



FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LICENCIATURA EM BIOLOGIA APLICADA

Trabalho de Culminação de Estudos

Variante de Investigação

**Deteccção Molecular de Fungos Toxigénicos em
Produtos Agrícolas em Moçambique**

Autor(a):

Rucila Kayla Nizam Abubacar



FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Trabalho de Culminação de Estudos

Variante de Investigação

Deteccção Molecular de Fungos Toxigénicos em Produtos Agrícolas em Moçambique

Supervisor(a):

Mestre Mariamo Parruque

Co-supervisor(a):

Prof. Doutor Edgar Cambaza

Mestre Vanessa Comé

Mestre Marília Titosse

Maputo, novembro de 2025

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar ao criador de tudo e todas as coisas *Allah* SWT por me dar força de vontade e encher meu coração e mente de propósitos, por estar comigo em todos momentos.

Agradeço especialmente à minha supervisora, doutora Mariamo Parruque, primeiro por ter escolhido confiar a mim este trabalho tão importante, agradeço por toda dedicação e paciência que teve para comigo, por todas correções e por todas conversas regadas de ensinamentos valiosos.

Ao meu supervisor Doutor Edgar e às minhas supervisoras do Centro de Biotecnologia, doutora Vanessa e doutora Marília agradeço por todo apoio prestado na realização do trabalho.

Aos meus pais Sandra e Nizam agradeço por tudo que fizeram para que chegasse aqui hoje, à minha querida irmã Nuceiba, palavras me faltam para agradecer por todos puxões de orelha e apoio incondicional, ao meu irmão Denzel por ter suportado o meu mau-humor e por respeitar o meu tempo enquanto escrevia este trabalho. Agradeço a melhor avó de todas, minha avó São, pelo suporte, pelas comidas super nutritivas que me dava para aguentar a pressão da faculdade, por estar lá para mim em todos momentos. À tia Sahina por sempre demonstrar interesse e me dar palavras de apoio para estudar e me formar. À dona Filomena por todo apoio directo e indirecto que me deu.

Ao Doutor Amândio Muthambe, pelo apoio na realização das partes iniciais deste trabalho, agradeço por todos ensinamentos e dedicação, aos técnicos de laboratório, especialmente ao senhor José Mathlombe por estar sempre disponível para ajudar e apoiar-me. Agradeço à Doutora Íris por sempre lembrar-se de mim, por ter me permitido viver novas experiências académicas das quais nunca irei me esquecer.

Às minhas colegas e amigas Nurah, Melanie, Joana e Karen por toda motivação e apoio, por estarem comigo nos momentos bons e maus desta jornada, vocês são incríveis.

Aos meus colegas e docentes do DCB, o meu muito obrigado por terem me acompanhado nesta jornada, o meu muito obrigado aos colegas Ronaldo, Dércio, Ciro, Dêlcio, Keila e Nióbio por toda ajuda.

A todos participantes do estudo, o meu especial agradecimento por terem aceite contribuir para a realização deste trabalho.

Declaração de Honra

Eu, Rucila Kayla Nizam Abubacar declaro por minha honra que o presente trabalho académico intitulado: “Detecção Molecular de Fungos Toxigénicos em Produtos Agrícolas em Moçambique” foi elaborado por mim sob orientações dos meus supervisores, com base na metodologia e recursos bibliográficos referenciados ao longo do texto.

Maputo, novembro de 2025



Rucila Kayla Nizam Abubacar

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus avós Izidine (em memória) e Maria Da Conceição, os pais e educadores maravilhosos que a vida me proporcionou, que sempre me incentivaram e guiaram nesta jornada com muito carinho e amor.

Resumo

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos principalmente por espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. A aflatoxina por exemplo, representa um grave problema de saúde pública devido as suas propriedades mutagénicas, imunossupressoras e hepatocarcinogénicas. Países africanos como Moçambique, levantam maior preocupação devido a falta de programas de monitoramento de contaminação de culturas agrícolas, más praticas agrícolas de colheita, armazenamento, processamento e transporte, associado ao clima tropical húmido da região. Actualmente o país conta com técnicas de detecção convencionais pouco precisas e sensíveis o que contribui para a entrada de micotoxinas na cadeia alimentar. Este estudo investigou a aplicação de técnicas moleculares para a detecção precoce de fungos toxigénicos em produtos agrícolas de diferentes regiões agroecológicas de Moçambique.

Foram recolhidas 25 amostras (13 de milho e 12 de amendoim) das regiões Sul (Boane, Marracuene, Boquisso e Manhiça), Centro (Manica) e Norte (Murrupula e Pemba) do país. A identificação fúngica foi inicialmente realizada por macroscopia e microscopia seguida de confirmação molecular com os *primers* ITS1 e ITS4. A presença de genes-chave da via biossintética das aflatoxinas (*aflR*, *nor-1*, *omtB*, *omt-1* e *ordA*) foi avaliada por PCR para determinar o potencial aflatoxigénico.

A análise morfológica revelou predominância de *Aspergillus* (84%), seguida de *Penicillium* (56%) e *Fusarium* (32%). A amplificação por PCR ITS1/ITS4 confirmou os resultados morfológicos em 100% das amostras com fragmentos de aproximadamente 600 pb, as pesquisas na ferramenta *Primer BLAST* confirmaram a associação dos tamanhos dos produtos obtidos com as principais espécies toxigénicas, com destaque para as aflatoxigénicas *A. flavus* e *A. parasiticus*. Para a confirmação da aflatoxigenicidade, a amplificação dos genes do *cluster* de aflatoxinas produziu fragmentos dentro do intervalo esperado (630-1490 pb). O género *Fusarium* foi mais frequente no milho (46,2%) e os géneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram mais frequentes no amendoim (100% e 58,3%, respectivamente). Os géneros *Aspergillus* e *Penicillium* ocorreram em todas regiões de colecta, o género *Fusarium* ocorreu em todas regiões com excepção da região de Manhiça e Manica. A elevada frequência de isolados potencialmente aflatoxigénicos reforça a necessidade de monitorização molecular contínua para melhor compreender a patogenicidade fúngica, a adaptação ambiental e as implicações para a segurança alimentar e a saúde pública.

Palavras-chave: micotoxinas, diagnóstico molecular rápido, segurança alimentar

Lista de Abreviaturas

ITS – *Internal Transcribed Spacer*/Espaçador Interno Transcrito

PCR – *Polymerase Chain Reaction*/Reação em cadeia de polimerase

DNA – *Desoxyrribonucleic Acid*/Ácido Desoxirribonucleico

RNA – *Ribonucleic Acid*/Ácido Ribonucleico

CHC – Carcinoma Hepatocelular

AFLA – Aflatoxina

AFB1 – Aflatoxina B1

OTA– Ocratoxina

FUM – Fumonisinias

ZEA – Zearalenona

TCTs – Tricotecenos

PAT – Patulina

CT – Citrinina

DON – Deoxinivalenol

DAS – Diacetoxiscirpenol

BQ – Boquisso

BN – Boane

MR – Marracuene

MH – Manhiça

MN – Manica

MU – Murrupula

PB - Pemba

Índice de figuras

Figura 1. Representação da estrutura dos diferentes tipos de aflatoxinas.	21
Figura 2. Esquema da produção de micotoxinas em grãos.....	22
Figura 3. Mapa da área de estudo com os pontos de colecta: Boane, Boquisso, Marracuene, Manhica, Manica, Murrupula e Pemba.	37
Figura 4. Principais géneros de fungos identificados morfológicamente.	48
Figura 5. Comparação da concentração de DNA em ng/μL entre o método optimizado de acetato de potássio (Conc_Acetato) e Kit comercial (Conc_Kit).	50
Figura 6. Comparação do índice de pureza entre o método optimizado de acetato de potássio (Pureza_Acetato) e kit comercial (Pureza_Kit).	51
Figura 7. Comparação do índice de contaminantes orgânicos entre os métodos de acetato de potássio (Contam_Acetato) e Kit comercial (Contam_Kit).....	52
Figura 8. Gel de agarose 1% do DNA extraído pelo método de acetato de potássio.	53
Figura 9. Gel de agarose 1% do DNA extraído pelo kit comercial.	53
Figura 10. Gel de agarose 1% do DNA amplificado usando os <i>primers</i> ITS1 e ITS4.	54
Figura 11. Gel de agarose 1% do DNA amplificado usando os <i>primers</i> ITS1 e ITS4.	55
Figura 12. Resultado do alinhamento dos <i>primers</i> ITS1 e ITS4 mostrando a especificidade de amplificação do fungo toxigénico <i>Aspergillus flavus</i>	56
Figura 13. Resultado do alinhamento dos <i>primers</i> ITS1 e ITS4 mostrando a especificidade de amplificação do fungo toxigénico <i>Aspergillus niger</i>	56
Figura 14. Resultado do alinhamento dos <i>primers</i> ITS1 e ITS4 mostrando a especificidade de amplificação do fungo toxigénico <i>Aspergillus parasiticus</i>	57
Figura 15. Resultado do alinhamento dos <i>primers</i> ITS1 e ITS4 mostrando a especificidade de amplificação do fungo toxigénico <i>Penicillium italicum</i>	57
Figura 16. Resultado do alinhamento dos <i>primers</i> ITS1 e ITS4 mostrando a especificidade de amplificação do fungo toxigénico <i>Penicillium expansum</i>	57
Figura 17. Resultado do alinhamento dos <i>primers</i> ITS1 e ITS4 mostrando a especificidade de amplificação do fungo toxigénico <i>Fusarium verticillioides</i>	58
Figura 18. Resultado do alinhamento dos <i>primers</i> ITS1 e ITS4 mostrando a especificidade de amplificação do fungo toxigénico <i>Fusarium graminearum</i>	58

Figura 19. Comparação das taxas de amplificação entre o DNA extraído pelo método de acetato de potássio e kit comercial.....	59
Figura 20. Gel de agarose 1% do DNA amplificado usando os <i>primers aflR-F</i> e <i>aflR-R</i>	60
Figura 21. Gel de agarose 1% do DNA amplificado usando os <i>primers nor-1F</i> e <i>nor-1R</i>	61
Figura 22. Gel de agarose 1% do DNA amplificado pelos <i>primers ver-1F</i> e <i>ver-1R</i>	62
Figura 23. Gel de agarose 1% do DNA amplificado pelos <i>primers omtB-F-F</i> e <i>omtB-F-R</i>	63
Figura 24. Gel de agarose 1% do DNA amplificado pelos <i>primers omt1-F</i> e <i>omt1-R</i>	64
Figura 25. Gel de agarose do DNA amplificado pelos <i>primers ord-1508</i> e <i>ord-2226</i>	64
Figura 26. Frequência de ocorrência do género <i>Aspergillus</i> entre as amostras de milho e amendoim.....	65
Figura 27. Frequência de ocorrência do género <i>Penicillium</i> entre as amostras de milho e amendoim.....	66
Figura 28. Frequência de ocorrência de fungos do género <i>Fusarium</i> nas amostras de milho e amendoim.....	67
Figura 29. Frequência de ocorrência do género <i>Aspergillus</i> entre os locais de colecta.	68
Figura 30. Frequência de ocorrência do género <i>Penicillium</i> entre os locais de colecta.	69
Figura 31. Frequência de ocorrência do género <i>Fusarium</i> entre os locais de colecta.	69

Índice de tabelas

Tabela 1. Resumo dos estudos sobre aflatoxinas em Moçambique.	27
Tabela 2. Genes envolvidos na biossíntese de AFB1 e as suas respectivas enzimas e primers (Levin, 2012).....	32
Tabela 3. Comparação entre os métodos de detecção de fungos e micotoxinas.....	32
Tabela 4. Localização geográfica dos pontos de coleta.	36
Tabela 5. Amostras usadas para o estudo e a respectiva descrição.....	40
Tabela 6. <i>Primers</i> usados para a amplificação da região ITS.	44
Tabela 7. Resumo das condições de amplificação da região ITS.	44
Tabela 8. <i>Primers</i> usados para a amplificação dos genes da biossíntese de AFB1.	46
Tabela 9. Resumo das condições de PCR para amplificação dos genes da biossíntese de AFB1.	46
Tabela 10. Resultados do teste de Wilcoxon para a comparação da concentração, índice de pureza e de contaminantes orgânicos entre o método de acetato de potássio e kit comercial.....	49
Tabela 11. Resultados do teste <i>t</i> pareado para a comparação do índice de pureza entre o método de acetato de potássio e kit comercial.....	49
Tabela 12. Resultados do teste de McNemar para a comparação do sucesso de amplificação entre o DNA extraído pelo método de acetato de potássio e kit comercial.	59

Lista de Anexos

Anexo 1: Amostra de grãos de amendoim com contaminação fúngica, em câmara húmida.	91
Anexo 2: Géneros de fungos identificados morfológicamente	92
Anexo 3: Quantificação do DNA extraído	93
Anexo 4: Consentimento Informado para Participantes do Estudo sobre Detecção Molecular de Fungos Toxigénicos em Produtos Agrícolas em Moçambique	95

Índice

Agradecimentos	iii
Declaração de Honra.....	iv
Dedicatória.....	v
Resumo	vi
Lista de Abreviaturas	vii
Índice de figuras.....	viii
Índice de tabelas.....	x
Lista de Anexos.....	xi
1. Introdução.....	15
1.1. Problema de pesquisa.....	17
1.2. Justificativa.....	17
2. Revisão Bibliográfica	19
2.1. As micotoxinas.....	19
2.1.1. Aflatoxinas.....	20
2.1.2. Fumonisinhas	22
2.1.3. Tricotecenos.....	23
2.1.4. Patulina	23
2.1.5. Zearalenona.....	24
2.1.6. Ocratoxinas	24
2.2. Ocorrência de micotoxinas em África.....	25
2.2.1. Micotoxinas em Moçambique.....	25
2.3. Estratégias para mitigação da contaminação por micotoxinas.....	27
2.4. Técnicas de detecção de micotoxinas em matrizes alimentares.....	28
2.4.1. Técnicas cromatográficas.....	29

2.4.2.	Métodos imunoquímicos.....	30
2.4.3.	Método de triagem em tiras	30
2.4.4.	Biossensores electroquímicos	30
2.4.5.	Testes moleculares baseados em PCR	31
2.4.6.	Comparação entre os métodos de detecção de fungos e micotoxinas	32
3.	Objectivos.....	34
3.1.	Objectivo geral	34
3.2.	Objectivos específicos.....	34
3.3.	Hipóteses	34
4.	Área de estudo	36
5.	Materiais e Métodos	38
5.1.	Materiais.....	38
5.1.1.	Instrumentos.....	38
5.1.2.	Equipamentos.....	38
5.1.3.	Material biológico.....	39
5.1.4.	Materiais químicos.....	39
5.2.	Amostragem	39
5.3.	Metodologia	40
5.3.1.	Identificação morfológica dos fungos.....	40
5.3.2.	Identificação molecular dos fungos (Amplificação da região ITS)	41
5.3.3.	Amplificação dos genes da via de biossíntese de aflatoxina B1 (AFB1)	45
5.4.	Análise de dados.....	47
6.	Resultados.....	48
6.1.	Principais géneros de fungos identificados morfológicamente.....	48

6.2.	Concentração, índices de pureza e de contaminantes orgânicos do DNA extraído pelos métodos de acetato de potássio e kit comercial.....	49
6.2.1.	Gel de agarose e integridade do DNA extraído	52
6.3.	Principais géneros de fungos identificados através da amplificação da região ITS.....	53
6.4.	Comparação do sucesso de amplificação entre o DNA extraído pelo método de acetato de potássio e kit comercial	59
6.5.	Ocorrência de fungos toxigénicos entre as amostras de milho e amendoim.....	60
6.6.	Comparação dos níveis de contaminação por fungos toxigénicos entre as regiões de colecta.....	67
7.	Discussão	70
8.	Utilidade dos resultados.....	78
9.	Limitações	79
10.	Conclusão.....	80
11.	Recomendações.....	82
12.	Referências Bibliográficas	83
13.	Anexos	91

1. Introdução

As aflatoxinas são potentes micotoxinas derivadas de poliketídeos que representam uma grande preocupação de segurança alimentar e saúde pública (Luque *et al.*, 2012; Mahmoud, 2014). Este metabólito secundário é principalmente produzido por fungos do género *Aspergillus* onde as espécies *A. flavus* e *A. parasiticus* são as principais produtoras de aflatoxinas (Rodríguez *et al.*, 2012; Levin, 2012; Gong *et al.*, 2016; Sineque *et al.*, 2019). A presença de aflatoxinas em matrizes alimentares é vista como uma grande ameaça para a saúde humana e animal (Sohrabi e Taghizadeh, 2018; Rahman *et al.*, 2020a) uma vez que, possui propriedades imunossupressoras, mutagénicas e hepatocarcinogénicas, isto é, capaz de causar cancro do fígado. As aflatoxinas podem ser classificadas em vários tipos: B1, B2, G1 e G2 sendo a aflatoxina B1 (AFB1) a mais tóxica e a mais hepatocarcinogénica (Levin, 2012; Luque *et al.*, 2012; Bintvihok *et al.*, 2016; Sineque *et al.*, 2019).

A quantidade de AFB1 nos alimentos é 16 à 32 vezes mais prevalente em países em desenvolvimento do que em países desenvolvidos (Sineque *et al.*, 2019; Rahman *et al.*, 2020a). A contaminação por aflatoxinas acomete mais aos cereais e leguminosas, mas, podem também ocorrer contaminações em rações de animais o que acaba suscitando a uma exposição indirecta às aflatoxinas pelo consumo de alimentos de origem animal (Negash, 2018; Jallow *et al.*, 2021). Em países africanos as práticas de colheita inadequadas assim como o transporte, armazenamento e comercialização inadequada das colheitas contribuem para a proliferação de fungos o que aumenta o risco de produção de aflatoxinas por estes (Sineque *et al.*, 2019), para além disso, o clima quente e húmido típico das regiões tropicais da África Subsaariana também é um importante factor que contribui para a contaminação das culturas alimentares (Gong *et al.*, 2016). Em Moçambique os principais alimentos básicos são os mais propensos à contaminação por aflatoxinas o que consequentemente contribui para o aumento do risco de doenças hepáticas e progressão de doenças infecciosas (Cambaza *et al.*, 2018b; Sineque *et al.* 2019).

O milho e o amendoim são culturas com um papel importante na dieta alimentar dos moçambicanos, uma vez que, são a principal fonte de rendimento agrícola para o país (Negash, 2018; Cambaza *et al.*, 2018a) e constituem a base da dieta alimentar da população e muitas vezes são consumidos em simultâneo nas refeições. Estes dois alimentos são susceptíveis à contaminação por fungos aflatoxigénicos principalmente quando expostos a condições de elevada temperatura e humidade (Gong *et al.*, 2016; Siddiqui *et al.*, 2018; Ankwasa *et al.*, 2021). Em estudos realizados

em Moçambique, verificou-se que os níveis totais de AFB1 no amendoim apresentam valores acima dos limites aceitáveis pela União Europeia (UE) enquanto que em estudos feitos com derivados de milho, o nível de AFB1 apresentou-se dentro dos limites estabelecidos pela UE (Hlashwayo, 2018; Martinho *et al.*, 2024), no entanto, estes alimentos contaminados ainda representam um risco potencial para a saúde pública no país devido ao consumo excessivo em consequência da falta de diversidade alimentar enfrentada por muitas famílias (Sineque *et al.*, 2019; Martinho *et al.*, 2024).

Para o diagnóstico de contaminação por aflatoxinas, são geralmente usados métodos convencionais para detectar fungos aflatoxigénicos em alimentos, como as técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia em camada fina (TLC) que consistem em separar e identificar componentes químicos em misturas, e ensaios imunoenzimáticos (ELISA) baseados na detecção de imunocomplexos. No entanto, estas técnicas são demoradas e trabalhosas e, uma detecção precoce de aflatoxinas nos alimentos é vantajosa para controlar lotes de alimentos produzidos para a comercialização, assim como os que entram no país por meio de doações, impedindo desta forma a entrada destas micotoxinas na cadeia alimentar (Luque *et al.*, 2012; Hussain *et al.*, 2015; Bintvihok *et al.*, 2016).

Os métodos de detecção baseados em PCR, que consiste na amplificação de sequências específicas do DNA, vêm ganhando atenção por serem mais precisos, sensíveis, rápidos, económicos, seguros de usar e portáteis para detectar fungos toxigénicos em matrizes de alimentos (Hussain *et al.*, 2015; Bintvihok *et al.*, 2016; Rahman *et al.*, 2020a). Esta técnica de detecção pode ser usada para identificar os fungos toxigénicos nas matrizes alimentares tendo como alvo a amplificação da região genómica ITS (espaçador interno transcrito), mas também pode ser usada para amplificação de genes directamente envolvidos na biossíntese de micotoxinas detectando a sua presença (Rodríguez *et al.*, 2012; Hussain *et al.*, 2015; El-Shaer *et al.*, 2021). A biossíntese de aflatoxina B1 por exemplo, envolve 23 reações enzimáticas com um total de 15 percursores intermediários e envolvem 25 genes agrupados em uma região de DNA de 75 kb (Mahmoud, 2014; Rahman *et al.*, 2020a). Os genes que são comumente usados para a detecção de aflatoxinas são o *aflD(nor1)*, *aflII(avfA)*, *aflM(ver1)*, *aflO(omtB)*, *aflP(omtA)*, *aflQ(ordA)*, *aflR(afl2)* e *aflS*, a escolha destes para a amplificação pode variar com o estudo, o tipo de matriz alimentar ou as condições para a execução da técnica (Levin, 2012, Luque *et al.*, 2012; Mahmoud, 2014; Hassan, 2023). Portanto,

o presente trabalho teve como objectivo detectar molecularmente fungos toxigénicos em milho e amendoim em Moçambique. Assim, são levantadas as seguintes perguntas de pesquisa:

- Será a PCR capaz de detectar genes da via metabólica de produção de micotoxinas?
- Como a detecção precoce de genes da via metabólica de produção de micotoxinas usando a PCR pode contribuir para a segurança alimentar em Moçambique?

1.1. Problema de pesquisa

De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), cerca de 25% das culturas alimentares do mundo estão contaminadas por micotoxinas, com a aflatoxina B1 (AFB1) sendo o principal contaminante (Rahman *et al.*, 2020a; Jallow *et al.*, 2020; Ankwasa *et al.*, 2021). Em Moçambique os alimentos menos contaminados são exportados, enquanto os mais contaminados são consumidos localmente, aumentando a exposição às aflatoxinas (Sineque *et al.*, 2019).

A AFB1 é extremamente potente e está associada a uma alta prevalência de carcinoma hepatocelular (CHC), estudos realizados por Siddiqui *et al.* (2018) sobre a epidemiologia do CHC, demonstraram que a taxa de incidência da doença em Moçambique, é a mais alta da África com 41,2 casos por 100.000 pessoas por ano (Cambaza *et al.*, 2018a; Siddiqui *et al.*, 2018).

A alta exposição às micotoxinas é agravada pela falta de programas de monitoramento, pelas práticas inadequadas de colheita, armazenamento e transporte e pelo clima quente e húmido do país (Sineque *et al.*, 2019; Cambaza *et al.*, 2020; Tamele *et al.*, 2022).

Para avaliar a gravidade das micotoxinas e fornecer informações documentadas sobre a situação em Moçambique que conduzam a mudanças de práticas inadequadas e influenciem políticas, propôs-se a aplicação de técnicas para a detecção precoce das aflatoxinas no milho e no amendoim, sendo as técnicas moleculares uma grande aposta (Siddiqui *et al.*, 2018; Cambaza *et al.*, 2018c). Este estudo pretende investigar a aplicação otimizada da PCR para a detecção de genes da via metabólica de produção de aflatoxinas em fungos.

1.2. Justificativa

Em Moçambique, a falta de programas de monitoramento e publicação de estudos experimentais relevantes sobre micotoxinas resulta em dados limitados sobre aflatoxinas, contribuindo para o

aumento de problemas de saúde relacionados ao consumo directo e indirecto dessas toxinas em alimentos (Tamele *et al.*, 2022). Em Moçambique há pouca sensibilização sobre o problema das micotoxinas fora do meio académico (Cambaza *et al.*, 2018b). A falta de profundidade em muitos estudos publicados até agora destaca a necessidade de rastreios rápidos e eficazes para um melhor controlo da presença de AFB1 nos alimentos (Cambaza *et al.*, 2018b).

A técnica de PCR para detecção de fungos aflatoxigénicos pode ser uma alternativa eficaz e sensível para identificar alimentos contaminados, ajudando a reduzir os problemas de saúde causados pela ingestão dessas toxinas. A presente pesquisa, além de testar esta técnica no rastreio de aflatoxinas no milho e amendoim, pode auxiliar na compreensão da epidemiologia do CHC em Moçambique.

2. Revisão Bibliográfica

2.1.As micotoxinas

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por determinadas espécies ou estirpes fúngicas quando crescem como contaminantes em determinados alimentos ou rações (Beatriz e Cambaza, 2015; Daou *et al.*, 2021). Estes metabólitos apresentam um baixo peso molecular e não apresentam efeito significativo no crescimento fúngico, sua produção pode ser devido ao acúmulo de precursores de metabólitos primários em excesso e pode ser influenciada por condições ambientais de temperatura e humidade elevadas, pH, estirpe fúngica e substrato (Adeyeye, 2016; Daou *et al.*, 2021; Szelenberger *et al.*, 2024). As micotoxinas são naturalmente produzidas por fungos filamentosos sendo a maioria delas produzida por alguns géneros de fungos como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, mas, os géneros *Alternaria* e *Claviceps* também apresentam algumas espécies micotoxigénicas (Da Rocha *et al.*, 2014; Moretti *et al.*, 2016; Daou *et al.*, 2021; Hamad *et al.*, 2023; Chandravarman *et al.*, 2024; Szelenberger *et al.*, 2024).

São compostos bastante estáveis e difíceis de destruir através de processamento e fervura dos alimentos, mesmo em pequenas concentrações as micotoxinas apresentam propriedades carcinogénicas, mutagénicas, teratogénicas, imunotóxicas, hepatotóxicas, citotóxicas, nefrotóxicas e neurotóxicas (Moretti *et al.*, 2016; Szelenberger *et al.*, 2024), e foram classificadas pela OMS e pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) como carcinógenos humanos (Pickova *et al.*, 2021; Chandravarman *et al.*, 2024). No entanto, estes efeitos podem variar de acordo com a idade, sexo, dieta, peso, exposição a agentes infecciosos, substâncias farmacologicamente activas (Omotayo *et al.*, 2019; El-Sayed *et al.*, 2022) e podem ser agravados em situações de má nutrição (Mussalama, 2023).

