INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

CENTRO DE CIÊNCIA E QUALIDADE DE ALIMENTOS

ADRIANA RAQUEL PERSSON DA SILVA

Micobiota e Incidência de Aflatoxinas e Ocratoxina A em pimenta preta (*Piper nigrum* L.) comercializada no Brasil

CAMPINAS

2017

ADRIANA RAQUEL PERSSON DA SILVA

Micobiota e Incidência de Aflatoxinas e Ocratoxina A em pimenta preta (*Piper nigrum* L.) comercializada no Brasil

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

Aluna: Adriana Raquel Persson da Silva

Orientadora: Drª. Beatriz Thie Iamanaka

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação defendida pela aluna Adriana Raquel Persson da Silva e orientada pela Profª. Drª. Beatriz Thie Iamanaka

CAMPINAS

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Bibliotecária Adriana Gomes do Nascimento CRB/8 8853 –

Biblioteca Central do ITAL- Instituto de Tecnologia de Alimentos.

S586a Silva, Adriana Raquel Persson da. Micobiota e Incidência de Aflatoxinas e Ocratoxina A em pimenta preta (*Piper nigrum* L.) comercializada no Brasil. Adriana Raquel Persson da Silva / Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas, SP: ITAL - Instituto de Tecnologia de Alimentos, 2017.

61f.

Beatriz Thie Iamanaka (orientador)

Inclui bibliografia

1. *Piper nigrum* L. 2. Fungos toxigênicos. 3. Aflatoxinas. 4. Ocratoxina A. I. Instituto de Tecnologia de Alimentos, CCQA – Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos. II. Adriana Raquel Persson da Silva. III. Título.

Título em inglês: Mycobiota and Incidence of Aflatoxins and Ochratoxin A in black pepper (*Piper nigrum* L.) commercialized in Brazil

Key words: *Piper nigrum*, fungi, aflatoxins, ochratoxin A.

Titulação: Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Banca Examinadora: Dra. Beatriz Thie Iamanaka (Orientadora), Dra. Marta H. Taniwaki (Titular), Dra. Maria Antonia Calori Domingues (Titular) e Dra. Andrezza Maria Fernandes (Suplente).

Data da Defesa: 22 de fevereiro de 2017

Programa de pós-graduação: Programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Dra. Beatriz Thie Iamanaka (Orientadora)
Instituto de Tecnologia de Alimentos

Dra. Marta Hiromi Taniwaki
Instituto de Tecnologia de Alimentos

Dra. Maria Antonia Calori Domingues
Depto. de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (LAN)
ESALQ - Universidade de São Paulo

Dra. Andrezza Maria Fernandes (Suplente)
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA)
Universidade de São Paulo

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida por Adriana Raquel Persson da Silva, aprovada pela Comissão Julgadora em 22/02/2017
Presidente da Banca: Beatriz Thie Iamanaka

DEDICATÓRIA

À Deus e aos meus pais dedico com amor.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre ao meu lado me abençoando, mostrando o caminho certo a seguir e cumprindo o plano maior na minha vida.

Aos meus pais e irmãos, pelo amor, suporte e compreensão ao longo da minha jornada.

À minha Orientadora Dra. Beatriz T. Iamanaka, pela paciência, disposição e ensinamentos.

À Dra. Marta H. Taniwaki, pela cooperação e contribuições valiosas.

À técnica do laboratório de Micotoxinas Ligia M. Martins, pela amizade e incentivo, além de todo o esforço e dedicação na realização deste trabalho.

As colegas do laboratório de Micologia, em especial Aline, Cristina, Larissa, Josiane e Gabriela e por toda a ajuda, amizade e companheirismo.

A todas as funcionárias do Laboratório de Microbiologia, pela receptividade e apoio na realização desta pesquisa.

Às estagiárias por todo o auxílio e prestatividade.

Aos professores e colegas da pós-graduação, pelo aprendizado e incentivo.

À secretária da pós-graduação, M.ª Elenice Ferreira, por toda a assistência e simpatia.

Ao programa de Pós-graduação do ITAL pela oportunidade oferecida de crescimento profissional.

À Banca Examinadora, pela atenção e auxílio.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Os objetivos principais deste trabalho foram isolar e quantificar as espécies fúngicas presentes em amostras de pimenta preta comercializadas no Brasil, na forma de grão e pó e vendidas a granel e embaladas; identificar as espécies de *Aspergillus* section *Flavi, A.* section *Nigri* e *A.* section *Circumdati* nas amostras; avaliar a produção de aflatoxinas (AFs) e ocratoxina A (OTA) pelos isolados; e determinar os níveis de aflatoxinas e ocratoxina A presentes nas amostras. Foram utilizados os métodos de plaqueamento direto dos grãos, com e sem desinfecção externa, e de diluição em placas para as amostras em pó. Foi empregada a técnica de Agar plug para avaliar a produção de AFs e OTA pelos isolados. Também foram determinados os níveis de aflatoxinas e ocratoxina A nas amostras, utilizando extração e limpeza com coluna de imunoafinidade e detecção e quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detector de fluorescência. No total foram isolados 2.765 fungos e a pimenta preta apresentou contaminação por 48 grupos diferentes de fungos. As espécies mais frequentes pertenceram ao grupo de *Aspergillus* section *Nigri*, com 28% de ocorrência nas amostras com desinfecção, 36,5% nas amostras sem desinfecção e 34,5% nas amostras em pó. As médias de contaminação foram de 5,1%, 13,7% e 1,4 x 10^3 UFC/g respectivamente. De um total de 1.079 isolados de *Aspergillus* section *Nigri* apenas 4% foram produtores de ocratoxina A. Cinquenta e cinco por cento das amostras estavam contaminadas com OTA, com níveis variando de 0,15 a 13µg/kg. Outros grupos de fungos estiveram presentes como *Eurotium chevalieri*, *Aspergillus tamarii* e *A. flavus. A. flavus* estiveram presentes em 42% das amostras com desinfecção, 64,5% das amostras sem desinfecção e 55% das amostras em pó. Quarenta por cento do total das cepas (376) de *A. flavus* produziram AFs. Cinquenta e três por cento das amostras estavam contaminadas com AFs variando de 0,12 a 11µg/kg. Cento e trinta e cinco cepas de *A.* section *Circumdati* foram isoladas e este grupo apresentou 12,9% de ocorrência nas amostras sem desinfecção, 58,1% com desinfecção e 13,8% nas amostras em pó, e 46,7% das cepas foram produtoras de ocratoxina A. A contaminação fúngica total e por fungos toxigênicos foram maiores nas amostras a granel do que nas amostras embaladas. A média de contaminação fúngica total nas amostras de grãos a granel foi de 55,03% com desinfecção, 94,34% sem

desinfecção e 3,52 x 10^4 UFC/g nas amostras em pó. Enquanto que nas amostras embaladas foi de 3% com desinfecção, 60% sem desinfecção e 2,82 x 10^4 UFC/g nas amostras em pó.

Palavras-chave: *Piper nigrum*, aflatoxinas, ocratoxina A, *Aspergillus* section *Flavi*, *Aspergillus* section *Nigri*.

ABSTRACT

The main objectives of this study were to isolate and quantify the fungal species present in black pepper commercialized in Brazil, in a grain and powder form, sold in bulk and packaged; to identify the *Aspergillus* section *Flavi*, *A.* section *Nigri* and *A.* section *Circumdati* in the samples; to evaluate the production of aflatoxins (AFs) and ochratoxin A (OTA) by the isolates; and to determine the aflatoxin and ochratoxin A levels present in the samples. Two methods were used: direct plating of the grains, with and without external disinfection, and dilution for the powder samples. Agar plug technique was used to evaluate the production of AFs and OTA by the isolates. The levels of aflatoxins and ochratoxin A in the samples were also determined using extraction and cleaning with immunoaffinity column and detection and quantification by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with fluorescence detector. In total, 2,765 fungi were isolated and black pepper showed contamination by 48 different groups of fungi. The most common species belonged to the *Aspergillus* section *Nigri*, with 28% of occurrence in the samples with disinfection, 36.5% in the samples without disinfection and 34.5% in the powder samples. The contamination averages were 5.1%, 13.7% and 1.4 x 10^3 CFU/g, respectively. From a total of 1,079 of *Aspergillus* section *Nigri* isolates, only 4% were ochratoxin A producers. Fifty-five percent of samples were OTA-contaminated, ranging from 0.15 to 13µg/kg. Other fungal groups were present such as *Eurotium chevalieri*, *Aspergillus tamarii* and *A. flavus*. *A. flavus* was present in 42% of the samples with disinfection, 64.5% of the samples without disinfection and 55% of the powder samples. Forty percent of the total strains (376) of *A. flavus* produced AFs. Fifty-three percent of the samples were contaminated with AFs ranging from 0.12 to 11µg/kg. One hundred and thirty-five strains of *A.* section *Circumdati* were isolated and this group occurrence was 12.9% in samples without disinfection, 58.1% with disinfection and 13.8% in powder samples, and 46.7% were ochratoxin A producers. Total fungal contamination was higher in bulk samples than in packaged samples. The mean total fungal contamination in the bulk samples was 55.03% with disinfection, 94.34% without disinfection and 3.52 x 10^4 CFU/g in powder samples. In the packaged samples it was 3% with disinfection, 60% without disinfection and 2.82 x 10^4 CFU/g in powder samples.

