers utilizados no sequenciamento foram os mesmos utilizados na PCR. A montagem da fita consenso foi gerada utilizando o programa DNA Baser Assembler.

Após a amplificação e sequenciamento da região gênica β -tubulina, as sequências nucleotídicas obtidas de cada isolado foram comparadas com sequências ortólogas de outras espécies depositadas no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), utilizando o programa Blastn (Altschul et al., 1997). Esta comparação inicial entre as sequências visou identificar quais espécies são filogeneticamente relacionadas com os isolados em estudo e assim determinar qual seção taxonômica do gênero *Aspergillus* os isolados pertenciam.

Em seguida foram realizados os alinhamentos das sequências utilizando a ferramenta Clustal W (Thompson; Higgins, Gibson, 1994) e corrigidas manualmente através do programa MEGA 7 (Kumar et al., 2016).

As análises filogenéticas de Inferência Bayesiana foram realizadas no portal web CIPRES (Miller; Pfeiffer; Schwartz, 2010) utilizando MrBayes v 3.2 (Ronquist et al., 2012), baseado na cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) com 10.000.000 de gerações, usando os melhores modelos substituição de nucleotídeos selecionados de acordo com o Akaike Information Criterion (AIC) no software MrModeltest v.2.3 (Posada; Crandall, 1998). As árvores foram amostradas a cada 1000 gerações, descartando 25% de todas as árvores obtidas. Probabilidade posterior (Rannala; Yang, 1996) foram determinadas a partir da árvore de maior consenso entre as árvores remanescentes. As árvores geradas foram visualizadas no programa FigTree (Rambaut, 2018).

Resultados

Nas amostras oriundas de grãos de feijão-caupi comercializados em seis estados da região Nordeste através de testes de sanidade de sementes, constatou-se a presença de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Macrophomina* (Figura 1). Pode-se observar que o gênero *Aspergillus* foi o mais frequente associado aos grãos comercializados em todos os Estados com frequências que variaram de 69% a 82%. Nas amostras analisadas também foi possível detectar a presença dos gêneros *Penicillium* e *Fusarium* com frequências variando de 25% a 10% para *Penicillium* e de 2% a 6% respectivamente. A frequência do gênero *Macrophomina* variou de 2% a 4% mostrando uma baixa frequência desse gênero associado aos grãos. No entanto, vale destacar a importância desse gênero para a cultura, sendo responsável pela ocorrência de uma doença conhecida como podridão cinzenta do caule do feijão-caupi, doença bastante importante para a cultura.

Baseados em índices ecológicos foi calculado a diversidade de fungos associados aos grãos de feijão-caupi. O valor elevado do índice de Simpson (0,5244) e os valores baixos do índice de Shannon (0,9154) e de equibilidade (0,3213) resultaram na alta frequência do gênero *Aspergillus* nas amostras, revelando a existência de gênero dominante. Com base nos resultados o gênero *Aspergillus* obteve um índice H' (0.9154) demonstrando uma maior riqueza específica na população amostrada, em comparação a *Penicillium* (H' : 0.4685), *Macrophomina* (H' : 0.3042) e *Fusarium* (H' : 0.3511) como demonstrado na Tabela 1.

Foram obtidos um total de 208 isolados com características morfo culturais pertencentes ao gênero *Aspergillus*. Os isolados foram preservados em ADE de acordo com a metodologia de Castalani (1939). Buscando uma amostra representativa da população em estudo, foram selecionados 47 isolados (Tabela 2) de acordo com diferenças encontradas em suas características morfo culturais para a identificação molecular utilizando sequências de DNA. Após amplificados por PCR, os segmentos de DNA extraídos geraram produtos de 490 pb para a região β -tubulina.

Inicialmente foi realizado o alinhamento das sequências da região β -tubulina dos 47 isolados obtidos neste trabalho, com representantes de espécies de *Aspergillus* das 27 seções existente para inferência bayesiana e identificação de qual seção os isolados do presente estudo pertencem. Os isolados do presente estudo se agruparam em duas Seções: *Flavi* (n=29) e *Nigri* (n=18) (Tabela 3).

A inferência Bayesiana usando parte da região gênica β -tubulina de isolados obtidos

neste trabalho mais sequências de isolados-tipos representativos das espécies da seção *Flavi* gerou uma árvore com topologia demonstrada na Figura 2. Os isolados LPPC 113, LPPC 114, LPPC 106, LPPC 109, LPPC 107 e LPPC 170 agruparam-se com o isolado-tipo da espécie *A. tamarii* (CBS 104.13) (PP: 100). Os isolados LPPC 119, LPPC 117, LPPC 116, LPPC 115, LPPC 111, LPPC 128, LPPC 136, LPPC 134, LPPC 130, LPPC 143, LPPC 142, LPPC 141, LPPC 140, LPPC 139, LPPC 138, LPPC 153, LPPC 152, LPPC 151, LPPC 163, LPPC 162, LPPC 161, LPPC 160 e LPPC 159 agruparam-se com representantes de *A. flavus* e *A. oryzae* (PP: 57). O baixo valor de probabilidade posterior (0.57) não proporciona a delimitação exata de espécies dos isolados do presente estudo. O melhor modelo de substituição de nucleotídeos escolhido para esta análise foi o GTR+I+G.

Os isolados LPPC 103, LPPC 100, LPPC 99, LPPC 123, LPPC 122, LPPC 123, LPPC 60, LPPC 35, LPPC 125, LPPC 137, LPPC 147, LPPC 156, LPPC 154, LPPC 169, LPPC 168, LPPC 166, LPPC 171 e LPPC 104 agruparam-se com os isolados-tipos de *A. niger* e *A. welwitschiae* (Bres.) (Figura 3) da seção *Flavi*. O valor de probabilidade posterior foi de 0.89. O melhor modelo de substituição de nucleotídeos escolhido para esta análise foi o HKY+I+G.

Dentre os 47 isolados que foram utilizados nas análises filogenéticas, seis foram provenientes do município de José de Freitas, sendo identificados como *A. tamarii* Kita. Dos municípios de Icó, Recife e Campina Grande foram obtidos 23 isolados que pertenciam a Seção *Flavi* e se agruparam com isolados- tipos de *A. flavus* (CBS 100927) e *A. oryzae* (CBS 102.07). Nos municípios de Códó, Campina Grande, Maceió e José de Freitas foram obtidos 23 isolados que se pertenciam a Seção *Nigri* e identificado no presente estudo como *A. niger sensu stricto* e agruparam com isolados-tipos de *A. niger* (CBS 554.65) e *A. welwitschiae* (CBS 139.54).

Discussão

O presente estudo mostrou que, assim como ocorre para outras culturas, o feijão-caupi pode ser contaminados por fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Macrophomina* conforme relatado em estudos anteriormente (Seenappa et al., 1983; Rodrigues, Menezes, 2002; Kritzinger et al., 2003). Estes fungos, ao contaminarem o feijão-caupi na colheita, podem determinar perdas significativas durante o período de armazenamento, comprometendo a qualidade dos grãos, bem como a germinação e o vigor das sementes (Silva et al., 2013).

Muitos estudos relatam os fungos de armazenamento, com destaque para as espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* como agentes importantes no processo de deterioração dos grãos

(Bellettini et al., 2005; Henning, 2005; Borém et al., 2006; Parrella et al., 2012). A presença de isolados de *Aspergillus* em feijão-comum e feijão-caupi é a primeira indicação de uma potencial risco de contaminação por micotoxinas. Especialmente em grandes partes do Brasil, tanto o feijão-comum como o feijão-caupi constitui a alimentação básica da população, aumentando as chances da ingestão de micotoxinas que levam a problemas de saúde pública (Santos-Ciscon et al., 2019).

No presente estudo o gênero *Aspergillus* foi mais frequente nas amostras de grãos de feijão-caupi. Um estudo conduzido por Santos-Ciscon et al., (2019) com o objetivo de realizar a identificação molecular de isolados de *Aspergillus* associados a feijão-comum e feijão-caupi no Brasil identificou as seguintes espécies: *A. niger*, *A. luchuensis* Inui, *A. westerdijkiae*, *A. ostianus* Wehmer, *A. ochraceus* e *A. goesii*. No entanto, o estudo foi realizado com amostras de feijão-caupi oriundas apenas dos estados da Bahia e do Ceará.

A identificação de *Aspergillus* tem sido tradicionalmente baseada na caracterização morfológica e cultural (Samson et al., 2000), no entanto, tais caracteres não conseguem realizar uma delimitação de espécies acurada. Alguns isolados de *Aspergillus* do presente estudo agruparam com representantes do grupo de *A. niger sensu stricto*. O status taxonômico *A. niger* “agregado” tem evoluído continuamente, por exemplo, o táxon *Aspergillus niger sensu stricto* foi desmembrado em *A. welwitschiae* e *A. niger* (Perrone et al., 2011). *A. niger* e *A. welwitschiae* diferem em sua capacidade de produzir ocratoxina A (OTA) e fumonisina B2 (FB2) (Massi et al., 2016). Em estudos de identificação e descrição de novas espécies a quimiotaxonomia é bastante importante pois basea-se na produção de metabólitos secundários que tem grande importância na taxonomia de *Aspergillus* (Larsen et al., 2005; Frisvad et al., 2008).

Alguns isolados agruparam com isolados-tipos de *A. flavus* e *A. oryzae* (Ahlb.) Cohn, na seção *Flavi*, no entanto, somente com a região β -tubulina não foi possível a delimitação da espécies dos isolados pelo baixo valor de probabilidade posterior. *A. flavus* e *A. oryzae* tem demonstrado alto grau de parentesco pelo DNA e similar tamanho de genoma. Com base na complementariedade do DNA, foram considerados praticamente impossíveis de discriminar, já que a similaridade do DNA foi de 100% (Samson et al., 2000).

A espécie *A. tamarii* está associada a grãos de feijão-caupi sendo esse o primeiro relato no Brasil. *A. tamarii* é tradicionalmente utilizado na indústria de alimento oriental, principalmente na produção de molho tamari, um molho de soja japonês (Vargas et al., 2011; Park et al., 2017). Esse fungo também se destaca pela produção de xilanases, lipases e por conseguir degradar cafeína, molécula que costuma ser tóxica para alguns microrganismos

(Gutiérrez-Sánchez et al., 2004; Monclaro et al., 2019).

Espécies de *Penicillium* são altamente prejudiciais às sementes e grãos e associam-se a condições inadequadas de colheita e armazenamento, podendo causar perda do poder germinativo, descoloração e apodrecimento, aquecimento da massa de sementes e produção de micotoxinas (Carvalho; Nakagawa, 2012).

O gênero *Fusarium* inclui espécies que também podem estar associadas às sementes durante o período de armazenamento (Puzzi, 2000), e sendo responsáveis por vários danos às sementes e pela produção de micotoxinas em grãos (Mallman, Dilkin, 2007). No feijão caupi, a murcha-de-fusarium está entre as doenças de maior importância econômica e é causada pelo fungo *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (e. F. Smith) (Pio-Ribeiro; Assis Filho; Andrade, 2016; Athayde Sobrinho, 2016).