Até o momento pode-se destacar vários tipos de micotoxinas como: aflatoxinas (AFLA), ocratoxinas (OTA), fumonisinas (FUM), deoxinivalenol (DON), zearalenona (ZEA), tricotecenos (TCTs), patulina (PAT), citrinina (CT), citreoviridina, luteosquirina, islanditoxina (Hamad *et al.*, 2023; Mussalama, 2023; Szelenberger *et al.*, 2024). Dentre elas, as aflatoxinas (AFLA), são as mais importantes.

2.1.1. Aflatoxinas

As aflatoxinas são maioritariamente produzidas por estirpes de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius* classificadas pela OMS como carcinógenos e genotóxicos (Omotayo *et al.*, 2019; Szelenberger *et al.*, 2024). As aflatoxinas desenvolvem-se em regiões de altas temperaturas e humidade que são ideais para o desenvolvimento dos fungos citados anteriormente, ou seja, os surtos desta micotoxina são mais comuns em regiões tropicais e subtropicais do que em regiões temperadas (Adeyeye, 2016; Omotayo *et al.*, 2019; El-Sayed *et al.*, 2022; Chandravarnan *et al.*, 2024).

A ingestão de alimentos contaminados por aflatoxinas pode levar ao desenvolvimento de aflatoxicose que pode evoluir para problemas de saúde mais graves causando danos aos órgãos, principalmente ao fígado, podendo levar a morte. É estimado que aproximadamente 4,5 bilhões de pessoas no mundo, com destaque para populações de países em vias de desenvolvimento, estejam expostas a alimentos contaminados por aflatoxinas e, nos últimos anos espera-se que haja um aumento no consumo destes alimentos devido as dificuldades socioeconómicas causadas pela pandemia da COVID-19 (Pickova *et al.*, 2021).

2.1.1.1. Estrutura das aflatoxinas

As aflatoxinas derivam de difuracumarinas com um grupo bifurano e um anel pentanona ou lactona no caso de aflatoxinas do tipo B (AFB) ou apenas lactona em aflatoxinas do tipo G (AFG) (El-Sayed *et al.*, 2022).

A figura abaixo representa a estrutura dos diferentes tipos de aflatoxinas, aflatoxina B1 (AFB1), aflatoxina B2 (AFB2), aflatoxina G1 (AFG1) e aflatoxina G2 (AFG2).

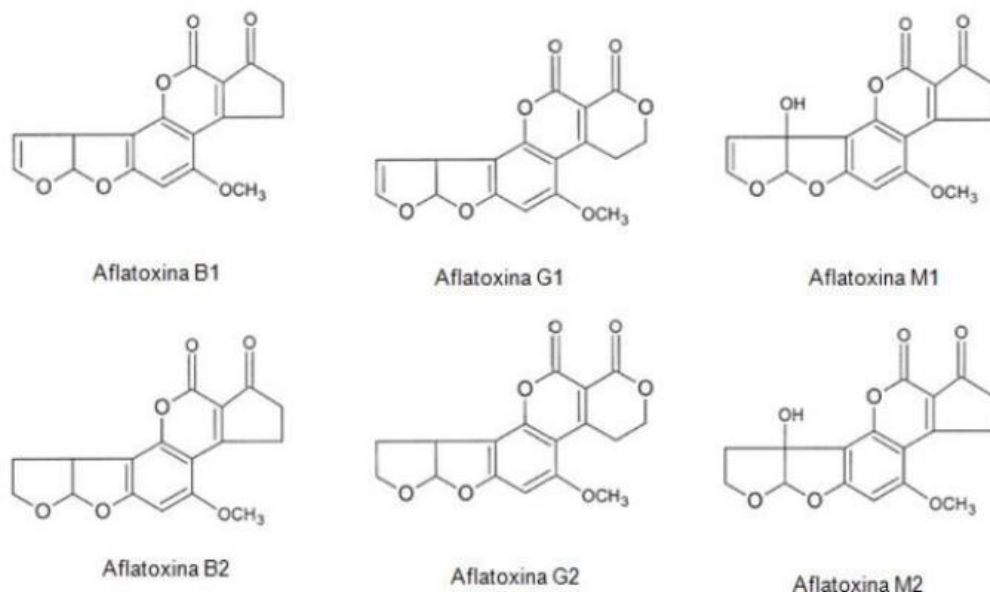


Figura 1. Representação da estrutura dos diferentes tipos de aflatoxinas. As aflatoxinas B1 e B2 apresentam um anel pentanona e lactona em suas estruturas enquanto as aflatoxinas G1 e G2 apresentam um anel lactona. Fonte: Souto *et al.*, (2017).

As aflatoxinas M1 (AFM1) e M2 (AFM2) são metabolitos hidroxilados de AFB1 e AFB2, respectivamente e são comumente encontradas em produtos de origem animal (Hamad *et al.*, 2023). A espécie *A. flavus* é responsável pela produção de aflatoxinas do tipo B enquanto a espécie *A. parasiticus* é responsável pela produção de aflatoxinas do tipo G (El-Sayed *et al.*, 2022).

A AFB1 desperta mais atenção por ser a mais tóxica e constituir um poderoso hepatocarcinógeno humano causador de grandes problemas de saúde como câncer de fígado, hepatite grave e surtos de aflatoxicose aguda (Omotayo *et al.*, 2019; El-Sayed *et al.*, 2022; Hamad *et al.*, 2023). Na maioria das vezes a AFB1 é detectada em cereais, nozes, grãos e rações (Adeyeye, 2016; Hamad *et al.*, 2023).

2.1.1.2.Ciclo das aflatoxinas

Os fungos podem sobreviver nos restos culturais de um cultivo anterior, no solo, a partir de sementes contaminadas ou em plantas hospedeiras alternativas, como as ervas daninhas. De seguida estes fungos infectam a planta, principalmente na fase de enchimento dos grãos, estes fungos então reproduzem-se nas espigas e, quando atingem maturidade, produzem as toxinas. Entretanto, se os grãos vierem do campo com uma boa qualidade, estes podem ser infectados pela

presença destes fungos durante o armazenamento onde o teor de água dos grãos, a humidade e a temperatura devem ser monitorados (Rohrig, 2022).

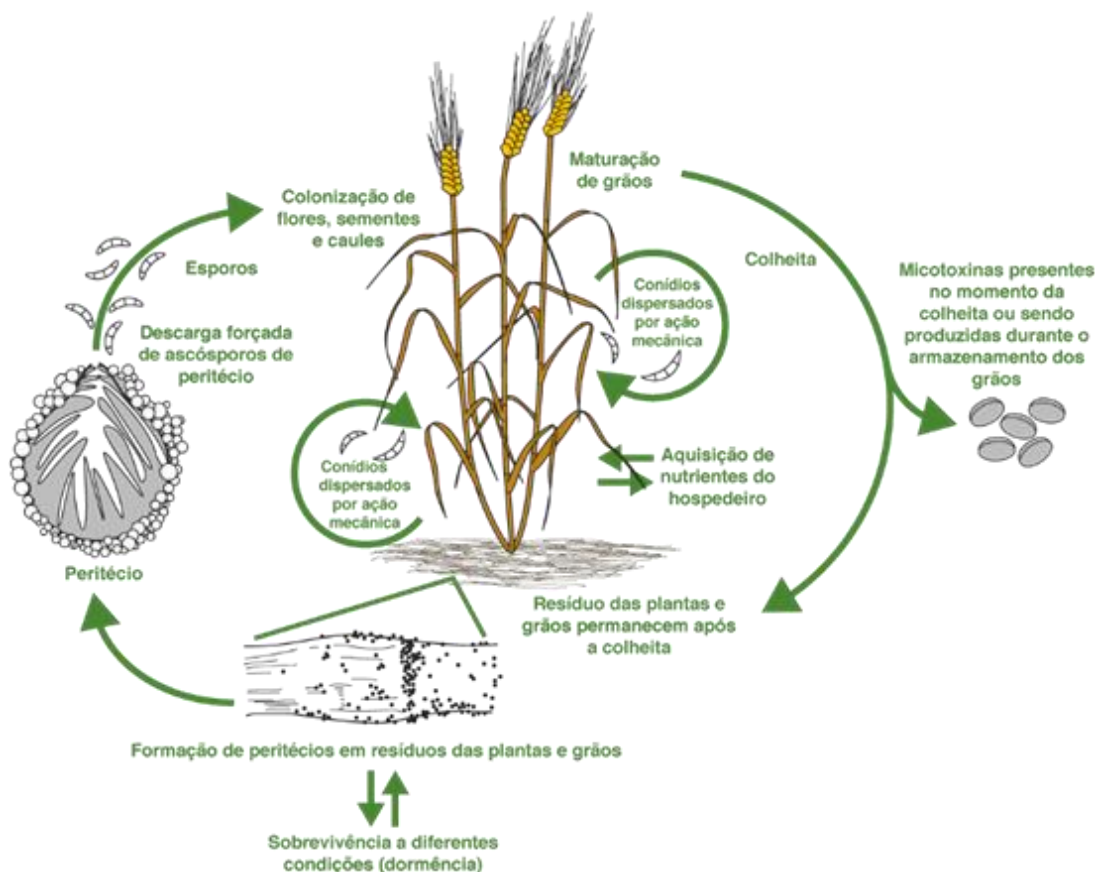


Figura 2. Esquema da produção de micotoxinas em grãos. Descrição: Pequenos envelopes de frutificação (peritécios) envolvem várias estruturas da planta, estes liberam esporos que colonizam flores, sementes e caules que se desenvolverão em fungos na fase de enchimento dos grãos. Após o processo de maturação dos grãos e sua colheita estes fungos também passarão por uma maturação para então sintetizarem as micotoxinas. (Fonte: Impextraco, 2021 citado por Rohrig, 2022).

2.1.2. Fumonisinhas

As fumonisinhas (FUMO) são um grupo de micotoxinas sintetizadas principalmente por espécies de *Fusarium*, mas, também pode ser sintetizada por espécies de *Alternaria*, estas constituem um grupo de até 16 substâncias sendo as mais importantes a FUMO B1 e FUMO B2 (Da Rocha *et al.*, 2014; Daou *et al.*, 2021). Esta micotoxina é comumente encontrada em cereais como milho, arroz, trigo, sorgo, cevada e aveia, mas também pode ser encontrada em algumas hortaliças como aspargos (Alshannaq e Yu, 2017; Daou *et al.*, 2021; El-Sayed *et al.*, 2022).

Espécies como *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. culmorum* e *F. nygamai* quando se desenvolvem em cereais podem sob determinadas condições produzir esta toxina que possui propriedades neurotóxicas, hepatotóxicas e é capaz de provocar danos e toxicidade nas vias aéreas (Da Rocha *et al.*, 2014; Daou *et al.*, 2021; Hamad *et al.*, 2022). Já foi relatado que a ingestão desta micotoxina foi responsável por casos de encefalomalácia humana, leucoencefalomacia em coelhos e equinos, insuficiência cardíaca e casos de câncer de esôfago (Da Rocha *et al.*, 2014; Omotayo *et al.*, 2019; El-Sayed *et al.*, 2022).

2.1.3. Tricotecenos

Os tricotecenos (TCTs) são um grupo de micotoxinas com aproximadamente 150 metabólitos sendo os mais importantes o deoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), toxina T2, toxina HT2 e o diacetoxiscirpenol (DAS) (Da Rocha *et al.*, 2014). Poucas destas micotoxinas ocorrem naturalmente e as que ocorrem encontram-se presentes em rações animais, cereais como milho, aveia, trigo e cevada, leguminosas, frutas, vegetais e silagem (Da Rocha *et al.*, 2014; Omotayo *et al.*, 2019; Daou *et al.*, 2021; El-Sayed *et al.*, 2022). Estas micotoxinas quando ingeridas apresentam uma forte capacidade de inibir a síntese proteica em eucariotas interferindo nas etapas de iniciação, alongamento e término da síntese, podem também provocar distúrbios hematológicos em animais e humanos como hemorragias, anemias, coagulopatias e granulocitopenias, necroses cutâneas, lesões epiteliais orais e hipotensão, para além de apresentarem propriedades citotóxicas, imunossupressoras e carcinogénicas (Da Rocha *et al.*, 2014; Omotayo *et al.*, 2021; El-Sayed *et al.*, 2022; Hamad *et al.*, 2023).

Tricotecenos são produzidos por vários géneros de fungos com destaque para *Fusarium*, *Stachybotrys*, *Myrothecium*, *Trichothecium* e *Trichoderma* (Tola e Kebede, 2016).

2.1.3.1. Deoxinivalenol

É um dos tipos de TCTs e é comumente encontrado em grãos, embora seja menos tóxica que outros TCTs. Apresenta propriedade imunossupressora e induz apatia, vômitos e rejeição alimentar, por esta razão também é conhecida por vomitoxina (Da Rocha *et al.*, 2014; Hamad *et al.*, 2023).

2.1.4. Patulina

A patulina (PAT) é uma micotoxina comumente encontrada em frutas como maçãs, pêssegos e uvas, mas também pode ser encontrada em alguns cereais como o trigo, em rações animais e

silagem (Omotayo *et al.*, 2019; Daou *et al.*, 2021; El-Sayed *et al.*, 2022). Esta toxina apresenta propriedades neurotóxicas, carcinogénicas e mutagénicas, ou seja, a sua ingestão pode acarretar problemas de hemorragias cerebrais, danos ao sistema nervoso, danos ao sistema imunológico e gastrointestinal, lesões cutâneas e cancros de pele e de pulmão (Adeyeye, 2016; Omotayo *et al.*, 2019; El-Sayed *et al.*, 2022; Hamad *et al.*, 2023).

Esta micotoxina é sintetizada por fungos do género *Penicillium*, com destaque para espécies como *P. carneum*, *P. clavigerum*, *P. griseofulvum* e *P. expansum*, mas, também pode ser encontrada em algumas espécies de *Aspergillus* como *A. clavatus*, *A. giganteus* e *A. terreus* e de *Byssoschlamys* (Da Rocha *et al.*, 2014; Daou *et al.*, 2021, El-Sayed *et al.*, 2022).

2.1.5. Zearalenona

A zearalenona é uma toxina que pode ser sintetizada por fungos do género *Fusarium* como *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. equisetii* e *F. crookwellense* (Adeyeye, 2016; Daou *et al.*, 2021; El-Sayed *et al.*, 2022). Ela é classificada como uma toxina estrogénica por causar degeneração de células reprodutivas e desequilíbrios hormonais, e é considerada carcinogénica e teratogénica (El-Sayed *et al.*, 2022; Hamad *et al.*, 2023).

Pode ser encontrada em cereais como milho, arroz, trigo, cevada e centeio, para além de oleaginosas como amendoim e, rações animais e silagem (Daou *et al.*, 2021; El-Sayed *et al.*, 2022).

2.1.6. Ocratoxinas

As Ocratoxinas (OTA) são um grupo de micotoxinas de estrutura semelhante as aflatoxinas, estas diferem pelo facto das OTA apresentarem um substituto de isocumarina ligado a um grupo l-fenilalanina (Da Rocha *et al.*, 2014). Existem três tipos de ocratoxinas, a A, B e C sendo a mais importante a ocratoxina A por apresentar propriedades carcinogénicas, teratogénicas, nefrotóxicas, neurotóxicas, hepatotóxicas e imunossupressoras (Adeyeye, 2016; Omotayo *et al.*, 2019; El-Sayed *et al.*, 2022, Hamad *et al.*, 2023). Esta toxina representa um perigo pois ao chegar ao útero pode atravessar a placenta e provocar malformação do sistema nervoso central e outros distúrbios cerebrais no feto (Omotayo *et al.*, 2019).

A OTA pode ser encontrada em cereais como trigo, cevada e aveia, em grãos de café e cacau, sementes oleaginosas, frutas frescas e secas (Da Rocha *et al.*, 2014; Daou *et al.*, 2021; El-Sayed *et al.*, 2022). Pode ser sintetizada por fungos do género *Aspergillus* e *Penicillium* com destaque

para *A. ochraceus*, *A. alliaceus*, *A. auricomus*, *A. carbonarius*, *A. glaucus*, *A. meleus*, *A. niger*, *P. nordicum* e *P. verrucosum* (Da Rocha *et al.*, 2014; Daou *et al.*, 2021; El-Sayed *et al.*, 2022).

2.2.Ocorrência de micotoxinas em África

Os países em vias de desenvolvimento têm registado um aumento de contaminação por micotoxinas o que resulta em perdas significativas na produção de alimentos (Omotayo *et al.*, 2019; Adeyeye *et al.*, 2021; Matusse *et al.*, 2023). A maior parte dos países em desenvolvimento encontra-se no continente africano e é aqui onde as condições climáticas de temperaturas elevadas e chuvas esparsas são registadas (Adeyeye *et al.*, 2021), para além disso em África há uma má implementação de políticas de análises alimentares rigorosas fazendo com que alimentos contaminados sejam vendidos e consumidos (Omotayo *et al.*, 2019).

Nestes países os produtos agrícolas constituem uma das principais fontes de rendimento, portanto a necessidade destes países exportadores obterem divisas é fundamental, por esta razão os grãos são selecionados em termos de qualidade, onde os grãos de melhor qualidade são destinados as exportações devido ao controlo rigoroso e legislações impostas pelos principais países importadores (Adeyeye, 2016; Chilaka *et al.*, 2022; Matusse *et al.*, 2024).

A contaminação por micotoxinas no continente africano representa um sério obstáculo para a concretização dos 17 Objectivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Organização das Nações Unidas (ONU) no âmbito da Agenda 2030 (Adeyeye *et al.*, 2021; Chilaka *et al.*, 2022).

O milho e o amendoim são duas culturas importantes em África, e estas são propensas a contaminação por aflatoxina (Johnson *et al.*, 2018). Os países da SADC são considerados altamente vulneráveis a contaminação por aflatoxinas e mesmo com este factor alarmante, estudos acerca dos níveis de contaminação das culturas alimentares nestes países ainda são escassos (Matusse *et al.*, 2024).

2.2.1. Micotoxinas em Moçambique

O nosso país tem como principal fonte de subsistência a agricultura, com 80% da população dependente dela como fonte de rendimento. O clima tropical húmido e as más práticas agrícolas contribuem para o desenvolvimento de fungos micotoxigénicos nas principais culturas de subsistência (Mussalama, 2023).

Moçambique é um dos países que apresenta escassez de estudos referentes a contaminação por micotoxinas, a maior parte da informação sobre os fungos toxigénicos provém de pesquisas estrangeiras o que tem dificultado a obtenção de informações sobre a real situação das micotoxinas no país (Cambaza *et al.*, 2018a). Apesar disso, com estes estudos foi possível provar que Moçambique é endémico de espécies de *Aspergillus* aflatoxigénicas (Cambaza *et al.*, 2018a).

Em Moçambique, as aflatoxinas são produzidas pelos mesmos fungos encontrados em outros países como o *A. flavus* e o *A. parasiticus*, estes são encontrados na região norte e centro do país com destaque para as províncias de Nampula, Tete e Zambézia. A maior parte dos estudos concentra-se na aflatoxina B1 e outros não distinguem os tipos de aflatoxinas, no entanto, estudos mencionados por Wyk *et al.*, (1999) detectaram as aflatoxinas B2, G1 e G2 em alimentos do país, especialmente no milho e amendoim.

As causas naturais como o clima tropical húmido, a seca e o estresse da temperatura favorecem o crescimento de espécies de *Aspergillus* nos campos de cultivo, em adição a isto, as pragas do solo, parasitas e doenças durante a pré-colheita contribuem para a danificação dos grãos permitindo que estes fungos ataquem os alimentos (Wyk *et al.*, 1999; Cambaza *et al.*, 2018a).

As intervenções mais recentes no país destinam-se principalmente em reduzir os níveis de contaminação nos alimentos o suficiente para permitir que estes sejam aceites no mercado internacional (Cambaza *et al.*, 2018c).

A tabela abaixo faz uma comparação da prevalência de aflatoxinas em diferentes alimentos ao longo dos anos, embora o número amostral seja diferente é possível notar que a cerveja, o milho e o amendoim apresentaram maiores prevalências 93%, 67% e 63%, respectivamente:

Tabela 1. Resumo dos estudos sobre aflatoxinas em Moçambique.

Ano	Produto	Amostra (n)	Prevalência (%)
1980	Feijão	54	17
	Cerveja	15	93
	Farinha de mandioca	12	25
	Milho	18	67
	Arroz	56	63
1985	Nozes	153	=
	Milho	168	=
1999	Nozes	4	8.3
2012	Nozes	23	
	Milho	13	
2017	Galinhas	80	13.8
	Fígado de galinha	100	39

Ao passar do tempo, os estudos actuais concentram-se na região Sul com destaque para as províncias de Gaza e Inhambane onde registou-se um aumento de contaminação nas culturas de milho e amendoim com *A. flavus* presente em 85,7% das amostras analisadas, todas estas foram reativas a AFPA (Ágar *Aspergillus flavus* e *parasiticus*) (Sitoe, 2024). Outros estudos realizados na região sul do país apontaram uma maior incidência de aflatoxinas em amostras de milho (Matusse *et al.*, 2024).

2.3. Estratégias para mitigação da contaminação por micotoxinas

Estudos não publicados em Moçambique, demonstraram que as técnicas de armazenamento e transporte de milho e amendoim no país não são as mais adequadas, nos mercados municipais por exemplo, estes produtos são muitas vezes comercializados em sacos a céu aberto estando assim sujeitos a humidade, poeiras e outros contaminantes, e quando armazenados estes alimentos são dispostos em locais inadequados. Portanto, a adoção de boas práticas de colheita, armazenamento, transporte e processamento dos grãos é fundamental para reduzir os níveis de contaminação por micotoxinas, no entanto a sua ocorrência torna-se inevitável e imprevisível o que representa um difícil desafio para a segurança alimentar (Alshannaq e Yu, 2017; Hamad *et al.*, 2023). Podem ser destacadas como estratégias de prevenção o melhoramento das plantas, as boas práticas agronómicas e a desintoxicação (Adeyeye, 2016).

Muitos estudos destacam estratégias com vista a reduzir os níveis de contaminação com base na remoção das micotoxinas nos alimentos pela adição de agentes de ligação de micotoxinas como argila bentonítica e montmorilonita que adsorvem estes metabólitos (Adeyeye, 2016), contudo, por nem todo o tipo de micotoxina poder ligar-se a estes agentes, tem-se usado métodos de desactivação a partir de enzimas, leveduras e cepas bacterianas (Adeyeye, 2016).

Estudos recentes apontam estratégias mais inovadoras para uma eliminação rápida e com tempo de processamento curto como o CAP (plasma atmosférico frio), as NEOs (nanopartículas e óleos essenciais naturais) e o uso de polifenóis e flavonoides (Hamad *et al.*, 2023). Apesar de muitos estudos indicarem o potencial promissor destas estratégias, ainda não foi possível alcançar uma descontaminação completa e, para além disso nenhuma estratégia atingiu 100% de eficiência e não podem ser consideradas universais para todas matrizes alimentares (Alshannaq e Yu, 2017; Hamad *et al.*, 2023).

No continente africano o controlo de micotoxinas é dividido em três estratégias: prevenção do crescimento dos fungos nas plantações e alimentos, descontaminação dos alimentos ou rações contaminadas como estratégia secundária e vigilância contínua de micotoxinas em plantações agrícolas e alimentos para animais e humanos (Tola e Kebede, 2016).

Em alguns países, incluindo Moçambique tem-se adoptado o uso de Aflasafe, um produto de controlo biológico composto por cepas nativas de *A. flavus* não produtoras de aflatoxina. Estas são introduzidas no campo onde realizam um processo de exclusão competitiva onde as cepas não tóxicas superam as cepas tóxicas. Foi relatado que em alguns estados da Nigéria houve reduções de contaminação de 80% em campos tratados em comparação com campos não tratados (Johnson *et al.*, 2018; Shabeer *et al.*, 2022).

Outra estratégia que tem sido usada, principalmente em culturas de milho, é a introdução de milho geneticamente modificado especificamente o milho-bt, para além dele oferecer resistência a insectos ele é muito menos infestado por micotoxinas, estudos apontaram que espigas de milho-bt apresentaram níveis mais baixos de FUMO e DON em comparação a espigas de milho não bt (Gbashi *et al.*, 2021).

2.4. Técnicas de detecção de micotoxinas em matrizes alimentares

As estratégias de mitigação da contaminação por micotoxinas muitas vezes não têm alcançado uma descontaminação completa das matrizes (Hamad *et al.*, 2023), surgiu assim a necessidade de

realização de testes para detectar estes metabólitos nas matrizes alimentares como forma de impedir que estes entrem na cadeia alimentar. Portanto, uma detecção precoce, rápida e eficaz tornou-se fundamental para a redução do perigo das micotoxinas com vista a prevenir os efeitos negativos que estas representam para a saúde (Adeyeye, 2016; Hamad *et al.*, 2023; Suo *et al.*, 2023). Diversos métodos analíticos foram validados para a análise de micotoxinas em alimentos, dentre testes imunoenzimáticos, técnicas cromatográficas e testes rápidos de triagem em tiras (Alshannaq e Yu, 2017; Suo *et al.*, 2023; Szelenberger *et al.*, 2024). Apesar deste progresso nas análises, estes métodos apresentam vários desafios e desvantagens como o facto de apresentarem dificuldades na detecção de contaminação por micotoxinas quando presentes em baixos níveis, o facto de existirem matrizes alimentares complexas que necessitam de processos de extração complicados, a diversidade de estruturas químicas das micotoxinas e a co-ocorrência de micotoxinas (Alshannaq e Yu, 2017).

2.4.1. Técnicas cromatográficas

As técnicas baseadas em cromatografia para análise de micotoxinas podem ser divididas em vários tipos: TLC (Cromatografia de camada fina), HPLC (Cromatografia líquida de alta performance) em conjunto de detectores como matriz de díodos, UV ou fluorescência, GC (Cromatografia gasosa) e UPLC (Cromatografia líquida de ultra performance) (Suo *et al.*, 2023; Szelenberger *et al.*, 2024). A técnica HPLC é considerada padrão-ouro para a detecção de micotoxinas em alimentos (Szelenberger *et al.*, 2024). A HPLC-FLD (Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência) destaca-se de entre as outras, acoplada a um método eficiente de extração e limpeza, este método é frequentemente usado para análises quantitativas de micotoxinas, com destaque para as aflatoxinas. As medições são realizadas com auxílio de um aparato de equipamentos como termostatos de coluna e detectores de fluorescência, após a corrida o equipamento gera um cromatograma que mostra o tempo de retenção e a intensidade do sinal de fluorescência, estes dados são então comparados com padrões já certificados (Alshannaq e Yu, 2017; Jakabová *et al.*, 2022). Este método apresenta certa sensibilidade e recuperação relativamente boa, no entanto a necessidade de limpeza extensiva e derivatização pré/pós-coluna para uma detecção adequada de micotoxinas constitui uma desvantagem (Alshannaq e Yu, 2017). Para além da HPLC-FLD, existe ainda a cromatografia líquida-espectrometria de massa em tandem (LC-MS), esta permite uma detecção quantitativa-qualitativa e precisa de micotoxinas e

seus derivados (Suo *et al.*, 2023; Szelenberger *et al.*, 2024). A LC-MS é mais sensível e eficaz (Adeyeye *et al.*, 2021; Szelenberger *et al.*, 2024).