Key-words: *Piper nigrum*, aflatoxins, ochratoxin A, *Aspergillus* section *Flavi*, *Aspergillus* section *Nigri*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL....1
2. OBJETIVOS....3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA....4
3.1. Pimenta preta....4
3.1.1. Propriedades....4
3.1.2. Piperina....4
3.1.3. Aspectos gerais....5
3.1.4. Produção....5
3.1.5. Cenário econômico....11
3.1.6. Lei de Incentivo a Qualidade....12
3.2. Principais fatores que influenciam o crescimento de fungos e produção de micotoxinas....13
3.3. Gênero *Aspergillus*....13
3.4. Micotoxinas....14
3.4.1. Micotoxicoses....14
3.4.2. Aflatoxinas....15
3.4.3. Ocratoxina A....16
3.4.4. Legislação brasileira....17
3.4.5. Legislação internacional....18
3.5. Ocorrência de fungos e micotoxinas em pimenta preta....18
Capítulo 1: Micobiota de pimenta preta (*Piper nigrum* L.) comercializada no Brasil..21
1. INTRODUÇÃO....23
2. OBJETIVOS....26
4. RESULTADOS....28
5. DISCUSSÃO....33
6. CONCLUSÕES....35
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS....36
Capítulo 2: Pimenta preta (*Piper nigrum* L.) – Ocorrência de *Aspergillus* section *Flavi* e aflatoxinas em amostras comercializadas no Brasil....41
1. INTRODUÇÃO....43
2. OBJETIVOS....44

3. MATERIAL E MÉTODOS 45
4. RESULTADOS 49
5. DISCUSSÃO.....57
6. CONCLUSÕES.....59
7. REFERÊNCIAS 60
Capítulo 3: Ochratoxin A and its producing fungi in black pepper (*Piper nigrum* L.) consumed in Brazil 64
1. INTRODUCTION 66
2. MATERIALS AND METHODS 68
3. RESULTS 72
4. DISCUSSION 75
5. CONCLUSIONS 77
6. ACKNOWLEDGMENTS 77
7. REFERENCES 78
Capítulo 3: Ochratoxin A and its producing fungi in black pepper (*Piper nigrum* L.) consumed in Brazil (Tables and figures) 83
4. CONCLUSÃO GERAL 92
5. REFERENCIAS 94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFB1	Aflatoxina B1
AFB2	Aflatoxina B2
AFG1	Aflatoxina G1
AFG2	Aflatoxina G2
AFPA	Aspergillus Flavus e Parasiticus Agar
ALARA	As Low As Reasonably Achievable
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CIA	Coluna de Imunoafinidade
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CNNPA	Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos
CREA	Creatine Sucrose Agar
CYA	Czapek Yeast Extract Agar
DESER	Departamento de estudos sócio-econômicos
ESA	European Spice Association
FO	Frequência de ocorrência
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IAC	Immunoaffinity column
IARC	International Agency for Research on Cancer
INCAPER	Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural
IPC	International Pepper Community
JECFA	The Joint WHO/FAO Expert Committee on Food Additives
MEA	Malt Extract Agar
MY50G	Malt Yeast Extract 50% Glucose Agar
OTA	Ocratoxina A
PTWI	Provisional Tolerable Weekly Intake
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
TLC	Thin Layer Chromatography
YESA	Yeast Extrat Sucrose Agar

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o quarto maior produtor de pimenta preta no mundo (FAO, 2014), e o estado do Pará é responsável por 75% da produção nacional seguido por Espírito Santo e Bahia (IBGE, 2016). A pimenteira é uma planta que apresenta grande produtividade e seu fruto é um dos condimentos mais apreciados no mundo apresentando grande valor econômico, permitindo que a atividade desenvolvida pelos pipericultores proporcione alta rentabilidade (LIMA *et al*., 2010). Buscando a melhoria da comercialização e qualidade deste produto, está em vigor no estado do Espírito Santo, a lei de incentivo à produção de pimentas-do-reino de qualidade, garantindo maior segurança do produto para comércio interno e externo (BRASIL, 2016). Porém, ainda há grande preocupação com a saúde pública em relação à presença de fungos e à produção de micotoxinas em grão armazenados como a pimenta preta, que é um produto natural, usualmente seco ao sol e de baixa atividade de água, portanto muito susceptível à contaminação por fungos xerofílicos toxigênicos (JAYASHREE; SUBRASMANYAM, 2000; SCHATZKI; ONG, 2001; BAYMAN; BAKER; MAHONEY, 2002b).

Algumas espécies fúngicas produzem metabólitos secundários que podem ser altamente tóxicos e prejudiciais à saúde do homem e outros animais, como ocratoxina A e aflatoxinas. A ocratoxina A é uma toxina nefrotóxica e tem sido encontrada em especiarias (JALILI; JINAP; NORANIZAN, 2010; RAMESH; JAYAGOUDAR, 2014; JESWAL; KUMAR, 2015; JALILI, 2016). Várias espécies de *Aspergillus* section *Circumdati* e *Nigri* são capazes de produzir a ocratoxina A, além de algumas espécies de *Penicillium* também (PITT, 1987; ABARCA *et al*., 1994; PITT, 2000; LARSEN; SVENDSEN; SMEDSGAARD, 2001; FRISVAD *et al*., 2004). O limite da ANVISA para esta toxina na pimenta preta é de 30µg/kg (BRASIL, 2011), e da União Europeia é de 15,0 µg/kg (EC, 2015).

Outro grupo de micotoxinas e de extrema importância em termos de segurança do alimento, são as aflatoxinas. Estas foram as primeiras a serem descobertas. São metabólitos produzidos principalmente por *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius,* e são consideradas as substâncias mais carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas encontradas naturalmente em alimentos e rações e também sua presença tem sido relacionada em pimenta preta (KURTZMAN, HORN;

HESSELTINE, 1987; PETERSON *et al*., 2001; ZINEDINE *et al*., 2006; JESWAL; KUMAR, 2015). As aflatoxinas são micotoxinas classificadas pela IARC (2002) como sendo compostos carcinógenos para humanos (classe 1). Para as aflatoxinas totais a ANVISA estabeleceu o Limite Máximo Tolerado de 20,0 µg/kg em especiarias, incluindo a pimenta preta (BRASIL, 2011) e a União Europeia é mais restritiva com um limite de 5 µg/kg para aflatoxina B1 e 10 µg/kg para aflatoxinas totais em pimenta preta (EC, 2010).

Em 2015, o Codex Committee on Contaminants in Foods (CCCF), incluiu a pimenta-do-reino no grupo 1 da lista das 6 especiarias prioritárias para avaliação e quantificação de aflatoxinas totais, aflatoxina B1 e ocratoxina A (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2016).

As etapas de produção da pimenta como colheita, secagem e armazenamento, devem ser bem controladas de modo a evitar contaminações por microrganismos, pois dependendo das condições de temperatura, umidade relativa e níveis de umidade do alimento, pode haver o favorecimento do crescimento de fungos toxigênicos, que são capazes de invadir e colonizar a matriz e produzir micotoxinas. Além disso, as espécies de *Aspergillus* section *Nigri,* por produzirem esporos pretos, possuem vantagem frente aos seus competidores, devido à resistência aos raios solares, e acabam persistindo nas pimentas durante a secagem ao sol (PITT; HOCKING, 2009).

Um aspecto importante a ser considerado é que, as pimentas são frequentemente consumidas *in natura*, e normalmente não recebem qualquer tratamento de descontaminação que possa diminuir a contaminação por esporos de fungos toxigênicos e a concentração da toxina, caso estejam presentes.

Nestas condições, por ser um produto largamente utilizado na alimentação humana, e as pesquisas sobre o assunto serem escassas no Brasil, é de extrema importância um estudo mais detalhado para avaliar a qualidade destes produtos consumidos em nosso país.