O gênero *Macrophomina* foi detectado em grãos de feijão-caupi no presente estudo. *M. phaseolina* (Tassi) Goid é o agente causal da doença conhecida como podridão cinzenta do caule do feijão-caupi. A doença pode ocorrer em todos os estádios de desenvolvimento do feijão-caupi. Os sintomas podem se manifestar durante todo o ciclo de desenvolvimento da cultura como podridão em plântulas e morte de tecidos em plantas adultas. Inicialmente, os sintomas surgem com lesões irregulares deprimidas e escuras na haste, com margens bem definidas. Posteriormente as lesões adquirem coloração cinza, e podem causar murcha e morte de ramos e em casos mais severos ocorre a morte de toda a planta (Athayde Sobrinho, 2016).

Com relação a estudos sobre a utilização de índices ecológicos para determinar a diversidade de fungos em grãos de feijão-caupi até o presente momento não foi encontrado. Esses índices ecológicos visa determinar a diversidade, riqueza e abundância de espécies de organismos e microrganismos em um ecossistema e auxilia no monitoramento. São usados em diversas áreas do conhecimentos para diversos fins. Estudos vem sendo conduzidos com a finalidade de avaliar a biodiversidade de fungos existente em diferentes agroecossistemas (Costa, Gusmão, 2017; Fiuza et al., 2019; Lacerda; Gusmão, Rodrigues., 2019; Dutra-Silva et al., 2021; Silva; Costa, Gusmão., 2021).

Para a identificação de espécies do gênero *Aspergillus* faz-se necessário a utilização do gene *BenA*, que codifica a β -tubulina, uma das subunidades que compõem os microtúbulos, estrutura que faz parte do citoesqueleto dos eucariotos. Assim como calmodulina, *BenA* também pode ser facilmente amplificado, entretanto, em algumas espécies da seção *Nigri* os *primers* utilizados para amplificar o gene *BenA* podem amplificar de modo inespecífico uma região de *tubC*, um parálogo do gene. O uso das sequências de *tubC* em análises filogenéticas de *Aspergillus* resulta em inferência incorretas sobre as relações evolutivas entre as espécies

incluídas nas análises (Hubka; Kolarik, 2012).

Filogenias moleculares que visam inferir relações evolutivas entre espécies devem ser realizadas apenas com sequências nucleotídicas ortólogas. Devido a essa limitação, os parálogos de β -tubulina são frequentemente misturados em análises filogenéticas, gerando clados inconsistentes na taxonomia do gênero *Aspergillus* (Souza et al., 2020).

Conclusão

Conclui-se com o presente trabalho que os gêneros fúngicos *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Macrophomina* estão associados aos grãos de feijão-caupi comercializados na Região Nordeste do Brasil. Existe uma baixa diversidade de fungos associados aos grãos de feijão-caupi, sendo o gênero *Aspergillus* o que possui a maior riqueza e diversidade. A espécie *Aspergillus tamarii* está associada a grãos de feijão-caupi constituindo esse o primeiro relato no Brasil. Não foi possível realizar a identificação molecular acurada de alguns isolados da seção *Flavi* por necessitar de mais regiões gênicas informativas para a seção.

Agradecimentos O primeiro autor agradece a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasil) pela bolsa de doutorado.

Conformidade com os padrões éticos Todos os princípios de conduta ética e profissional foram seguidos durante esta pesquisa e elaboração deste manuscrito.

Conflito de interesses Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Pesquisa envolvendo participantes humanos e/ou animais Não aplicável.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHÄFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25, (17), 3389-3402.

AKIBODE, S., MAREDIA, M. (2011). *Global and regional trends in production, trade and consumption of food legume crops*. Michigan, 1–83.

ASHIQ, S. et al. Natural occurrence of mycotoxins in medicinal plants: a review. (2014)

Fungal Genet Biology, 66, 1-10,

BAPTISTA, A., PINHO, O., PINTO, E., CASAL, S., MOTA, C., FERREIRA, I. M. P. L. V. O. (2017). Characterization of protein and fat composition of seeds from common beans (*Phaseolus vulgaris* L.), cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and bambara groundnuts (*Vigna subterranea* L. Verdc) from Mozambique. *Food Measure*, 11, 442–450.

BENNET, J. W. *An overview of the genus Aspergillus*. New York: CRC Press, 2010. 576 p. Disponível em: <<http://www.open-access-biology.com/aspergillus/aspergillus1.pdf>>. Acesso em: 03 de fevereiro de 2023.

BORÉM, F. M., RESENDE, O., MACHADO, J. C., FONTENELLE, I. M. R., SOUSA, F. F. (2006). Controle de fungos presentes no ar e em sementes de feijão durante armazenamento. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 10, (3), 651-659.

BOYE, J., ZARE, F., PLETCH, A. (2010). Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Research International*, 43, 414–431.

BRASIL. *Manual de análise sanitária de sementes* – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: MAPA-ACS, 2009, 200 p.

CARDOSO, M. J.; BASTOS, E. A.; ANDRADE JUNIOR., A. S.; ATHAYDE SOBRINHO, C. (2017). *Feijão-caupi: O produtor pergunta, a Embrapa responde*. Brasília: Embrapa, 250p.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. (2012). *Sementes: ciência, tecnologia e produção*. Jaboticabal: FUNEP, 590 p.

CONAB (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO). Acompanhamento da safra brasileira grãos: Safra 2021/2022 – 12º levantamento. Brasília: CONAB, 2022. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>.

COSTA, L. A., GUSMÃO, L. F. P. (2017). Communities of saprobic fungi on leaf litter of *Vismia guianensis* in remnants of the Brazilian Atlantic Forest. *Journal of Forestry Research*, 28, (1), 163–172.

DUTRA-SILVA, L., PEREIRA, G. E., BATISTA, L. R., MATTEOLI, F. P. (2021). Fungal diversity and occurrence of mycotoxin producing fungi in tropical vineyards. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37, (112).

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION). *Faostat*. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>>. Acesso em: 28 de janeiro de 2023.

FIUZA, P. O., COSTA, L. A., MEDEIROS, A. O., GULIS, V., GUSMÃO, L. F. P. (2019). Diversity of freshwater hyphomycetes associated with leaf litter of *Calophyllum brasiliense* in streams of the semiarid region of Brazil. *Mycological Progress*, 18, 907-920.

- FRISVAD, J. C., ANDERSEN, B., THRANE, U. (2008). The use of secondary metabolite profiling in fungal taxonomy. *Medical Mycology*, 112, 231–240.
- FROTA, K. M. G., MORGANO, M. A., SILVA, M. G., ARAÚJO, M. A. M., MOREIRA-ARAÚJO, R. S. R. (2008). Utilização da farinha de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) na elaboração de produtos de panificação. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30, (1), 2008.
- GLASS, N. L., DONALDSON, G.C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology Journal*, 61, (4), 1323-1330.
- GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, G., ROUSSOS, S., AUGUR, C. (2004). Effect of the nitrogen source on caffeine degradation by *Aspergillus tamarii*. *Letters in Applied Microbiology*, 38, (1), p. 50–55.
- HAMMER, Ø., HARPER, D. A. T., RYAN, P. D. (2001). PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4, (1), 1-9.
- HENNING, A. A. (2005). *Patologia e tratamento de sementes: noções gerais*. Londrina: Embrapa Soja, 52 p. (Documentos, 264).
- HUBKA, V., KOLARIK, M. (2012). β -tubulin paralogue *tubC* is frequently misidentified as the *benA* gene in *Aspergillus* section *Nigri* taxonomy: primer specificity testing and taxonomic consequences. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 29, 1-10.
- HUISSEIN, H. S., BRASEL, J. M. (2001). Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167, 101-134.
- JARVIS, B. B., MILLER, J. D. (2005). Mycotoxins as harmful indoor air contaminants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66, (4), 367-372.
- KATSANDE, S., BALOYI, J. J., NHERERA-CHOKUDA, F. V., NGONGONI, N. T., MATOPE, G., ZVINOROVA, P. I., GUSHA, J. (2016). Apparent digestibility and microbial protein yield of *Desmodium uncinatum*, *Mucuna pruriens* and *Vigna unguiculata* forage legumes in goat. *African Journal of Range & Forage Science*, 33, (1), 53-58.
- KUMAR S., STECHER G., TAMURA, K. (2016). MEGA 7: molecular evolutionary genetics analysis 508 version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33, 1870-1874.
- KUMAR, P., MAHATO, D. K., KAMLE, M., MOHANTA, T. K., KANG, S.G. (2017). Aflatoxins: a global concern for food safety, human health and their management. *Frontiers in Microbiology*, 7, 21-70.
- LACERDA, L. T., GUSMÃO, L. F. P., RODRIGUES, A. (2019). Fungal communities in different aged leaves of *Eucalyptus microcorys* F. Muell. *Brazilian Journal of Botany*, 42, 499-508.

- LARSEN, T. O., SMEDSGAARD, J., NIELSEN, K. F., HANSEN, M. E., SAMSON, R. A., FRISVAD, J. C. (2007). Production of mycotoxins by *Aspergillus lentulus* and other medically important and closely related species in section *Fumigati*. *Medical Mycology*, 45, 225–232.
- LUTZ, E., CORADI, P. C. (2022). Applications of new technologies for monitoring and predicting grains quality stored: Sensors, Internet of Things, and Artificial Intelligence. *Measurement*, 188, 110609.
- MARTINS, M. P. S. C., LOPES, A. F. S., JEAN, A., DAMASCENO-SILVA, K. J., MARTINS, M. C. C. E., ROCHA, M. M. (2023). Characterization of cowpea cultivars for grain size, color, and biofortification. *Revista Caatinga*, 36, 207-214.
- MASSIA, F. P., SARTORI, D., FERRANTI, L. S., IAMANAKA, B. T., TANIWAKI, M. H., VIEIRA, M. L. C., FUNGARO, M. H. P. (2016). Prospecting for the incidence of genes involved in ochratoxin and fumonisin biosynthesis in Brazilian strains of *Aspergillus niger* and *Aspergillus welwitschiae*. *International Journal of Food Microbiology*, 221, 19–28.
- MILLER, M. A., PFEIFFER, W., SCHWARTZ, T. (2010). Creating the CIPRES science gateway for 540 inferences of large phylogenetic trees. *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, 1-8.
- MONCLARO, A. V., RECALDE, G. L., SILVA, F. G., FREITAS, S. M., FERREIRA FILHO, E. X. (2019). Xylanase from *Aspergillus tamarii* shows different kinetic parameters and substrate specificity in the presence of ferulic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, 120, 16–22.
- PARRELLA, N. N. L. D. et al. (2012). *Qualidade fitossanitária de sementes*. Belo Horizonte: EPAMIG, 2012. 6 p. (Circular Técnica, 156).
- PARK, H. S., JUN, S. C., HAN, K. H., HONG, S. B., YU, J. H. (2017). Diversity, Application, and Synthetic Biology of Industrially Important *Aspergillus* Fungi. *Advances in Applied Microbiology*, 100, 161–202.
- PEREIRA, V. L. et al. (2014). Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 36, 96–136.
- PERRONE, G., STEA, G., EPIFANI, F., VARGA, J., FRISVAD, J. C., SAMSON, R.A. (2011). *Aspergillus niger* contains the cryptic phylogenetic species *A. awamori*. *Fungal Biology*, 115, 1138–1150.
- PITT, J. I. et al. (2000). Mycotoxins and toxigenic fungi. *Medical Mycology*, 38, 41-46.