2.4.2. Métodos imunoquímicos

Estes métodos baseiam-se em interações competitivas entre micotoxinas, que actuam como antígenos, e anticorpos atribuídos marcados com conjugados de toxina-enzima para muitos locais de ligação (Alshannaq e Yu, 2017). O teste mais usado é o ELISA (*Enzyme Linked Immuno-Assay*) e apesar de fornecer uma triagem rápida e ser validado para uma ampla variedade de matrizes alimentares, este requer etapas de incubação complicadas e processos repetidos de adição de amostras ao manusear múltiplos alvos (micotoxinas), este método também apresenta reatividade cruzada e dependência de uma matriz específica (Alshannaq e Yu, 2017; Suo *et al.*, 2023). Apesar disso, esta técnica apresenta um baixo custo e alta maturidade de aplicação no campo de detecção de micotoxinas, mas estes factos acabam tornando-se irrelevantes pois há uma necessidade de confirmação dos resultados através das técnicas cromatográficas por serem mais confiáveis e sensíveis pois incluem etapas de extração e limpeza das amostras usando colunas de imunoafinidade (Alshannaq e Yu, 2017; Suo *et al.*, 2023; Chandravarman *et al.*, 2024).

2.4.3. Método de triagem em tiras

A técnica de imunoensaio de fluxo lateral (LFA) é um teste simples que envolve o uso de leitos capilares (tiras de teste/fragmentos de papel poroso) para transportar analitos que serão capturados por elementos únicos responsáveis por reconhecer o analito de interesse (Szelenberger *et al.*, 2024). É um método fácil de operar se comparado a outras técnicas imunológicas e os resultados podem estar disponíveis em um tempo conciso o que facilita a implementação de autoexames em larga escala (Suo *et al.*, 2023).

O LFA é adequado para casos em que é necessário um diagnóstico POCT (*Point-of-Care-Testing*) devido ao seu componente de tira de teste e ao modo de medição visual, e o diagnóstico POCT é um dos objectivos finais para a determinação de micotoxinas (Suo *et al.*, 2023; Sadegui *et al.*, 2024). Embora o teste LFA seja rápido e simples de ser usado, características fundamentais para o diagnóstico POCT, este método apresenta uma sensibilidade limitada (Alshannaq e Yu, 2017; Sadegui *et al.*, 2024).

2.4.4. Biossensores electroquímicos

Os biossensores são dispositivos analíticos de detecção que usam transdutores eléctricos com vista a transformar reações biológicas em sinais eléctricos observáveis e quantificáveis (Sadegui *et al.*,

2024; Szelenberger *et al.*, 2024). No âmbito da detecção de micotoxinas em matrizes alimentares o biossensor baseado em eletroquimioluminescência (ECL) ganhou destaque por apresentar sensibilidade e especificidade maiores em comparação com métodos convencionais baseados em ácidos nucleicos (Szelenberger *et al.*, 2024). O ECL baseia-se em anticorpo e foi altamente sensível para a detecção de AFB1 em milho com faixa de sensibilidade entre 0,01 pg/ml a 100ng/ml (Szelenberger *et al.*, 2024).

2.4.5. Testes moleculares baseados em PCR

O uso de técnicas baseadas em moléculas para detectar micotoxinas são considerados mais confiáveis em relação a maioria das técnicas analíticas por apresentarem maior sensibilidade, especificidade e precisão (Rahimi *et al.*, 2021; Shabeer *et al.*, 2022). A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem como princípio a amplificação de regiões específicas do DNA, no âmbito da detecção de fungos toxigênicos tem se destacado o uso da PCR em tempo real (RT-qPCR), PCR multiplex (mPCR), PCR de transcriptase reversa (rt-PCR) e a PCR monoplex ou convencional.

Um passo importante e fundamental antes de realizar-se a detecção dos genes da via metabólica de produção das micotoxinas nos fungos, é a detecção destes ao nível do género e espécie. Para tal, diversas regiões genómicas que servem como marcadores de código de barras podem ser usadas, como a amplificação dos genes de RNA ribossómico (rRNA) da subunidade pequena (SSU), genes da subunidade maior (LSU), e os espaçadores internos transcritos não codificantes, ITS1 e ITS2 separados pelo gene 5.8s rRNA (Li *et al.*, 2019). A região ITS (espaçador interno transcrito) é a mais amplamente usada para estudos filogenéticos e de diagnóstico de géneros de fungos intimamente relacionados pois é considerada o código de barras universal para a comunidade fúngica (Li *et al.*, 2019; Rahman *et al.*, 2020b; Bradshaw *et al.*, 2023). Este marcador esta localizado na região correspondente aos genes 18S, 5.8S e 28S e inclui duas regiões, ITS1 e ITS2, estas são separadas pelo gene 5.8S (Li *et al.*, 2019). Portanto, a amplificação dos genes de uma destas regiões pode facilmente identificar corretamente os fungos (Schoch *et al.*, 2012).

Uma vez determinado o género do fungo, é possível inferir que a presença destes nos alimentos pode significar um risco para a saúde pública por serem capazes de sintetizar micotoxinas, porém é possível realizar análises mais detalhadas para averiguar se o fungo realmente apresenta um metabolismo de produção de micotoxinas.

Estes testes têm como alvo de amplificação um *cluster* de genes da via metabólica de produção de micotoxinas, no caso específico da AFB1 a sua via metabólica é constituída por oito genes que codificam enzimas que catalisam a conversão dos metabólitos da via em AFB1 (Al-Zaban *et al.*, 2023). Os genes envolvidos e as enzimas que estes codificam são apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Genes envolvidos na biossíntese de AFB1 e as suas respectivas enzimas e *primers* (Levin, 2012).

Gene	Sinónimo	Enzima	Primers	
<i>afl D</i>	<i>nor-1</i>	Redutase do ácido norsolínico	<i>nor-1</i> F	ACG-GAT-CAC-TTA-GCC-AGC-AC
			<i>nor-2</i> R	CTA-CCA-GGG-GAG-TTG-AGA-TCC
<i>afl I</i>	<i>avfA</i>	Averufina oxidase		Não documentado
				Não documentado
<i>afl M</i>	<i>ver-3</i>	Versicolorina A desidrogenase	<i>ver-1</i> F	GCC-GCA-GGC-CGC-GGA-GAA-AGT-GGT
			<i>ver-1</i> R	GGG-GAT-ATA-CTC-CCG-CGA-CAC-AGC-C
<i>afl O</i>	<i>omtB</i>	O-metiltransferase	<i>OmtB(F)</i> F	GCC-TTG-ACA-TGG-AAA-CCA-TC
			<i>OmtB(F)</i> R	CCA-AGA-TGG-CCT-GCT-CTT-TA
<i>afl P</i>	<i>omtA, omt-5</i>	O-metiltransferase	<i>Omt1</i> F	GCC-TTG-CAA-ACA-CAC-TTT-CA
			<i>Omt1</i> R	AGT-TGT-TGA-ACG-CCC-CAG-T
<i>afl Q</i>	<i>ord A</i>	Oxidoreductase	<i>ord 1508</i>	TTA-AGG-CAG-GGG-AAT-ACA-AG
			<i>ord 2226</i>	GAC-GCC-CAA-AGC-CGA-ACA-CAA-A
<i>afl R</i>	<i>afl-2, apa-8</i>	Factor de transcrição - Regulador positivo	<i>aflR</i> F	CGC-GCT-CCC-AGT-CCC-CTT-GAT-T
			<i>aflR</i> R	CTT-GTT-CCC-CGA-GAT-GAC-CA

2.4.6. Comparação entre os métodos de detecção de fungos e micotoxinas

A tabela a seguir compara as vantagens e desvantagens dos métodos usados na detecção de fungos e micotoxinas:

Tabela 3. Comparação entre os métodos de detecção de fungos e micotoxinas.

Método	Vantagens	Desvantagens
Microscopia	- Método relativamente barato; - Pode ser realizado em laboratórios de investigação de base; - Não exige pessoal altamente treinado.	- Permite apenas a verificação da diversidade dos fungos; - Não permite a identificação da espécie.
	- Permite a detecção de fungos não cultiváveis; - Identifica pontos críticos de controle pela detecção de genes ligados à produção de micotoxinas;	- Bandas de mesmo tamanho em gel podem não representar o mesmo fragmento de DNA; - Risco de contaminação por DNA exógeno;

PCR	• Possibilita estudo de diversos táxons.	• Possibilidade de falsos negativos, exigindo controlos positivos e negativos; • DNA de fungos semelhantes ao alvo pode gerar falsos positivos; • Genes comuns a diferentes micotoxinas aumentam risco de erro.
Técnicas Cromatográficas (HPLC, GC, LC-MS/MS)	• Alta sensibilidade e especificidade; • Permite quantificação precisa; • Identifica múltiplas micotoxinas simultaneamente.	• Custo elevado de equipamentos e reagentes; • Necessidade de pessoal altamente treinado; • Processos de extração e preparação complexos.
Métodos Imunoquímicos (ELISA)	• Rápidos e relativamente baratos; • Boa sensibilidade; • Adequados para análise de um grande número de amostras.	• Possibilidade de reações cruzadas, causando falsos positivos; • Menor precisão quantitativa comparado a métodos cromatográficos; • Necessitam de kits específicos.
Método de Triagem em Tiras (<i>Lateral Flow</i>)	• Extremamente rápido (minutos); • Fácil de usar no campo; • Não requer equipamento sofisticado.	• Resultados qualitativos ou semi-quantitativos; • Menor sensibilidade e especificidade que ELISA ou HPLC; • Vida útil limitada das tiras.
Biossensores Eletroquímicos	• Alta sensibilidade e possibilidade de detecção em tempo real; • Potencial para uso portátil; • Pode ser reutilizável dependendo do design.	• Tecnologia ainda pouco disponível comercialmente; • Necessidade de calibração frequente; • Sensores podem degradar com o tempo ou sofrer interferências ambientais.

3. Objectivos

3.1. Objectivo geral

- Detectar através de métodos moleculares fungos toxigénicos em produtos agrícolas em Moçambique.

3.2. Objectivos específicos

- Comparar dois métodos de extração de DNA, método de acetato de potássio optimizado e kit comercial, para a detecção de fungos toxigénicos;
- Identificar fungos toxigénicos em milho e amendoim através da amplificação da região ITS;
- Comparar o sucesso de amplificação da região ITS entre o DNA extraído pelo método de acetato de potássio e kit comercial;
- Optimizar e validar um protocolo de PCR para a detecção de genes da via de biossíntese de micotoxinas em fungos presentes em grãos de milho e amendoim;
- Determinar a frequência de ocorrência de fungos toxigénicos em amostras de milho e amendoim, comparando os níveis de contaminação entre essas duas culturas alimentares;
- Comparar os níveis de contaminação por fungos toxigénicos entre diferentes regiões de cultivo do país.

3.3. Hipóteses

H0: A técnica de PCR não será capaz de detectar fungos potencialmente toxigénicos em milho e amendoim;

H1: A técnica da PCR será capaz de detectar fungos potencialmente toxigénicos em milho e amendoim com maior eficiência em comparação as técnicas de cultura e microscopia;

H0: A aplicação de técnicas de PCR para a detecção de genes específicos envolvidos na biossíntese de micotoxinas em fungos não melhora a precisão e a rapidez da identificação de contaminações em alimentos como milho e amendoim, em comparação com métodos convencionais.

H2: A aplicação de técnicas de PCR para a detecção de genes específicos envolvidos na biossíntese de micotoxinas em fungos melhora significativamente a precisão e a rapidez da identificação de

contaminações em alimentos como milho e amendoim, em comparação com métodos convencionais.

4. Área de estudo

As amostras foram colectadas de diferentes regiões agroecológicas de Moçambique, país localizado no sudeste do continente africano e banhado pelo oceano Índico. O seu território possui mais de 30 milhões de hectares de terra arável e 70% da sua população usa a agricultura como fonte de subsistência. Moçambique divide-se em três regiões: região Sul composta pelas províncias de Maputo Cidade, Maputo Província, Gaza e Inhambane, região centro composta pelas províncias de Sofala, Manica, Tete e Zambézia e região norte composta pelas províncias de Nampula, Cabo Delgado e Niassa. Para o estudo foram usadas amostras de milho e amendoim colectadas em diferentes agroecologias do país nomeadamente: Região Sul (Boane, Marracuene, Boquisso e Manhiça), Região Centro (Manica), e Região Norte (Murrupula e Pemba).

Tabela 4. Localização geográfica dos pontos de coleta.

Regiões agroecológicas		Latitude	Longitude	Temperatura média anual	Precipitação média anual	Tipo de solo
Sul	Boane	S 26°0'55.90656"	E 32°19'21.52632"	24 - 26°C	400 - 600 mm	Solo arenoso, avermelhado e seco
	Boquisso	S 25°22'50.98764"	E 32°45'59.62932"	24 - 26°C	400 - 600 mm	Solo arenoso, avermelhado e seco
	Marracuene	S 25°26'0.79656"	E 32°42'8.06112"	24 - 26°C	400 - 600 mm	Solo arenoso, avermelhado e seco
	Manhiça	S 25°27'25.092"	E 32°39'19.49436"	24 - 26°C	400 - 600 mm	Solos arenosos semi-húmidos
Centro	Manica	S -19°29'59.99"	E 33°14'60.00"	20 - 22°C	Acima de 1200 mm	Solos vermelhos e castanhos
Norte	Murrupula	S -15°27'39.60"	E 38°40'51.60"	Acima de 26°C	Acima de 1200 mm	Solos vermelhos e castanhos
	Pemba	S -12°58'26.22"	E 20°31'3.90"	Acima de 26°C	800 - 1200 mm	Solos pouco profundos

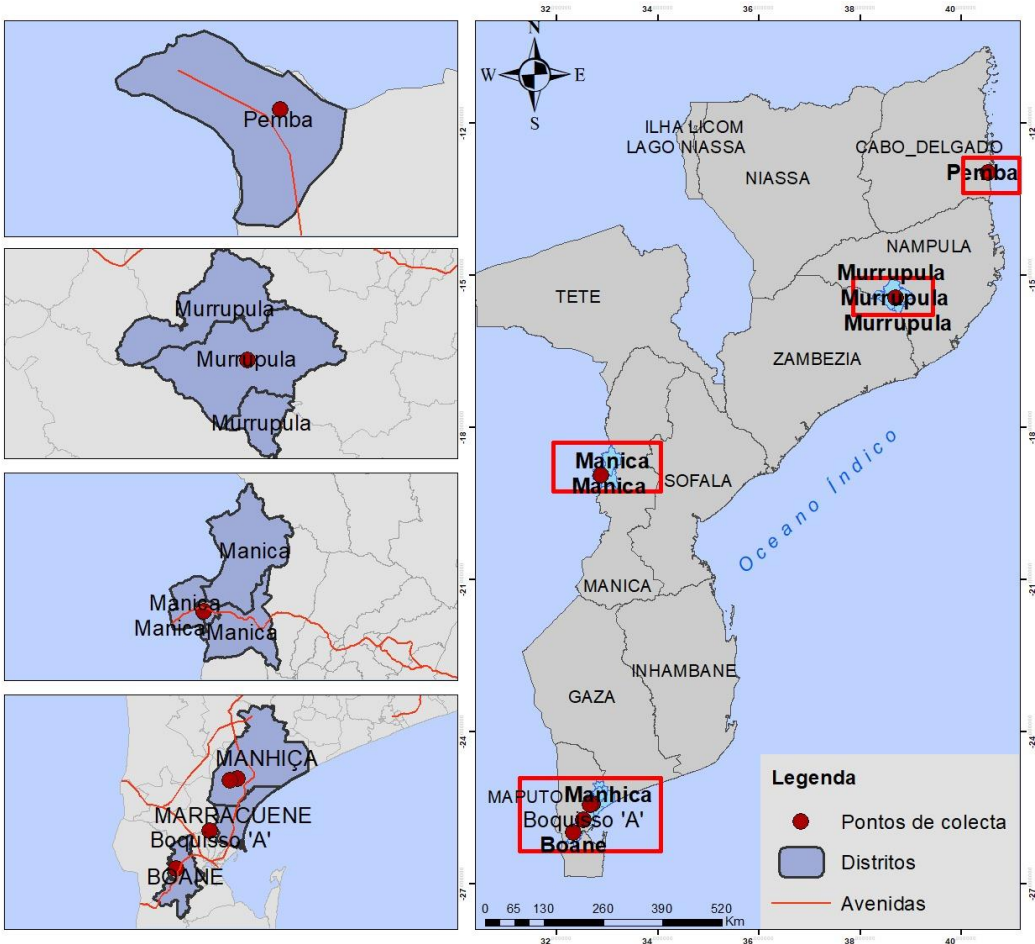


Figura 3. Mapa da área de estudo com os pontos de colecta: Boane, Boquisso, Marracuene, Manhica, Manica, Murrupula e Pemba. Fonte: ArcGIS.

As análises laboratoriais foram realizadas no Centro de Biotecnologia da Universidade Eduardo Mondlane (CB-UEM), que se encontra localizado em Maputo, tendo a sede de suas infraestruturas nas instalações da Faculdade de Veterinária da UEM (FAVET) sita na Av. De Moçambique, quilómetro 15 no bairro Luís Cabral, pertencente ao distrito municipal KaMubukwana.

5. Materiais e Métodos

5.1. Materiais

5.1.1. Instrumentos

- Kit de extração de DNA fúngico (Qiagen *AllPrep®Fungal DNA/RNA/Protein purification*);
- Kit de PCR *Supreme NZYTaQ II 2 x Green Master Mix*;
- Tubos para PCR;
- Tubos de 2 ml;
- Tubos de 1,5 ml;
- Micropipetas 10 µL, 200 µL e 1000 µL;
- Pontas de pipeta;
- Tubos para microcentrífuga;
- Suporte para microtubos;
- Suporte para tubos de 2 ml;
- Copos de Becker;
- Provetas;
- Pinças;
- Lâminas;
- Lamelas;
- Agulhas;
- Espátula;
- Bastões de maceração;
- Lamparina;
- Frascos de vidro;
- Moldes e pente para gel de agarose;
- Papel alumínio;
- Papel filtro;

- Parafilme;
- Marcador.

5.1.2. Equipamentos

- Microscópio óptico;
- Lupa;
- Termocicladores;
- Câmara de biossegurança;
- Capela de exaustão;
- Temporizador;
- Vórtex;
- Centrífuga refrigerada;
- Nanodrop one;
- Microcentrífuga;
- pH-metro;
- Liofilizador;
- Bloco de aquecimento;
- Frigorífico;
- Micro-ondas;
- Balança analítica;
- Cuba de electroforese;
- Fonte de alimentação de voltagem;
- Transiluminador UV;
- Luvas de látex;
- Batas descartáveis;
- Máscara cirúrgica.

5.1.3. Material biológico

- Amostras de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) com contaminação fúngica em câmara húmida;
- Amostras de milho (*Zea mays*) com contaminação fúngica em câmara húmida.

5.1.4. Materiais químicos

- Água molecularmente pura;
- Azul de lactofenol;
- Água destilada;
- Etanol 70%;
- Etanol absoluto;
- PVP (polivinilpirrolidona);
- Tris-HCL;
- Tris-Base;
- EDTA;
- NaCl;
- Proteinase K;
- SDS;
- Acetato de Potássio;
- Isopropanol absoluto;
- β -mercaptoetanol;
- *Primers* ITS1 e ITS4;
- *Primers aflR, nor-1, ver-1, omtB, omt-1 e ordA*;
- Agarose;
- TBE (Tris-borato-EDTA);
- TAE (Tris-acetato-EDTA);
- *Loading dye*;
- *GreenSafe Premium* (MB132);
- Marcadores de peso molecular 1 kb e 100 pb.

5.2. Amostragem

As amostras de grãos de milho e amendoim eram provenientes de um estudo prévio sobre detecção de fungos micotoxigénicos em produtos agrícolas em Moçambique. As amostras foram colhidas de sete regiões agroecológicas com três pontos de amostragem em cada, usou-se o método Zig-Zag para colectar dos campos de cultivo uma espiga de milho e quatro plântulas de amendoim em cada ponto. Nos principais mercados das regiões, colectou-se grãos de amendoim e milho de três pontos em cada mercado. Acondicionou-se as amostras em sacolas plásticas devidamente etiquetadas com a data, nome do local e tipo de amostra, estas foram armazenadas no frigorífico à -18°C. Todos os participantes do estudo forneceram as amostras de forma voluntária e informada mediante a assinatura de um termo de consentimento informado (Anexo 4). Os grãos foram dispostos em sistema de câmara húmida para indução do crescimento de micélio fúngico (Figura

1-Anexo) pelo método descrito por Mathur e Kongsdal (2003), e foram armazenados no laboratório de cultura de tecidos do Departamento de Ciências Biológicas UEM à -20°C até o momento de uso.

Para o estudo foram incluídas amostras de mercado e de campo como descrito na tabela 5.

Tabela 5. Amostras usadas para o estudo e a respectiva descrição.

Código da amostra	Região de coleta	Tipo de grão	Local de coleta
BQ-A-M	Boquisso	Amendoim	Mercado
BQ-A-C	Boquisso	Amendoim	Campo
BQ-M-M	Boquisso	Milho	Mercado
BQ-M-C	Boquisso	Milho	Campo
BN-M-M	Boane	Milho	Mercado
BN-A-M	Boane	Amendoim	Mercado
BN-M-C	Boane	Milho	Campo
MR-A-M	Marracuene	Amendoim	Mercado
MR-A-C	Marracuene	Amendoim	Campo
MR-M-M	Marracuene	Milho	Mercado
MR-M-C	Marracuene	Milho	Campo
MH-A-M	Manhiça	Amendoim	Mercado
MH-M-M	Manhiça	Milho	Mercado
MH-M-C	Manhiça	Milho	Campo
MH-A-C	Manhiça	Amendoim	Campo
MN-A-M	Manica	Amendoim	Mercado
MN-M-M	Manica	Milho	Mercado
MU-A-C	Murupula	Amendoim	Campo
MU-A-M	Murupula	Amendoim	Mercado
MU-M-C	Murupula	Milho	Campo
MU-M-M	Murupula	Milho	Mercado
PB-A-M	Pemba	Amendoim	Mercado
PB-A-C	Pemba	Amendoim	Campo
PB-M-M	Pemba	Milho	Mercado
PB-M-C	Pemba	Milho	Campo

5.3. Metodologia

5.3.1. Identificação morfológica dos fungos

Para cada amostra realizou-se uma identificação macroscópica e microscópica dos fungos presentes na superfície dos grãos a fim de identificar os gêneros de fungos presentes. As análises

macroscópicas foram realizadas na lupa e as microscópicas consistiram na preparação de lâminas com micélio fúngico coradas com azul de lactofenol e posteriormente observadas ao microscópio nas ampliações de 40X, 100X e 400X. Comparou-se as estruturas observadas com a literatura e atlas para a identificação de fungos filamentosos.

5.3.2. Identificação molecular dos fungos (Amplificação da região ITS)

5.3.2.1.Extração do DNA fúngico das amostras

De modo a otimizar o melhor método de extração de DNA fúngico para a identificação molecular dos fungos toxigênicos e posterior amplificação de genes das vias de biossíntese de micotoxinas, foram usados dois protocolos de extração: método otimizado de acetato de potássio descrito por Dellaporta *et al.*, (1983) para extração de DNA de folhas de plantas e kit comercial. Para cada amostra fez-se uma réplica. Ao final da extração avaliou-se a concentração, pureza e integridade do DNA.

A. Extração do DNA pelo método de acetato de potássio

O micélio dos fungos presente na superfície dos grãos foi removido com auxílio de pinças e agulhas e introduziu-se em microtubos de 1,5 ml. Macerou-se o conteúdo dos microtubos com PVP (polivinilpirrolidona) e adicionou-se 500 µL do tampão de extração composto por 100 mM de Tris-HCl, 50 mM de EDTA e 500 mM de NaCl à um pH de 8.0, de seguida vortexou-se os tubos por 2 minutos. Adicionou-se 33 µL de SDS à 20%, vortexou-se novamente durante 2 minutos e adicionou-se 20 µL de proteinase K em cada microtubo. Incubou-se os microtubos no termoblock por 1 hora à 65°C com agitação, de seguida adicionou-se 160 µL de acetato de potássio à 5 mM e vortexou-se por 2 minutos. Centrifugou-se os microtubos por 10 minutos à 14 000 rpm em temperatura ambiente, removeu-se o sobrenadante de aproximadamente 400 µL e transferiu-se o mesmo para um novo microtubo de 1,5 ml. Adicionou-se 330 µL de isopropanol aos microtubos e inverteu-se suavemente 50x, após este processo colocou-se os microtubos em um refrigerador à -20°C durante 30 minutos de modo a evitar a precipitação dos polissacarídeos. Centrifugou-se os microtubos à 14 000 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente e descartou-se o sobrenadante cuidadosamente. De seguida adicionou-se 500 µL de etanol 70%, centrifugou-se por 30 segundos e descartou-se novamente o sobrenadante, repetiu-se este processo uma vez. Adicionou-se 250 µL de etanol absoluto, centrifugou-se por 5 minutos à 14 000 rpm e descartou-se o sobrenadante. Por fim, deixou-se o *pellet* secar por 60 minutos, adicionou-se 50 µL de tampão de eluição composto

de 10 mM de Tris-base e 0,1 mM de EDTA e armazenou-se o DNA extraído em um refrigerador à -20°C.

B. Extração do DNA pelo kit comercial

O DNA dos fungos presentes na superfície dos grãos foi extraído usando um kit comercial *Qiagen*® *AllPrep Fungal DNA/RNA/Protein purification*. Retirou-se micélio presente na superfície dos grãos com auxílio de espátulas e pinças e introduziu-se em um *PowerBead* tube. O *PowerBead* tube consistia em um tubo de aproximadamente 2 ml com esferas de vidro, após a introdução do micélio presente nas amostras nestes tubos, adicionou-se em cada um 350 µL da solução HC previamente preparada com β-mercaptoetanol. Vortexou-se os tubos usando um adaptador por 10 minutos em velocidade máxima e a seguir adicionou-se 175 µL da solução MR previamente aquecida a 65°C por 10 minutos, e vortexaram-se novamente os tubos por 10 segundos. Os tubos foram centrifugados a 15000 x g por 2 minutos em temperatura ambiente antes de seguir-se para a etapa de purificação do DNA.

Para purificar o DNA das amostras transferiu-se aproximadamente 350 µL do lisado para uma coluna de purificação *MBspin*, estas foram de seguida centrifugadas por 1 minuto a 15000 x g e transferiu-se a coluna para um novo tubo de coleta de 2 ml. Neste tubo adicionou-se 650 µL de solução EA, centrifugou-se a 15000 x g por 1 minuto, descartou-se o fluxo e adicionou-se 650 µL da solução IW e no fim centrifugou-se nas mesmas condições da adição da solução EA.