2. OBJETIVOS

A pesquisa teve como objetivos principais:

- Isolar e quantificar as espécies fúngicas presentes em amostras a granel e embaladas (em grão e em pó) de pimentas pretas comercializadas no Brasil;
- Identificar os principais grupos e espécies de *Aspergillus* section *Flavi, A.* section *Nigri* e A. section *Circumdati* nas amostras;
- Avaliar a produção de aflatoxinas pelos isolados de *Aspergillus* section *Flavi* e ocratoxina A por *Aspergillus* section *Nigri* e *A.* section *Circumdati*;
- Determinar os níveis de aflatoxinas e ocratoxina A presentes nas amostras e se estão de acordo com os limites das regulamentações e resoluções vigentes.

E como objetivos secundários:

- Identificar a micobiota presente em pimenta preta;
- Determinar a atividade de água das amostras;
- Otimizar os métodos de detecção e quantificação de ocratoxina A e aflatoxinas em pimenta preta utilizando colunas de imunoafinidade e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e derivatização pós–coluna com Kobracell no ensaio de aflatoxinas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Pimenta preta

3.1.1. Propriedades

Os condimentos são mundialmente utilizados principalmente para adicionar ou aumentar sabor aos alimentos, com ou sem valor nutritivo e, secundariamente, com o propósito de conservação, em razão de suas propriedades antioxidantes (CNNPA, 1978; PRADO, 2008). A pimenta preta também apresenta propriedades medicinais sendo amplamente utilizados na medicina indiana (JESWAL; KUMAR, 2015).

Tais propriedades terapêuticas da pimenta preta incluem analgésico, antisséptico, antiespasmódico, afrodisíaco, diaforético, digestivo, diurético, antipirético, laxante, rubefaciente (SRINIVASAN, 2007).

3.1.2. Piperina

A pimenta-do-reino, também conhecida como pimenta preta, é famosa como a “rainha” das especiarias devido à presença de um alcalóide - a piperina - responsável pela sua qualidade pungente (VASAVIRAMA; UPENDER, 2014).

A piperina é encontrada nos frutos e raízes de *Piper nigrum* (pimenta preta) e *Piper longum* (pimenta longa). Ela é um componente importante na oleorresina dessas pimentas, ajuda a aumentar a absorção e a biodisponibilidade de outros compostos bioativos (DUANGJAI *et al*., 2012).

Tal oleorresina tem muitas aplicações em alimentos, cosméticos e farmácia (SOVOVÁ *et al*., 1995; PERAKIS; LOULI; MAGOULAS, 2005; VASAVIRAMA; UPENDER, 2014).

Bhardwaj *et al*. (2007) mostraram que a piperina pode conter propriedades antibacteriana e antialérgica, e aumentar dramaticamente a absorção de selênio, vitamina B e β-caroteno assim como outros nutrientes.

3.1.3. Aspectos gerais

A pimenta preta (*Piper nigrum* L.) é uma espécie perene, semi-lenhosa e trepadeira. O gênero Piper pertence à classe das Dicotiledôneas, ordem Piperales e família Piperacea. Quando maduro seu fruto possui de 4 a 6 mm de diâmetro e a casca adquire coloração avermelhada (EMBRAPA, 2004).

Originária da Ásia é uma especiaria altamente valorizada em todo o mundo. Devido ao seu sabor único, é frequentemente utilizada como condimento alimentar, e é utilizada especialmente no preparo e processamento de alimentos (BONTEMPO, 2007).

Por ser uma planta de região tropical, necessita de temperatura e umidade altas para seu desenvolvimento, exigindo temperaturas entre 23°C e 28°C, e precipitação pluviométrica anual acima de 1.500 mm, bem distribuída e com período seco bem definido, de dois a três meses, para proporcionar maturação uniforme dos frutos, aumento de produção e melhoria na qualidade dos frutos (MAPA, 2011).

Embora as cultivares de pimenta preta não apresentem resistência a doenças, é importante diversificar no campo, evitando a uniformidade genética com a utilização de uma única cultivar. As principais utilizadas pelos produtores no Brasil são: Cingapura, Guajarina, Bragantina, APRA, Kuthiravally, Kottanadan-1, Iaçará-1 (LEMOS; TREMACOLDI; POLTRONIERI, 2014).

3.1.4. Produção

3.1.4.1. Tutoramento

A pimenteira por ser uma planta trepadeira necessita de suportes (tutores) para seu crescimento e desenvolvimento. Estes tutores podem ser mortos ou vivos. Usualmente são utilizadas estacas de madeira como tutores mortos, medindo por volta de 3 m. Estas estacas são normalmente de madeira-de-lei, resistentes ao apodrecimento (EMBRAPA, 2004).

A utilização de tutores vivos vem utilizando a gliricídia (*Gliricidia sepium*) como uma alternativa mais sustentável. Neste sistema a poda é feita anualmente para evitar sombreamento e crescimento excessivo da pimenteira. Este método de

cultivo das pimentas pretas possibilita maior sustentabilidade econômica e ecológica, reduzindo assim o uso de tutor de madeira, e consequentemente diminuindo a pressão sobre o desmatamento das florestas (LEMOS; TREMACOLDI; POLTRONIERI, 2014).

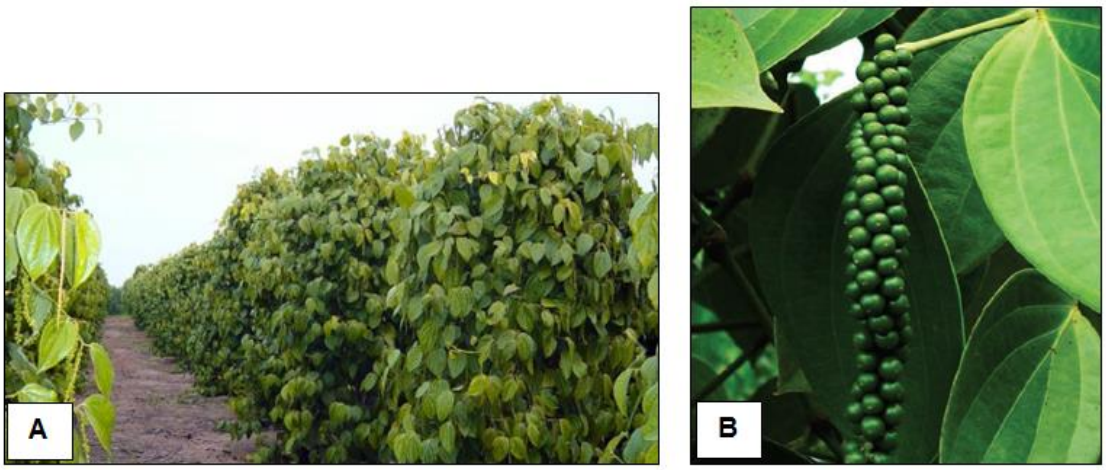


Figura 1. A. Cultivo de pimenta-do-reino (INCAPER, 2014). B. Espiga de pimenta-do-reino com os frutos ainda imaturos (FILGUEIRA, 2014).

3.1.4.2. Fusariose em pimenta preta

A fusariose é a principal doença fitossanitária na pipericultura no Brasil. É causada pelo fungo *Nectria haematococca* f. sp. *piperis* (fase teleomórfica) e *Fusarium solani* f. sp. *piperis* (fase anamórfica) (SILVA; NETO; SILVA, 2011).

A doença pode reduzir a vida útil da planta em média de 12 para 7 ou 6 anos, diminuindo a produção e podendo levar um pimental inteiro à morte em pouco tempo, pois dissemina-se rapidamente entre as plantas (LEMOS; TREMACOLDI; POLTRONIERI, 2014).

3.1.4.3. Colheita

No Pará a colheita é feita entre os meses de junho e novembro e no Espírito Santo e Bahia é feita durante praticamente o ano todo. A colheita é manual e as espigas são colocadas em cestas ou sacolas de pano pelos trabalhadores. No ato

da colheita o solo ao redor da pimenteira é coberto com lona ou plástico previamente higienizados, para evitar que os grãos caiam no solo e sejam contaminados. É recomendável higienizar sempre as cestas de transporte das pimentas antes da próxima colheita para evitar riscos de contaminação. Além disso, é muito importante impedir que excretas humanos ou animais possam ser introduzidos nos momentos da colheita, secagem e armazenamento (EMBRAPA, 2004).