- RAMBAUT, A. *FigTree 1.4.4*. 2018. Disponível em: <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>>. Acesso em 20 de janeiro de 2023.
- RANNALLA, B., YANG, Z. (1996). Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *Journal of Molecular Evolution*, 43, 304 -311.
- ROCHA, M. E. B. et al. (2014). Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control*, 36, 159-165.
- RONQUIST, F., TESLENKO, M., VAN DER MARK, P., AYRES, D.L., ARLING, A., HÖHNA, S., LARGET, B., LIU, L., SUCHARD, M.A., HUELSENBECK, J. P. (2012). MrBayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61, (3), 539–542.
- SAMSON, R. A. et al. (2000). Identification of the common food and airborne fungi, *Aspergillus*. In: SAMSON, R. A. et al. *Introduction to food and airborne fungi*. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmekultures, 64-97.
- SAMSON, R. A. et al. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 78, 141-173.
- SEENAPPA, M., KESWANI, C.L., KUNDYA, T. M. (1983). *Aspergillus* infection and aflatoxin production in some cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) lines in Tanzania. *Mycopathologia*, 83, 103–106.
- SILVA, K.J.D., ROCHA, M.M., MENEZES JÚNIOR, J. A. N. (2016). Capítulo 3. Socioeconomia. 2016. In: BASTOS, E.A. (Ed). *A cultura do feijão-caupi no Brasil*. Teresina: Embrapa Meio Norte, 44-67.
- SILVA, S.S., COSTA, L. A., GUSMÃO, L. F. P. (2021). Diversity of saprotrophic filamentous fungi on *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (Brazilian pine). *Brazilian Journal of Microbiology*, 52, (3), 1489-1501.
- TANIWAKI, M. H. et al. (2003). The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. *International Journal of Food Microbiology*, 82, (2), 173-179.
- TERZI, V. et al. (2014). Reducing the incidence of cereal head infection and mycotoxins in small grain cereal species. *Journal of Cereal Science*, 59, 284-293.
- VARGA, J., FRISVAD, J. C., SAMSON, R. A. (2011). Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. *Studies in Mycology*, 69, 57–80.
- VISOTTO, L. E. et al. (2008). Isolamento de fungos toxigênicos em grãos de café (*Coffea arabica* L.) e avaliação da produção *in vitro* de ocratoxina A. *Revista Brasileira de Armazenamento, Especial Café*, 10, 49-57.

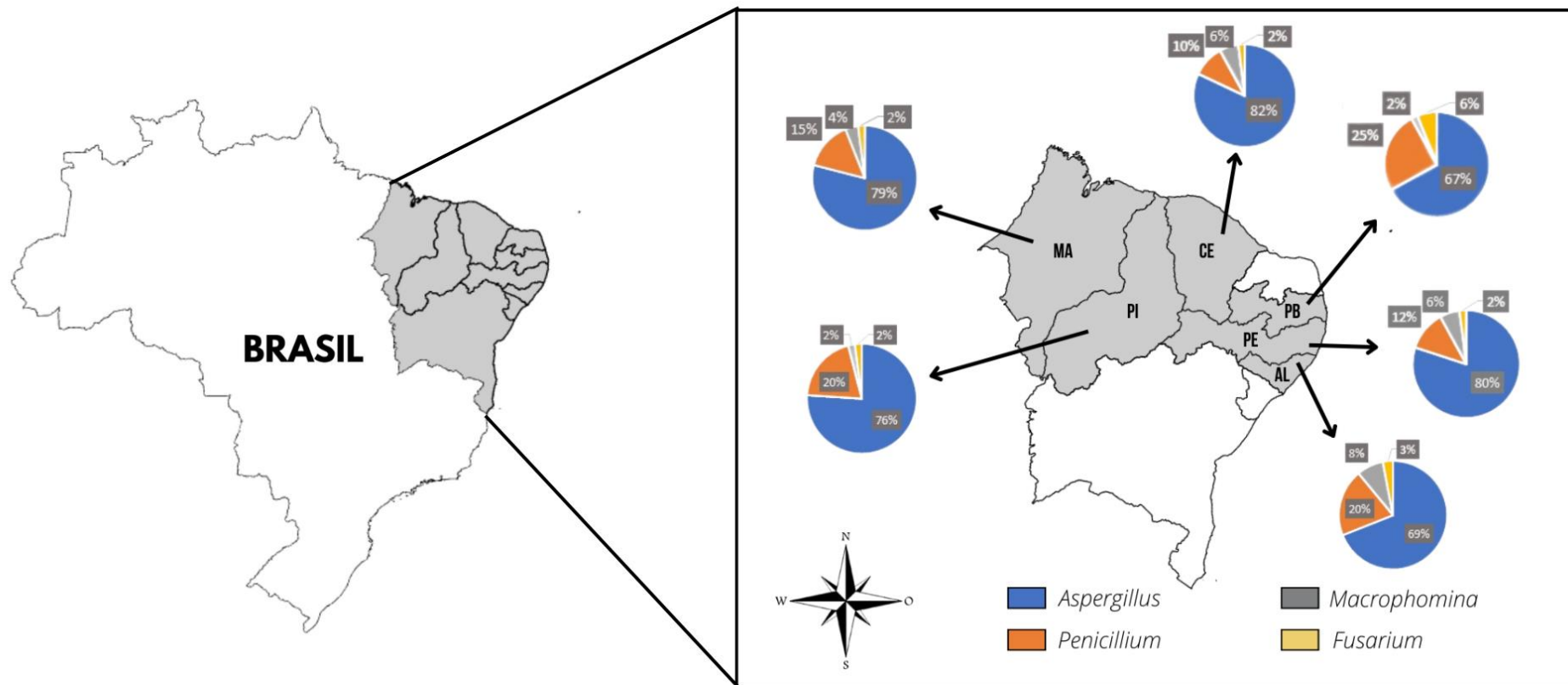


Figura 1. Frequência de fungos associados aos grãos de feijão-caupi comercializados na região Nordeste do Brasil.

Tabela 1. Diversidade de fungos associados a feijão-caupi no Nordeste do Brasil expresso por três índices relacionados à riqueza - Shannon Weaver (H'), dominância - Simpson (λ) e equibilidade - Pielou (J).

Fungos	Shannon- Weaver (H')	Simpson (λ)	Pielou (J)
<i>Aspergillus</i> spp.	0.9154	0.5244	0.3213
<i>Penicillium</i> spp.	0.4685	0.2031	0.1762
<i>Macrophomina</i> spp.	0.3042	0.1385	0.1502
<i>Fusarium</i> spp.	0.3511	0.1143	0.1320
Média	0,5098	0,2450	0,3253

Tabela 2. Isolados selecionados de *Aspergillus* obtidos de grãos de feijão-caupi comercializados na região Nordeste do Brasil.

Código do isolado	Cidade	Estado ^a	Espécies/Seção
LPPC 113	José de Freitas	PI	<i>Aspergillus tamarii</i>
LPPC 114	José de Freitas	PI	<i>Aspergillus tamarii</i>
LPPC 104	José de Freitas	PI	<i>Aspergillus niger sensu stricto</i> **
LPPC 106	José de Freitas	PI	<i>Aspergillus tamarii</i>
LPPC 109	José de Freitas	PI	<i>Aspergillus tamarii</i>
LPPC 107	José de Freitas	PI	<i>Aspergillus tamarii</i>
LPPC 170	José de Freitas	PI	<i>Aspergillus tamarii</i>
LPPC 119	José de Freitas	PI	<i>Flavi</i> *
LPPC 117	Icó	CE	<i>Flavi</i> *
LPPC 116	Icó	CE	<i>Flavi</i> *
LPPC 115	Icó	CE	<i>Flavi</i> *
LPPC 111	Icó	CE	<i>Flavi</i> *
LPPC 128	Icó	CE	<i>Flavi</i> *
LPPC 136	Icó	CE	<i>Flavi</i> *
LPPC 134	Icó	CE	<i>Flavi</i> *
LPPC 130	Recife	PE	<i>Flavi</i> *

LPPC 143	Recife	PE	<i>Flavi*</i>
LPPC 142	Recife	PE	<i>Flavi*</i>
LPPC 141	Recife	PE	<i>Flavi*</i>
LPPC 140	Recife	PE	<i>Flavi*</i>
LPPC 139	Recife	PE	<i>Flavi*</i>
LPPC 138	Campina Grande	PB	<i>Flavi*</i>
LPPC 153	Campina Grande	PB	<i>Flavi*</i>
LPPC 152	Icó	CE	<i>Flavi*</i>
LPPC 151	Icó	CE	<i>Flavi*</i>
LPPC 163	Icó	CE	<i>Flavi*</i>
LPPC 162	Icó	CE	<i>Flavi*</i>
LPPC 161	Recife	PE	<i>Flavi*</i>
LPPC 160	Recife	PE	<i>Flavi*</i>
LPPC 159	Recife	PE	<i>Flavi*</i>
LPPC 103	Codó	MA	<i>Aspergillus niger sensu stricto**</i>
LPPC 100	Codó	MA	<i>Aspergillus niger sensu stricto**</i>
LPPC 99	Codó	MA	<i>Aspergillus niger sensu stricto**</i>
LPPC 123	Codó	MA	<i>Aspergillus niger sensu stricto**</i>
LPPC 122	Codó	MA	<i>Aspergillus niger sensu stricto**</i>
LPPC 60	Codó	MA	<i>Aspergillus niger sensu stricto**</i>
LPPC 35	Campina Grande	PB	<i>Aspergillus niger sensu stricto**</i>
LPPC 125	Campina Grande	PB	<i>Aspergillus niger sensu stricto**</i>
LPPC 137	Campina Grande	PB	<i>Aspergillus niger sensu stricto**</i>
LPPC 147	Campina Grande	PB	<i>Aspergillus niger sensu stricto**</i>
LPPC 156	Campina Grande	PB	<i>Aspergillus niger sensu stricto**</i>
LPPC 154	Maceió	AL	<i>Aspergillus niger sensu stricto**</i>
LPPC 169	Maceió	AL	<i>Aspergillus niger sensu stricto**</i>
LPPC 168	Maceió	AL	<i>Aspergillus niger sensu stricto**</i>
LPPC 166	Maceió	AL	<i>Aspergillus niger sensu stricto**</i>
LPPC 171	Maceió	AL	<i>Aspergillus niger sensu stricto**</i>

^a AL = Alagoas, CE = Ceará, MA = Maranhão, PE = Pernambuco, PI = Piauí, PB = Paraíba

* Os isolados do presente estudo agruparam com isolados-tipos de *A. flavus* (CBS 100927) e *A. oryzae* (CBS 102.07).