Após a centrifugação, descartou-se o fluxo e passou-se a coluna para um novo tubo que foi centrifugado a 15000 x g por 2 minutos. Transferiu-se a coluna para um novo tubo onde adicionou-se 100 µL do tampão de eluição EB, incubou-se por 1 minuto em temperatura ambiente e no final voltou-se a centrifugar por 1 minuto nas mesmas condições e armazenou-se o DNA eluído na geleira a -4°C.

5.3.2.2.Quantificação do DNA extraído

O DNA extraído foi quantificado usando um Nanodrop onde obteve-se valores referentes a concentração do DNA em ng/µL, a razão A260/A280 referente a pureza do DNA extraído e a razão A260/A230 referente ao índice de contaminantes orgânicos.

O DNA foi também quantificado por electroforese em gel de agarose a 1%. Para tal, pesou-se 0,75 gramas de agarose e dissolveu-se em 75 ml de TAE (40 mM tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 8.0), aqueceu-se a solução no micro-ondas até que esta se dissolvesse e quando esta arrefeceu até

aproximadamente 65°C adicionou-se 3,75µL de gel Stain e depositou-se a solução na tina com o respectivo adaptador e pente. As amostras foram carregadas nos poços com aproximadamente 1 µL de *Loading dye* para 3 µL de DNA, adicionou-se também um marcador de peso molecular de 1 kb. Correu-se o gel por 45 minutos com uma voltagem de 80V. Após a corrida o gel foi visualizado em um Transiluminador UV.

5.3.2.3.Liofilização do DNA extraído

Um total de 100 amostras de DNA foi submetido ao processo de liofilização para permitir o seu transporte do Centro de Biotecnologia Centro da Universidade Eduardo Mondlane (CB-UEM) para o Laboratório Central do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa (UNL-IHMT), Portugal.

Inicialmente, foram aliqüotadas 25 µL de cada amostra – tanto as obtidas pelo método de acetato de potássio quanto pelas extraídas com o kit – para microtubos novos, sendo preparada uma réplica por amostra. As amostras foram colocadas a -80°C por 1 hora para congelamento prévio e, posteriormente, submetidas ao liofilizador por 4 horas e 30 minutos.

Após a liofilização, as amostras foram conservadas e transportadas à temperatura ambiente, assegurando que não fossem expostas a temperaturas extremas. Durante o transporte, foram incluídos: a identificação das amostras, a concentração de DNA, o protocolo de liofilização, os contactos do remetente e do destinatário, bem como a declaração de material não infeccioso.

À chegada ao laboratório de destino, cada amostra foi reconstituída em 25 µL de tampão TE, homogeneizada por inversão, vortexada suavemente e centrifugada em *short spin*. Em seguida, foram armazenadas a -20°C até a utilização nas reacções de PCR.

5.3.2.4.Amplificação da região ITS através da PCR convencional

A reacção de PCR convencional visando a amplificação da região ITS realizou-se usando o kit de PCR *Supreme NZYTaQ II 2 x Green Master Mix* e os *primers* universais ITS 1 e ITS4 (Tabela 6). Os *primers* liofilizados foram ressuspensos para uma solução de 100 µM, da qual foi preparada uma solução de trabalho (1:4) de 25 µM (10 µL *stock* em 30 µL água ultrapura). A mistura de PCR foi preparada de acordo com o número de amostras de DNA incluindo as réplicas e dois controlos, um positivo e um negativo. O controlo positivo continha DNA fúngico conhecidos e o controlo negativo não continha DNA. Todo o processo de preparação da reacção ocorreu na cabine de fluxo laminar onde descongelou-se os reagentes e as amostras em temperatura ambiente, estes foram combinados e optimizados para um volume final de 25 µL. Adicionou-se em cada tubo 12,5 µL da

solução *Supreme NZYTaQ 2x Green Master Mix* previamente misturada por inversão do tubo, 0,25 µL de cada *primer*, 2 µL de DNA molde, completou-se o volume com água ultrapura e misturou-se a solução suavemente. A PCR decorreu em 37 ciclos dos quais, 1 para a desnaturação inicial à 95°C por 5 minutos, 35 para a desnaturação à 94°C por 30 segundos, anelamento à 60°C por 30 segundos e extensão à 72°C por 30 segundos e, 1 ciclo para a extensão final à 72°C por 10 minutos.

Tabela 6. *Primers* usados para a amplificação da região ITS.

<i>Primer</i>	Tamanho do <i>primer</i> (pb)	Sequência 5'-3'	Tamanho do produto (pb)
ITS1	19	5- TCC GTA GGT GAA CCT GCG G- 3	600 pb ± 50
ITS4	20	5- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC- 3	600 pb ± 50

Tabela 7. Resumo das condições de amplificação da região ITS.

Componente	Volume por reação		Etapa	Objectivo	Temperatura (°C)	Tempo	Nº de ciclos
<i>Supreme NZYTaQ II 2x Green Master Mix</i>	12,5 µL						
<i>Primer ITS1</i>	0,25 µL		1	Desnaturação inicial	95°C	5 min	1
<i>Primer ITS4</i>	0,25 µL		2	Desnaturação	94°C	30 s	35
DNA molde	2,0 µL		3	Anelamento	60°C	30 s	
Água ultrapura	10 µL		4	Extensão	72°C	30 s	
Volume final	25 µL		5	Extensão final	72°C	10 min	1

5.3.2.5. Gel de agarose para visualização dos produtos da PCR.

Os produtos da PCR incluindo os controlos positivo e negativo e o marcador de peso molecular foram visualizados através de uma corrida electroforética em gel de agarose à 1%. Para tal, pesou-se 1,0 grama de agarose e dissolveu-se em 100 ml de TBE 1x (0,1 M Tris-Base; 0,1 M ácido bórico; 0,005 M EDTA; pH 8,3), aqueceu-se a solução no micro-ondas até que esta se dissolvesse e quando esta arrefeceu até aproximadamente 65°C, adicionou-se 2 µL de corante *GreenSafe Premium* (MB132) e depositou-se a solução na tina com o respectivo adaptador e pente. Nos poços carregou-se 5 µL de cada *amplicon* e adicionou-se um marcador de peso molecular de 100 pb. Correu-se o gel por 1 hora e 30 minutos com uma voltagem de 100V. Após a corrida o gel foi visualizado em um Transiluminador UV *ChemiDoc Imaging System*, onde avaliou-se a presença

de bandas com peso molecular próximo do esperado entre 580 – 650 pb que representavam a presença de fungos toxigênicos do género *Aspergillus*, *Penicillium* ou *Fusarium*.

5.3.2.6. Interpretação dos resultados da PCR

Após a confirmação da banda de aproximadamente 600 pb no gel de agarose, comparou-se o dado com os resultados da identificação morfológica para aferir o género identificado. Para além disso, o tamanho da banda foi ainda comparado usando o software NCBI *Primer-BLAST*, este foi programado para exibir produtos de uma faixa de tamanho de 500 a 700 pb, restringiu-se o grupo taxonómico para cada um dos géneros identificados morfolologicamente limitando a pesquisa à base de dados *nt* (coleção de nucleotídeos), por fim executou-se o programa.

5.3.3. Amplificação dos genes da via de biossíntese de aflatoxina B1 (AFB1)

A composição da mistura de PCR e as condições de amplificação usadas para amplificação de genes da via de biossíntese de AFB1 também se basearam no protocolo usado para a amplificação da região ITS com optimização da temperatura de anelamento. Primeiramente, seleccionou-se todas amostras positivas para o género *Aspergillus* para que os genes *aflR*, *nor-1*, *ver-1*, *omtB*, *omt-1* e *ordA* fossem amplificados. Cada amostra foi submetida a 6 reacções de PCR para cada um dos genes, respectivamente. O processo de preparação da reacção de PCR decorreu dentro da cabine de fluxo laminar onde foram preparadas reacções para um volume final de 25 µL para cada série: série 1 - amplificação do gene *aflR*, série 2 - amplificação do gene *nor-1*, série 3 - amplificação do gene *ver-1*, série 4 - amplificação do gene *omtB*, série 5 - amplificação do gene *omt-1* e série 6 - amplificação do gene *ordA*. Na cabine de fluxo laminar, descongelou-se os reagentes e as amostras em temperatura ambiente bem como os controlos positivo e negativo, o controlo positivo continha DNA do fungo *Aspergillus* e o controlo negativo não continha DNA. Adicionou-se em cada tubo 12,5 µL da solução *Supreme NZYTaQ 2x Green Master Mix* previamente misturada por inversão do tubo, 0,25 µL de cada *primer*, 2 µL de DNA molde, completou-se o volume com água ultrapura e misturou-se a solução suavemente. A PCR decorreu em 37 ciclos dos quais, 1 para a desnaturação inicial à 95°C por 5 minutos, 35 para a desnaturação à 94°C por 30 segundos, anelamento à 58°C por 30 segundos e extensão à 72°C por 30 segundos e, 1 ciclo para a extensão final à 72°C por 10 minutos.

Tabela 8. Primers usados para a amplificação dos genes da biossíntese de AFB1.

Gene	Primer	Tamanho do primer (pb)	Sequência 5'- 3'	Tamanho do produto (pb)	Referência
<i>aflD/nor-1</i>	<i>nor-1</i> F	20	5'- ACG GAT CAC TTA GCC AGC AC- 3'	990	Rodrigues <i>et al.</i> , (2007)
	<i>nor-2</i> R	21	5'- CTA CCA GGG GAG TTG AGA TCC- 3'		
<i>aflM/ver-1</i>	<i>ver-1</i> F	24	5'- GCC GCA GGC CGC GGA GAA AGT GGT- 3'	537	Levin (2012)
	<i>ver-1</i> R	25	5'- GGG GAT ATA CTC CCG CGA CAC AGC C- 3'		
<i>aflO/omtB</i>	<i>OmtB-F</i> -F	20	5'- GCC TTG ACA TGG AAA CCA TC- 3'	1333	Rodrigues <i>et al.</i> , (2007)
	<i>OmtB-F</i> -R	20	5'- CCA AGA TGG CCT GCT CTT TA- 3'		
<i>aflP/omt-1/omtA</i>	<i>Omt1</i> -F	20	5'- GCC TTG CAA AGA CAC TTT CA- 3'	1490	Rodrigues <i>et al.</i> , (2007)
	<i>Omt1</i> -R	19	5'- AGT TGT TGA ACG CCC CAG T- 3'		
<i>aflQ/ordA</i>	<i>ord</i> -1508	20	5'- TTA AGG CAG GGG AAT ACA AG- 3'	719	Sweeney <i>et al.</i> , (2000)
	<i>ord</i> -2226	22	5'- GAC GCC CAA AGC CGA ACA CAA A- 3'		
<i>aflR/afl-2/apa-2</i>	<i>aflR</i> -F	22	5'- CGC GCT GCC AGT CCC CTT GAT T- 3'	630	Sweeney <i>et al.</i> , (2000)
	<i>aflR</i> -R	20	5'- CTT GTT CCC CGA GAT GAC CA- 3'		

Tabela 9. Resumo das condições de PCR para amplificação dos genes da biossíntese de AFB1.

Componente	Volume por reação		Etapa	Objectivo	Temperatura (°C)	Tempo	Nº de ciclos
<i>Supreme NZYTa II 2x Green Master Mix</i>	12,5 µL						
<i>Primer Forward</i>	0,25 µL		1	Desnaturação inicial	95°C	5 min	1
<i>Primer Reverse</i>	0,25 µL		2	Desnaturação	94°C	30 s	35
DNA molde	2,0 µL		3	Anelamento	58°C	30 s	
Água ultrapura	10 µL		4	Extensão	72°C	30 s	
Volume final	25 µL		5	Extensão final	72°C	10 min	1

5.3.3.1.Preparação de gel de agarose para visualização dos produtos de amplificação dos genes de biossíntese

Os produtos da PCR incluindo os controlos positivo e negativo e o marcador de peso molecular foram visualizados através de uma corrida electroforética em gel de agarose à 1%. Para tal, pesou-se 1,0 grama de agarose e dissolveu-se em 100 ml de TBE 1x (0,1 M Tris-Base; 0,1 M ácido bórico; 0,005 M EDTA; pH 8,3), aqueceu-se a solução no micro-ondas até que esta se dissolvesse e quando esta arrefeceu até aproximadamente 65°C, adicionou-se 2 µL de corante *GreenSafe Premium* (MB132) e depositou-se a solução na tina com o respectivo adaptador e pente. Nos poços carregou-se 5 µL de cada amplicon e adicionou-se um marcador de peso molecular de 100 pb. Correu-se o gel por 1 hora e 30 minutos com uma voltagem de 100V. Após a corrida o gel foi visualizado em um Transiluminador UV *ChemiDoc Imaging System*, onde avaliou-se a presença de bandas com aproximadamente 630 pb para a amplificação do gene *aflR*, 990pb para o gene *nor*-

1, 537 pb para o gene *ver-1*, 1333 pb para o gene *omtB*, 1490 pb para o gene *omt-1* e 719 pb para o gene *ordA*.

5.4. Análise de dados

Os resultados obtidos foram organizados e analisados no Excel versão 16.0 e no software IBM SPSS versão 20. O nível de significância foi estabelecido a 5%.

Para a análise dos dados obtidos através da identificação morfológica, calculou-se as frequências dos principais gêneros encontrados em cada amostra.

Os dados relativos da extração de DNA foram testados quanto a sua normalidade pelo teste de Shapiro-wilk W.

Para comparar os resultados relativos a concentração e índice de contaminantes orgânicos entre os métodos de extração usou-se o teste Wilcoxon *sign test* uma vez que os dados não apresentaram distribuição normal.

Para comparar o índice de pureza entre os métodos de extração aplicou-se o teste *t* para amostras dependentes (*t paired test*) uma vez que os dados apresentaram distribuição normal.

Para comparar o sucesso de amplificação entre o DNA obtido dos dois métodos de extração aplicou-se o teste de McNemar.

Para comparar a frequência de ocorrência dos gêneros de fungos toxigênicos detectados entre as amostras de amendoim e milho aplicou-se o teste exacto de Fisher.

Para comparar os níveis de contaminação por fungos toxigênicos entre as diferentes regiões de coleta calculou-se as frequências de ocorrência de cada gênero em cada um dos locais.

6. Resultados

6.1. Principais géneros de fungos identificados morfologicamente

Os principais géneros de fungos identificados nas diferentes amostras de milho e amendoim foram o género *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. A presença destes variou entre as amostras, como exibido na tabela 1 (Anexo 2), na amostra de milho colectada nos mercados de Boquisso por exemplo, detectou-se os três géneros de fungos toxigénicos, o mesmo não aconteceu com a amostra de amendoim colectada no mesmo local em que somente detectou-se a presença dos fungos do género *Aspergillus* e *Penicillium*. Nas amostras de milho e amendoim colectadas nos mercados do distrito da Manhiça e na amostra de amendoim colectada em campos do mesmo local, detectou-se apenas um único género de fungos, o *Aspergillus*, no entanto o mesmo não aconteceu com a amostra de milho colectada nos campos de cultivo desta região, nesta só foi possível detectar o género *Penicillium*.

Na tabela 1 (Anexo 2) também é possível observar que, a maior parte das amostras foi positiva para o género *Aspergillus*, este apresentou maior frequência (84%) em relação aos outros géneros. O género *Penicillium* (56%) foi o segundo mais frequente entre as amostras, seguido do género *Fusarium* (32%).

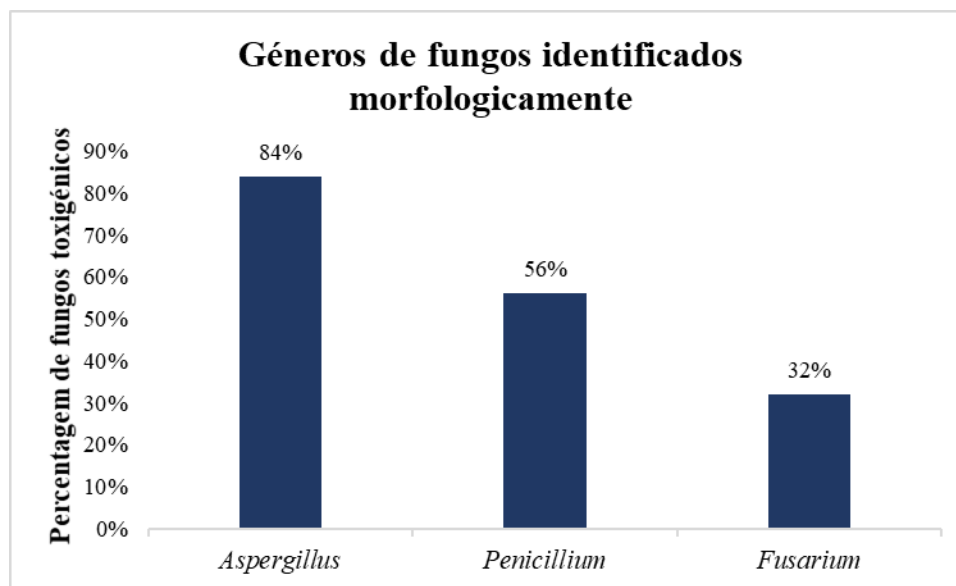


Figura 4. Principais géneros de fungos identificados morfologicamente. No total o género *Aspergillus* apresentou uma frequência de 84%, seguido dos géneros *Penicillium* e *Fusarium* com 56% e 32%, respectivamente.

Destacou-se também a presença de um género não toxigénico, o *Rhizopus* com uma frequência de 68%.

6.2. Concentração, índices de pureza e de contaminantes orgânicos do DNA extraído pelos métodos de acetato de potássio e kit comercial

A concentração de DNA extraído entre os dois métodos apresentou diferenças estatisticamente significativas ($p=0$) como apresentado na tabela 10, com o método de acetato de potássio tendo apresentado melhores concentrações de DNA extraído. Os índices de pureza entre o método de acetato de potássio e kit comercial não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p=0,249$), em comparação aos índices de contaminantes orgânicos, estes apresentaram diferenças significativas ($p=0,001$) com o método de acetato de potássio apresentando melhores índices.

Tabela 10. Resultados do teste de Wilcoxon para a comparação da concentração, índice de pureza e de contaminantes orgânicos entre o método de acetato de potássio e kit comercial.

	Conc_Kit - Conc_Acetato	Contam_Kit - Contam_Acetato
Z	-4,238 ^b	-3,377 ^b
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000	,001

Tabela 11. Resultados do teste *t* pareado para a comparação do índice de pureza entre o método de acetato de potássio e kit comercial.

		Paired Differences				t	df	Sig. (2-tailed)	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower				Upper
Pair 1	Pureza_Acetato - Pureza_Kit	,0692000	,2927729	,0585546	-,0516507	,1900507	1,182	24	,249

Como destacado na tabela 10, a concentração e o índice de contaminantes orgânicos entre os dois métodos apresentou um $p \leq 0,05$ e o índice de pureza um $p > 0,05$ (tabela 11) o que indica que foram observadas diferenças significativas no que diz respeito a concentração e índice de contaminantes orgânicos entre o método optimizado de acetato de potássio e o kit comercial, o mesmo não foi observado quanto ao índice de pureza entre os métodos.

A concentração do DNA extraído apresentou variações entre as amostras com valores em um intervalo de 3,75 a 1528 ng/μL para o método de acetato de potássio e 3,65 a 118,3 ng/μL para o kit comercial como mostram as tabelas 4 e 5 (Anexo).

O método otimizado de acetato de potássio apresentou um bom desempenho em termos de concentração de DNA extraído com uma média de 327,5 ng/μL, em comparação as concentrações obtidas através do kit comercial com uma média de 24,7 ng/μL, como podemos observar no gráfico abaixo (Figura 5).

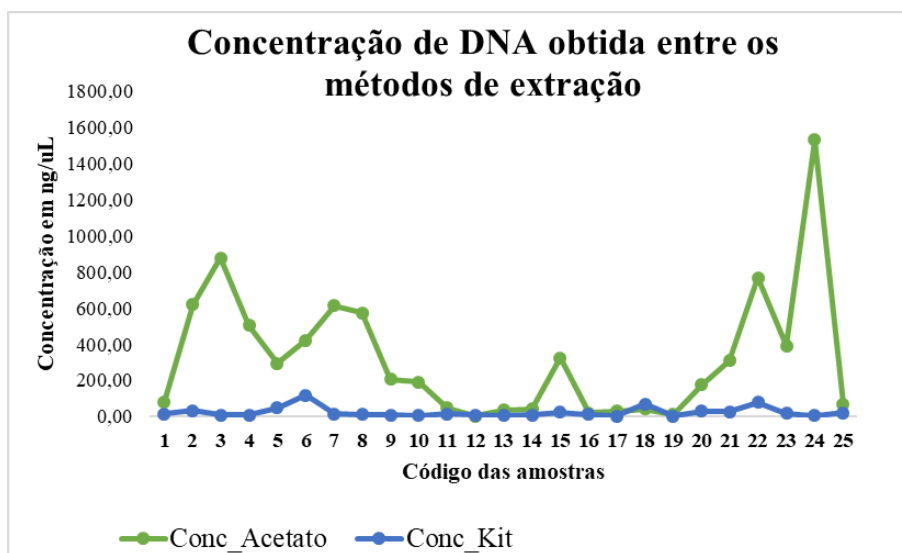


Figura 5. Comparação da concentração de DNA em ng/μL entre o método otimizado de acetato de potássio (Conc_Acetato) e Kit comercial (Conc_Kit). O método otimizado de acetato de potássio apresentou concentrações de DNA mais elevadas (3,75 a 1528 ng/μL) em relação ao DNA extraído pelo kit comercial em 92% das amostras analisadas. O DNA do kit comercial superou as concentrações do DNA extraído pelo método de acetato de potássio em apenas 8% das amostras analisadas, as concentrações de DNA proveniente do kit comercial apresentaram uma escala de 2,35 a 118,3 ng/μL. As diferenças foram estatisticamente significativas ($Z=-4,238$; $p\leq 0,05$).

O índice de pureza do DNA extraído entre os dois métodos apresentou valores semelhantes, com uma média de 1,94 e 1,87 para o método de acetato de potássio e para o kit comercial, respectivamente. O índice de pureza obtido do DNA extraído pelo método de acetato de potássio apresentou valores em uma escala de 1,35 a 2,65, com uma moda de 1,86 o que indica que o DNA extraído apresentou índices de pureza adequados embora algumas amostras tenham apresentado valores abaixo e acima do limite adequado, 1,8 e 2,0, respectivamente, o que pode indicar presença

de proteínas e RNA. O DNA extraído pelo kit comercial apresentou valores em uma escala de 1,59 a 2,20, com uma moda de 1,75.

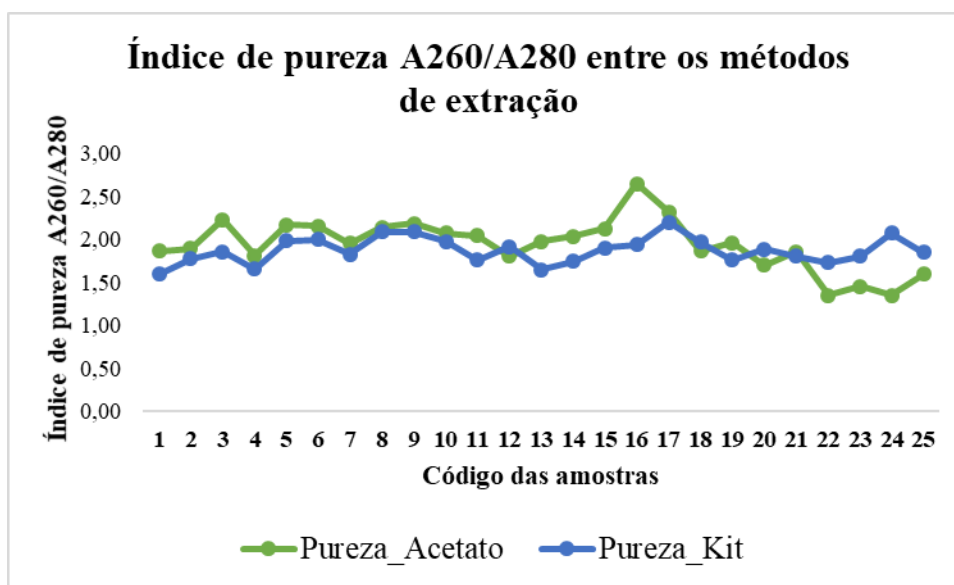


Figura 6. Comparação do índice de pureza entre o método otimizado de acetato de potássio (Pureza_Acetato) e kit comercial (Pureza_Kit). O teste estatístico mostrou que não houve diferenças estatisticamente significativas ($0,249 > 0,05$) de índice de pureza entre os métodos ($t=1,182$; $p > 0,05$).

O índice de contaminantes orgânicos do DNA extraído entre os dois métodos apresentou diferenças significativas ($0,001 < 0,05$), o índice de contaminantes do DNA extraído pelo método otimizado de acetato de potássio apresentou valores entre 0,30 à 2,22 com uma moda de 1,55, o kit comercial apresentou valores entre 0,08 à 1,79 com uma moda de 0,27, estes valores estão abaixo do limite adequado de índice de contaminação orgânica (1,8 à 2,2).

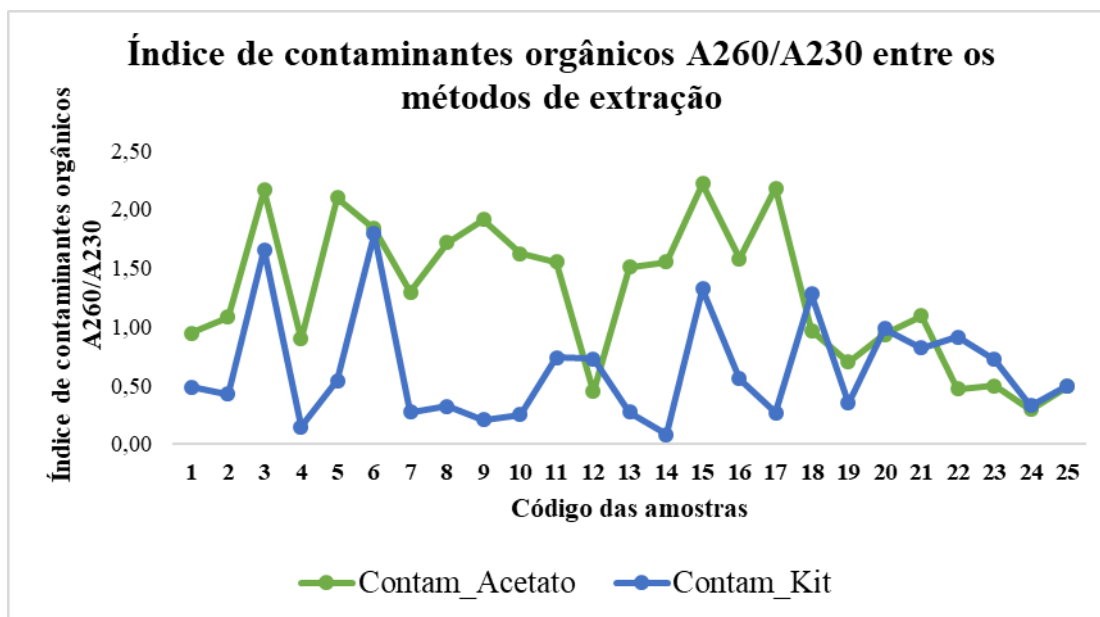


Figura 7. Comparação do índice de contaminantes orgânicos entre os métodos de acetato de potássio (Contam_Acetato) e Kit comercial (Contam_Kit). O índice de contaminantes obtido no método de acetato de potássio apresentou valores mais elevados (0,30 a 2,22) em relação ao kit comercial (0,08 a 1,79) o que é adequado para a qualidade do DNA extraído. Os valores foram maiores em 18 das 25 amostras analisadas para o método de acetato de potássio, o que significa que se observou diferenças estatisticamente significativas entre estes dois métodos ($Z=-3,377$; $p \leq 0,05$).