3.1.4.4. Beneficiamento

O tipo de pimenta obtido a partir de *Piper nigrum* L. vai depender da maturação do fruto e do beneficiamento realizado. Dessa forma, pode-se alcançar 4 diferentes tipos de pimenta-do-reino: verde, preta, vermelha e branca.

Para obtenção da pimenta verde, a colheita é feita quando os frutos, ainda verdes, atingiram apenas dois terços do desenvolvimento. Os frutos são retirados das espigas, manualmente ou em pequenas debulhadoras, conservados e comercializados em salmouras à vácuo (DUARTE *et al.*, 2006).

Para a obtenção da pimenta preta os frutos são colhidos semimaduros. São secos ao sol em torno de 3 a 6 dias. Para alcançar uma secagem homogênea, a pimenta deve ser revolvida até os grãos atingirem a umidade recomendada. A *European Spice Association* (ESA, 2015) recomenda uma umidade dos grãos de ≤12%. Depois da secagem, os grãos passam por ventilação para eliminar as impurezas e os grãos chochos, e em seguida, são peneirados, classificados e padronizados (LEMOS; TREMACOLDI; POLTRONIERI, 2014).

Para obtenção da pimenta vermelha a colheita é feita após a maturação completa, quando a casca apresenta coloração avermelhada e textura lisa. É vendida fresca e seca ou em conserva (MAPA, 2006).

A pimenta branca é obtida a partir da vermelha, na qual a colheita é feita após a maturação completa, quando a casca apresenta coloração avermelhada. Os grãos são colocados em tanques com água por um período de 15 a 30 dias para amolecer e desprender as cascas (a água dos tanques é trocada de 3 em 3 dias). A água é drenada e em seguida é realizada a secagem dos grãos, que é feita ao sol, por cerca de 3 dias, com o objetivo de preservar o aroma e a cor clara. Assim como a

pimenta preta, a pimenta branca também passa por ventilação, peneiragem, classificação e padronização (EMBRAPA, 2004).

3.1.4.5. Secagem da pimenta preta

O intuito da secagem é de reduzir a umidade dos grãos, promovendo melhor qualidade do produto final, considerando que é uma etapa crítica na qual pode haver grande contaminação (DUARTE; ALBUQUERQUE, 2005).

O sistema de secagem mais comum é a céu aberto em terreiros durante 3 a 6 dias, onde a pimenta-do-reino é espalhada em lonas plásticas, não sendo recomendada a secagem diretamente no chão. Nesta etapa existe o risco de contaminação do produto por coliformes termotolerantes e *Salmonella* spp. por meio de material fecal e urina de animais domésticos e silvestres, que podem ter acesso ao local. Neste caso, recomenda-se cercar a área para evitar a circulação de animais. Na secagem, os grãos são regularmente revolvidos durante o dia, cobertos durante a noite e protegidos da chuva e orvalho. É importante que as pessoas que trabalham no processo de secagem pratiquem bons hábitos de higiene e não circulem sobre a lona e os grãos com calçados não higienizados (DUARTE *et al.*, 2006; PICCOLO, 2014).

Uma alternativa para diminuir o risco de contaminação é a utilização de jirau para a secagem. É uma armação em rede suspensa que evita o contato dos grãos com os pés ou calçados dos trabalhadores e dificulta o acesso de animais. Também podem ser utilizados secadores mecânicos movidos à lenha, com mecanismo de rotação horizontal ou vertical, com temperatura que atinge 70ºC durante 8 a 10 horas. Além de secadores a diesel e elétricos (EMBRAPA, 2004).

3.1.4.6. Armazenamento

Após a secagem, o produto é ensacado (normalmente em sacos de polipropileno de 50 kg), armazenado em local fechado e ventilado, preferencialmente em armazéns de alvenaria, evitando o reumedecimento para prolongar a conservação, podendo permanecer nessas condições por mais de 1 ano (LEMOS; TREMACOLDI;

POLTRONIERI, 2014). A *European Spice Association* (ESA, 2015) recomenda umidade dos grãos ≤12% (ESA, 2015).

É importante evitar o acesso de animais domésticos e selvagens nos locais de armazenamento (*e.g*., gatos, cães, aves, morcegos e roedores) (DUARTE; ALBUQUERQUE, 2005).

O excesso de umidade acelera os processos oxidativos que conduzem ao envelhecimento e consequentemente a deterioração dos grãos, podendo atrair animais que encontram acesso aos armazéns quando não são completamente fechados, tornando-se vetores de contaminação fúngica e bacteriana do produto (PICCOLO, 2014). A ESA considera seguro o limite de atividade de água dos grãos de 0,65 (ESA, 2015).

As etapas de colheita, secagem e armazenamento são críticas, pois a temperatura, o teor de água do alimento e umidade relativa do ar podem deteriorar o produto, favorecendo o desenvolvimento de fungos e consequentemente a produção de micotoxinas. O produto pode ainda ser contaminado por resíduos de agrotóxicos que podem se acumular nos grãos quando são aplicados sem a observação do período de carência das substâncias (DUARTE; ALBUQUERQUE, 2005; PICCOLO, 2014).

3.1.4.7. Comercialização

A pimenta preta que é padronizada e classificada e que atende às normas vigentes de qualidade e sanidade torna-se um produto mais competitivo no mercado (EMBRAPA, 2004).

Dentre os parâmetros microbiológicos, os micro-organismos a serem monitorados são *Salmonella spp.* e o grupo dos coliformes termotolerantes. De acordo com a resolução da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) RDC 12/2001, a pimenta preta não pode estar contaminada com *Salmonela* spp. (ANVISA, 2001). Também é proibida a comercialização de lotes com mais de 2% de grãos mofados (MAPA, 2006).

Os lotes contaminados com aflatoxinas ou agrotóxicos também são descartados (DUARTE; ALBUQUERQUE, 2005).

A padronização e classificação são feitas com base na Lei nº 9.972/2000 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que institui a classificação de produtos vegetais, subprodutos e resíduos de valor econômico, para fins de comercialização (MAPA, 2000).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) classifica a pimenta-do-reino em 3 tipos ("Brasil Asta", "Brasil 1" e "Brasil 2") de acordo com a Instrução Normativa nº 10, de 15 de Maio de 2006, que estabelece o Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) da Pimenta-do-reino (MAPA, 2006).

Essas classificações levam em consideração alguns fatores de qualidade, os principais que diferem um tipo das outras são: impurezas e matérias estranhas, grãos chochos, grãos mofados e densidade mínima. Em ordem crescente dos fatores e porcentagem de presença, é feita a denominação da qualidade das pimentas. As indústrias fazem a seleção e separação dos grãos da seguinte maneira: dentro da classe de pimenta preta, o tipo "Brasil Asta" é a mais pura que se pode encontrar no mercado, são pimentas selecionadas e que apresentam a casca mais lisa; a "Brasil 1" possui mais grãos chochos e matéria estranha quando comparada à anterior, esteticamente tem sua casca com algumas partes enrugadas; e a "Brasil 2" apresenta grãos pequenos em relação às demais, casca enrugada, e qualidade inferior pois são as que apresentam maior quantidade de grãos chochos e impurezas (praticamente não são comercializadas no Brasil) (MAPA, 2006).

Outro aspecto importante para garantir a qualidade da pimenta pelas indústrias é o uso de processos de descontaminação como irradiação e ozonização.

Alguns estudos mostraram os efeitos da radiação gama sobre *Aspergillus* e aflatoxinas e ocratoxina A.

Qumer et al. (2012) avaliou três híbridos de pimenta (Red Sky, Maha, e Maravilha King). As contagens de *Aspergillus* foram reduzidas em 93 e 97%, em doses de 2 e 4 kGy, respectivamente. Uma dose de radiação de 6 kGy eliminou completamente a população total de bolores e fungos *Aspergillus*, porém os níveis de aflatoxinas foram pouco afetados na mesma dose (redução de 6%).

Outro estudo demonstrou que a redução nos níveis de ocratoxina A (OTA) e aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 em pimenta preta, em doses de radiação de 60kGy, foram capazes de destruir 52%, 43%, 24%, 40% e 36% de OTA, AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2, respectivamente (JALILI; JINAP; NORANIZAN, 2010).

Pesquisas também mostram os efeitos do uso de ozônio sobre fungos filamentosos e leveduras.

Zhao e Cranston (1995) estudaram o uso do ozônio para descontaminar pimentas pretas. A população de *Penicilium* spp. foi reduzida em mais de 3 números de log após tratamento com ar ozonizado durante 40 min., enquanto a população de *Aspergillus* spp. foi reduzida em mais de 4 números de log após tratamento por 10 min.