** Os isolados do presente estudo agruparam com isolados-tipos de *A. niger* (CBS 554.65) e *A. welwitschiae* (CBS 139.54).

Tabela 3. Relação dos isolados e número de acesso no GenBank das sequências utilizadas como referência neste estudo.

Seção	Espécie	Código do isolado	BenA
<i>Flavi</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	CBS 100927 T strain 17-4	EF661485 AF036804
	<i>Aspergillus lanosus</i>	CBS 650.74 T NRRL 3648	MG517633 EF661468
	<i>Aspergillus leporis</i>	CBS 151.66 T NRRL 6599	MG517662 EF661500
	<i>Aspergillus luteovirescens</i>	CBS 620.95 T	MG517625
	<i>Aspergillus minisclerotigenes</i>	CBS 117635 T strain J117c	EF203148 MG957169
	<i>Aspergillus mottae</i>	CBS 130016 T DTO 223-C8	MG517687 MG517688
	<i>Aspergillus neoalliaceus</i>	CBS 143681 T DTO 326-E7	MG517763 MG517772
	<i>Aspergillus nomius</i>	CBS 260.88 T PW2959	EF661494 KF562213
	<i>Aspergillus novoparasiticus</i>	CBS 126849 T	MG517684
	<i>Aspergillus oryzae</i>	CBS 102.07 T NRRL 469	EF661483 AF036805
	<i>Aspergillus parasiticus</i>	CBS 100926 T CA3-01	EF661481 AF036807
	<i>Aspergillus pipericola</i>	CBS 143680 T	MG517717
	<i>Aspergillus pseudocaelatus</i>	CBS 117616 T PW4287	MG517626 LC516876
	<i>Aspergillus pseudonomius</i>	CBS 119388 T NRRL 3353	EF661495 AY017577
	<i>Aspergillus pseudotamarii</i>	CBS 766.97 T NRRL 443	EF661477 AF255066
	<i>Aspergillus sergii</i>	CBS 130017 T	MG517688
	<i>Aspergillus sojae</i>	CBS 100928 T	EF203168
	<i>Aspergillus subflavus</i>	CBS 143683 T S843b	MG517773 MG517792
	<i>Aspergillus tamarii</i>	CBS 104.13 T	EF661474

Nigri	<i>Aspergillus togoensis</i>	CBS 272.89 T	FJ491477
	<i>Aspergillus trans-</i>	CBS 130015 T	HM803101
	<i>montanensis</i>	CMV 011A5	MK451183
	<i>Aspergillus</i>	CBS 612.78 T	EF661469
	<i>vandermerwei</i>	IBT 29491	MG517789
	<i>Aspergillus</i>	DTO 228-G2 T	MG517706
	<i>aflatoxiformans</i>	DTO438-B6	MZ027917
	<i>Aspergillus alliaceus</i>	CBS 536.65 T	EF661465
		CCF 135	HE608869
	<i>Aspergillus</i>	CBS 117610 T	EF203158
	<i>arachidicola</i>	DTO 010-H5	MG517627
	<i>Aspergillus aspearensis</i>	CBS 143672 T	MG517669
	<i>Aspergillus austwickii</i>	CBS 143677 T	MG517702
		DTO 228-G8	MG517712
	<i>Aspergillus avenaceus</i>	CBS 109.46 T	FJ491481
		NRRL 4517	EF661502
	<i>Aspergillus</i>	CBS 143687 T	MG517689
	<i>bertholletius</i>	CCT 7615	KY924666
	<i>Aspergillus caelatus</i>	CBS 763.97 T	MG517640
	<i>Aspergillus cerealis</i>	CBS 143674 T	MG517693
		NRRL 66710	MK119745
	<i>Aspergillus</i>	CBS 553.77 T	FJ491482
	<i>coremiiformis</i>	NRRL 13756	EU014105
	<i>Aspergillus krugeri</i>	CMV006G4 T	MK451098
		CMV002C8	MK450928
	<i>Aspergillus japonicus</i>	CBS 114.51 T	AY585544
		WYH 2	MW364863
	<i>Aspergillus uvarum</i>	CBS 121591 T	AM745753
		ITEM 5325	KF476655
	<i>Aspergillus aculeatus</i>	CBS 172.66 T	LT907918
		F-719	HE577810
	<i>Aspergillus</i>	NRRL 62479 T	JN121448
	<i>trinidadensis</i>		
	<i>Aspergillus floridensis</i>	NRRL 62478 T	HE818087

<i>Aspergillus</i>	CBS 621.78 T	HE818087
<i>brunneoviolaceus</i>	IHEM 17066	HE818086
<i>Aspergillus</i>	CBS 127449 T	HM853553
<i>saccharolyticus</i>		
<i>Aspergillus</i>	CBS 101889 T	AY820016
<i>homomorphus</i>		
<i>Aspergillus labruscus</i>	IBT 33586 T	KT986019
	ITAL 28.294	KT986018
<i>Aspergillus ellipticus</i>	CBS 482.65 T	AY585530
	IHEM 5805	MH614571
<i>Aspergillus</i>	CBS 117.55 T	AY585529
<i>heteromorphus</i>	CCMFBH-999	MT41018
<i>Aspergillus</i>	CBS 121057 T	EU159233
<i>sclerotiiicarbonarius</i>	CBS 121056	EU159232
	LC12167 T	MK289601
<i>Aspergillus sclerotioniger</i>	CBS 115572 T	EU159233
<i>Aspergillus</i>	CBS 111.26 T	LT907919
<i>carbonarius</i>		
	CCF 3388	HE577803
<i>Aspergillus ibericus</i>	NRRL 35644 T	AM419748
	IHEM 23498	MH614574
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	CBS 101740 T	AY820006
	CBS 122724	EU600387
<i>Aspergillus niger</i>	CBS 554.65 T	KU897009
	G1401	OP646314
<i>Aspergillus</i>	CBS 101883 T	FJ629287
<i>lacticoffeatus</i>		
<i>Aspergillus</i>	CBS 139.54 T	MT120310
<i>welwitschiae</i>	DTO 438-C4	MZ027924
<i>Aspergillus piperis</i>	CBS 112811 T	KJ469441
	CCF 661	HE577807
<i>Aspergillus luchuensis</i>	CBS 205.80 T	MN510418
<i>Aspergillus tubingensis</i>	NRRL 4875 T	OL771245
	CCF 2818	HE577808

<i>Aspergillus luchuensis</i>	CBS 205.80 T	MN510418
<i>Aspergillus tubingensis</i>	NRRL 4875 T	OL771245
	CCF 2818	HE577808
<i>Aspergillus vadensis</i>	CBS 113365 T	MT261357
<i>Aspergillus</i> <i>costaricaensis</i>	CBS 115574 T	FJ629277
<i>Aspergillus eucalypticola</i>	CBS 122712 T	EU482435
<i>Aspergillus vinaceus</i>	ITAL 47.456 T	MN583579

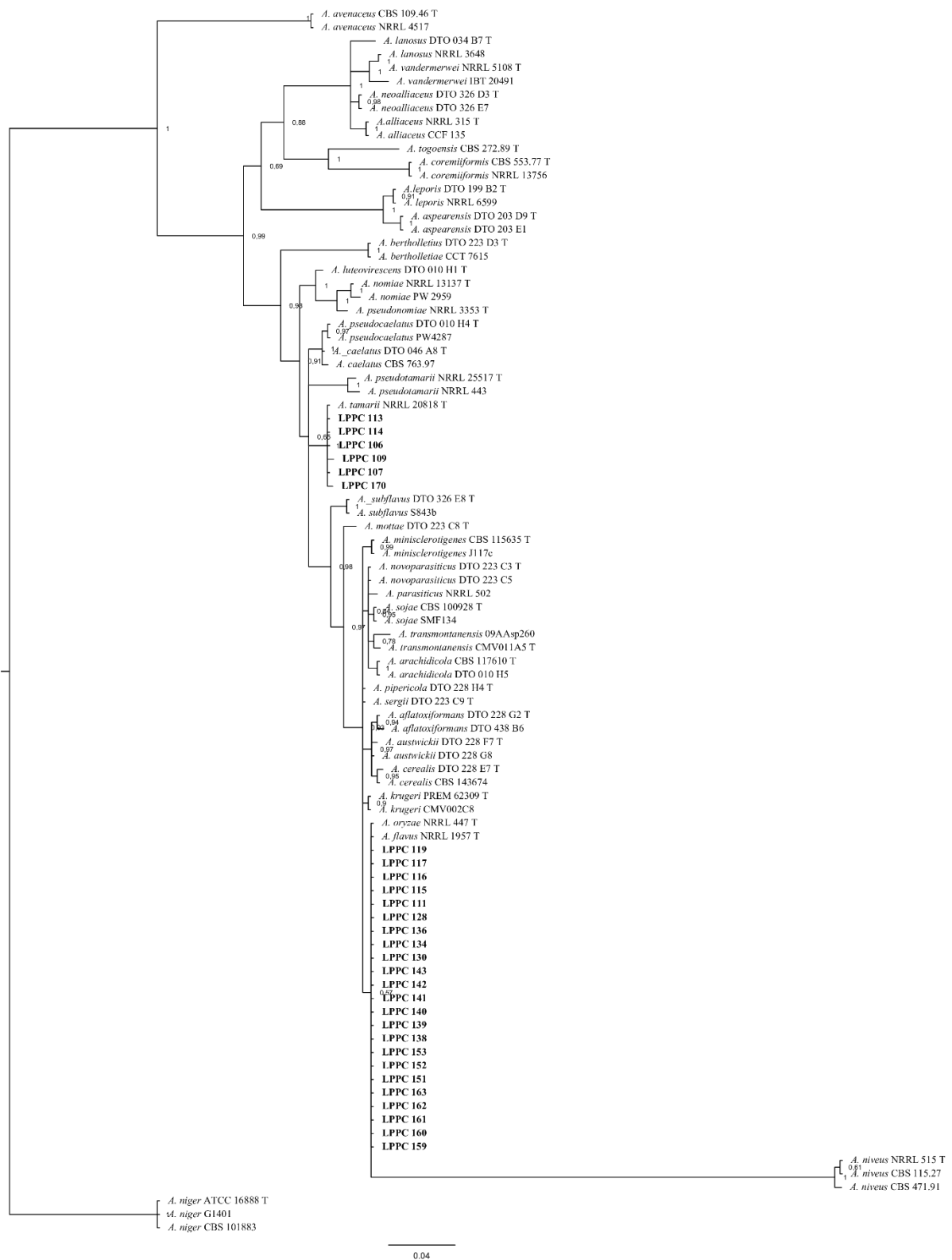


Figura 3. Árvore filogenética gerada por Inferência Bayesiana baseada nas sequências dos dados de β -tubulina com representantes da seção *Flavi*. Os valores de probabilidade posterior encontram-se nos nós. Os isolados utilizados neste trabalho estão destacados em negrito. T: isolado-tipo. *Aspergillus niger* (ATCC 16888) foi utilizado como *outgroup*.