6.2.1. Gel de agarose e integridade do DNA extraído

O DNA extraído apresentou um peso molecular superior a 10 000 bp, tanto para o método de acetato de potássio como para o kit comercial. No entanto, o DNA extraído pelo método de acetato de potássio apresentou arrastões intensos e dispersos no gel, enquanto o DNA extraído pelo kit comercial apresentou arrastões leves em determinadas amostras, como nas amostras 18, 18', 20, 20', 23 e 25 (Figura 9).

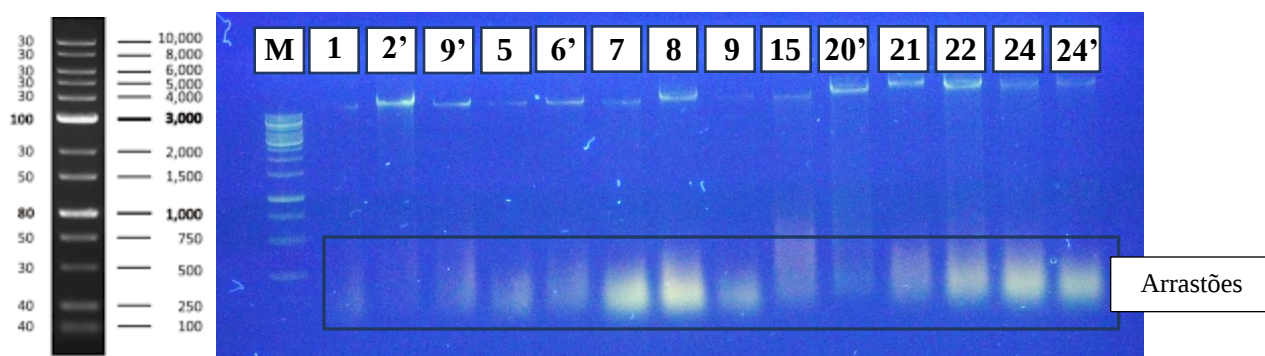


Figura 8. Gel de agarose 1% do DNA extraído pelo método de acetato de potássio. O DNA apresentou bandas ligeiramente definidas com um alto peso molecular. Nota-se também arrastões intensos no gel o que pode indicar presença de contaminantes ou de DNA de fragmentos menores.

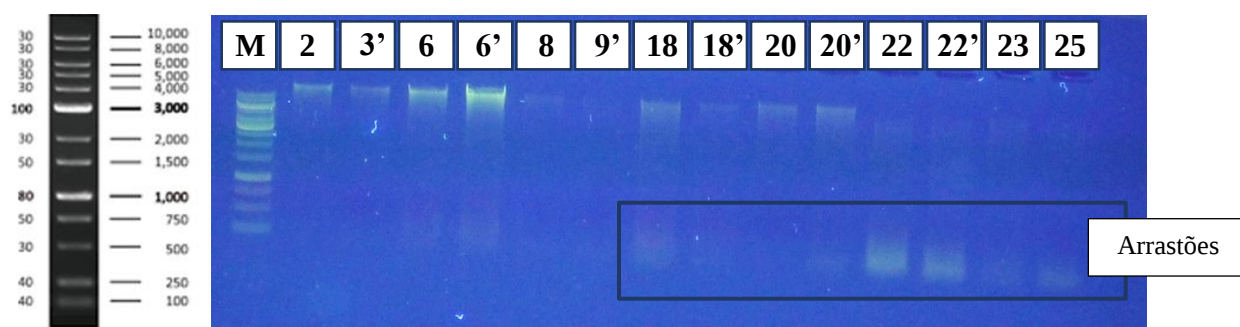


Figura 9. Gel de agarose 1% do DNA extraído pelo kit comercial. Algumas amostras apresentaram bandas ligeiramente definidas (amostra 6 e 6'), no entanto a maioria apresentou bandas menores e fracas. Observou-se também a presença de arrastões de pouca intensidade.

6.3. Principais géneros de fungos identificados através da amplificação da região ITS

A amplificação da região ITS usando as amostras de DNA extraído pelos dois métodos, acetato de potássio e kit comercial, produziu bandas padronizadas com um peso molecular esperado de aproximadamente 600 pb.

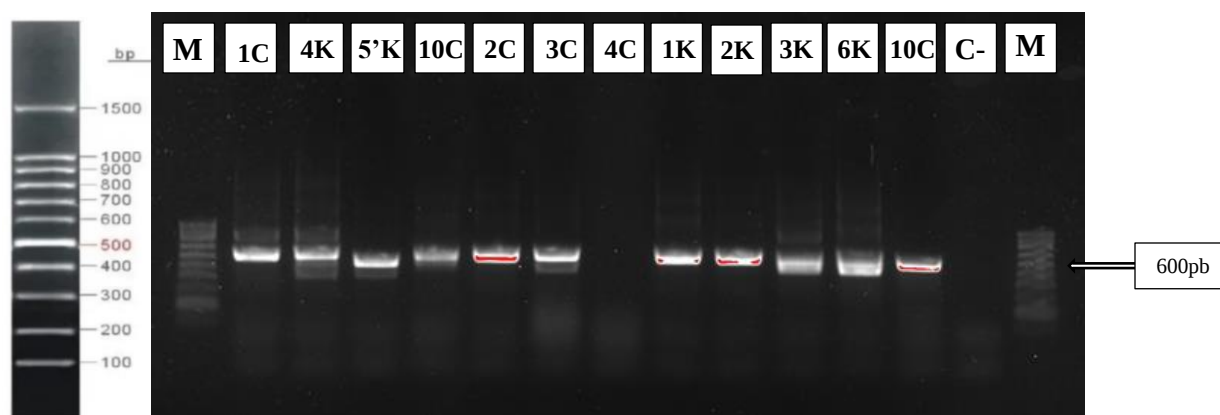


Figura 10. Gel de agarose 1% do DNA amplificado usando os *primers* ITS1 e ITS4. Legenda: M- marcador 100pb; Linha 1C- amostra de amendoim do mercado de Boquisso extraída pelo método de acetato de potássio; Linha 4K- amostra de amendoim do mercado de Boane extraída pelo kit comercial; Linha 5'K- amostra de amendoim do mercado de Manhiça extraída pelo kit comercial; Linha 10C- amostra de milho do campo de Marracuene extraída pelo método de acetato de potássio; Linha 2C- amostra de amendoim do mercado de Manica extraída pelo método de acetato de potássio; Linha 3C- amostra de milho do mercado de Boane extraída pelo método de acetato de potássio; Linha 4C- amostra de amendoim do mercado de Boane extraída pelo método de acetato de potássio; Linha 1K- amostra de amendoim do mercado de Boquisso extraída pelo kit comercial; Linha 2K- amostra de amendoim do mercado de Manica extraída pelo kit comercial; Linha 3K- amostra de milho do mercado de Boane extraída pelo kit comercial; Linha 6K- amostra de milho do mercado de Pemba extraída pelo kit comercial; Linha 10C- amostra de milho do campo de Marracuene extraída pelo método de acetato de potássio; C-: controlo negativo. Podemos observar que os produtos de amplificação apresentaram um peso molecular de 600 pb, tanto para as amostras do método de acetato de potássio quanto para as do kit, com exceção da amostra da linha 4C correspondente ao amendoim do mercado de Boane, esta só amplificou o DNA proveniente do kit comercial.

Com a identificação morfológica foi possível detectar três principais géneros de fungos toxigénicos, o *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Analisando os resultados da identificação molecular, nota-se que todas amostras apresentaram produtos de amplificação aproximadamente do mesmo tamanho. Comparando estes resultados com os dados da identificação morfológica, percebe-se que a banda apresentada na linha 2K (Figura 10) correspondente a amostra de amendoim do mercado de Manica, é um produto de amplificação referente apenas ao género

Aspergillus. O mesmo caso é observado na amostra da linha 10C (Figura 10) correspondente a amostra de milho do campo de Marracuene, nesta o produto de amplificação refere-se apenas ao género *Penicillium*, uma vez que foi o único identificado morfológicamente.

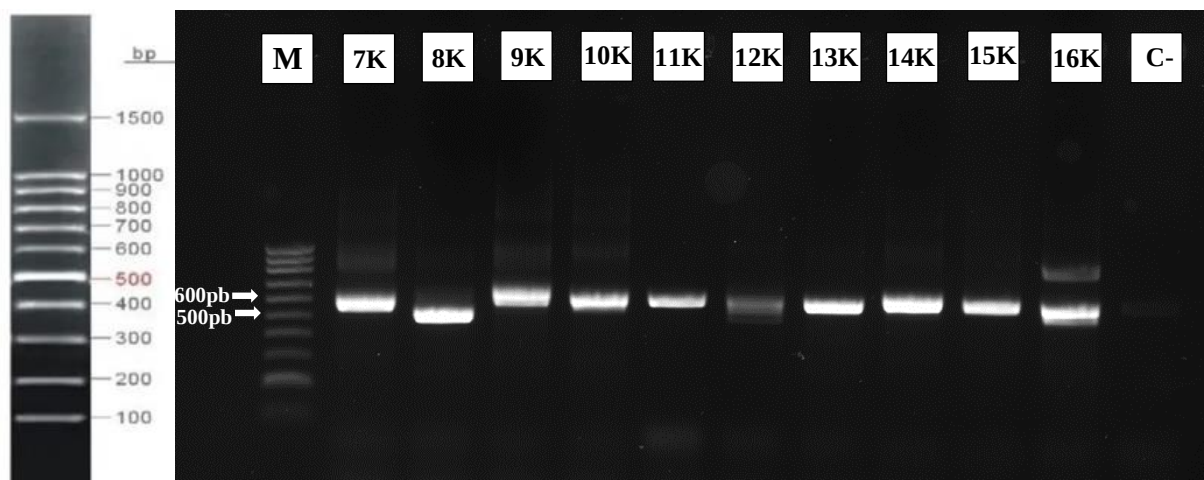


Figura 11. Gel de agarose 1% do DNA amplificado usando os *primers* ITS1 e ITS4. Legenda: M- marcador 100pb; Linha 7K- amostra de amendoim do mercado de Pemba extraído pelo kit comercial; Linha 8K- amostra de milho do mercado de Murrupula extraído pelo kit comercial; Linha 9K- amostra de milho do mercado de Marracuene extraída pelo kit comercial; Linha 10K- amostra de milho do campo de Marracuene extraído pelo kit comercial; Linha 11K- amostra de amendoim do campo de Boquisso extraído pelo kit comercial; Linha 12K- amostra de milho do mercado de Boquisso extraído pelo kit comercial; Linha 13K- amostra de milho do campo de Boquisso extraída pelo kit comercial; Linha 14K- amostra de milho do mercado de Manica extraída pelo kit comercial; Linha 15K- amostra de milho do campo de Boane extraída pelo kit comercial; Linha 16K- amostra de milho do mercado de Manhiça extraída pelo kit comercial; C-: controlo negativo. Observa-se que todas amostras de DNA provenientes do kit comercial amplificadas geraram um produto de amplificação de 500 a 600 pb.

A amostra da linha 15K (Figura 11) correspondente ao milho do campo de Boane, produziu um *amplicon* de aproximadamente 600 pb, no entanto ele pode indicar um produto de amplificação do género *Aspergillus*, *Penicillium* ou *Fusarium*, uma vez que a amostra foi positiva para os três géneros na identificação morfológica. O mesmo caso acontece com a amostra da linha 12K (Figura 11) correspondente ao milho do mercado de Boquisso, na identificação morfológica esta também foi positiva para os três géneros, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. A amostra da linha 8K

(Figura 11) correspondente ao milho do mercado de Murrupula indica apenas a presença dos gêneros *Aspergillus* e *Fusarium* uma vez que, o gênero *Penicillium* não foi identificado durante as análises morfológicas.

A análise na base de dados do *GeneBank* NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) na ferramenta BLAST, permitiu confirmar os gêneros e algumas espécies comumente toxigênicas através do tamanho dos produtos de amplificação produzidos usando os *primers* ITS1 e ITS4. Ao limitar a pesquisa ao gênero *Aspergillus* e a produtos de tamanho de 550-650 pb foi possível identificar produtos de amplificação referentes as principais espécies de fungos toxigênicos do gênero *Aspergillus* como *A. flavus*, *A. niger* e *A. glaucus*.

Products on target templates				
>MT645322.1 <i>Aspergillus flavus</i> isolate LUOHE small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence				
product length = 595				
Forward primer	1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	19	
Template	3		21	
Reverse primer	1	TCCTCCGCTTATTCATATGC	20	
Template	597	G.....	578	

Figura 12. Resultado do alinhamento dos *primers* ITS1 e ITS4 mostrando a especificidade de amplificação do fungo toxigênico *Aspergillus flavus*. Observa-se que o isolado *A. flavus* quando amplificado usando os *primers* ITS1 e ITS4 gera um produto de 595 pb à semelhança dos resultados da amplificação realizada neste estudo.

>MT550026.1 <i>Aspergillus niger</i> isolate RMUAN75 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence				
product length = 599				
Forward primer	1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	19	
Template	1		19	
Reverse primer	1	TCCTCCGCTTATTCATATGC	20	
Template	599	G.....	580	

Figura 13. Resultado do alinhamento dos *primers* ITS1 e ITS4 mostrando a especificidade de amplificação do fungo toxigênico *Aspergillus niger*. Podemos observar que o isolado *A. niger* quando amplificado usando os *primers* ITS1 e ITS4 gera um produto de 599 pb à semelhança dos resultados da amplificação realizada neste estudo.

O isolado de *A. glaucus*, de acordo com a pesquisa no NCBI, apresenta um produto de tamanho de 554 pb, limitando a pesquisa para a espécie *Aspergillus parasiticus* observou-se diferentes cepas

e isolados que podem ser amplificadas pelos *primers* usados no estudo, estes apresentaram produtos de tamanho variável, 595-604 pb.

Products on target templates				
>PQ644082.1 <i>Aspergillus parasiticus</i> strain CoID_030-C4 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence				
product length = 599				
Forward primer	1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	19	
Template	112		130	
Reverse primer	1	TCCTCCGCTTATTCATATGC	20	
Template	710	G.....	691	

Figura 14. Resultado do alinhamento dos *primers* ITS1 e ITS4 mostrando a especificidade de amplificação do fungo toxigénico *Aspergillus parasiticus*. Observa-se que o isolado *A. parasiticus* cepa CoID_030-C4, quando amplificado usando os *primers* ITS1 e ITS4 gera um produto de 599 pb à semelhança dos resultados da amplificação realizada neste estudo.

Ao limitar a pesquisa ao género *Penicillium*, foi possível identificar produtos de amplificação referentes as espécies toxigénicas *Penicillium italicum* e *Penicillium expansum*.

Products on target templates				
>PQ644085.1 <i>Penicillium italicum</i> strain CoID_030-D9 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence				
product length = 588				
Forward primer	1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	19	
Template	96		114	
Reverse primer	1	TCCTCCGCTTATTCATATGC	20	
Template	683	G.....	664	

Figura 15. Resultado do alinhamento dos *primers* ITS1 e ITS4 mostrando a especificidade de amplificação do fungo toxigénico *Penicillium italicum*. Observa-se que o isolado *P. italicum* cepa CoID_030-D9, quando amplificado usando os *primers* ITS1 e ITS4 gera um produto de 588 pb à semelhança dos resultados da amplificação realizada neste estudo.

Products on target templates				
>MT582774.1 <i>Penicillium expansum</i> strain DUCC5734 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence				
product length = 586				
Forward primer	1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	19	
Template	11		29	
Reverse primer	1	TCCTCCGCTTATTCATATGC	20	
Template	596	G.....	577	

Figura 16. Resultado do alinhamento dos *primers* ITS1 e ITS4 mostrando a especificidade de amplificação do fungo toxigénico *Penicillium expansum*. Observa-se que o isolado *P. expansum* cepa DUCC5734, quando amplificado usando os *primers* ITS1 e ITS4 gera um produto de 586 pb à semelhança dos resultados da amplificação realizada neste estudo.

Quanto ao género *Fusarium*, os resultados da pesquisa apresentaram produtos de amplificação de espécies toxigénicas como *F. verticillioides*, *F. graminearum* e *F. proliferatum*.

Products on target templates			
>PV920204.1 <i>Fusarium verticillioides</i> isolate FvCB1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence			
product length = 546			
Forward primer	1	TCGTAAGGTGAACCTGCGG	19
Template	1		19
Reverse primer	1	TCCTCCGCTTATTCATATGC	20
Template	546	G.....	527

Figura 17. Resultado do alinhamento dos *primers* ITS1 e ITS4 mostrando a especificidade de amplificação do fungo toxigénico *Fusarium verticillioides*. Observa-se que o isolado *F. verticillioides*, quando amplificado usando os *primers* ITS1 e ITS4 gera um produto de 546 pb à semelhança dos resultados da amplificação realizada neste estudo.

>MT636316.1 <i>Fusarium graminearum</i> isolate Fg-W18 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence			
product length = 549			
Forward primer	1	TCGTAAGGTGAACCTGCGG	19
Template	4		22
Reverse primer	1	TCCTCCGCTTATTCATATGC	20
Template	552	G.....	533

Figura 18. Resultado do alinhamento dos *primers* ITS1 e ITS4 mostrando a especificidade de amplificação do fungo toxigénico *Fusarium graminearum*. Observa-se que o isolado *F. graminearum*, quando amplificado usando os *primers* ITS1 e ITS4 gera um produto de 549 pb à semelhança dos resultados da amplificação realizada neste estudo.

A linha 8K (Figura 11) correspondente a amostra de milho do mercado de Murrupula apresentou um tamanho inferior a 600pb, entre 500 a 550 pb, ao comparar com os dados da identificação morfológica nota-se que a amostra foi positiva para *Aspergillus* e *Fusarium*. De acordo com os dados apresentados na ferramenta BLAST, os produtos de amplificação do género *Fusarium* quando amplificados com os *primers* ITS1 e ITS4 geram produtos numa faixa de 540-550 pb.

Os resultados da amplificação dos produtos de PCR comparados as análises na ferramenta BLAST confirmaram a presença dos principais géneros de fungos toxigénicos previamente identificados morfológicamente. Com isto, pode-se afirmar que produtos resultantes da amplificação da região ITS usando os *primers* ITS1 e ITS4 que exibam *amplicons* de tamanho de aproximadamente 600 pb, indicam a presença de fungos toxigénicos nas amostras analisadas.

6.4. Comparação do sucesso de amplificação entre o DNA extraído pelo método de acetato de potássio e kit comercial

Os resultados da amplificação do DNA extraído pelo método de acetato de potássio e pelo kit comercial não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p>0,05$). Todas amostras de DNA extraídas pelo kit comercial amplificaram a região ITS, o mesmo não aconteceu com todas amostras de DNA extraído pelo método de acetato de potássio.

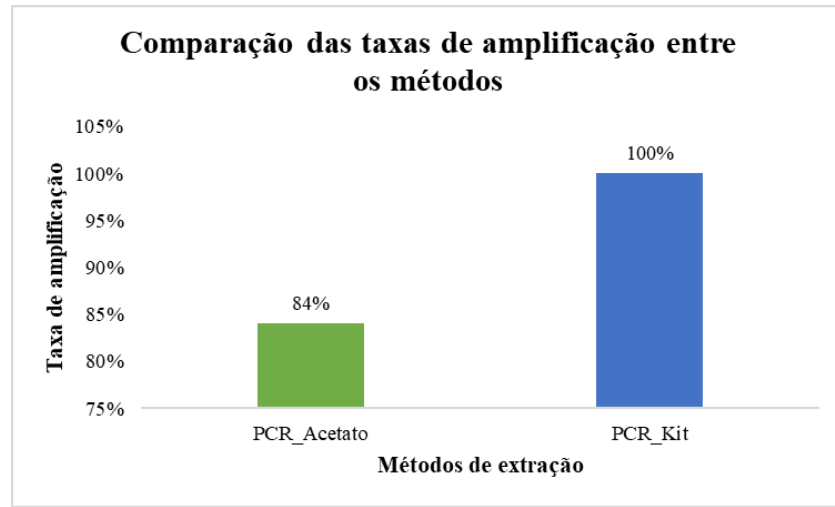


Figura 19. Comparação das taxas de amplificação entre o DNA extraído pelo método de acetato de potássio e kit comercial. O DNA extraído pelo kit comercial apresentou uma taxa de amplificação de 100% enquanto o DNA extraído pelo método de acetato de potássio apresentou uma taxa de amplificação de 84%.

Tabela 12. Resultados do teste de McNemar para a comparação do sucesso de amplificação entre o DNA extraído pelo método de acetato de potássio e kit comercial.

	PCR_acetato & PCR_kit
N	25
Exact Sig. (2-tailed)	,125 ^b

O teste estatístico mostrou que apesar das diferenças das taxas de amplificação do DNA extraído pelos dois métodos (Figura 19), as diferenças não foram estatisticamente significativas ($p=0,125$).

6.5. Principais genes da via de biossíntese de AFB1 detectados nas amostras de milho e amendoim

A amplificação dos genes da via de biossíntese de AFB1 produziu bandas de tamanhos variados para cada gene, 630 pb para a amplificação do gene *aflR*, 990 pb para o gene *nor-1*, 537 pb para o gene *ver-1*, 1333 pb para o gene *omtB*, 1490 pb para o gene *omt-1* e 719 pb para o gene *ordA*.

A amplificação do gene regulador *aflR* produziu bandas de aproximadamente 600 pb como apresentado na figura 20.

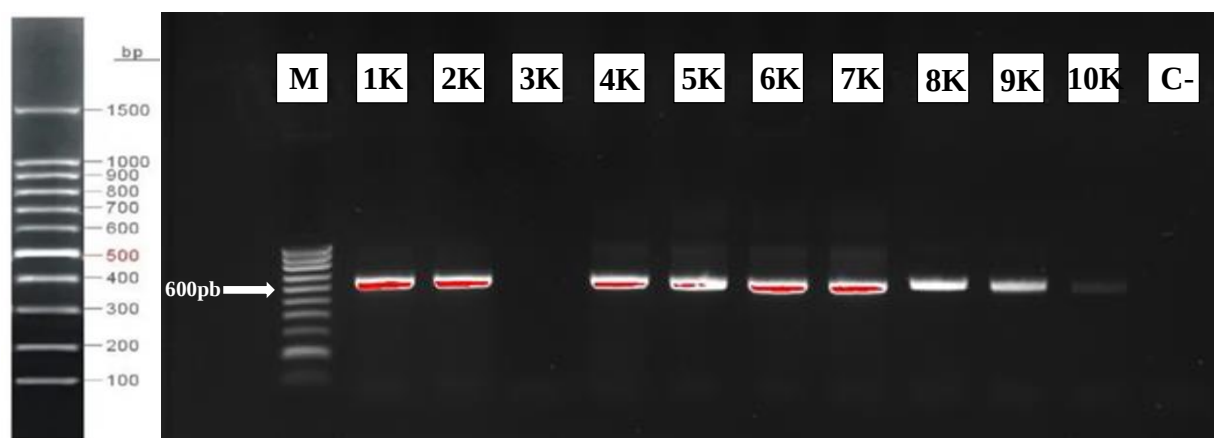


Figura 20. Gel de agarose 1% do DNA amplificado usando os *primers* *aflR*-F e *aflR*-R. Legenda: M- marcador 100pb; Linha 1K- amostra de amendoim do mercado de Boquisso extraída pelo kit comercial; Linha 2K- amostra de amendoim do mercado de Manica extraída pelo kit comercial; Linha 3K- amostra de milho do mercado de Boane extraída pelo kit comercial; Linha 4K- amostra de amendoim do mercado de Boane extraída pelo kit comercial; Linha 5K- amostra de amendoim do mercado de Manhiça extraída pelo kit comercial; Linha 6K- amostra de milho do mercado de Pemba extraída pelo kit comercial; Linha 7K- amostra de amendoim do mercado de Pemba extraída pelo kit comercial; Linha 8K- amostra de milho do mercado de Murrupula extraída pelo kit comercial; Linha 9K- amostra de milho do mercado de Marracuene extraída pelo kit comercial, Linha 10K- amostra de milho do campo de Marracuene extraída pelo kit comercial; C-: controle negativo.

A amostra da linha 3K (Figura 20) correspondente ao milho do mercado de Boane não amplificou o gene *aflR*, embora a amostra tenha sido positiva para o género *Aspergillus*. As amostras das linhas 9K e 10K (Figura 20) correspondentes ao milho do mercado de Marracuene e milho do

campo de Marracuene respectivamente, não foram positivas para o género *Aspergillus* embora o gene *aflR* tenha amplificado em ambas.

A amplificação do gene *nor-1* exibiu bandas de DNA de aproximadamente 1000 pb (Figura 21).