Restaino *et al.* (1995) estudaram a eficácia da água ozonizada contra micro-organismos alimentares. Cerca de 4,5 unidades log de células de *Candida albicans* e *Zygosaccharomyces bailii* por ml foram destruídas instantaneamente em água ozonizada, enquanto que menos de 1 unidade logarítmica de esporos de *Aspergillus niger* por ml foram destruídas após uma exposição de 5 min.

3.1.5. Cenário econômico

A pimenta preta apresenta grande produtividade e é um dos condimentos mais valorizados no mundo apresentando grande valor econômico, permitindo que a atividade desenvolvida pelos pipericultores proporcione alta rentabilidade (LIMA *et al*., 2010).

A espécie de pimenta preta (*Piper nigrum* L.) se estabeleceu como cultivo nacional após a introdução da cultivar Cingapura, pelos imigrantes japoneses em 1933, no estado do Pará. Até a década de 40, embora produzisse pimenta-do-reino, o Brasil importava parte do que consumia, tornando-se autossuficiente em 1950 (DESER, 2008).

Nos anos de 1980 a 1983, o Brasil se destacou na produção de pimenta preta, se tornando o país que mais produziu pimenta preta em todo o mundo, e nos anos de 1980 a 1982 e em 1984, alcançou a posição de maior exportador mundial de pimenta preta, graças à produção paraense (HOMMA, 2008). Porém, após 1984 houve uma queda na produção e o Brasil encontra-se na quarta posição entre os maiores produtores mundiais de pimenta preta (FAO, 2014).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2016), no ano de 2016 a área cultivada no Brasil com pimenta-do-reino foi de 37.915 hectares e a produção atingiu 52.794 toneladas. O consumo no Brasil em 2013 foi de 5.000

toneladas de pimentas brancas e pretas (IPC, 2014). Os Estados do Pará (65,6%), Espírito Santo (24,2%) e Bahia (8,5%) concentram a maior parte da produção nacional (IBGE, 2016). Sendo que o Espírito Santo apresenta o cultivo mais tecnificado, com mais de 80 % da área cultivada sob sistema de irrigação, o que propicia maior produtividade, quando relacionado com os outros 2 estados (LOURINHO, 2014).

No Pará, existem áreas plantadas com pimenta preta em quase todas as regiões do Estado. Sendo que os principais municípios produtores estão situados no nordeste do Estado. As áreas de produção de Espírito Santo se concentram no norte e da Bahia na região denominada Baixo sul (EMBRAPA, 2004).

No cenário mundial, o principal produtor de pimenta preta é o Vietnã (81.825 toneladas), seguido de Indonésia (75.387 toneladas) e Índia (60.100 toneladas), além dos outros países membros da *International Pepper Community* – IPC, Brasil, Malásia e Sri Lanka, portanto o Brasil se destaca por ser o maior produtor não-asiático (IPC, 2004, FAO, 2014). De acordo com a IPC (2014), em 2013 o Brasil exportou 37.940 toneladas de pimenta, com 33% destinado aos Estados Unidos, porém a maior exportação registrada foi em 2004, com 40.530 toneladas.

Os maiores importadores da pimenta brasileira são os Estados Unidos, Holanda, Argentina, Alemanha, Espanha, México e França (IPC, 2011).

O consumo de pimenta preta na Índia e no Sri Lanka é de 1,5 g/dia/pessoa e 1,13 g/dia/pessoa, respectivamente. Na Tailândia, Estados Unidos e União Europeia o consumo de especiarias é de 14,7 g/dia/pessoa, 4 g/dia/pessoa e 0,5 g/dia/pessoa, respectivamente (YOGENDRARAJAH, 2014). Já no Brasil o consumo é menor, com uma estimativa de 0,06 g/dia/pessoa (IPC, 2014).

3.1.6. Lei de Incentivo a Qualidade

A Assembleia Legislativa do Espírito Santo com a Lei Nº 10.582, de 11 de outubro de 2016, instituiu a Política Estadual de Incentivo à Produção de Pimenta-do-Reino (pimenta preta) de Qualidade, com o objetivo de elevar o padrão de qualidade da pimenta preta produzida no Brasil e nortear o aprimoramento da atividade, possibilitando aos pipericultores do Espírito Santo oferecer ao mercado

um produto reconhecido internacionalmente como de qualidade superior (ESPÍRITO SANTO, 2016).

3.2. Principais fatores que influenciam o crescimento de fungos e produção de micotoxinas

Os fungos estão largamente distribuídos nos solos, plantas, matéria orgânica em decomposição, água, ar e poeira. Logo, produtos de origem animal e vegetal podem tornar-se contaminados com uma extensa variedade de espécies fúngicas (PRADO *et al*., 2008).

Diversos fatores influenciam o desenvolvimento de fungos e a produção de micotoxinas em alimentos, sendo a temperatura e a atividade de água dois parâmetros fundamentais neste processo (PITT; HOCKING, 2009). Isso pode acontecer com muitos condimentos que são produzidos em países de clima tropical, pois apresentam elevados índices de temperatura, umidade e pluviosidade. Além disso, os condimentos comumente permanecem no solo para secagem à temperatura ambiente, onde as condições climáticas favorecem o desenvolvimento de fungos toxigênicos e a produção de micotoxinas (PRADO *et al*., 2008).

3.3. Gênero *Aspergillus*

Espécies de *Aspergillus* estão entre os fungos mais abundantes em todo o mundo. Eles não são muito seletivos no que diz respeito às condições de crescimento abióticas. Por exemplo, eles podem crescer numa ampla faixa de temperatura (6-55°C) e muitas espécies são xerofílicas, capazes de crescer em baixa atividade de água (aw < 0,85). *Aspergillus penicilloides,* um dos fungos comumente isolados de pimenta preta, é uma das espécies mais xerofílicas existentes (WILLIAMS; HALLSWORTH, 2009). As espécies de *Aspergillus* utilizam uma grande variedade de substratos, incluindo fezes de animais e tecidos humanos. A disseminação dos *Aspergillus* também é explicada pela sua dispersão eficaz. Os esporos deste gênero estão entre as estruturas fúngicas mais dominantes no ar, dispersando-se a curtas e longas distâncias (BENNETT, 2010).

As colônias de *Aspergillus* geralmente crescem rápido, apresentam diversidade na coloração, variando de branca, rosa, amarela, castanha, preta e tons de verde, e normalmente apresentam muitos conidióforos (não ramificados) com vesícula na extremidade, que são estruturas de frutificação. As fiálides nascem diretamente nas vesículas (uniseriado) ou nas métulas (biseriado). A vesícula, as fiálides, a métula (se presente) e os conídios formam a cabeça conidial. Os conídios, também conhecidos como esporos mitóticos, podem apresentar formas diferentes e ornamentos e podem ser hialinos ou pigmentados. Todas estas características são importantes para a identificação das espécies (SAMSON, *et al*., 2010).

O gênero *Aspergillus* não é apenas conhecido por ser saprófito (PAWAR *et al*., 2008). Muitas espécies deste gênero também são patógenos oportunistas, podendo invadir indivíduos com um sistema imunológico comprometido (PITT, 1994; BRAKHAGE, 2005). *Aspergillus* (*A. fumigatus*, e, em menor frequência as espécies *A. flavus, A. niger, A. terreus* e *A. nidulans*) podem causar aspergilose invasiva (envolvendo vários sistemas e órgãos), particularmente aspergiloma pulmonar invasivo, e aspergilose broncopulmonar alérgica (STEVENS *et al*., 2000).

Algumas espécies são conhecidas e importantes por serem capazes de produzir micotoxinas, dentre estas, aflatoxinas e ocratoxina A.

3.4. Micotoxinas

As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos, que podem apresentar atividade mutagênica, carcinogênica e teratogênica, sintetizados, ainda que não exclusivamente, no final da fase de crescimento exponencial de alguns fungos (IARC, 2002).

Elas podem estar amplamente presentes nos alimentos e seus derivados, constituindo-se em um sério problema de saúde pública (BENNET; KLICH, 2003).

3.4.1. Micotoxicoses

Micotoxicoses como todas as síndromes toxicológicas, podem ser categorizadas como aguda ou crônica. A toxicidade aguda geralmente tem um início rápido e uma reação tóxica óbvia, enquanto que a toxicidade crônica caracteriza-se por exposição

de baixa dose ao longo de um longo período de tempo, resultando em câncer e outros efeitos geralmente irreversíveis (ZAIN, 2011). Antes da descoberta e aplicação das práticas modernas de moagem, espécies de *Fusarium* foram implicados em vários surtos de micotoxicoses humanos. Cereais contaminados com *F. sporitrichoides* e *F. poae* foram implicados em aleucia tóxica alimentar na Rússia a partir de 1932 para 1947. Os sintomas incluíam hiperemia da membrana mucosa, dor esofágica, laringite, asfixia, gastroenterite, e vertigem (LEWIS *et al.*, 2005).