Capítulo III

**Uso de eugenol, extrato de própolis, óleo essencial de citronela e
óleo essencial de capim-limão no manejo de espécies de *Aspergillus*
associadas a feijão-caupi no Nordeste do Brasil**

A ser submetido para **International Journal of Food Microbiology**

Uso de eugenol, extrato de própolis, óleo essencial de citronela e de capim-limão no manejo de espécies de *Aspergillus* associadas a feijão-caupi no Nordeste do Brasil

E. R. Paz Filho^a, A. A. M. Gomes^{a*}

^a Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil.

RESUMO - Tendo em vista a importância dos óleos essenciais no controle de fungos associados aos grãos, objetivou-se, com este trabalho, avaliar o efeito *in vitro* e *in vivo* de diferentes concentrações de eugenol, extrato de própolis, óleo essencial de citronela e óleo essencial de capim-limão sobre isolados de *Aspergillus* associados a grãos de feijão-caupi. Foram utilizados, no presente estudo, quatro isolados de *Aspergillus* sendo: LPPC 104 e LPPC 122 (*Aspergillus niger sensu stricto*), LPPC 113 (*Aspergillus tamarii*) e LPPC 130 (*Aspergillus* sp.). No ensaio *in vitro* foram testadas as concentrações de 0,0 (testemunha), 15,62, 31,25, 62,50, 125 µL/L para o eugenol e 0, 25, 50, 75, e 125 µL/L para extrato de própolis, OE de citronela e OE de capim-limão. Foram preparadas suspensões de conídios na concentração de 10⁵ conídios/mL para cada isolado de *Aspergillus*. Uma alíquota de 0,2 mL desta suspensão foi depositada em placas de Petri contendo o meio de cultura BDA + eugenol, extrato de própolis, OE de citronela ou OE de capim-limão. Foi mensurado a quantidade de unidades formadoras de colônias a cada 24 h. O controle correspondeu a deposição de suspensão fúngica em meio BDA sem a presença dos compostos utilizados. Para o ensaio de germinação dos conídios de *Aspergillus*, tubos de ensaio contendo água destilada esterilizada (ADE) foi adicionada uma suspensão de conídios 10⁵ conídios/mL e o composto, nas mesmas concentrações supracitadas, acrescentando Tween 80 a 1%. As avaliações foram realizadas determinando-se a porcentagem de germinação de 100 conídios por amostra, 24 horas após o início da incubação. No teste *in vivo* 200 grãos de feijão-caupi proveniente do estado Ceará foram imersos em soluções de eugenol, extrato de própolis, OE de citronela, OE de capim-limão e a testemunha (água) e em seguida realizado um teste de sanidade de sementes no qual com oito dias incubação avaliou-se a frequência de fungos associados aos grãos. Os resultados indicam que todos os compostos testados tem atividade fungitóxica para isolados de *Aspergillus* e pode ser uma alternativa para o tratamentos de fungos associados ao feijão-caupi. No teste *in vivo* (grãos) todos os tratamentos testados diminuíram a frequência de fungos associados aos grãos de feijão-caupi.

Palavras-chaves: *Aspergillus tamarii*; *Syzygium aromaticum*; *Vigna unguiculata*; micotoxinas.

*Autor correspondente: Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil. e-mail: andreangelomg@gmail.com (A. A. M. Gomes)

Use of eugenol, propolis extract, citronella and lemongrass essential oils in the management of *Aspergillus* species associated with cowpea in Northeastern Brazil

ABSTRACT - Bearing in mind the importance of essential oils in the control of fungi associated with grains, the objective of this work was to evaluate the *in vitro* and *in vivo* effect of different concentrations of eugenol, propolis extract, citronella essential oil and lemongrass essential oil lemongrass on *Aspergillus* isolates associated with cowpea grains. Four *Aspergillus* isolates were used in the present study: LPPC 104 and LPPC 122 (*Aspergillus niger stricto sensu*), LPPC 113 (*Aspergillus tamarii*) and LPPC 130 (*Aspergillus* sp.). In the *in vitro* assay, samples were collected at concentrations of 0.0 (control), 15.62, 31.25, 62.50, 125 $\mu\text{L/L}$ for eugenol and 0, 25, 50, 75, and 125 $\mu\text{L/L}$ for propolis extract, citronella EO and lemongrass EO. Suspensions of conidia were prepared at a concentration of 10^5 conidia/mL for each *Aspergillus* isolate. An aliquot of 0.2 mL of this suspension was deposited in Petri dishes containing the culture medium PDA + eugenol, propolis extract, citronella EO or lemongrass EO. The amount of colony forming units was measured every 24 h. The control corresponded to the deposition of fungal suspension in PDA medium without the presence of the compounds used. For the *Aspergillus* conidia germination assay, test tubes containing sterilized distilled water (ADE) were added to a suspension of conidia 10^5 conidia/mL and the compound, at the same concentrations mentioned above, adding Tween 80 at 1%. Estimates were performed by determining the percentage of germination of 100 conidia per sample, 24 hours after the start of incubation. In the *in vivo* test, 200 cowpea grains from the state of Ceará were immersed in solutions of eugenol, propolis extract, citronella EO, lemongrass EO and the control (water) and then a seed health test was carried out in which, with eight days of incubation, the frequency of fungi associated with grains was evaluated. The results indicate that all tested compounds have fungitoxic activity for *Aspergillus* isolates and may be an alternative for the treatment of fungi associated with cowpea. In the *in vivo* test (grains) all tested treatments decreased the frequency of fungi associated with cowpea grains.

Keywords: *Aspergillus tamarii*; *Syzygium aromaticum*; *Vigna unguiculata*; mycotoxins.

1. Introdução

Os fungos são os principais contaminantes de alimento e vem causando consideradas perdas na indústria alimentícia e impactando a produção de alimentos no mundo. Os fungos podem causar aquecimento dos grãos, perda de massa, diminuição do valor nutricional (Fleurat-Lessard., 2017). Além disso, a ocorrência de fungos toxigênicos e micotoxinas em grãos é uma das preocupações sociais e econômicas mais importantes nos países produtores de cereias e *pulses*.

Além do dano geral dos grãos por fungos, algumas espécies são capazes de produzir micotoxinas. As micotoxinas são compostos tóxicos produzidas por certas espécies de fungos que crescem em grãos e alimentos quando armazenados em condições inseguras, principalmente, alto teor de umidade. As micotoxinas têm o potencial de causar sérias implicações para a saúde humana e animal e varias medidas de manejo vem sendo pesquisadas para evitar o risco de introduzir alimentos contaminados com micotoxinas nas cadeias de processamento de grãos e alimentos para animais (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2014; Fleurat-Lessard., 2017).

Vários métodos de controle são utilizados para o manejo de fungos toxigênicos e de micotoxinas em grãos e produtos derivados, dos quais os principais são os métodos físicos, biológicos e químicos (Bullerman & Bianchini, 2007; Magan & Aldred, 2007; Varga et al., 2010; Jard et al., 2011). Com relação aos métodos físicos os mais utilizados são a limpeza dos grãos, aquecimento com microondas e a ionização (Lesnik et al., 2014), para os principais meios químicos-biológicos são a ozonização e a utilização de microrganismos antagonicos como bactérias lácteas e o fungo do gênero *Trichoderma* (Karlovsy et al., 2011; 2014; Lopes, 2013). Um manejo alternativo que vem sendo amplamente pesquisado e mostrando eficiência é o uso de extratos de plantas ou óleos essenciais para o controle de fungos associados aos grãos.

Os óleos essenciais, constituintes voláteis orgânicos responsáveis pela fragrância de muitas plantas, são compostos que têm apresentado grande importância em determinadas pesquisas, por serem potencialmente úteis no controle fitossanitário, propiciando o desenvolvimento de técnicas que procuram diminuir os efeitos negativos de oxidantes, radicais e microrganismos que causam prejuízos nas indústrias alimentícias e na agricultura (Bakkali et al., 2008). Adicionalmente, estes compostos, são categorizados como GRAS (geralmente reconhecido como seguro) pela Food and Drug Administration (2023).

GRAS é a designação da Food and Drug Administration (FDA), no qual, um produto

químico ou substância adicionada ao alimento é considerado seguro por especialistas, e assim isento dos requisitos de tolerância de aditivos alimentares (Palou et al., 2016). Os principais aditivos alimentares citados são: carbonatos, sorbatos, benzoatos, hidrocolóides, óleos essenciais, extratos vegetais e microrganismos antagonistas (Palou et al., 2016).

Óleos essenciais vêm sendo objeto de estudos avaliando sua atividade biológica e antimicrobiana, incluído efeitos deletérios em fitopatógenos. Estudo realizado por Cakir et al. (2005) constataram efeito fungicida do óleo essencial de *Hypericum linarioides* Bosse em seis espécies do gênero *Fusarium* (*F. acuminatum*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum*, *F. sambucinum* e *F. solani*), importantes fungos causadores de doenças em plantas e que causam grandes prejuízos aos sistemas agrícolas.

A espécie *Cymbopogon citratus* produz um óleo essencial rico em citral, conhecido como óleo essencial (OE) de capim-limão e vem apresentando diversas atividades biológicas, tais como: inseticida (Lima et al., 2008), antimicrobiana (Santos et al., 2009), antibacteriano (Pereira et al., 2004), antifúngica (Guimarães et al., 2011) e nematicida (Moreira et al., 2009).

O eugenol é um óleo claro a amarelo pálido extraído como um componente principal (aproximadamente 85%) de brotos e folhas de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*). Esse composto tem demonstrado atividade fungistática sobre *A. niger*, *A. terreus*, *Penicillium expansum*, *P. glabrum* e *P. italicum* (Campaniello; Corbo, Sinigaglia, 2010).

A própolis é uma substância resinosa colhida pelas abelhas melíferas de diferentes exsudatos de plantas, tais como secreções de árvores, folhas e flores. Esta resina é utilizada pelas abelhas na proteção da colméia contra a proliferação de microrganismos, incluindo fungos e bactérias (Silva et al., 2006).

De uma maneira geral, a composição da própolis inclui 55% de resinas e bálsamos, 30% de cera, 10% de pólen e metabólitos secundários, incluindo flavonóides, ácidos fenólicos, além de minerais (Matsuno, 1995; Miyataka et al., 1997). A própolis tem sido relatada como inibidora do crescimento e desenvolvimento de fungo que causa a cercosporiose em café (*Cercospora coffeicola* Berk & Cooke (1881) (Pereira et al., 2013), bem como antracnose em feijoeiro causado por *Colletotrichum lindemuthianum* Briosi & Cavara, 1889 (Pereira et al., 2014), ferrugem e mancha foliar na videira (*Phakopsora euvitis* Ono (2000) e *Pseudocercospora vitis* Speg (1910) (Marini et al., 2012). Em um estudo conduzido por Lorini et al., (2018) avaliando a atividade antimicrobiana verificaram o efeito na germinação de *A. flavus* utilizando extrato de própolis.