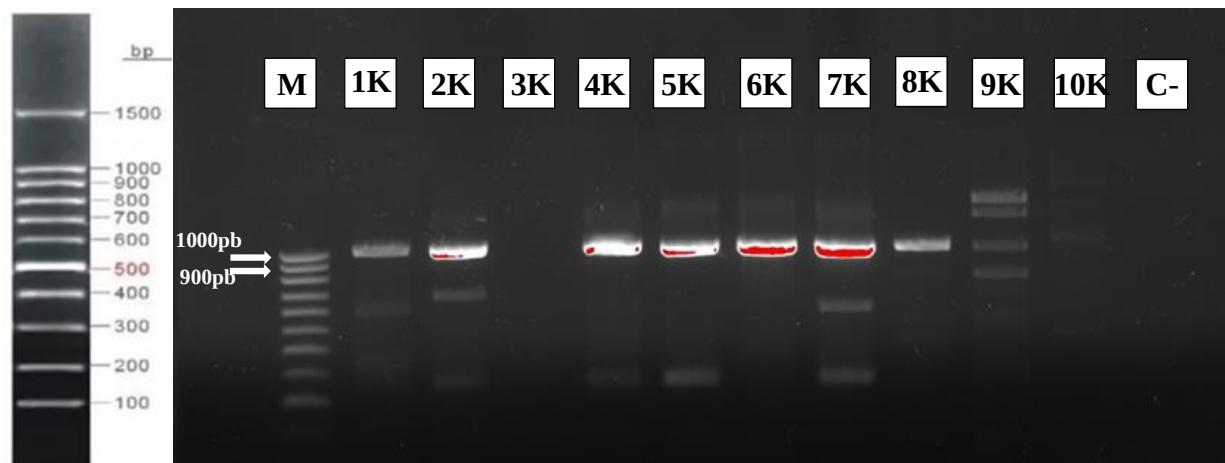


Figura 21. Gel de agarose 1% do DNA amplificado usando os *primers nor-1F* e *nor-1R*. Legenda: M- marcador 100pb; Linha 1K- amostra de amendoim do mercado de Boquisso extraída pelo kit comercial; Linha 2K- amostra de amendoim do mercado de Manica extraída pelo kit comercial; Linha 3K- amostra de milho do mercado de Boane extraída pelo kit comercial; Linha 4K- amostra de amendoim do mercado de Boane extraída pelo kit comercial; Linha 5K- amostra de amendoim do mercado de Manhiça extraída pelo kit comercial; Linha 6K- amostra de milho do mercado de Pemba extraída pelo kit comercial; Linha 7K- amostra de amendoim do mercado de Pemba extraída pelo kit comercial; Linha 8K- amostra de milho do mercado de Murrupula extraída pelo kit comercial; Linha 9K- amostra de milho do mercado de Marracuene extraída pelo kit comercial, Linha 10K- amostra de milho do campo de Marracuene extraída pelo kit comercial; C-: controlo negativo.

A linha 3K (Figura 21) correspondente ao milho do mercado de Boane também não amplificou o gene *nor-1*, esta não apresentou banda no gel. O mesmo caso ocorreu com as amostras das linhas 9K e 10K (Figura 21) correspondentes ao milho do mercado de Marracuene e milho do campo de Marracuene, respectivamente, estas apresentaram bandas degradadas.

A amplificação do gene *ver-1* exibiu bandas de aproximadamente 500 pb como apresentado na figura 22.

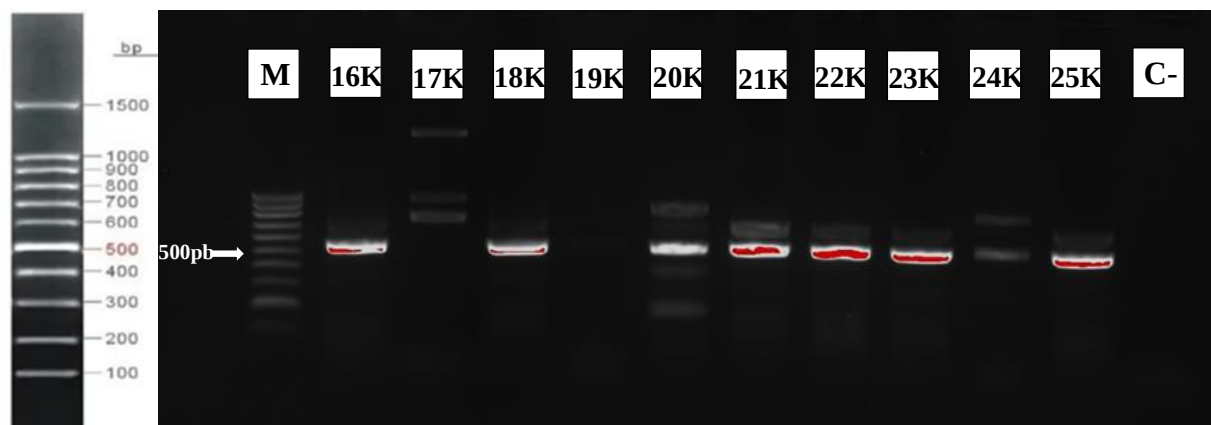


Figura 22. Gel de agarose 1% do DNA amplificado pelos primers *ver-1F* e *ver-1R*. Legenda: M- marcador 100 pb; Linha 16K- amostra de milho do mercado de Manhiça extraída pelo kit comercial; Linha 17K- amostra de milho do campo de Manhiça extraída pelo kit comercial; Linha 18K- amostra de amendoim do campo de Pemba extraída pelo kit comercial; Linha 19K- amostra de milho do campo de Pemba extraída pelo kit comercial; Linha 20K- amostra de milho do campo de Murrupula; Linha 21K- amostra de amendoim do campo de Murrupula extraída pelo kit comercial; Linha 22K- amostra de amendoim do mercado de Murrupula extraída pelo kit comercial; Linha 23K- amostra de amendoim do mercado de Marracuene extraída pelo kit comercial; Linha 24K- amostra de amendoim do campo de Marracuene extraída pelo kit comercial; Linha 25K- amostra de amendoim do campo de Manhiça extraída pelo kit comercial; C-: controlo negativo.

A amostra da linha 17K correspondente ao milho do campo de Manhiça não amplificou o gene *ver-1*, esta amostra foi negativa para o género *Aspergillus*. O mesmo ocorreu com a amostra da linha 19K, não houve amplificação do gene *ver-1*, no entanto, esta foi positiva para o género *Aspergillus*.

A amplificação do gene *omtB* exibiu produtos de amplificação superiores à 1000 pb (Figura 23).

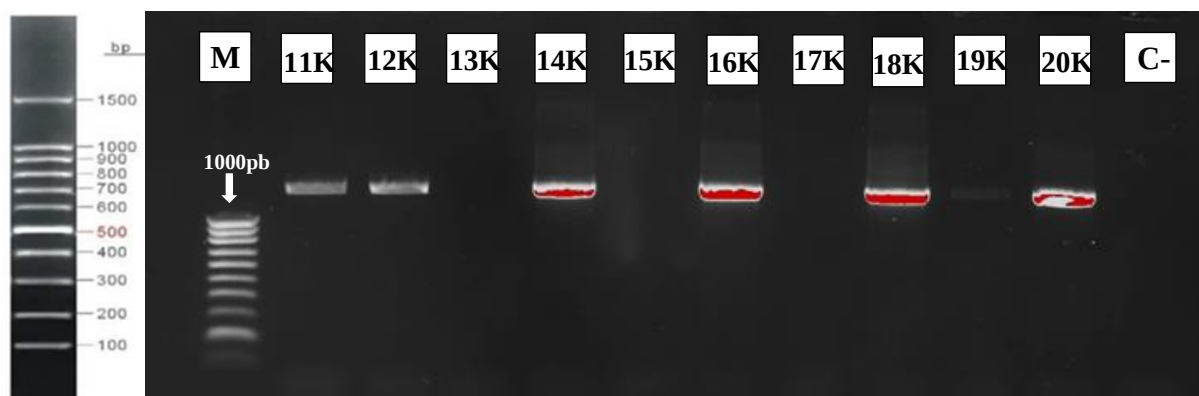


Figura 23. Gel de agarose 1% do DNA amplificado pelos *primers omtB-F-F* e *omtB-F-R*.
 Legenda: M- marcador 100 pb; 11K- amostra de amendoim do campo de Boquisso extraída pelo kit comercial; 12K- amostra de milho do mercado de Boquisso extraída pelo kit comercial; 13K- amostra de milho do campo de Boquisso extraída pelo kit comercial; 14K- amostra de milho do mercado de Manica extraída pelo kit comercial; 15K- amostra de milho do campo de Boane extraída pelo kit comercial; 16K- amostra de milho do mercado de Manhiça extraída pelo kit comercial; 17K- amostra de milho do campo de Manhiça extraída pelo kit comercial; 18K- amostra de amendoim do campo de Pemba; 19K- amostra de milho do campo de Pemba; 20K- amostra de milho do campo de Murrupula; C-: controlo negativo.

As amostras das linhas 13K e 17K (Figura 23) correspondentes ao milho do campo de Boquisso e milho do campo de Manhiça não amplificaram o gene *omtB*, ambas foram negativas para o género *Aspergillus*. A amostra da linha 15K (Figura 23) também não amplificou o gene, no entanto esta foi positiva para o género *Aspergillus*.

A amplificação do gene *omt1* exibiu produtos de amplificação superiores à 1000 pb (Figura 24).

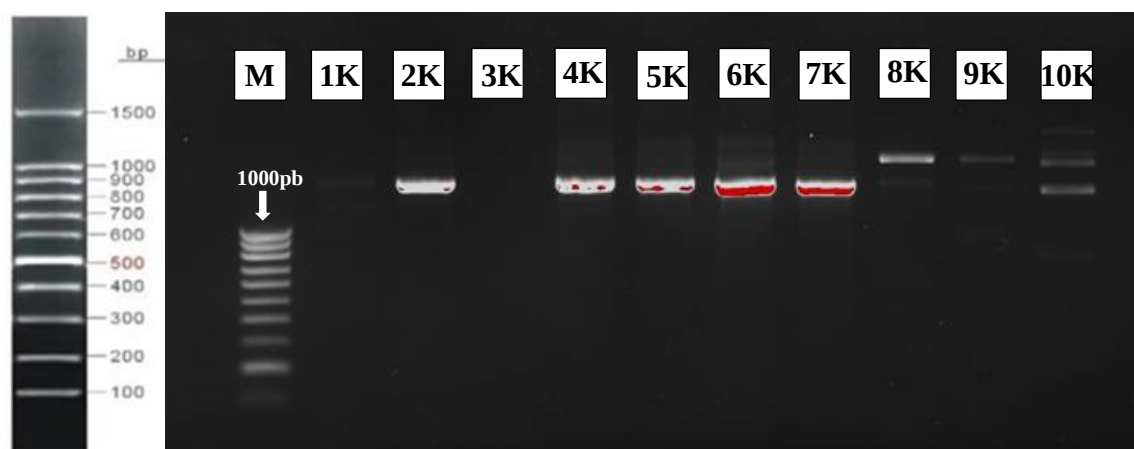


Figura 24. Gel de agarose 1% do DNA amplificado pelos *primers* *omt1*-F e *omt1*-R. Legenda: M- marcador 100pb; Linha 1K- amostra de amendoim do mercado de Boquisso extraída pelo kit comercial; Linha 2K- amostra de amendoim do mercado de Manica extraída pelo kit comercial; Linha 3K- amostra de milho do mercado de Boane extraída pelo kit comercial; Linha 4K- amostra de amendoim do mercado de Boane extraída pelo kit comercial; Linha 5K- amostra de amendoim do mercado de Manhiça extraída pelo kit comercial; Linha 6K- amostra de milho do mercado de Pemba extraída pelo kit comercial; Linha 7K- amostra de amendoim do mercado de Pemba extraída pelo kit comercial; Linha 8K- amostra de milho do mercado de Murrupula extraída pelo kit comercial; Linha 9K- amostra de milho do mercado de Marracuene extraída pelo kit comercial, Linha 10K- amostra de milho do campo de Marracuene extraída pelo kit comercial.

As amostras das linhas 1K e 3K (Figura 24) correspondentes ao amendoim do mercado de Boquisso e milho do mercado de Boane não amplificaram o gene *omt1* embora ambas sejam positivas para o género *Aspergillus*. As amostras das linhas 8K, 9K e 10K correspondentes ao milho do mercado de Murrupula, milho do mercado de Marracuene e milho do campo de Marracuene, respectivamente apresentaram bandas múltiplas.

A amplificação do gene *ordA* exibiu produtos de amplificação de aproximadamente 700 pb, como apresentado na figura 25.

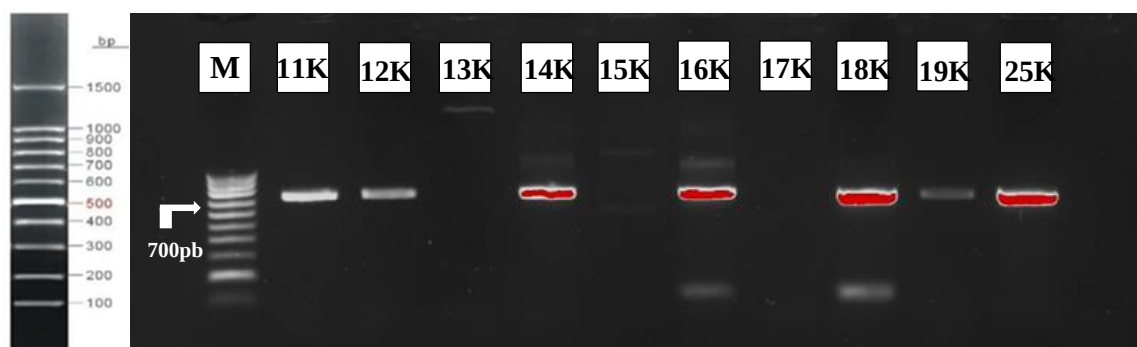


Figura 25. Gel de agarose do DNA amplificado pelos *primers* *ord*-1508 e *ord*-2226. Legenda: M- marcador 100 pb; Linha 11K- amostra de amendoim do campo de Boquisso extraída pelo kit comercial; Linha 12K- amostra de milho do mercado de Boquisso extraída pelo kit comercial; Linha 13K- amostra de milho do campo de Boquisso extraída pelo kit comercial; Linha 14K- amostra de milho do mercado de Manica extraída pelo kit comercial; Linha 15K- amostra de milho do campo de Boane extraída pelo kit comercial; Linha 16K- amostra de milho do mercado de Manhiça extraída pelo kit comercial; Linha 17K- amostra de milho do campo de Manhiça extraída

pelo kit comercial; Linha 18K- amostra de amendoim do campo de Pemba; Linha 19K- amostra de milho do campo de Pemba; Linha 25K- amostra de amendoim do campo de Manhiça extraída pelo kit comercial.

As amostras das linhas 13K e 17K (Figura 25) correspondentes ao milho do campo de Boquisso e milho do campo de Manhiça não amplificaram o gene *ordA*, ambas foram negativas para o género *Aspergillus*. A amostra da linha 15K (Figura 25) também não amplificou o gene, no entanto esta foi positiva para o género *Aspergillus*.

6.6. Ocorrência de fungos toxigénicos entre as amostras de milho e amendoim

A frequência de ocorrência dos principais géneros de fungos toxigénicos identificados entre as diferentes amostras não apresentou diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$). O género *Aspergillus* por exemplo, ocorreu em todas amostras de amendoim analisadas em contraste com o género *Fusarium*, este teve menor percentagem de ocorrência no amendoim. A ocorrência do género *Penicillium* entre os dois tipos de amostra não apresentou diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,057$).

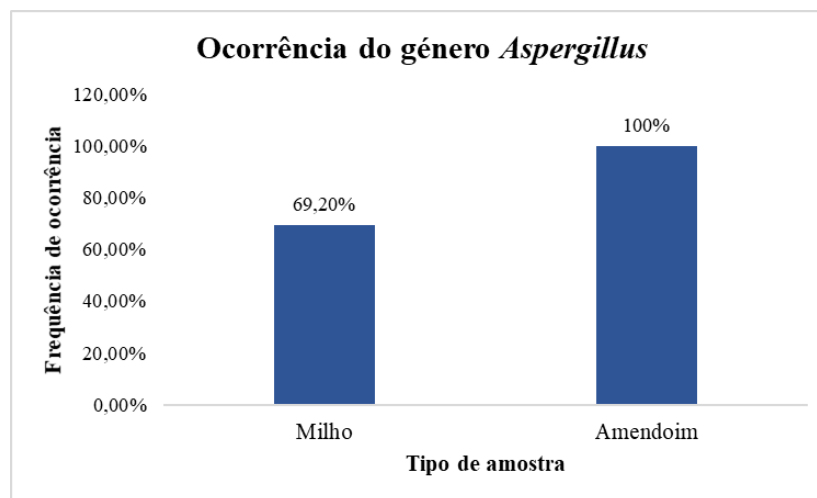


Figura 26. Frequência de ocorrência do género *Aspergillus* entre as amostras de milho e amendoim. O género *Aspergillus* foi mais frequente em amostras de amendoim (100%) do que em amostras de milho, nestas o género de *Aspergillus* esteve presente em 9 das 13 amostras com uma frequência de ocorrência de 69,20%.

Apesar das duas culturas terem apresentado frequências de ocorrência distintas, o teste estatístico mostrou que não há diferenças estatisticamente significativas quanto a ocorrência do gênero *Aspergillus* no milho e amendoim ($p=0,057$). No que diz respeito a ocorrência do gênero *Aspergillus* em 69,20% das amostras de milho, 85,7% destas eram provenientes do mercado e 50% provenientes do campo. Nas amostras de amendoim, o gênero ocorreu em ambas amostras de mercado e de campo.

A ocorrência do gênero *Penicillium* entre as amostras de milho e amendoim não apresentou diferenças estatisticamente significativas ($p=0,570$), no entanto este foi mais frequente em amostras de amendoim (58,30%).

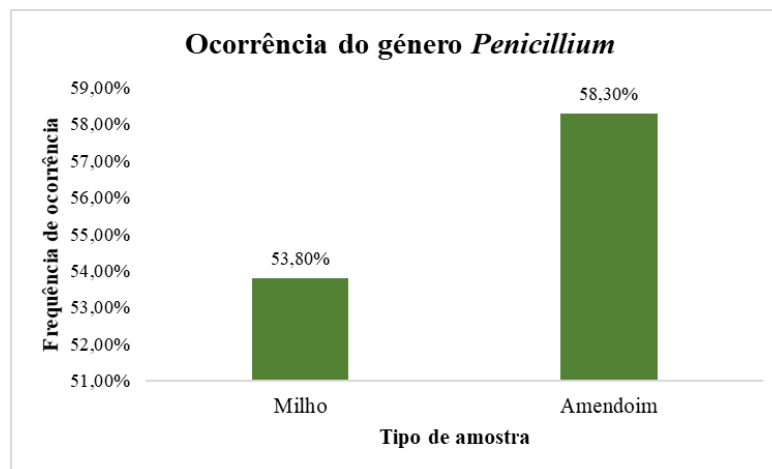


Figura 27. Frequência de ocorrência do gênero *Penicillium* entre as amostras de milho e amendoim. Foi possível constatar que a ocorrência do gênero *Penicillium* não apresentou diferenças significativas entre os dois grupos de amostras, milho e amendoim. Este esteve presente em 7 das 13 amostras de milho com uma frequência de ocorrência de 53,80% e, em 7 das 12 amostras de amendoim com uma frequência de ocorrência de 58,3%.

O gênero *Penicillium* como ilustrado no gráfico acima, fez-se presente em 53,80% das amostras de milho, destas 66,6% eram provenientes do campo e apenas 42,8% do mercado, o que indica que *Penicillium* colonizou mais amostras de milho provenientes de campos de cultivo do que de mercados. Das 58,3% amostras de amendoim contaminado, apenas 40% provinham do campo e 71,4% provinham do mercado, isto significa que no caso do amendoim o gênero colonizou mais amostras de mercado do que de campo.

A ocorrência do género *Fusarium* entre as amostras de milho e amendoim também não apresentou diferenças estatisticamente significativas ($p=0,125$), no entanto este género ocorreu com maior frequência em amostras de milho do que em amostras de amendoim.

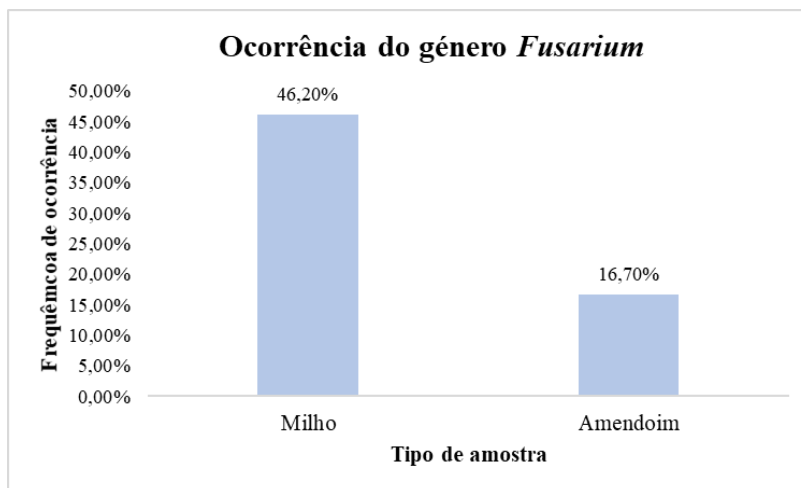


Figura 28. Frequência de ocorrência de fungos do género *Fusarium* nas amostras de milho e amendoim. O género *Fusarium* este mais presente nas amostras de milho com uma frequência de ocorrência de 46,20% no milho e 16,70% no amendoim.

Das 46,20% amostras de milho positivas para o género *Fusarium*, 50% provinham do campo e 42,8% do mercado. Das 16,70% amostras de amendoim contaminadas, todas eram provenientes do campo.

Em resumo, foi possível observar que o amendoim foi a cultura mais afectada pelo género *Aspergillus* (100%) seguido pelo *Penicillium* (58,3%). O milho foi o mais afectado pelo género *Fusarium* (46,2%).

6.7. Comparação dos níveis de contaminação por fungos toxigénicos entre as regiões de colecta

Os principais géneros de fungos toxigénicos detectados através da amplificação da região ITS estavam distribuídos entre as amostras dos 7 locais de colecta. Fungos do género *Aspergillus* e *Penicillium* foram detectados em amostras dos 7 locais de colecta, nomeadamente Boane, Boquisso, Manhiça, Marracuene, Manica, Murrupula e Pemba, no entanto fungos do género *Fusarium* só foram detectados em amostras dos seguintes locais: Boane (33,30%), Boquisso (25%), Marracuene (25%), Murrupula (75%) e Pemba (50%).

Os fungos toxigénicos do género *Aspergillus* destacaram-se em maior quantidade (50% a 100%) na maioria das amostras dos diferentes locais de colecta. A maioria das amostras (84%) foi positiva para este género.

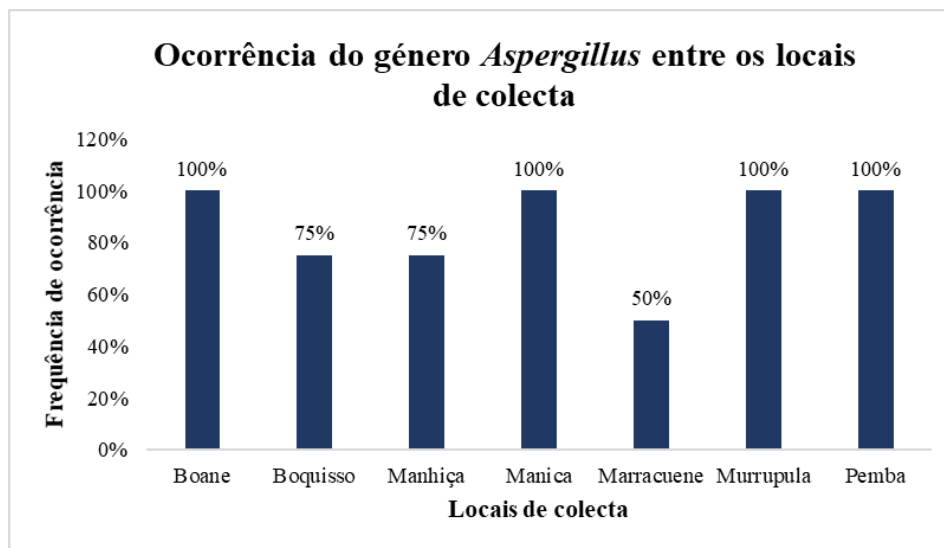


Figura 29. Frequência de ocorrência do género *Aspergillus* entre os locais de colecta. O género esteve presente em todas amostras colectadas em Boane, Manica, Murrupula e Pemba. A ocorrência do género foi menos frequente nas amostras colectadas no distrito de Marracuene (50%), seguido do distrito de Manhiça e do bairro de Boquisso (75%).

Os fungos toxigénicos do género *Penicillium* também foram detectados em amostras de todos locais de colecta neste estudo, entretanto com menor frequência comparado ao género *Aspergillus*.

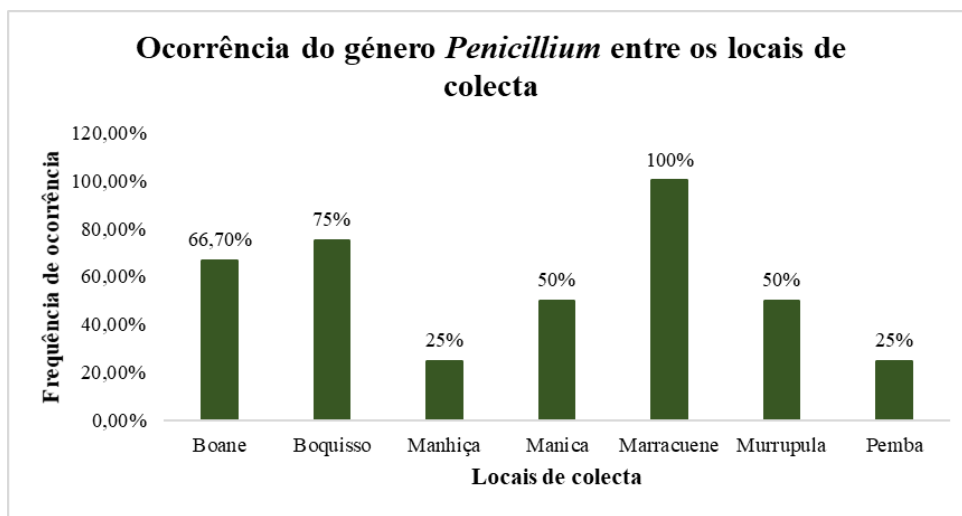


Figura 30. Frequência de ocorrência do género *Penicillium* entre os locais de colecta. Todas amostras provenientes do distrito de Marracuene foram positivas para o género *Penicillium*. O distrito de Manhiça e cidade de Pemba tiveram baixas frequências de ocorrência deste género nas amostras colectadas (25%).

Os fungos toxigénicos do género *Fusarium* foram os menos frequentes não tendo sido detectados em todos locais de colecta. As amostras colectadas no distrito de Manhiça e na província de Manica foram negativas para este género.