Os efeitos das micotoxinas em animais de companhia são graves e podem conduzir à morte. Um exemplo, tal como acontece com outras espécies, o rim é o órgão alvo primário da OTA em cães e gatos. Em um estudo com cães, a ansiedade e vômitos foram observados a uma dose de OTA de 0,2 mg/kg no alimento. Com doses entre 0,2 e 3,0 mg/kg no alimento, sintomas de intoxicação em cães incluíram anorexia, polidipsia, poliúria, ansiedade, prostração, e morte. Os achados de necropsia incluíram a degeneração do epitélio (túbulos proximais), enterite muco hemorrágica (ceco, cólon e reto) e a necrose dos tecidos linfoides (baço, amígdalas, timo, e nódulos linfáticos periféricos) (ZAIN, 2011).

3.4.2. Aflatoxinas

As aflatoxinas se destacam entre as micotoxinas, foram as primeiras a serem descobertas e são as substâncias mais carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas encontradas naturalmente em alimentos e rações (IARC, 2002).

Elas são produzidas durante o metabolismo secundário principalmente das espécies *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* (KURTZMAN; HORN; HESSELTINE, 1987), e também as espécies *A. nomius*, *A. bombycis*, *A. pseudotamari* e *A.ochraceoroseus* têm se mostrado aflatoxigênicas (KURTZMAN; HORN; HESSELTINE, 1987; PETERSON *et al*., 2001). Com exceção de *A. flavus* e *A. parasiticus*, as demais espécies mencionadas ocorrem com pouca frequência na natureza (FREIRE *et al*., 2007).

As principais aflatoxinas são denominadas B1, B2, G1 e G2 baseadas em suas fluorescências sob a luz ultravioleta (B = Blue = azul e G = Green = verde) e relativa mobilidade cromatográfica durante cromatografia de camada delgada (FREIRE *et al*., 2007). A aflatoxina B1 é um dos mais potentes carcinógenos

naturais conhecidos e é usualmente a principal aflatoxina produzida por cepas toxigênicas (BENNET; KLICH, 2003).

As aflatoxinas foram consideradas pela *International Agency for Research on Cancer* – IARC (2002) como pertencentes à classe 1, sendo um composto carcinógeno para humanos. A aflatoxina B1 apresentou valores de DL50 variando de 0,3 a 9,0 mg/kg de peso corpóreo (KHOURY *et al*., 2008).

3.4.3. Ocratoxina A

A ocratoxina A foi isolada originalmente como um metabólito a partir de uma cepa de *Aspergillus ochraceus* em 1965, mas nem todos os isolados da espécie são capazes de produzi-la. Além de *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus cretensis, A. flocculosus, A. pseudoelegans, A. roseoglobulosus, A. westerdijkiae, A. sulphureus*, *Neopetromyces muricatus, A. sclerotiorum*, *A. melleus, A. ostianus, A. petrakii, A. persii, A. carbonarius, A. niger*, *Penicillium nordicum* e *P. verrucosum* também são produtores de ocratoxina A (PITT, 1987; ABARCA *et al.*, 1994; PITT, 2000; LARSEN; SVENDSEN; SMEDSGAARD, 2001; FRISVAD *et al.*, 2004; SAMSON *et al.,* 2010). Como *Aspergillus niger* é uma espécie utilizada amplamente na indústria, para a produção de enzimas e ácido cítrico para o consumo humano, é importante se certificar que os isolados industriais não sejam produtores de ocratoxina A (FREIRE *et al*., 2007; TEREN *et al*., 1996).

A ocratoxina A é um importante metabólito nefrotóxico e nefrocarcinógeno (LARSEN; SVENDSEN; SMEDSGAARD, 2001), considerada um potente cancerígeno em ratos e camundongos (POHLAND, 1993). É classificada pela IARC (1993) como um possível cancerígeno humano (categoria 2B).

A OTA pode contaminar uma variedade de produtos vegetais e animais podendo ser encontrada em grãos de cereais armazenados, principalmente em países de clima temperado. Como uma nefrotoxina, ela tem sido de particular importância para a indústrias de aves e suínos. Os resíduos de OTA podem ser introduzidos no corpo humano pela cadeia alimentar através do sangue e produtos à base de carne (HOLMBERG *et al*., 1991; ABARCA *et al.,* 1994). A ocratoxina A pode ser encontrada no leite humano e em amostras de sangue (BREITHOLTZ-EMANUELSSON *et al*., 1993).

O JECFA (The Joint WHO/FAO Expert Committee on Food Additives) reavaliou a ocratoxina A na sua 44ª reunião em 1995, e reconfirmou a Dose Semanal Tolerável Provisória (*Provisional Tolerable Weekly Intake* - PTWI) estabelecido na 37a reunião de 100 ng/kg peso corpóreo para essa micotoxina, o que corresponde a 14 ng/kg peso corpóreo por dia. A avaliação baseou-se no nível mais baixo de efeito adverso observado para lesão renal de suínos. Não foi observado nível sem efeito. A Comissão Europeia *Scientific Committee for Food* (SCF) reavaliou seus dados e em 1998 concluiu que seria prudente reduzir a exposição à OTA, tanto quanto possível, garantindo que a exposição seja para a extremidade inferior do intervalo de doses diárias admissíveis de 1,2 a 14 ng/kg peso corpóreo (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 1998).

3.4.4. Legislação brasileira

A Resolução RDC Nº 7, de 18 de Fevereiro de 2011 dispõe sobre os Limites Máximos Tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos prontos para o consumo. Os LMT referem-se aos resultados obtidos por metodologias que atendem aos critérios de desempenho estabelecidos pelo Codex Alimentarius. Este Regulamento aplica-se às empresas que importam, produzem, distribuem e comercializam diferentes categorias de bebidas, alimentos e matérias-primas. Em relação à categoria de alimento “especiarias” os LMT são de 20µg/kg para aflatoxinas B1, B2, G1 e G2; e de 30µg/kg para ocratoxina A (BRASIL, 2011).

Nesta categoria “especiarias” incluem-se: *Capsicu*m spp. (o fruto seco, inteiro ou triturado, incluindo pimentas, pimenta em pó, pimenta de caiena e pimentão-doce); *Piper* spp. (o fruto, incluindo a pimenta branca e a pimenta preta); e misturas de especiarias que contenham uma ou mais das especiarias acima indicadas (BRASIL, 2011).

A Resolução ainda determina que os níveis de micotoxinas devam ser tão baixos quanto razoavelmente possível (*as low as reasonably achievable* - ALARA), devendo ser aplicadas as melhores práticas e tecnologias na produção, manipulação, armazenamento, processamento e embalagem, de forma a evitar que um alimento contaminado seja comercializado ou consumido.

3.4.5. Legislação internacional

Os limites para aflatoxinas estabelecidos na União Europeia são de 5 µg/kg para aflatoxina B1 e 10 µg/kg para aflatoxinas totais em pimentas pretas (EC, 2010). O limite da União Europeia é de 15,0 µg/kg de OTA em pimenta preta (EC, 2015).

O Vietnã, o maior produtor mundial, segue os mesmos limites da União Europeia para aflatoxinas totais e aflatoxina B1, porém para OTA adota um limite de 30 µg/kg, como no Brasil (USDA, 2013).

3.5. Ocorrência de fungos e micotoxinas em pimenta preta

Sabe-se que a pimenta preta é um substrato suscetível ao crescimento de fungos e subsequente produção de micotoxinas (JESWAL; KUMAR, 2015).

Muitas especiarias são expostas a contaminações fúngicas e seus metabólitos tóxicos em vários estágios da produção. Embora a presença dos fungos não necessariamente signifique que as micotoxinas também estarão presentes (BARUG, 2004).

A micobiota da pimenta preta foi descrita por Flannigan e Hui (1976) e compreendida por: *A. flavus, A. glaucus, A. niger, A. nidulans, A. versicolor, Penicillium* spp., *Mucor* e *Rhizopus*. *A. flavus* foi predominante contaminando 70% das amostras e 29% das cepas produziam aflatoxinas.