Citronela é um óleo essencial extraído de *Cymbopogon nardus* e possui vários compostos, principalmente monoterpenos ($\pm 80\%$), que inclui principalmente citronelal,

citronelol e geraniol, embora também sejam encontrados sesquiterpenos (Beneti et al. 2011). Com relação a fungos toxigênicos, um estudo conduzido por Li et al., (2013) avaliou o efeito antifúngico de citronela sobre *A. niger* isolado ATCC 16404 e concluiu que citronela causou várias alterações nas hifas e conídios mostrando-se eficiente.

O trabalho teve como objetivo avaliar o efeito *in vitro* e *in vivo* de diferentes concentrações de eugenol, extrato de própolis, óleo essencial de citronela e óleo essencial de capim-limão sobre isolados de *Aspergillus* associados a grãos de feijão-caupi.

2. Material e Métodos

2.1. Isolados de *Aspergillus* utilizados

Foram utilizados, no presente estudo, quatros isolados de *Aspergillus* sendo: LPPC 104 e LPPC 122 (*Aspergillus niger sensu stricto*), LPPC 113(*Aspergillus tamarii*) e LPPC 130 (*Aspergillus* sp.) no qual, foram identificados previamente utilizando a região gênica β -tubulina.

2.2. Efeito de eugenol, extrato de própolis, óleo essencial de citronela e de capim-limão em *Aspergillus* spp.

Para avaliar o efeito de eugenol, extrato de própolis, óleo essencial (OE) de citronela e OE de capim-limão no crescimento de *Aspergillus* spp, foram preparadas suspensões de conídios na concentração de 10^5 conídios/mL para cada isolado de *Aspergillus*. Uma alíquota de 0,2 mL desta suspensão foi depositada em placas de Petri contendo o meio de cultura BDA + eugenol, extrato de própolis, OE de citronela ou OE de capim-limão. Com o auxílio de uma alça de Drigalski, a suspensão foi espalhada na superfície do meio e as placas foram incubadas à temperatura de $25^\circ \pm 2^\circ\text{C}$, com fotofase de 12 h claro/12 h escuro. Foram testadas as concentrações de 0,0 (testemunha), 15,62, 31,25, 62,50, 125 $\mu\text{L/L}$ para o eugenol (Souza et al., 2021) e 0, 25, 50, 75, e 125 $\mu\text{L/L}$ para extrato de própolis, citronela e OE de capim-limão (Barbosa et al., 2015). Foi mensurado a quantidade de unidade formadora de colônia a cada 24 h. O controle correspondeu a deposição de suspensão fúngica em meio BDA sem a adição dos compostos utilizados.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial $4 \times 4 + 1$ (4 isolados $\times$ 4 concentrações + testemunha), com 8 repetições para cada tratamento, sendo a repetição considerada uma placa de Petri. Os dados obtidos nesse estudo foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, em seguida, as análises de regressões para dados quantitativos.

Adicionalmente, avaliou-se o efeito das concentrações de eugenol, extrato de própolis, citronela e OE de capim-limão na germinação dos conídios de *Aspergillus*. Em tubo de ensaio contendo água destilada esterilizada (ADE) foi adicionado uma suspensão de conídios 10^5 conídios/mL e o composto, calibrando para as mesmas concentrações utilizadas no ensaio anterior, acrescentando Tween 80 a 1%. As avaliações foram realizadas determinando-se a porcentagem de germinação de 100 conídios por amostra, 24 horas após o início da incubação, contando-se o número de esporos germinados e não germinados em câmara de Newbauer (Silva & Bastos, 2007). Foram considerados como esporos germinados aqueles que apresentaram tubo germinativo como tamanho igual ou superior aos conídios.

2.3. Efeito de eugenol, extrato de própolis, óleo essencial de citronela e de capim-limão na sanidade de grãos de feijão-caupi

Foi avaliado o efeito de eugenol, extrato de própolis, óleo essencial (OE) de citronela e OE de capim-limão na sanidade de grãos de feijão-caupi. Grãos de feijão-caupi foram desinfestados em hipoclorito de sódio a 1% durante 3 minutos, e em seguida secos a temperatura ambiente. Posteriormente, esses grãos foram imersos em soluções de eugenol, extrato de propolis, OE de citronela e OE de capim-limão (nas mesmas concentrações do ensaio *in vitro*), mantidos sob agitação por 3 min, seguido por *overnight*. No dia seguinte, os grãos foram depositados em caixas do tipo gerbox, contendo três folhas de papel de filtro embebidas em ADE. As caixas gerbox contendo os grãos foram incubadas por sete dias à temperatura de 20 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas. Os grãos foram examinados individualmente, com o auxílio de estereomicroscópio e de microscópio ótico para a presença de estruturas fúngicas. Foram utilizados 200 grãos de feijão-caupi para cada tratamento.

Foi calculado a frequência dos fungos associados a grãos de feijão-caupi com as diferentes concentrações de eugenol, extratos de própolis, OE de citronela e OE de capim-limão. A testemunha foi constituída de grãos sem a adição dos compostos citados. Efetuaram-se análises de regressão, adotando-se como critérios para a escolha do modelo, o maior coeficiente de determinação ajustado e a significância dos coeficientes da regressão testados pelo teste F a 1% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas pelos programas Sisvar (Ferreira, 2011).

3. Resultados

3.1 Efeito de de eugenol, extrato de própolis, óleo essencial de citronela e de capim-limão em Aspergillus spp.

Ao avaliar os dados sobre o efeito *in vitro* de diferentes concentrações de eugenol, extrato de própolis, OE de citronela e OE de capim-limão, foi possível verificar que todos os compostos citados, reduziram significativamente as variáveis unidade formadora de colônia (UFC) e porcentagem de germinação, comparada com a testemunha à medida do aumento das concentrações.

Para a diferentes concentrações de eugenol ocorreu uma diminuição da unidade formadora de colônia com o aumento das concentrações testadas no estudo (Figura 1A). Resultado similar ocorreu com a porcentagem de germinação, no qual, com o aumento das concentrações de eugenol observou-se a diminuição da porcentagem de germinação de diferentes isolados de *Aspergillus* (Figura 2A).

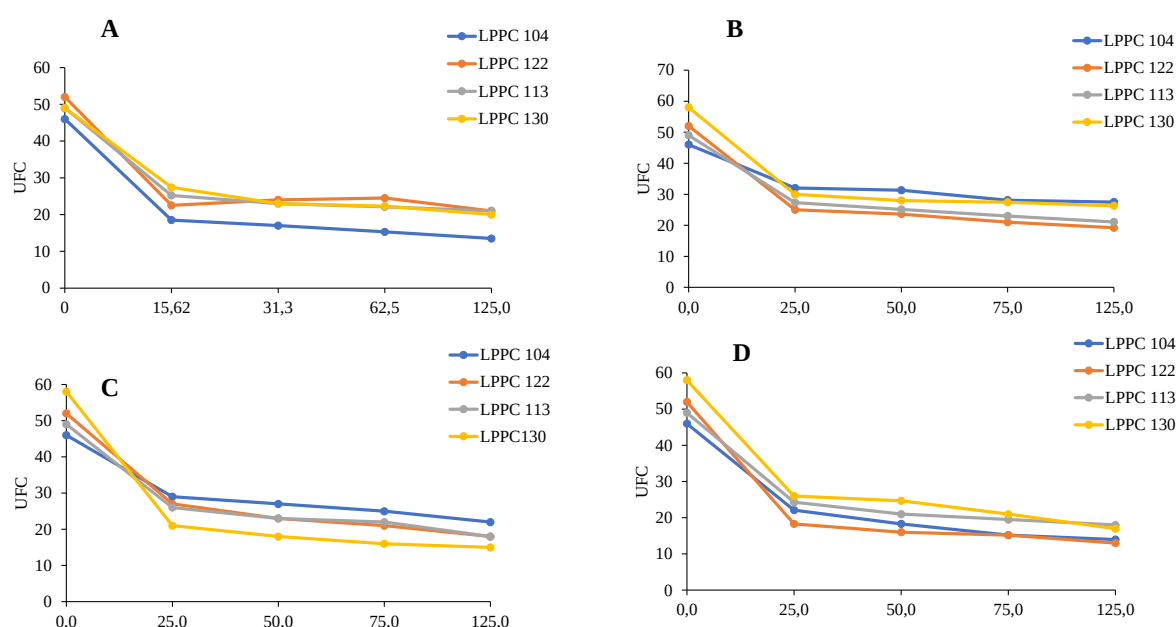


Figura 1

Análise de regressão do efeito *in vitro* de diferentes concentrações de eugenol, extrato de própolis, OE de citronela e OE de capim-limão sobre isolados de *Aspergillus*. (1A) UFC de isolados de *Aspergillus* expostos a diferentes concentrações de eugenol. (1B) UFC de isolados de *Aspergillus* expostos a diferentes concentrações de extrato de própolis. (1C) UFC de isolados de *Aspergillus* expostos a diferentes concentrações de OE de citronela (1D) UFC de isolados de *Aspergillus* expostos a diferentes concentrações de OE de capim-limão. *Aspergillus niger sensu stricto* (LPPC 104, LPPC 122) *Aspergillus tamarii* (LPPC 113) e *Aspergillus* sp. (LPPC 130).

As atividades fungitóxicas do extrato de própolis sobre a unidade formadora de colônia (UFC) de diferentes isolados de *Aspergillus* estão apresentadas na Figura 1B. De acordo com as análises estatísticas de regressão, diante das concentrações do extrato de própolis, apresentaram comportamentos lineares, quadráticos e exponencial sobre os diferentes isolados tanto na variável unidade formadora de colônia como da porcentagem de germinação, mostrando a sensibilidade dos isolados frente a diferentes concentrações de extrato de própolis

(Figura 2B).