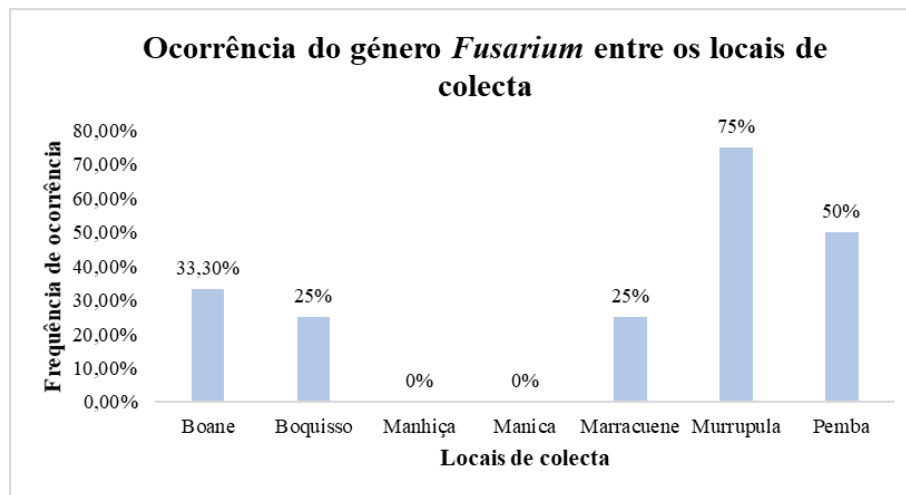


Figura 31. Frequência de ocorrência do género *Fusarium* entre os locais de colecta. Este género foi mais frequente nas amostras colectadas no distrito de Murrupula (75%) e na cidade de Pemba (50%). Em Manhiça e Manica não foram detectados fungos do género *Fusarium* nas amostras colectadas.

7. Discussão

Os fungos filamentosos apresentam uma parede celular resistente a maioria dos métodos de extração de DNA geralmente usados, uma vez que diferente da parede celular celulósica das plantas, a quitina é um polissacarídeo mais forte e flexível, o que torna difícil análises moleculares envolvendo esses seres. Os dois métodos aplicados neste estudo conseguiram superar tal barreira ao ponto de serem obtidas concentrações variáveis de DNA entre as diferentes amostras. O método de acetato de potássio proposto por Dellaporta *et al.*, (1983) embora destinado à extração de DNA de folhas de plantas, tem sido usualmente aplicado para extração de DNA fúngico. Estudos realizados por Faraghati *et al.*, (2022) e Alani *et al.*, (2004) envolvendo a metodologia de extração de Dellaporta *et al.*, (1983) apresentaram sucesso ao extrair o DNA do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* e de *Fusarium oxysporum* respectivamente, em análises de diversidade genética. Embora neste estudo tenha se obtido maior concentração de DNA através do método de acetato de potássio, muitos estudos sobre comparação de métodos de extração de DNA fúngico apontam o uso de kits comerciais como sendo a melhor alternativa para um DNA de qualidade. O kit comercial *Norgen* por exemplo, associado a etapas de digestão com enzimas como liticase e proteinase K e batimento de esferas e sonicação, apresentou um bom desempenho na extração de DNA fúngico (Kumar e Mugunthan, 2018), processos semelhantes foram usados na extração com o kit *Qiagen AllPrep Fungal DNA/RNA/Protein purification* usado neste estudo.

Os índices de pureza entre o método de acetato de potássio e kit comercial apresentaram médias de 1,94 e 1,87 respectivamente, estes valores são considerados ideais para a pureza do DNA extraído (Yu *et al.*, 2024). Os índices de contaminantes orgânicos apresentaram valores abaixo de 1,8 no DNA extraído pelo kit comercial o que pode indicar presença de polissacarídeos, fenóis e outros solventes usados durante a extração (Yu *et al.*, 2024). O DNA extraído pelo método de acetato de potássio apresentou índices de contaminantes orgânicos relativamente adequados, com valores entre 0,30 a 2,20, tal facto pode ser explicado pela adição de PVP (polivinilpirrolidona) durante o processo de maceração, este composto é usado na remoção de fenóis de amostras (Porebski *et al.*, 1997).

Relativamente a amplificação do DNA extraído, ambos métodos de extração produziram um DNA de qualidade e adequado para amplificação. A amplificação da região ITS usando os *primers* ITS1 e ITS4, é considerada um passo importante para testar o DNA quanto à

adequação para reacções de PCR usando *primers* mais específicos (Rahman *et al.*, 2020b). A amplificação da região ITS de todas amostras de DNA fúngico produziu *amplicons* com um peso molecular que variou de 500 a 600 pb o que entra em acordo com uma série de estudos que abordam detecção molecular de fungos, como os de Mirhendi *et al.*, (2010), Salim *et al.*, (2019), El-Shaer *et al.*, (2021) e Pakshir *et al.*, (2021).

Observou-se que a amplificação usando os *primers* ITS1 e ITS4 não foi suficiente para diferenciar os géneros fúngicos presentes nas amostras, uma vez que todas elas apresentaram bandas de peso molecular semelhante, portanto recorreu-se aos dados da análise morfológica realizada antes da extração. Raja *et al.*, (2017) defende que apenas a amplificação da região ITS para a identificação de géneros e espécies fúngicas não é suficiente por isso, sempre que possível é necessário combinar dois ou mais métodos de identificação de fungos, como a combinação de métodos morfológicos e moleculares. A amplificação da região ITS não é considerada ideal para identificar espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (Raja *et al.*, 2017), por isso tem surgido a necessidade de analisar outras regiões, como os genes codificadores de proteínas. Em um estudo em que se pretendia analisar fungos produtores de ocratoxina A em rações animais, primeiramente identificou-se os fungos presentes nas amostras com base nas características morfológicas, de seguida testou-se a adequação do DNA extraído usando os *primers* ITS1 e ITS4, e por fim usou-se *primers* específicos para identificar molecularmente as espécies sem necessidade de sequenciamento (Alsalabi *et al.*, 2023). Com o *primer* ITS/NIG por exemplo, foi possível identificar corretamente a espécie *A. niger*, esta exibiu bandas definidas com um peso molecular de 420 pb, por sua vez os *primers* OCRAF e OCRAR apresentaram bandas de 430 pb que indicavam a presença de *A. ochraceus* (Alsalabi *et al.*, 2023).

De modo a confirmar as comparações entre os dados do método morfológico e molecular, recorreu-se a ferramenta *Primer BLAST* para aferir o tamanho do produto gerado ao amplificar DNA fúngico com os *primers* ITS1 e ITS4, este exibiu para os três géneros tamanhos de produtos que variaram de 500 a 620 pb. Durante as análises percebeu-se que as pesquisas direccionadas ao género *Fusarium* exibiram tamanhos de produtos de amplificação entre 540 a 550 pb, com destaque para a amostra MU-M-M correspondente ao milho do mercado de Murrupula que apresentou uma banda inferior à 600 pb à semelhança do ocorrido no estudo

realizado por Mirhendi *et al.* (2010), que analisou cepas de *Fusarium*, todas estas ao amplificar com os *primers* ITS1 e ITS4 exibiram produtos de 550 pb.

O DNA extraído pelo kit comercial *Qiagen AllPrep Fungal DNA/RNA/Protein purification* amplificou 100% das amostras em comparação com o DNA extraído pelo método de acetato de potássio, o fabricante *Qiagen* tem sido o preferido em estudos de identificação molecular de fungos com destaque para o kit *Qiagen Dneasy plant* (Salim *et al.*, 2019; Mikusová *et al.*, 2020; Alsalabi *et al.*, 2023). A presença de fenóis e polissacarídeos é conhecida por influenciar negativamente o sucesso de amplificação (Wilson, 1997), e embora neste estudo o DNA extraído pelo método de acetato de potássio tenha apresentado melhores índices de contaminantes orgânicos em relação ao DNA extraído pelo kit, este último ainda teve melhor desempenho mesmo que a maioria das amostras tenha apresentado valores muito abaixo de 1,8 o que indica a presença de contaminantes orgânicos e de resíduos de solventes usados na extração.

A optimização e validação de um protocolo para detecção de genes da via de biossíntese de aflatoxinas deu-se pela amplificação dos genes *aflR*, *nor-1*, *ver-1*, *omtB*, *omt-1*, e *ordA*, o uso de *primers* direcionados aos quatro primeiros genes é documentado como garantia de detecção precisa, confiável e rápida de fungos produtores de aflatoxinas (Levin, 2012; Yassin *et al.*, 2024). A amplificação do gene *aflR* gerou fragmentos de aproximadamente 600 pb, Sweeney *et al.*, (2000) e Rahimi *et al.*, (2008) relataram que os produtos de amplificação dos *primers* *aflR-F* e *aflR-R* com as mesmas sequências usadas neste estudo geram produtos de amplificação de 630 pb. A amostra correspondente ao milho do mercado de Boane (Linha 3K) não amplificou o gene *aflR* apesar de ter se detectado o género *Aspergillus* durante a identificação morfológica, isto pode indicar que as espécies de *Aspergillus* presentes na amostra não são consideradas aflatoxigénicas, como o caso da espécie *A. niger*, que é conhecida por sintetizar ocratoxinas e não aflatoxinas (El-Sayed *et al.*, 2022). A ausência de produto de amplificação pode ainda indicar que se trata de uma cepa não toxigénica, pois o gene *aflR* é considerado um gene regulador que codifica uma proteína que actua como factor de transcrição, esta proteína é responsável por localizar no DNA fúngico promotores de genes estruturais da via de biossíntese de aflatoxina ligando-se a eles e activando a transcrição dos genes (Levin, 2012). Portanto, a ausência deste gene pode significar que os fungos presentes na amostra não apresentam potencial aflatoxigénico. Nas amostras de milho do mercado e do

campo de Marracuene (Linhas 9K e 10K, respectivamente) não detectou-se morfologicamente o género *Aspergillus*, porém estas amplificaram o gene *aflR*, as técnicas moleculares são mais eficazes para detectar fungos mesmo em amostras com pouca biomassa fúngica, ao ponto de macroscopicamente e microscopicamente serem consideradas negativas para um certo microrganismo (Lieberman *et al.*, 2021).

A amplificação do gene *nor-1* apresentou produtos de amplificação de aproximadamente 1000 pb, as sequências dos *primers nor-1F* e *nor-1R* usadas neste estudo são equivalentes as documentadas por Rodrigues *et al.*, (2007), este relata produtos de amplificação de 990 pb. Das amostras selecionadas para a amplificação do gene *nor-1*, a amostra correspondente ao milho do mercado de Boane (Linha 3K) não amplificou o gene à semelhança do ocorrido com o gene *aflR*. O gene *nor-1* codifica uma enzima conhecida como redutase do ácido norsolínico, é o segundo gene fundamental para a via de biossíntese de AFB1, a enzima redutase catalisa a conversão do ácido norsolínico em averantina que é um passo importante da via metabólica de AFB1 (Levin, 2012; El-Dawy *et al.*, 2024) portanto, a presença ou ausência deste gene sugere fortemente o potencial aflatoxigénico do fungo uma vez que codifica uma enzima importante para o início da síntese de AFB1.

O produto de amplificação dos *primers ver-1F* e *ver-1R* direcionados ao gene *ver-1* gerou um fragmento de aproximadamente 500 pb à semelhança do descrito por Levin (2012) e Yassin *et al.* (2024), a amostra correspondente ao milho do campo de Manhiça (Linha 17K) não amplificou o gene uma vez que esta amostra foi negativa para o género *Aspergillus*, este gene codifica a enzima versicolorina A desidrogenase responsável por catalisar a reação de conversão da versicolorina A em dimetilesterigmatocistina passo importante da via metabólica de produção de AFB1 (El-Dawy *et al.*, 2024). A amostra de milho do campo de Pemba também não amplificou o gene *ver-1*, no entanto esta foi positiva para *Aspergillus*, isto indica que a espécie presente na amostra não é aflatoxigénica ao contrário de espécies como *A. flavus* e *A. parasiticus* (Levin, 2012).

A amplificação do gene *omtB* gerou produtos de amplificação superiores à 1000 pb, Rodrigues *et al.* (2007) em estudo sobre identificação e caracterização de *A. flavus* e aflatoxinas documentaram o uso dos *primers omtB-F-F* e *omtB-F-R* com as mesmas sequências dos *primers* usados neste estudo, estes geraram fragmentos de 1333 pb. As amostras de milho do campo de Boquisso e Manhiça (Linhas 13K e 17K, respectivamente) foram negativas para

Aspergillus, portanto não amplificaram o gene *omtB* codificador da enzima O-metiltransferase responsável pela catalisação da conversão de dimetilesterigmatocistina em esterigmatocistina na via de biossíntese de AFB1 (Levin, 2012).

O gene *omt1* gerou fragmentos superiores à 1000 pb também a semelhança do descrito por Rodrigues *et al.* (2007) que obteve produtos de amplificação de 1490 pb. A amostra de milho do mercado de Boane (Linha 3K) não amplificou o gene como ocorrido com os genes *aflR* e *nor-1*, mas a amostra de amendoim do mercado de Boquisso (Linha 1K) desperta atenção uma vez que amplificou o gene regulador *aflR* e o gene *nor-1* e não amplificou o gene *omt1*, tal acontecimento pode ser explicado pela ocorrência de mutações ou deleções do gene *omt1* na amostra que pode suscitar a perda do potencial aflatoxigénico (El-Dawy *et al.*, 2024), uma vez que este gene codifica também uma O-metiltransferase responsável por catalisar a conversão da esterigmatocistina em O-metilesterigmatocistina (Levin, 2012). Para além disso, a ausência deste gene pode também denotar que o fungo presente na amostra produz apenas a toxina esterigmatocistina pois a síntese deste composto tóxico compartilha os mesmos genes estruturais da via de biossíntese de AFB1 e uma vez que o gene da enzima responsável pela conversão da esterigmatocistina em outros metabolitos precursores da AFB1 não foi amplificado, isto pode significar que o fungo sintetiza apenas a esterigmatocistina (Levin, 2012).

A amplificação do gene *ordA* gerou fragmentos de aproximadamente 700 pb à semelhança do ocorrido nos estudos de Sweeney *et al.* (2000), Mahmoud (2014) e Hassan (2023) que relataram produtos de amplificação de 719 pb. As amostras de milho do campo de Boquisso e Manhiça (Linhas 13K e 17K, respectivamente) não amplificaram o gene *ordA* como ocorrido com os genes *omtB* e *ver-1*, estas amostras foram negativas para *Aspergillus*, portanto não apresentam em seu genoma genes estruturais de biossíntese de AFB1 (Levin, 2012).

O género *Aspergillus* foi mais frequente em amostras de amendoim, seguido do género *Penicillium* (Embaby e Abdel-Galel, 2014; Ismail *et al.*, 2016; Bediako *et al.*, 2019).

As amostras de milho tiveram menor frequência de ocorrência do género *Aspergillus* em relação as amostras de amendoim em contraste aos resultados obtidos por Aristil *et al.*, (2019) e Sineque *et al.*, (2025) que obtiveram maior frequência do género *Aspergillus* no milho. O género foi mais frequente em amostras de mercado, tal facto comprova que o desenvolvimento destes fungos muito dá-se em fases pós-colheita uma vez que a humidade é um factor

importante que contribui para o crescimento destes fungos e posterior síntese de micotoxinas (Gong *et al.*, 2024).

A frequência do género *Penicillium* entre as amostras de milho e amendoim não apresentou diferenças significativas (Aristil *et al.*, 2019), no entanto este esteve mais presente no amendoim o que entra em desacordo com o estudo realizado por Ismail *et al.*, (2016) que ao analisar amostras de amendoim e milho constatou que o género *Penicillium* apresentou mais propágulos no milho. Análises realizadas por Sineque *et al.*, (2025) constataram que o género *Penicillium* foi mais frequente em amostras de amendoim (30,7%) do que em amostras de milho (8,2%). O género esteve presente na maioria das amostras de milho do campo e na maioria das amostras de amendoim do mercado, tais factos divergem uma vez que o género *Penicillium*, assim como o *Aspergillus* são conhecidos por atacar cereais e oleaginosas em fases pós-colheita, como durante o armazenamento (Deligeorgakis *et al.*, 2023). Entretanto, em um estudo sobre micotoxinas associadas aos grãos de milho colhidos de campos no sudoeste da Etiópia, detectou-se metabólitos de fungos do género *Penicillium* em amostras recém-colhidas (Atnafu *et al.*, 2024).

Apesar dos fungos do género *Aspergillus* e *Penicillium* serem comumente associados às fases pós-colheita, estes também foram detectados em amostras de campo, estes patógenos são omnipresentes e por isso podem atacar culturas alimentares nos campos de cultivo e em fases de armazenamento, transporte e processamento associado a capacidade que estes patógenos têm de sobreviver sob factores ambientais adversos (Daou *et al.*, 2021).

O género *Fusarium* foi mais frequente no milho, este colonizou mais grãos de milho do que grãos de amendoim (Ismail *et al.*, 2016; Sineque *et al.*, 2025). Os fungos do género *Fusarium* são mais comuns em cereais, leguminosas, frutos, silagens e forragens do que em oleaginosas (El-Sayed *et al.*, 2022). Dentre as amostras positivas para o género a maioria das de milho era proveniente do campo, e dentre as de amendoim positivas todas eram provenientes do campo o que sustenta o facto de que fungos do género *Fusarium* são maioritariamente considerados fungos de campo por atacarem as culturas antes da colheita (Ekwomadu e Mwanza, 2023).

A ocorrência destes géneros fúngicos nas amostras desperta alarme uma vez que estes são os principais produtores de micotoxinas (Hamad *et al.*, 2023), com destaque para o género que ocorreu com maior frequência nas amostras, o *Aspergillus*, que suscita grande preocupação pela capacidade de biossíntese de aflatoxina, toxina esta perigosa por apresentar propriedades

hepatocarcinogénicas (Rahman *et al.*, 2020a). Estudos realizados por Matusse *et al.*, (2024) verificaram que a maior incidência e níveis de aflatoxinas foi encontrada em amostras de milho de Moçambique, embora neste estudo o género fúngico produtor de aflatoxina tenha sido encontrado com maior frequência em amostras de amendoim. A presença destes fungos com capacidade de produzir aflatoxinas contribui para a subida dos níveis de CHC no país que já é considerado por certos autores como o país com maior taxa de CHC do mundo (El-Kassas e Elbadry, 2022).

Todas amostras de milho e amendoim de Boane, Manica, Murrupula e Pemba foram positivas para o género *Aspergillus*, apesar deste fungo ser ubíquo, factores como humidade e temperatura influenciam o seu desenvolvimento que pode levar a síntese de aflatoxinas. Um estudo realizado por Klich (2007) mostrou que fungos produtores de aflatoxina pertencentes a secção *Flavi*, em substrato de amendoim obtiveram uma faixa ideal de produção da toxina entre 20 à 35°C, tal facto explica os maiores níveis de contaminação por *Aspergillus* nestes locais uma vez que, estes apresentam faixas de temperaturas propícias para o desenvolvimento destes fungos. Murrupula e Pemba por exemplo, apresentam uma temperatura média anual acima dos 26°C, isto não apenas contribui para o crescimento dos fungos do género *Aspergillus* como também para a síntese de aflatoxinas.

Os fungos do género *Penicillium* também estiveram presentes em amostras de todos locais de colecta, com destaque para as amostras de Marracuene em que todas elas foram positivas para este género. Estes fungos são comumente associados a maus hábitos de armazenamento, como em lugares com altos níveis de humidade (Deligeorgakis *et al.*, 2023).

O género *Fusarium* não foi detectado nas amostras de Manica, todas amostras deste local de colecta eram amostras de mercado o que reforça o facto do género *Fusarium* ser um fungo de campo (Ekwomadu e Mwanza, 2023). Para além disso Ekwomadu e Mwanza (2023), reforçam que este género tem tendência a desenvolver-se melhor em condições de campo com alta humidade, observou-se que Murrupula e Pemba foram os locais com maiores níveis de contaminação por *Fusarium*, nestes locais predomina um clima tropical húmido e a precipitação média anual varia dos 800 aos 1200 mm, podendo superar os 1200 mm. O distrito de Manhiça também foi um dos locais em que não detectou-se o género *Fusarium* nas amostras colhidas, este local apresenta baixos níveis de precipitação comparados aos outros locais, 400-600 mm e há predominância de solos arenosos e semi-húmidos.

Os factores como temperatura, solo e humidade nos campos de cultivo influenciam a contaminação dos cereais e oleaginosas por estes fungos, para além disso insectos e roedores presentes nos campos propiciam uma porta de entrada para a infestação dos grãos por fungos toxigénicos (Wagacha e Muthomi, 2008), tal facto pode explicar a presença de fungos de armazenamento, *Aspergillus* e *Penicillium*, em amostras de campo. Delgado *et al.* (2021) apontam que pragas de roedores e insectos contribuem significativamente para perdas durante as fases de colheita. Os autores também apontam a falta de treinamento e experiência na seleção dos produtos e no manuseio dos mesmos, como por exemplo sacos não devidamente amarrados e outros problemas relacionados ao transporte e armazenamento dos grãos como principais contribuintes para perdas de alimentos.

Em suma a aplicação da técnica de PCR visando a amplificação da região ITS detectou de forma eficiente fungos comumente conhecidos como toxigénicos em amostras de milho e amendoim e, a técnica de PCR visando a amplificação de genes de biossíntese de aflatoxina permitiu também detectar com maior precisão e rapidez contaminações por fungos potencialmente toxigénicos nessas matrizes alimentares.

8. Utilidade dos resultados

Os resultados obtidos neste estudo são úteis para conhecer e entender a situação da contaminação das culturas alimentares básicas pelos fungos toxigénicos e assim influenciar políticas de controlo e monitoramento de micotoxinas em matrizes alimentares. As técnicas de detecção de fungos toxigénicos aqui apresentadas podem servir para a elaboração de um protocolo de testagem de matrizes alimentares mais rápido, eficiente e preciso de modo a impedir a entrada de micotoxinas na cadeia alimentar e assim contornar os principais problemas advindos da ingestão de alimentos contaminados por micotoxinas, como o caso do carcinoma hepatocelular, também conhecido como cancro primário do fígado, que assola grande parte da população.

9. Limitações

Não foi possível reduzir a presença de RNA nas amostras extraídas pelo método de acetato de potássio por falta de reagentes.

Não foi possível adquirir amostras de milho e amendoim de campos de cultivo da província de Manica.

Não foi possível sequenciar o DNA extraído de modo a aferir com exatidão as espécies de fungos presentes nas amostras.

10. Conclusão

As análises morfológicas dos fungos presentes nas amostras de milho e amendoim permitiram detectar três principais gêneros de fungos toxigênicos, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, e um gênero não toxigênico *Rhizopus*. O gênero *Aspergillus* foi o mais frequente (84%), seguido do *Penicillium* (56%) e *Fusarium* (32%). O gênero *Rhizopus* apresentou uma frequência de 68%.

O DNA extraído pelo método de acetato de potássio e kit comercial não apresentou diferenças significativas quanto aos índices de pureza. A concentração e os índices de contaminantes orgânicos entre o DNA extraído pelos dois métodos apresentou diferenças significativas, o DNA extraído pelo método de acetato de potássio apresentou concentrações maiores que o DNA extraído pelo kit comercial, e os índices de contaminantes orgânicos foram mais adequados no DNA extraído pelo método de acetato de potássio. O DNA extraído pelos dois métodos apresentou um peso molecular superior à 10 000 pb.

A amplificação da região ITS gerou fragmentos únicos de um peso molecular entre 500 a 600 pb. Com o auxílio dos resultados morfológicos e da ferramenta *Primer BLAST* comprovou-se que os fragmentos dos produtos de amplificação pertenciam aos gêneros de fungos toxigênicos *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*.

Quanto ao sucesso de amplificação da região ITS entre o DNA extraído pelos dois métodos não houve diferenças significativas, no entanto o DNA do kit comercial amplificou 100% das amostras e o DNA do método de acetato de potássio amplificou 84% das amostras.

O protocolo de amplificação permitiu detectar os principais genes da via de biossíntese de AFB₁, o gene *aflR* produziu bandas de aproximadamente 600 pb, o gene *nor-1* bandas de aproximadamente 1000 pb, o gene *ver-1* bandas de aproximadamente 500 pb, o gene *omtB* e *omt1* bandas superiores à 1000 pb, e o gene *ordA* bandas de aproximadamente 700 pb. Isto mostrou que dentre os fungos identificados nas amostras, muitos possuíam potencial aflatoxigênico.

A ocorrência de fungos toxigênicos entre as amostras de milho e amendoim não apresentou diferenças estatisticamente significativas, o gênero *Aspergillus* ocorreu com mais frequência nas amostras de amendoim (100%) do que em amostras de milho (69,20%). O gênero *Penicillium* teve uma frequência de ocorrência de 53,80% em amostras de milho e 58,30% em amostras de amendoim. O gênero *Fusarium* ocorreu com maior frequência em amostras de milho (46,20%) do que em amostras de amendoim (16,70%).

A ocorrência de fungos toxigénicos e os níveis de contaminação variaram entre os locais de colecta. O género *Aspergillus* foi o mais frequente com 100% de amostras contaminadas de Boane, Manica, Murrupula e Pemba. O género *Penicillium* foi o segundo mais frequente com 100% das amostras colhidas em Marracuene contaminadas. O género *Fusarium* foi mais frequente em Murrupula e Pemba.

Estes resultados indicam que nas amostras colectadas em diferentes regiões do país há contaminação por fungos potencialmente toxigénicos alertando assim para a necessidade de políticas de controlo eficazes.

11. Recomendações

Para estudos futuros recomendo que as amostras sejam imediatamente submetidas as análises moleculares de modo a preservar a qualidade da amostra. Sempre que possível, o sequenciamento da região ITS deve ser feito de modo a confirmar as espécies fúngicas presentes nas amostras ou devem usar-se *primers* ITS associados a proteínas estruturais de cada espécie fúngica e, a confirmação da quantidade ou concentração de aflatoxinas nas amostras deve ser realizada para aferir se os níveis de aflatoxinas encontram-se dentro dos limites estabelecidos pela OMS.