Outros estudos relatam como contaminantes de especiarias os bolores *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Eurotium*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Mucor* e *Stachybotrys* (FREIRE *et al*., 2000; BOKHARI, 2007; HASHEM; ALAMRI, 2010). Entre estes, as espécies do gênero *Aspergillus* são os fungos mais abundantes no Brasil e em países de clima tropical (WILLIAMS, HALLSWORTH, 2009) e a maioria de suas espécies é capaz de produzir metabólitos secundários tóxicos. Os *Aspergillus* section *Flavi* são importantes produtores de aflatoxinas em matrizes que eles invadem e colonizam (ATEHNKENG *et al*., 2008). *A. flavus* é o fungo predominante em amostras de pimenta em vários estudos realizados (FLANNIGAN; HUI, 1976; SEENAPPA; STOBBS; KEMPTON, 1980; BANERJEE, 1993; PATEL *et al*., 1996, EZEKIEL, 2013).

Gatti *et al.* (2003) analisaram 115 amostras de pimentas pretas secas fornecidas diretamente dos produtores do Pará e Espírito Santo. Um total de 497 cepas de nove gêneros foram isoladas e identificadas. As espécies predominantes (frequência de ocorrência) pertenciam aos gêneros *Aspergillus* (53,5%), seguido por *Eurotium* (24,5%), *Rhizopus* (12,3%) e *Penicillium* (3,2%), entre outros. As frequências de ocorrência das espécies de *Eurotium* spp. foram *E. chevalieri* (16,5%), *E. rubrum* (6,0%) e *E. amstelodami* (3,9%). A seção predominante foi *Aspergillus* section *Flavi* (25,1%) seguida de *Nigri* (15,7%). A espécie prevalente na seção *Flavi* foi *Aspergillus flavus* (14,6% de frequência de ocorrência). *Aspergillus niger*, *A. ochraceus* e *A. parasiticus* apresentaram baixa frequência de ocorrência, de 8,4%, 4,2% e 1,1%, respectivamente. De 56 cepas de *A. flavus*, 13 (23,21%) foram produtoras de aflatoxinas e de 16 cepas de *A. ochraceus,* 2 (12,5%) foram produtoras de OTA.

Outro estudo analisou 10 amostras de pimenta preta e *A. flavus* também foi predominante com 43,8% de média de porcentagem de infecção, seguido de *A. niger* com 16,2% (FREIRE *et al*., 2000).

A maioria dos estudos de contaminação de pimenta preta por aflatoxinas apresenta alta porcentagem de amostras positivas para aflatoxinas, variando de 27% a 75%, com níveis de contaminação de 0,3 a 6,6 µg/kg (BIRCAN, 2005; FAZEKAS; TAR; KOVÁCZ, 2005; FERREIRA; MENDES; OLIVEIRA., 2007; KURSUN; MUTLU, 2010; OZBEY; KABAK, 2012).

Estudos também têm sido conduzidos sobre a ocorrência de ocratoxina A em especiarias e a maior parte das pesquisas está concentrada em alguns países asiáticos como Índia, Vietnã, Indonésia, Malásia e Sri Lanka. A maioria destes estudos em pimenta preta apresenta uma porcentagem de amostras positivas para OTA variando de 17,4% a 75% e com uma variação de contaminação de 0,07 a 13,58 µg/kg (JALILI; JINAP; NORANIZAN, 2010; OZBEY; KABAK, 2012; RAMESH; JAYAGOUDAR, 2014; JALILI, 2016; KABAK; DOBSON, 2017).

Podemos observar que todas estas amostras analisadas encontram-se dentro dos limites estabelecidos na legislação nacional e internacional. Porém um estudo revelou maiores níveis de contaminação. Jeswal e Kumar (2015), entre outras especiarias, analisaram 42 amostras de pimenta preta e 32 delas estavam contaminadas com aflatoxinas com uma média de 185 ng/g e variação de não

detectado a 500 ng/g. No mesmo estudo foi relatado que 33 amostras estavam contaminadas com ocratoxina A com média de 154,1 ng/g e uma variação de não detectado a 400 ng/g, constituindo-se em um sério problema de saúde pública. *Aspergillus flavus* foi o fungo predominante com porcentagem de incidência de 28,3%. Dentre estes isolados 45,4% foram produtores de aflatoxinas. *Aspergillus niger* foi a segunda espécie mais abundante, com incidência de 19,6% (não foi testado quanto a produção de micotoxinas). *A. ochraceus* apresentou incidência de 10%, e 45% deles produziram ocratoxina A.

Yogendrarajah (2014) também encontrou níveis elevados de contaminação ao analisar 82 amostras de pimenta preta. A ocorrência de aflatoxinas totais variou de não detectado a 25,2 µg/kg (média de 10,3 µg/kg), aflatoxina B1 de não detectado a 17,3 µg/kg (média de 9,1 µg/kg) e ocratoxina A de não detectado a 79 µg/kg (média de 30,9 µg/kg). No total, 63% das amostras foram contaminadas com pelo menos uma micotoxina, e 29 (76,3%) cepas de *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* produziram aflatoxina do grupo B, enquanto que apenas 9 (23,7%) produziram aflatoxinas dos grupos B e G. Os fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus niger* e *Penicillium* spp. foram os mais dominantes, apenas 3% das amostras estavam livres de qualquer contaminação fúngica. No total, 73% das amostras estavam contaminadas com *A. flavus* e/ou *A. parasiticus* (*A. flavus* e *A. parasiticus* foram contados em conjunto) com contagens até 4,29 x 10^4 UFC/g. A frequência de ocorrência de *A. niger* foi de 62% com contagens até 1,3 x 10^3 UFC/g, *Penicillium* spp. foi encontrado em 61% das amostras com contagens até 9,0 x 10^3 UFC/g e outros *Aspergillus* spp. encontrados (frequência de ocorrência de 90%) incluíram, *A. terreus*, *A. tamarii*, *A. candidus*, *A. penicilloides*, *A. sydowii* e *A. fumigatus*, com contagens até 6,6 x 10^4 UFC/g.

Capítulo 1

Micobiota de pimenta preta (*Piper nigrum* L.) comercializada no Brasil

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo analisar a micobiota de pimentas pretas comercializadas no Brasil. Foram analisadas 60 amostras no total, 31 em grãos e 29 em pó, sendo 51 a granel e 9 embaladas. Foi utilizado o método de plaqueamento direto com desinfecção da superfície dos grãos e também sem desinfecção superficial dos grãos, além do método de diluição para amostras em pó. Foi feito o isolamento das espécies em diferentes meios de cultura e incubados em diferentes temperaturas, e a identificação foi realizada de acordo com as chaves taxonômicas específicas. No total foram isolados 2.765 fungos e a pimenta preta apresentou contaminação por 48 espécies ou grupos diferentes de fungos. Os fungos de maior ocorrência (médias de contaminação com e sem desinfecção dos grãos e diluição, respectivamente) foram *Eurotium chevalieri* (16%, 46% e 4,8 x 10^3 UFC/g), *Aspergillus niger* "agregados" (15%, 40,5% e 2,8 x 10^3 UFC/g), *Rhizopus oryzae* (3%, 16% e 2,7 x 10^3 UFC/g), *A. tamarii* (4%, 15,7% e 4,4 x 10^2 UFC/g) e *A. flavus* (3%, 13% e 1,2 x 10^3 UFC/g). Houve maior média de contaminação fúngica nas amostras sem desinfecção superficial dos grãos (92,1%) em relação às amostras com desinfecção (51,7%).

Palavras-chave: *Piper nigrum*, fungos, *Aspergillus*, *Eurotium*.

1. INTRODUÇÃO

Considerada a rainha das especiarias, a pimenta preta (*Piper nigrum* L.) ou pimenta-do-reino como é conhecida no Brasil é uma fruta pequena, de formato arredondado, menor que uma ervilha. As várias maturações dos grãos oriundos da *Piper nigrum* L. dão origem à pimenta verde (não madura), pimenta preta (semimadura e seca) e pimenta vermelha (madura). A pimenta branca origina-se da vermelha após lavagem, descascamento e secagem. O princípio ativo mais importante deste gênero é a piperina, responsável por sua pungência (EMBRAPA, 2004).

A pimenta preta é rica em diversos minerais, vitaminas, lipídeos e proteínas. Pode ser usada inteira ou moída, combina bem com quase todos os tipos de pratos (BONTEMPO, 2007).

A pimenta preta contém óleo essencial que tem algumas propriedades antifúngicas (DEANS; RITCHIE, 1987; ILONDU; ILOH, 2007). Porém, as condições abióticas, como secagem ao sol e práticas de armazenamento poderiam degradar estes óleos essenciais, diminuindo assim sua propriedade antifúngica (BIANCHI *et al.*, 1997).