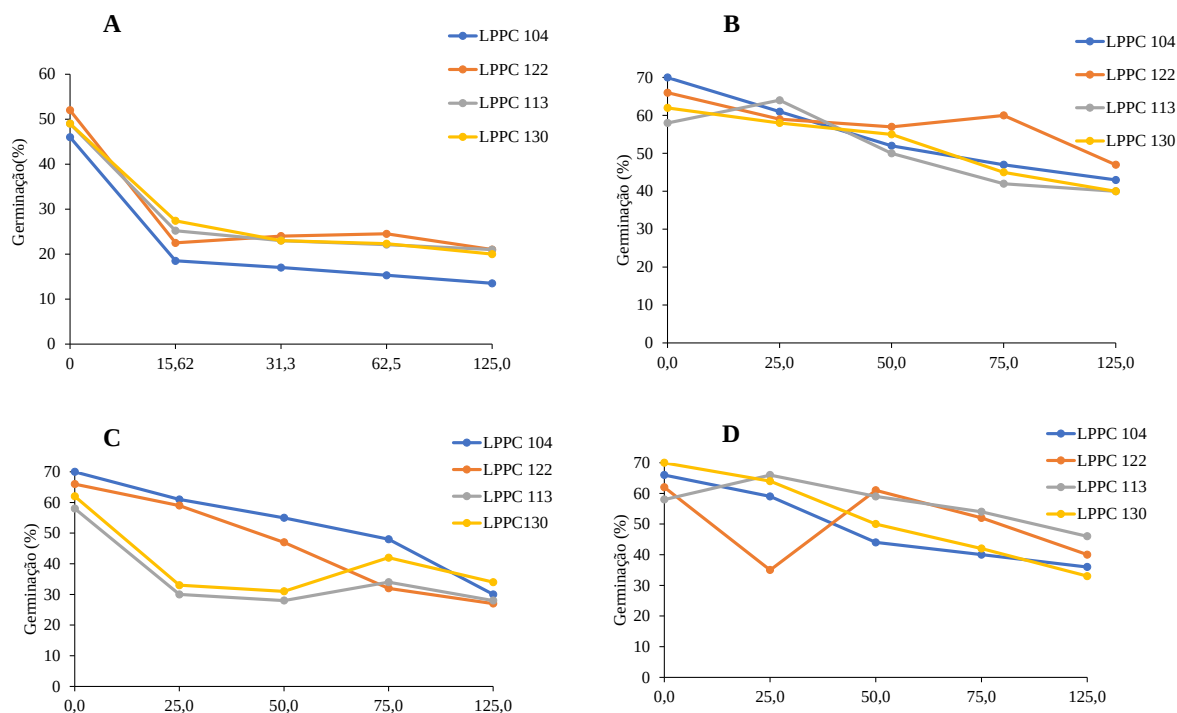


Figura 2

Análise de regressão do efeito *in vitro* de diferentes concentrações de eugenol, extrato de própolis, OE de citronela e OE de capim-limão sobre isolados de *Aspergillus*. (2A) Porcentagem de germinação de isolados de *Aspergillus* expostos a diferentes concentrações de eugenol. (B) Porcentagem de germinação de isolados de *Aspergillus* expostos a diferentes concentrações de extrato de própolis. (C) Porcentagem de germinação de isolados de *Aspergillus* expostos a diferentes concentrações de OE de citronela. (D) Porcentagem de germinação de isolados de *Aspergillus* expostos a diferentes concentrações de OE de capim-limão. *Aspergillus niger sensu stricto* (LPPC 104, LPPC 122) *Aspergillus tamarii* (LPPC 113) e *Aspergillus* sp. (LPPC 130).

O efeito de diferentes concentrações do OE de citronela sobre isolados de *Aspergillus* estão apresentado na Figura 1C. Foi observado um comportamento variado dos isolados frente as diferentes concentrações de citronela. O isolado LPPC 130 (*Aspergillus* sp.) mostrou-se mais sensível com relação a variável unidade formadora de colônia comparando com outros isolados utilizado no estudo. Ocorreu uma diminuição com o aumento da concentração na porcentagem de germinação dos isolados testados no presente estudo, como pode ser observados na Figura 2C. Para o isolado 122 (*Aspergillus niger sensu stricto*) ocorreu uma diminuição de até 30% na maior concentração testada, mostrando uma sensibilidade desse isolado ao composto.

O óleo essencial de capim-limão teve seu efeito *in vitro* testado sobre diferentes isolados de *Aspergillus*. Pode-se observar que houve a diminuição dos valores de unidade formadora de colônia e germinação comparada com a testemunha com uso do OE de capim-limão sobre os isolados testados (Figura 1D). Pode-se observar que houve uma variação na porcentagem de

germinação de todos os isolados testado com uma variação no isolado LPPC 122 (*Aspergillus niger sensu stricto*) que teve sua germinação diminuída em até 40% (Figura 2D).

3.2 Efeito de eugenol, extrato de própolis, óleo essencial de citronela e de capim limão na sanidade de grãos de feijão-caupi

Foi constatada a diminuição da presença de fungos associados aos grãos de feijão-caupi quando tratados com diferentes concentrações de eugenol, extrato de própolis, OE de citronela e OE de capim-limão comparado com a testemunha (Figura 5). De acordo com os resultados obtidos o eugenol diminuiu a frequência dos fungos associados a feijão-caupi em até 50% comparado com a testemunha, evidenciando o potencial do uso desse composto no tratamento dos grãos de feijão-caupi. Para o extrato de própolis a redução da frequência de fungos foi de até 47% comparado com a testemunha.

Para os óleos essenciais de citronela e capim-limão se destacaram na redução de fungos associados aos grãos de feijão-caupi, com frequência de fungos 40% e 42%, respectivamente, comparada com a testemunha. Esses resultados evidenciam o potencial de uso do eugenol, extrato de própolis, OE de citronela e OE de capim-limão no tratamento de grãos de feijão-caupi com infestação natural por fungos.

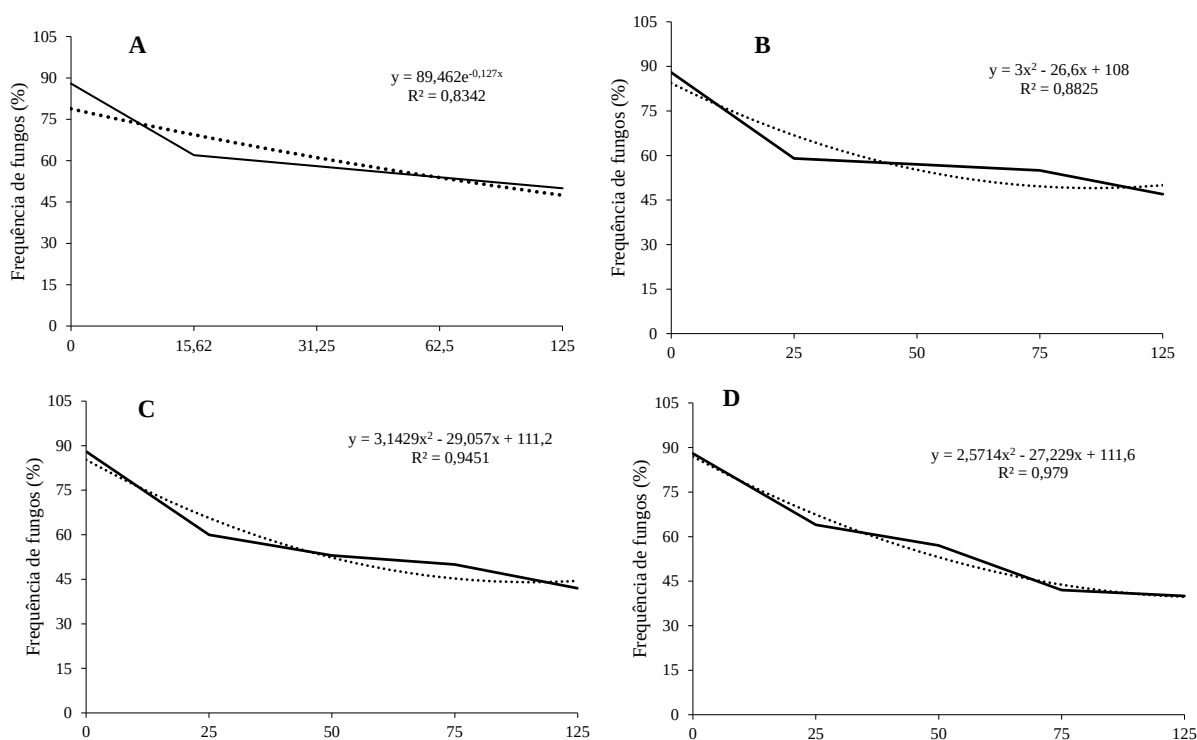


Figura 5

Análise de regressão do efeito *in vivo* de diferentes concentrações de eugenol, extrato de própolis, OE de citronela e OE de capim-limão sobre a frequência de fungos associados aos

grãos de feijão-caupi. (A) Frequência de fungos associados aos grãos de feijão-caupi expostos a diferentes concentrações de eugenol. (B) Frequência de fungos associados aos grãos de feijão-caupi expostos a diferentes concentrações de extrato de própolis. (C) Frequência de fungos associados aos grãos de feijão-caupi expostos a diferentes concentrações do OE de citronela. (D) Frequência de fungos associados aos grãos de feijão-caupi expostos a diferentes concentrações do OE de capim-limão.

4. Discussão

Apesar da atividade fungitóxica de diversos óleos essenciais serem relatadas sobre os mais diversos microrganismos, pouco se sabe a respeito de seus mecanismos de ação. Segundo Kumar et al. (2008) relatam que as atividades dos óleos essenciais e seus constituintes estão relacionadas com as suas hidrofobicidades, o que faz com eles sejam capazes de interagirem com a camada lipídica das membranas celulares, causando alterações em suas estruturas e as tornando menos seletivas, podendo ocasionar o extravasamento de íons e outros constituintes celulares.

Um estudo realizado por Costa et al. (2011) avaliando o efeito do óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry), no qual tem o eugenol como composto majoritário, sobre o fungo *Rizoctonia solani*, mostrou diferentes alterações morfológicas nas hifas do fungo, sendo observado a presença de vacúolos e desorganização dos conteúdos celulares, diminuição na nitidez da parede celular, intensa fragmentação das hifas, além de menor turgência das mesmas podendo ser considerado um indicativo de degeneração celular. No presente trabalho houve uma diminuição da frequência de fungos associados aos grãos de feijão-caupi com a utilização de eugenol, com frequências que variaram de 62% a 50%.

Estudo realizado por Silva (2008), descreveram a diminuição do crescimento micelial do fungo *Rhizopus stolonifer*, importante patógeno pós-colheita, em meio de cultura com óleo essencial de cravo-da-índia, em concentrações de 200, 400, 600 e 800 mg.mL⁻¹. A atividade antifúngica do óleo essencial está relacionada com sua hidrofobicidade, a qual os permite interagir com os lipídeos da parede, membrana celular e da mitocôndria, alterando a permeabilidade, causando distúrbios nestas estruturas.

Trabalhos vem sendo realizados nos últimos anos e comprovam as propriedades antimicrobianas da própolis, sendo destacada sua ação sobre *Staphylococcus aureus* (Pinto et al., 2001; Fernandes Junior et al., 2003); *Streptococcus pyogenes* (Bosio et al., 2000); *Candida* sp. (Stepanovic et al., 2003), *Aspergillus flavus* (Cortés-Higareda et al., 2019), *Cercospora coffeicola* (Pereira et al., 2008). Esses resultados corroboram com resultados obtidos no presente trabalho demonstrando o potencial antimicrobiano da própolis.

Segundo Fontana et al., (2004), a ação fungicida e fungistática da própolis, deve-se principalmente aos ácidos aromáticos e seus derivados, assim como os flavonoides. Esse compostos fitoquímicos possuem a capacidade de inibir a síntese de DNA, bem como compromete a membrana plasmática dos fungos (Silva, 2009).