12. Referências Bibliográficas

1. Adeyeye, S. A. O. (2016). Fungal mycotoxins in foods: A review. *Cogent Food & Agriculture*, (2)1: 1-11
2. Adeyeye, S. A., T. J. Ashaolu e F. Idowu-Adebayo (2021). Mycotoxins: Food Safety, Consumer Health and Africa's Food Security. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 1-18
3. Al-Zaban, M. I., A. H. Alrokaban e M. Mahmoud (2023). Development of a real-time PCR and multiplex PCR assay for the detection and identification of mycotoxigenic fungi in stored maize grains. *Mycology*, 14 (3): 227-238
4. Alani, B., M. Motallebi, M. R. Zamani, N. Zarghami, S. Jabbarzadeh, M. Rahbani e M. A. Mashayekhi (2004). Using Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD) Technique for DNA Polymorphism in Isolated Strains of *Fusarium oxysporum*. *Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services*, 26 (3): 65-70
5. Alsalabi, F., Z. Hassan, R. Al-Thani e S. Jaouna (2023). Molecular identification and biocontrol of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in animal feed marketed in the state of Qatar. *Heliyon*, 1-10
6. Alshannaq, A. e J. Yu (2017). Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(632): 1-20
7. Ankwas, E. M., I. Francis e T. Ahmad (2021). Update on mycotoxin contamination of maize and peanuts in East African community countries. *Food Science and Nutrition Therapy*, 7 (1): 1-10
8. Aristil, J., G. Venturini, G. Maddalena, S. Toffolatti e A. Spada (2019). Fungal contamination and aflatoxin content of maize, moringa and peanut foods from rural subsistence farms in South Haiti. *Journal of Stored Products Research*, 85: 1-8
9. Atnafu, B., C. A. Garbaba, F. Lemessa, Q. Migheli, M. Sulyok e A. Chala (2024). Multiple Mycotoxins associated with maize (*Zea mays* L.) grains harvested from subsistence farmers' field in southwestern Ethiopia. *Mycotoxin Research*, 40: 389-399
10. Beatriz, C. e E. M. Cambaza (2015). *Biologia dos Fungos*, 1ª edição, 243pp. Maputo. Universidade Eduardo Mondlane
11. Bediako, K. A., D. Dzidzienyo, K. Ofori, S. K. Offei, J. Y. Asibuo, R. A. Amoah e J. Obeng (2019). Prevalence of fungi and aflatoxin contamination in stored groundnut in Ghana. *Food Control*, 104: 152-156

12. Bintvihok, A., S. Treebonmuang, K. Srisakwattana, W. Nuanchun, K. Patthanachai e S. Usawang (2016). A rapid and sensitive detection of aflatoxina-producing fungus using na optimized polymerase chain reaction (PCR). *Toxicological Research*, 32 (1): 81-87
13. Bradshaw, M. J., M. C. Aime, A. Rokas, A. Maust, S. Moparthi, K. Jellings, A. M. Pane, D. Hendricks, B. Pandey, Y. Li e D. H. Pfister (2023). Extensive intragenomic variation in the internal transcribed spacer region of fungi. *iScience*, 26: 1-10
14. Cambaza, E., S. Koseki e S. Kawamura. (2018a). Aflatoxins in Mozambique: Impact and Potential for Intervention. *Agriculture*, 8 (100): 1-11
15. Cambaza, E., S. Koseki e S. Kawamura. (2018b). Aflatoxins in Mozambique: Etiology, Epidemiology and Control. *Agriculture*, 8 (87): 1-14
16. Cambaza, E., S. Koseki e S. Kawamura. (2018c). Aflatoxins in Mozambique: a Historical Review. *Preprints*, 1-8
17. Cambaza, E., A. Sineque, E. Mongo, A. Gatambire, E. Mateonane e R. Chisumba (2020). Aflatoxins in Mozambican Online Mainstream Press. Repositório da UEM
18. Chandravarman, P., D. Agyei e A. Ali (2024). The prevalence and concentration of mycotoxins in rice sourced from markets: A global description. *Trends in Food Science & Technology*, 146: 1-10
19. Chilaka, A. C., J. E. Obidiegwu, A. C. Chilaka, O. O. Atanda e A. Mally (2022). Mycotoxin Regulatory Status in Africa: A Decade of Weak Institutional Efforts. *Toxins*, 14(442): 1-20
20. Da Rocha, M. E. B., F. O. Freire, F. E. Maia, M. I. F. Guedes e D. Rondina (2014). Mycotoxins and their effects on human and animal Health. *Food Control*, 36: 159-165
21. Daou, R., K. Joubrane, R. G. Maroun, L. R. Khabbaz, A. Ismail e A. El Khoury (2021), Mycotoxins: Factors influencing production and control strategies. *Agriculture and Food*, 6(1): 416-447
22. Dellaporta, S. L., J. Wood e J. B. Hicks (1983). A Plant DNA Minipreparation: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1 (4): 19-21
23. Delgado, L., D. Laborde, e V. Piñeiro (2021). Post-harvest loss in Mozambique – Estimating maize loss in Manica and Zambézia provinces. Technical note. *Monitoring and Analysing Food and Agricultural Policies (MAFAP)*, 1-32

24. Deligeorgakis, C., C. Magro, A. Skendi, H. Gebrehiwot, V. Valdramidis e M. Papageorgiou (2023). Fungal and Toxin Contaminants in Cereal Grains and Flours: Systematic Review and Meta-Analysis. *Foods*, 12 (4328): 1-52
25. Ekwomadu, T. I. e M. Mwanza (2023). *Fusarium* Fungi Pathogens, Identification, Adverse Effects Disease Management, and Global Food Security: A Review of the Latest Research. *Agriculture*, 13 (1810): 1-20
26. El-Dawy, E., Y. Gherbawy e M. Hussein (2024). Characterization of *Aspergillus* section *Flavi* associated with stored grains. *Mycotoxins Research*, 40: 187-202
27. El-Kassas, M., M. Elbadry (2022). Hepatocellular Carcinoma in Africa: Challenges and Opportunities. *Frontiers in Medicine*, 9: 1-4
28. El-Sayed, R. A., A. B. Jebur, W. Kang e F. M. El-Demerdash (2022). An overview on the major mycotoxins in food products: characteristics, toxicity, and analysis. *Journal of Future Foods*, 2 (2): 91-102
29. El-Shaer, H. F., A. A. Shoukry e H. E. Youness (2021). Detection aflatoxin production by local isolates of *Aspergillus* spp. and molecular characterization. *Archives of Agriculture Sciences Journal*, 4 (3): 45-63
30. Embaby, E. M. e M. M. Abdel-Galel (2014). Detection of fungi and aflatoxins contaminated peanut samples (*Arachis hypogaea* L.). *Journal of Agricultural Technology*, 10 (2): 423-437
31. Faraghati, M., M. Abrinbana e Y. Ghosta (2022). Genetic structure of *Sclerotinia sclerotiorum* population from sunflower and cabbage in West Azarbaijan province of Iran. *Scientific Reports*, 12 (9263): 1-11
32. Gbashi, S., O. Adebo, J. A. Adebisi, S. Targuma, S. Tebele, O. M. Areo, B. Olopade, J. O. Odukoya e P. Njobeh (2021). Food safety, food security and genetically modified organisms in Africa: a current perspective. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 37(1): 30-63
33. Gong, Y. Y., S. Watson e M. N. Routledge (2016). Aflatoxin exposure and associated human health effects, a review of epidemiological studies. *Food Safety*, 4 (1): 14-27
34. Hamad, G. M., T. Mehany, J. Simal-Gandara, S. Abou-Alella, O. J. Esua, M. A. Abdel-Wahhab e E. E. Hafez (2023). A review of recent innovative strategies for controlling mycotoxins in foods. *Food Control*, 144: 1-11

35. Hassan, K. I. (2023). Molecular Techniques for Detection of Aflatoxigenic *Aspergillus flavus* and Determine their Aflatoxin in Pistachios. *Iraqi Journal of Agricultural Sciences*, 54 (6): 1773-1783
36. Hlashwayo, D. F. (2018). Aflatoxin B1 contamination in raw peanuts sold in Maputo City, Mozambique and associated factors. *Journal of Stored Products and Postharvest Research*, 9 (6): 58-67
37. Hussain, A., A. Afzal, M. Irfan e K. Malik (2015). Molecular detection of aflatoxin producing strains of *Aspergillus flavus* from peanut (*Arachis hypogaea*). *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 3 (5): 335-341
38. Ismail, M. A., N. T. El-Maali, G. A. Omran e N. M. Nasser (2016). Biodiversity of mycobiota in peanut seeds, corn and wheat grains with special reference to their aflatoxigenic ability. *J Microbiol Biotech Food Sci*, 5(4): 314-319
39. Jakabová, S., Z. Barboráková, D. Tancinová, Z. Masková e J. Golian (2022). Optimization and validation of HPLC-FLD method for determination of aflatoxin B1 and production of this Mycotoxins by *Aspergillus* Section *Flavi* isolates. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 9271: 1-4
40. Jallow, A., H. Xie, X. Tang, Z. Qi e P. Li (2021). Worldwide aflatoxin contamination of agricultural products and foods: from occurrence to control. *Compr Rev Sci Food Saf*, 20: 2332-2381
41. Johnson, A. M., J.R. Fulton, T. Abdoulaye, B. Ayedun, N. J.O. Widmar, A. Akande, R. Bandyopadhyay e V. Manyong (2018). Aflatoxin awareness and Aflasafe adoption potential of Nigerian smallholder maize farmers. *World Mycotoxin Journal*, 1-10
42. Klich, M. A. (2007), Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Mycoscience*, 48: 71-80
43. Kumar, C. M. e M. Mugunthan (2018). Evaluation of three DNA extraction methods from fungal cultures. *Medical Journal Armed Forces India*, 74: 333-336
44. Levin, R. E. (2012). PCR detection of aflatoxin producing fungi and its limitations. *International Journal of Food Microbiology*, 156: 1-6
45. Li, S., Y. Deng, Z. Wang, Z. Zhang, X. Kong, W. Zhou, Y. Yi e Y. Qu (2019). Exploring the accuracy of amplicon-based internal transcribed spacer markers for a fungal community. *Mol Ecol Resour*, 20: 170-184

46. Lieberman, J., A. Bryan, J. Mays, K. Stephens, K. Kurosawa, P. Mathias, D. SenGupta, L. Bourassa, S. Salipante e B. Cookson (2021). High clinical impact of broad-range fungal PCR in suspected fungal sinusitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 59 (11): 1-10
47. Luque, M. I., A. Rodríguez, M. J. Andrade, A. Martín e J. J. Córdoba (2012). Development of a PCR protocol to detect aflatoxigenic molds in food products. *Journal of Food Protection*, 75 (1): 85-94
48. Mahmoud, M. A. (2014). Detection of *Aspergillus flavus* in stored peanuts using real-time PCR and the expression of aflatoxin genes in toxigenic and atoxigenic *A. flavus* isolates. *Foodborne pathogens and disease*, 0 (0): 1-8
49. Martinho, M. G. D., A. Rocha, N. Dos Santos, V. Jesus, E. Gomes e J. Menezes-Filho (2024). Aflatoxins in maize flour produced in Mozambique and its risk assessment. *Food Addit Contam*, 22: 1-9
50. Mathur, S. B. e O. Kongsdal (2003). *Common laboratory seed health testing methods for detecting fungi*, 1ª edição, 427pp. Zurique, International Seed Testing Association (ISTA)
51. Matusse, C., Z. Lucamba, J. Bila, C. Macuamule, A. Sampaio, S. Afonso, A. Venâncio e P. Rodrigues (2024). Aflatoxin Contamination of Various Staple Foods from Angola and Mozambique. *Toxins*, 15(516): 1-16
52. Mikusová, P., M. Cabon, A. Melicharkova, M. Uríl, A. Ritieni e M. Slovák (2020). Genetic Diversity, Ochratoxin A and Fumonisin Profiles of Strains of *Aspergillus* Section Nigri Isolated from Dried Vine Fruits. *Toxins*, 12(592): 1-15
53. Mirhendi, H., A. Ghiasian, H. F. Vismer, M. R. Asgary, N. Jalalizand, M. C. Arendrup e K. Makimura (2010). Preliminary Identification and Typing of Pathogenic and Toxigenic Fusarium Species Using Restriction Digestion of ITS1-5.8S rDNA-ITS2 Region. *Iranian J Publ Health*, 39(4): 35-44
54. Moretti, A., A. Logrieco e A. Susca (2016). Mycotoxigenic Fungi: Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology*, 1542: 1-20
55. Mussalama, E. A. (2023). *Avaliação dos Hábitos Alimentares das Populações nas Províncias de Inhambane e Gaza-Sul de Moçambique: Contribuição para a avaliação de risco de exposição às Micotoxinas*. Tese de Licenciatura. 57pp. Maputo, Universidade Eduardo Mondlane

56. Negash, D. (2018). A review of aflatoxin: Occurrence, Prevention, and Gaps in both food and feed safety. *J. Appl Microb Res*, 1 (1): 35-43
57. Omotayo, O. P., A. O. Omotayo, M. Mwanza e O. O. Babalola (2019). Prevalence of Mycotoxins and their Consequences on Human Health. *Toxicol. Res.*, 35(1): 1-7
58. Pakshir, K., M. Kamali, H. Nouraei, K. Zomorodian, M. Motamedi e M. Mahmoodi (2021). Molecular characterization and antifungal activity against non-dermatophyte molds causing onychomycosis. *Nature*, 11 (20736): 1-9
59. Pickova, D., V. Ostry, J. Toman e F. Malir (2021). Aflatoxins: History, Significant Milestones, Recent Data on their Toxicity and Ways to Mitigation. *Toxins*, 13(399): 1-23
60. Porebski, S., L. Bailey e B. Baum (1997). Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant molecular Biology Reporter*, 15: 8-15
61. Rahimi, K. P., B. Sharifnabi e M. Bahar (2008). Detection of aflatoxin in *Aspergillus* species isolated from pistachio in Iran. *The Journal of Pathology*, 156: 15–20.
62. Rahimi, A., E. Sasani, S. Rezaie, M. M. S. Dallal, S. Mahmoudi, A. Ahmadi, M. Ghaffari, F. Aala e S. Khodavaissy (2021). Molecular identification of aflatoxigenic *Aspergillus* species in dried nuts and grains collected from Tehran, Iran. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 19: 1795-1799
63. Rahman, H., X. Yue, Q. Yu, W. Zhang, Q. Zhang e P. Li (2020a). Current PCR-based methods for the detection of mycotoxigenic fungi in complex food and feed matrices. *World Mycotoxin Journal*, 13 (2): 139-150
64. Rahman, H. U., X. Yue, X. Ren, W. Zhang, Q. Zhang e P. Li (2020b). Multiplex PCR assay to detect *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* species simultaneously. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 1-13
65. Raja, H. A., A. N. Miller, C. J. Pearce e N. H. Oberlies (2017). Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *J. Nat. Prod.*, 80: 756-770
66. Rodrigues, P., C. Soares, Z. Kozakiewicz, R. Paterson, N. Lima e A. Venâncio (2007). Identification and characterization of *Aspergillus flavus* and aflatoxins. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, 2: 527-534

67. Rodríguez, A., M. Rodríguez, M. I. Luque, A. Martín e J. J. Córdoba (2012). Real-time PCR assays for detection and quantification of aflatoxina-producing molds in foods. *Food Microbiology*, 31: 89-99
68. Rohrig, B. (2022). Micotoxinas no milho: Tudo o que você precisa saber. BoosterAgro. [<https://boosteragro.com/blog-po/micotoxinas-no-milho/>] (Janeiro, 2018). Consultado a 13 de Agosto de 2025
69. Sadegui, P., H. Sohrabi, M. R. Majidi, A. Eftekhari, F. Zargari, M. De La Guardia e A. A. Mokhtarzadeh (2024). Mycotoxins detection in food samples through lateral flow assays (LFAs) –An update for status and prospect. *Trends in Analytical Chemistry*, 176: 1-15
70. Salim, R. G., S. Aly, N. Abo-Sereh, A. Hathout e B. Sabry (2019). Molecular Identification and Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Differentiation of Toxigenic *Aspergillus* Strains. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 12(5): 609-616
71. Schoch, C. L., K. A. Seifert, S. Huhndorf, V. Robert, J. L. Spouge, C. A. Levesque, W. Chen e Fungal Barcoding Consortium (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS*, 109(16): 6241-6246
72. Shabeer, S., S. Asad, A. Jamal e A. Ali (2022). Aflatoxin Contamination, Its Impact and Management Strategies: An Updated Review. *Toxins*, 14(307): 1-24
73. Siddiqui, M. A., H. H. Siddiqui, A. Mishra e A. Usmani (2018). Epidemiology of Hepatocellular carcinoma. *International Journal of pharmaceutical sciences and research*, 9 (12): 5050-5059
74. Sineque, A. R., F. R. Dos Anjos e C. L. Macuamule (2019). Aflatoxin contamination of foods in Mozambique: Occurrence, public health implications and challenges. *Journal of Cancer Treatment and Diagnosis*, 3 (4): 21-29
75. Sineque, C. I. I. M., A. Bachir, A. Pondja, A. Muchanga, J. Njamahango, J. Saveca, G. Cecchi, T. Cunhane, F. Dos Anjos, C. Macuamule e S. Di Piazza (2025). Assessment of fungal contamination in corn and peanuts marketed in Southern Mozambique. *Revista Científica UEM (XIII Conferência Científica UEM)*
76. Siteo, M. D. (2024). *Phytosanitary problems of maize, peanuts and cassava flakes (tapioca) stored by smallholder farmers in southern Mozambique*. Tese de Doutorado. 197pp. Lisboa, Universidade de Lisboa

77. Sohrabi, N. e M. Taghizadeh (2018). Molecular identification of aflatoxigenic *Aspergillus* species in feedstuff samples. *Current Medical Mycology*, 4 (2): 1-6
78. Souto, P., L. Augusto, M. Gregório e C. De Oliveira (2017). Principais micotoxicoses em suínos. *Vet. E Zootec.*, 24(3): 480-494
79. Suo, Z., X. Niu, M. Wei, H. Jin e B. Ele (2023). Latest strategies for rapid and point of care detection of Mycotoxins in food: A review. *AnalyticaChimicaActa*, 1246
80. Sweeney, M. J., P. Pàmies e A. Dobson (2000). The use of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for monitoring aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus*. *International Journal of Food Microbiology*, 56: 97-103
81. Szelenberger, R., N. Cichon, W. Zajackowski e M. Bijak (2024). Application of Biosensors for the Detection of Mycotoxins for the Improvement of Food Safety. *Toxins*, 16(249): 1-21
82. Tamele, I., M. Hassouani, I. Timba, T. Guimarães, R. Maia; Z. Falé e V. Vasconcelos (2022). Mycotoxins in Mozambique: Need for a national monitoring programme. *S Afr J Sci*, 118 (9/10): 2-10
83. Tola, M., B. Kebede (2016). Occurrence, importance and control of mycotoxins: A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1): 1-12
84. Wagacha, J. M., J. W. Muthomi (2008). Mycotoxin problem in Africa: Current status, implications to food safety and Health and possible management strategies. *International Journal of Food Microbiology*, 124: 1-12
85. Wyk, P., P. Van der Merwe, P. Subrahmanyam e D. Boughton (1999). Aflatoxin contamination of groundnuts in Mozambique. *International Arachis Newsletter*, 19: 25-7
86. Wilson, I. G. (1997). Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (10): 3741-3751
87. Yassin, S., S. Fadl e W. Elkassas (2024). Assessment of fungal contamination in some cheese varieties with attempts to control its growth. *Assiut Vet. Med. J.*, 70 (183): 208-222
88. Yu, Y., X. Wang, R. Qu, Z. OuYang, J. Guo, Y. Zhao e L. Huang (2024). Extraction and analysis of high-quality chloroplast DNA with reduced nuclear DNA for medicinal plants. *BMC Biotechnology*, (24) 20: 1-10

13. Anexos

Anexo 1: Amostra de grãos de amendoim com contaminação fúngica, em câmara húmida.



Anexo 2: Gêneros de fungos identificados macroscopicamente

Tabela 1. Principais gêneros de fungos identificados morfolologicamente nas amostras.

Código da amostra	Gêneros de fungos		
	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Fusarium</i>
BQ-A-M 1	Positivo	Positivo	Negativo
MN-A-M 2	Positivo	Negativo	Negativo
BN-M-M 3	Positivo	Negativo	Negativo
BN-A-M 4	Positivo	Positivo	Negativo
MH-A-M 5	Positivo	Negativo	Negativo
PB-M-M 6	Positivo	Negativo	Positivo
PB-A-M 7	Positivo	Positivo	Negativo
MU-M-M 8	Positivo	Negativo	Positivo
MR-M-M 9	Negativo	Positivo	Negativo
MR-M-C 10	Negativo	Positivo	Negativo
BQ-A-C 11	Positivo	Negativo	Negativo
BQ-M-M 12	Positivo	Positivo	Positivo
BQ-M-C 13	Negativo	Positivo	Negativo
MN-M-M 14	Positivo	Positivo	Negativo
BN-M-C 15	Positivo	Positivo	Positivo
MH-M-M 16	Positivo	Negativo	Negativo
MH-M-C 17	Negativo	Positivo	Negativo
PB-A-C 18	Positivo	Negativo	Negativo
PB-M-C 19	Positivo	Negativo	Positivo
MU-M-C 20	Positivo	Negativo	Positivo
MU-A-C 21	Positivo	Positivo	Positivo
MU-A-M 22	Positivo	Positivo	Negativo
MR-A-M 23	Positivo	Positivo	Negativo
MR-A-C 24	Positivo	Positivo	Positivo
MH-A-C 25	Positivo	Negativo	Negativo

Anexo 3: Quantificação do DNA extraído

Tabela 2. Concentração e índices de pureza e de contaminantes orgânicos do DNA extraído pelo método de acetato de potássio.

Amostra	Concentração ng/ul	Índice de pureza A260/A280	Índice de contaminantes orgânicos A260/A230
BQ-A-M 1	81,15	1,865	0,945
MN-A-M 2	619,25	1,89	1,08
BN-M-M 3	875,95	2,23	2,165
BN-A-M 4	503,4	1,81	0,895
MH-A-M 5	293,05	2,17	2,1
PB-M-M 6	422,75	2,155	1,835
PB-A-M 7	613,65	1,95	1,295
MU-M-M 8	574,65	2,135	1,715
MR-M-M 9	206,05	2,185	1,91
MR-M-C 10	192,25	2,075	1,62
BQ-A-C 11	49,8	2,045	1,55
BQ-M-M 12	3,75	1,805	0,45
BQ-M-C 13	35,45	1,975	1,51
MN-M-M 14	42,05	2,035	1,55
BN-M-C 15	323,9	2,125	2,22
MH-M-M 16	22,5	2,65	1,58
MH-M-C 17	30,15	2,315	2,18
PB-A-C 18	43,1	1,865	0,965
PB-M-C 19	11,5	1,96	0,7
MU-M-C 20	176,1	1,695	0,935
MU-A-C 21	310,95	1,855	1,09
MU-A-M 22	768,7	1,345	0,47
MR-A-M 23	390,75	1,45	0,495
MR-A-C 24	1528	1,345	0,295
MH-A-C 25	68,85	1,59	0,49

Tabela 3. Concentração e índices de pureza e de contaminantes orgânicos do DNA extraído pelo kit comercial.

Amostra	Concentração ng/ul	Índice de pureza A260/A280	Índice de contaminantes orgânicos A260/A230
BQ-A-M 1	15,65	1,59	0,485
MN-A-M 2	32,85	1,775	0,425
BN-M-M 3	10,75	1,855	1,655
BN-A-M 4	8,2	1,655	0,15
MH-A-M 5	47,8	1,985	0,54
PB-M-M 6	118,3	2	1,79
PB-A-M 7	15,25	1,825	0,275
MU-M-M 8	12,35	2,09	0,32
MR-M-M 9	10,2	2,085	0,205
MR-M-C 10	6,85	1,975	0,25
BQ-A-C 11	16,65	1,755	0,735
BQ-M-M 12	8,75	1,915	0,725
BQ-M-C 13	5,85	1,645	0,275
MN-M-M 14	10,55	1,74	0,08
BN-M-C 15	23,85	1,9	1,32
MH-M-M 16	13,25	1,935	0,555
MH-M-C 17	2,35	2,195	0,265
PB-A-C 18	70,7	1,97	1,28
PB-M-C 19	3,65	1,755	0,35
MU-M-C 20	31,65	1,885	0,985
MU-A-C 21	26,5	1,805	0,82
MU-A-M 22	78,9	1,73	0,91
MR-A-M 23	18,45	1,805	0,72
MR-A-C 24	7,95	2,07	0,33
MH-A-C 25	20,7	1,85	0,495

Anexo 4. Consentimento Informado para Participantes do Estudo sobre Detecção Molecular de Fungos Toxigénicos em Produtos Agrícolas em Moçambique

Título do Estudo: Detecção Molecular de Fungos Toxigénicos em Produtos Agrícolas em Moçambique.

Investigadores:

- Nome do Investigador Principal: Prof. Doutor Edgar Cambaza
- Instituição de Pesquisa: Universidade Eduardo Mondlane – Departamento de Ciências Biológicas
- Contacto: [Telefone, Email]

Descrição do Estudo: Convidamos-lhe a participar de um estudo de pesquisa que visa detectar fungos Toxigénicos em amostras de milho e amendoim utilizando técnicas de PCR. Este estudo é conduzido pela Universidade Eduardo Mondlane e tem como objetivo melhorar a segurança alimentar e a saúde pública em Moçambique.

Objetivo do Estudo:

- Comparar dois métodos de extração de DNA, método de acetato de potássio otimizado e kit comercial, para a detecção de fungos toxigénicos;
- Identificar fungos toxigénicos em milho e amendoim através da amplificação da região ITS;
- Comparar o sucesso de amplificação da região ITS entre o DNA extraído pelo método de acetato de potássio e kit comercial;
- Otimizar e validar um protocolo de PCR para a detecção de genes da via de biossíntese de micotoxinas em fungos presentes em grãos de milho e amendoim;
- Determinar a frequência de ocorrência de fungos toxigénicos em amostras de milho e amendoim, comparando os níveis de contaminação entre essas duas culturas alimentares;
- Comparar os níveis de contaminação por fungos toxigénicos entre diferentes regiões de cultivo do país.

Procedimentos: Se concordar em participar, será solicitado que forneça amostras de milho e amendoim para análise. As amostras serão colectadas de diferentes regiões para garantir representatividade. As análises incluirão a extração de DNA e amplificação por PCR para detectar genes específicos de aflatoxinas.

Duração: A coleta e análise das amostras levará aproximadamente 2 horas. A sua participação consiste apenas em fornecer as amostras de alimentos.

Riscos e Benefícios:

- **Riscos:** Este estudo não apresenta riscos directos para os participantes.
- **Benefícios:** Os resultados poderão contribuir para a melhoria da segurança alimentar e redução de problemas de saúde relacionados ao consumo de alimentos contaminados por aflatoxinas.

Confidencialidade: Todas as informações colectadas serão mantidas confidenciais. Os dados serão codificados e armazenados de forma segura. Os resultados serão divulgados em publicações científicas sem identificar os participantes.

Participação Voluntária: A participação neste estudo é totalmente voluntária. O participante pode optar por não participar ou retirar-se a qualquer momento sem qualquer penalidade ou perda de benefícios aos quais tenha direito.

Contato para Dúvidas: Caso tenha alguma dúvida sobre o estudo, pode entrar em contato com:

- Doutor Edgar Cambaza
- [Contacto, Email]

Declaração de Consentimento: Eu, _____, concordo em participar do estudo "Detecção Molecular de Fungos Toxigénicos em Produtos Agrícolas em Moçambique". Compreendo que a participação é voluntária e que posso me retirar a qualquer momento. Compreendo que os dados colectados serão mantidos confidenciais.

Assinatura do Participante: _____ **Data:** ____/____/____

Assinatura do Investigador: _____ **Data:** ____/____/____

Assinatura da Testemunha (se aplicável): _____ **Data:** ____/____/____