Com relação ao OE de citronela, alguns estudos tem demonstrado o potencial antimicrobiano desse óleo. Perini et al., (2013) observaram inibição total do crescimento *in vitro* de *Pyricularia grisea* sob diferentes alíquotas (30, 60, 90, 120 e 150 µL) do óleo essencial de citronela. Estudo conduzido por Medice et al., (2007) com o objetivo de avaliar o potencial de óleos essenciais na inibição da germinação e no tamanho de uredinósporos de *Phakopsora pachyrhizi* conclui que o OE de citronela tem efeito sobre o tamanho das urédias. No presente trabalho o OE de citronela se destacou na redução de fungos associados aos grãos de feijão-caupi com frequência de 40% comparada com a testemunha que obteve 88% de fungos associados aos grãos de feijão-caupi.

Estudos envolvendo fungos fitopatogênicos e OE de capim-limão vem sendo conduzidos com resultados bastantes promissores. O OE de capim-limão apresentou ação antifúngica sobre *Pseudocercospora griseola*, causando danos ultraestruturais nas células dos conídios, sendo observada condensação no citoplasma, fusão dos vacúolos, alterações na estrutura mitocondrial interna, lise de organelas membranosas, ruptura da membrana plasmática e da parede celular (Hojos et al., 2012).

Tzartzakis et al. (2007) avaliaram a atividade antifúngica do OE de capim limão contra *Colletotrichum coccodes*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum*, *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus niger*, importantes patógenos em pós-colheita em frutas, pelo teste de difusão em ágar, e observaram atividade contra a germinação de esporos, crescimento do tubo germinativo e micelial perante todos os fungos.

Existe estudos com óleo essencial e extratos vegetais no controle de fungos associados aos grãos com resultantes bastante promissores. Em um estudo conduzido por Baiotto et al., (2023) avaliando o efeito dos óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e eucalipto (*Corymbia citriodora*) no tratamento contra fungos fitopatogênicos em grãos de soja armazenadas, concluiu que o óleo essencial de *C. citriodora* reduziu a incidência de *Aspergillus* sp.

Hiller et al., (2012) verificou o efeito fungitóxico dos óleos essenciais (OE) extraídos de *Eremanthus erythropappus* (candeia), *Cymbopogon martinii* (palmarosa) e de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) no tratamento de sementes de milho, soja e feijão-comum.

Apesar de extratos vegetais e óleos essenciais ter mostrado atividade antimicrobiana

contra uma ampla gama de fitopatógenos, estudos sobre seu uso no tratamento de grãos e sementes ainda são escassos (Nascimento et al., 2021). De acordo com o nosso conhecimento este é o primeiro estudo com o uso de eugenol, extrato de própolis, OE de citronela e OE de capim-limão no controle de *Aspergillus* spp. associados a grãos de feijão-caupi.

Em conclusão do presente estudo, o eugenol, extrato de própolis, OE de citronela e OE de capim-limão tem efeito *in vitro* e *in vivo* sobre isolados de *Aspergillus*. Os compostos eugenol, extrato de própolis, OE de citronela e OE de capim-limão é uma alternativa para o tratamento de grãos de feijão-caupi com infestação natural de fungos. Mais estudos precisarão ser realizados visando validar a utilização desses compostos para o manejo de fungos em grãos de feijão-caupi.

Agradecimentos

O primeiro autor agradece a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasil) pela bolsa de doutorado.

Referências bibliográficas

BAIOTTO, C. S., BAIOTTO, L. M.C., BEBER, S. C., KLEIBERT, K. R. U., FELL, A. P. W., BABESKI, C. M., BANDEIRA, W. J. A., BASSO, N. C. F., SILVA, J. A. G., COLE, C. F. 2023. Antifungal effect of essential oils on control of phytopathogens in stored soybean seeds. Brazilian Journal of Agricultural and Environmental Engineering, 27, 4, 272-278.

BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M. 2008. Biological effects of essential oils: a review. Food and Chemical Toxicology, 46, 446-475.

BARBOSA, M. S., VIEIRA, G.H.C., TEIXEIRA, A.V. 2015. Atividade biológica *in vitro* de própolis e óleos essenciais sobre o fungo *Colletotrichum musae* isolado de bananeira (*Musa* spp.). Revista Brasileira de Plantas Medicinais, 17, 254-261.

BOSIO, K. et al. 2000. *In vitro* activity of propolis Against *Streptococcus pyogenes*. Letters in Applied Microbiology, 31, 174-177.

BULLERMAN, L. B., BIANCHINI, A. 2007. Stability of mycotoxins during food processing. International Journal of Food Microbiology, 119, 140-146.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. 2014. Discussion Paper on the Possible Revision of the Code of Practice for the Prevention and Reduction of Mycotoxin Contamination in Cereals (Cac/rcp 51e2003), 8th Session. Codex Committee on Contaminants in Foods, The Hague, the Netherlands, 31 March-4 April 2014.

CORTÉS-HIGAREDA, M., RAMOSGARCÍA, M. L., CORREA-PACHECO, Z. N., RÍO-GARCÍA, J. C., BAUTISTABÁÑOS, S. 2019. Nanostructured chitosan/propolis formulations: characterization and effect on the growth of *Aspergillus flavus* and production of aflatoxins. *Heliyon*, 5, 1-7.

FERNANDES JÚNIOR, A. et al. 2003. Atividade anti *Staphylococcus aureus* de extratos de própolis (EP) de *Apis mellífera* preparados com diferentes concentrações de etanol como extrator. *Revista Ciência Farmacêutica*, 24, 147–152.

FERREIRA, D. F. 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35, 1039-1042.

FLEURAT-LESSARD, F. 2017. Integrated management of the risks of stored grain spoilage by seedborne fungi and contamination by storage mould mycotoxins - An update. *Journal of Stored Products Research*, 71, 22-40.

FONTANA, J. D., ADELMANN, J., PASSOS, M., MARASCHIN., LACERDA, C. A de L., LANÇAS, F. M. 2004. Própolis: chemical micro-heterogeneity and bioactivity. New Jersey: Humana press, 203-218.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. 2023. Disponível em < <https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/index.cfm?set=GRASNotices> > Acessado em: 10 de fevereiro de 2023.

GUIMARÃES, L. G. L., CARDOSO, M. G., SOUSA, P. E., ANDRADE, J., VIEIRA, S. S. 2011. Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. *Revista Ciência Agronômica*, 42, 464-472.

HILLEN, T., SCHWAN-ESTRADA, K. R. F., MESQUINI, R. M., CRUZ, M. E. S., STANGARLIN, J. R., NOZAKI, M. 2012. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais no controle de alguns fitopatógenos fúngicos *in vitro* e no tratamento de sementes. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, 14, 439-445.

HOJOS, J.M.A. et al. 2012. Antifungal activity and ultrastructural alterations in *Pseudocercospora griseola* treated with essential oils. Ciência & Agrotecnologia, 36, 270-284.

JARD, G., LIBOZ, T., MATHIEU, F., GUYONVARC'H, A., LEBRIHI, A. 2011. Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. Food Additives & Contaminants, Part A 28, 1590-1609.

KARLOVSKY, P. 2011. Biological detoxification of the mycotoxin deoxynivalenol and its use in genetically engineered crops and feed additives. Applied Microbiology and Biotechnology, 91, 491-504.

KARLOVSKY, P. 2014. Enzymatic detoxification of mycotoxins for healthy food. New Food Magazine, 17, 66-68.

KUMAR, A. et al. 2008. Assessment of *Thymus vulgaris* L. essential oil as a safe botanical preservative against post-harvest fungal infestation of food commodities. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 9, 575-580.

LÉŠNIK, M., VAJS, S., KRAMBERGER, B., ZERJAV, M., ZEMLJIC, A., SIMONCIC, A., KOLMANÍČ, A. 2014. *Fusarium* infected grain removal efficacy in cleaning wheat grain prior to milling. Zemdirbyste-Agriculture, 101, 285-294.

LOPES, N. A. Atividade ocratoxigênica de *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus niger* na presença de dois isolados bacterianos. 2013. 55p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MAGAN, N., ALDRED, D. 2007. Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. International Journal of Food Microbiology, 119, 131-139.

MEDICE, R. et al. 2007. Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. Ciência e Agrotecnologia, 31, 83-90.

NASCIMENTO, D. M., RIBEIRO JUNIOR, M. R., SANTOS, P. L., PEREIRA, A. E., KRONKA, A. Z. 2021. Óleos essenciais no tratamento de sementes. Revisão Anual de Patologia de Plantas, 27, 77-90.

PALOU, L., ALI, A., FALLIK, E., ROMANAZZI, G. 2016. GRAS, plant- and animal-derived compounds as alternatives to conventional fungicides for the control of postharvest diseases of fresh horticultural produce. Postharvest Biology and Technology, 122, 41–52.

PEREIRA, C. S., GUIMARÃES, R. J., POZZA, E. A., SILVA, A. A. da. 2008. Controle da cercosporiose e da ferrugem do cafeeiro com extrato etanólico de própolis. Revista Ceres, 55, 369- 376.

PERINI, V.B.M. et al. 2011. Avaliação do efeito curativo e preventivo do óleo essencial do capim citronela no controle de *Pyricularia grisea*. Journal of Biotechnology and Biodiversity, 2, 23- 27.

PINTO, M.S. et al. 2001. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, 38, 278-283.

SILVA, A. F. Própolis: caracterização físico-química, atividade antimicrobiana e antioxidante. 2009. 126 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência e Tecnologia de alimentos, Programa de Pós-Graduação, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

STEPANOVIC, S. et al. 2003. *In vitro* antimicrobial activity of própolis and synergism between própolis and antimicrobial drugs. Microbiology Research, 158, 353-357.

SOUZA, R.F., CARDOSO, M. G., FERREIRA, V. R. F., OLIVEIRA, C. D., ALVES, M. V. P., CAMPOLINA, G. A., BATISTA, L. R. 2015. Potencial antifúngico de constituintes de óleos essenciais. Research, Society and Development, 10, e457101220537.

TZARTZAKIS, N. G., ECONOMAKIS, C. D. 2007. Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 8, 253-258.

VARGA, J., KOCSUBÉ, S., PÉTERI, Z., VÁGVOLGYI, C., TÓTH, B. 2010. Chemical, physical and biological approaches to prevent Ochratoxin induced toxicoses in humans and animals. Toxins, 2, 1718-1750.

Capítulo IV

Conclusões gerais

CONCLUSÕES GERAIS

1. Os gêneros fúngicos *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Macrophomina* estão associados aos grãos de feijão-caupi comercializados na Região Nordeste do Brasil.
2. Existe uma baixa diversidade de fungos associados aos grãos de feijão-caupi sendo o gênero *Aspergillus* o que possui a maior riqueza e diversidade.
3. A espécie *Aspergillus tamarii* está associada a grãos de feijão-caupi constituindo esse o primeiro relato no Brasil.
4. Eugenol, extrato de própolis, OE de citronela e OE de capim-limão tem efeito *in vivo* e *in vivo* sobre isolados de *Aspergillus*.
5. Os compostos eugenol, extrato de própolis, OE de citronela e OE de capim-limão é uma alternativa para o tratamento de grãos de feijão-caupi com infestação natural de fungos.