Dessa maneira, apesar da pimenta preta conter algumas substâncias que são ativas contra vários fungos, estudos mostraram que esse produto pode estar contaminado com uma grande variedade de fungos e micotoxinas (KABAK; DOBSON, 2017), especialmente dos gêneros *Aspergillus, Penicillium, Mucor* e *Rhizopus* que produzem e liberam muitos esporos (DOMSCH; GAMS; ANDERSON, 1980a; GNONLONFIN *et al*., 2013).

A colheita da pimenta preta é feita manualmente. Depois de debulhada é colocada para secar ao sol ou em secadores movidos a lenha, diesel ou elétricos. Após a secagem (3 a 6 dias), a pimenta é ventilada para eliminação de pedras, talos, pedaços de ramos, pimenta chocha e folhas secas; e embalada em sacos de polipropileno de 50 kg (LEMOS; TREMACOLDI; POLTRONIERI, 2014; FRAIFE FILHO; LEITE; RAMOS, 2015). Durante o manuseio e secagem, a pimenta-do-reino pode ser contaminada por *Salmonella* spp. e coliformes termotolerantes que tornam o produto impróprio para consumo *in natura* (PICCOLO, 2014).

A secagem é a etapa mais crítica, pois o produto permanece exposto ao sol. Nesta etapa animais domésticos como cães, gatos, galinhas, suínos; e animais silvestres, podem contaminar a pimenta com material fecal ou urina. Os próprios trabalhadores que lidam com a pimenta também podem ser agentes de contaminação ao pisarem no produto durante a secagem e/ou se não exercerem boas práticas de higiene (DUARTE; ALBUQUERQUE, 2005).

A secagem preserva o produto, podendo ser armazenados os grãos secos em uma média de 14 meses (máximo de 20 meses) (GNONLONFIN *et al*., 2013). Durante o armazenamento é preciso evitar a re-contaminação. É recomendado o uso de armazéns de alvenaria fechados e ventilados (LEMOS; TREMACOLDI; POLTRONIERI, 2014; FRAIFE FILHO*;* LEITE; RAMOS, 2015).

Durante o armazenamento o teor de água dos grãos deve ser monitorado. A *European Spice Association* (ESA) recomenda uma umidade dos grãos de pimenta preta de ≤12% (ESA, 2015). Isso porque o excesso de água acelera os processos oxidativos que conduzem ao envelhecimento, assim como possibilita o crescimento de microrganismos e a deterioração. Deve-se evitar também o acesso dos armazéns por roedores, morcegos e répteis, que agem como vetores de contaminação por micro-organismos. Os armazéns devem ser mantidos adequadamente fechados para evitar esse problema (PICCOLO, 2014).

Os alimentos geralmente associados à presença de fungos e micotoxinas - compostos tóxicos que podem ser produzidos por algumas espécies de fungos -, são os grãos armazenados. A contaminação pode ocorrer durante a germinação do grão e crescimento da planta, ainda no campo; ou após a colheita, no processo de secagem e armazenamento destes produtos (JAYASHREE; SUBRASMANYAM, 2000; SCHATZKI; ONG, 2001; BAYMAN; BAKER; MAHONEY, 2002). A deterioração pós-colheita por fungos filamentosos é uma das mais importantes ameaças associadas aos produtos alimentícios armazenados em todo o mundo. Descoloração, deterioração da qualidade, redução em valor comercial e produção de micotoxinas têm sido associadas a alimentos contaminados com fungos filamentosos (GNONLONFIN *et al*., 2013).

Estudos revelam que muitas especiarias são expostas à contaminação fúngica e seus metabólitos tóxicos em vários estágios da produção (GATTI *et al*.,

2003; YOGENDRARAJAH *et al*., 2014; JESWAL; KUMAR, 2015; KABAK; DOBSON, 2017).

A micobiota da pimenta preta foi descrita por Flannigan e Hui (1976) na Escócia e foi compreendida por: *A. flavus, A. glaucus, A. niger, A. nidulans, A. versicolor, Penicillium* spp., *Mucor* e *Rhizopus*.

Outros estudos relatam como contaminantes de especiarias os bolores *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Eurotium*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Mucor* e *Stachybotrys* (FREIRE; KOZAKIEWICZ; PATERSON, 2000; BOKHARI, 2007; HASHEM; ALAMRI, 2010). Entre estes, as espécies do gênero *Aspergillus* continuam a ser o maior problema, pois são os fungos mais abundantes no Brasil e em países de clima tropical (WILLIAMS, HALLSWORTH, 2009) e a maioria das espécies é capaz de produzir metabólitos tóxicos secundários. Os *Aspergillus* section *Flavi* são importantes produtores de aflatoxinas em matrizes de alimentos que eles invadem e colonizam (ATEHNKENG *et al*., 2008). *A. flavus* é o fungo predominante em amostras de pimenta em vários estudos já realizados (FLANNIGAN; HUI, 1976; SEENAPPA; STOBBS; KEMPTON, 1980; PATEL *et al*., 1996, EZEKIEL, 2013). *Aspergillus* section *Nigri*, também são capazes de produzir ocratoxina A e fumonisina B2. Dentro desta seção, *Aspergillus niger* é frequentemente encontrado em especiarias incluindo pimenta preta (FREIRE; KOZAKIEWICZ; PATERSON, 2000; GATTI *et al*., 2003; YOGENDRARAJAH *et al*., 2014; JESWAL; KUMAR, 2015). Por serem fungos negros, estes apresentam maior capacidade de sobrevivência na pimenta preta por mimetismo e resistência aos raios solares (PITT; HOCKING, 2009).

Além dos fungos e micotoxinas, a pimenta preta pode ainda ser contaminada com resíduos de agrotóxicos, que podem se acumular nos grãos quando são aplicados sem a observação do período de carência das substâncias. Sendo assim, análises químicas e microbiológicas são recomendadas para a liberação para a sua comercialização interna e externa (DUARTE; ALBUQUERQUE, 2005; FRAIFE FILHO *et al.*, 2015).

Perante esse quadro a Assembleia Legislativa do Espírito Santo com a Lei Nº 10.582, de 11 de outubro de 2016, instituiu a Política Estadual de Incentivo à Produção de Pimenta-do-Reino de Qualidade, com o objetivo de elevar o padrão de qualidade da pimenta-do-reino produzida no Espírito Santo e nortear o

aprimoramento da atividade, possibilitando aos pipericultores oferecer ao mercado um produto reconhecido internacionalmente como de qualidade superior (ESPÍRITO SANTO, 2016).

No Brasil ainda existe uma escassez de dados de ocorrência de fungos e micotoxinas em especiarias. O levantamento destes dados neste trabalho será útil para esclarecer o padrão de contaminação do produto comercializado e consumido no Brasil e nortear alternativas para a redução deste problema.

2. OBJETIVOS

Analisar a micobiota de pimentas pretas (*Piper nigrum* L.) comercializadas no Brasil e, isolar, quantificar e identificar as espécies e/ou grupos de fungos filamentosos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras

Foi adquirido um total de 60 amostras de pimentas pretas: 29 em pó e 31 em grão, obtidas em estabelecimentos comerciais dos Estados de São Paulo (39), Maranhão (9) e Rio Grande do Sul (3), no período de Março de 2015 à Outubro de 2016. Dentre as 60 amostras, 9 eram embaladas, vendidas em supermercados e 51 comercializadas a granel, em mercados públicos. Foram coletadas de 200g a 300g por amostra.

As amostras foram transportadas ao Laboratório de Micologia do Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos (CCQA) do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), em Campinas.

3.2. Atividade de água

Foi realizada a medição da atividade de água das amostras de pimentas com a utilização do equipamento AquaLab - Decagon, em triplicata a 25ºC (± 1ºC).

3.3. Plaqueamento direto para amostras de pimenta preta em grãos

Para as amostras em grão, foi utilizado o método de Plaqueamento direto com desinfecção da superfície da amostra de acordo com Pitt e Hocking (2009) e também sem desinfecção superficial dos grãos.

Cinquenta grãos por amostra foram desinfectados superficialmente com hipoclorito de sódio 0,4% durante 2 minutos e distribuídos em 10 placas de Petri contendo o meio Dichloran 18% Glycerol Agar (DG18). Paralelamente foi realizado o mesmo procedimento, com as mesmas amostras, porém sem desinfecção dos grãos (não realizando a etapa de desinfecção com hipoclorito de sódio). As placas foram incubadas a 25ºC/5-7dias, e a contaminação fúngica foi expressa em porcentagem (%).

3.4. Método de diluição para amostras de pimenta preta em pó

O método de diluição e o plaqueamento em superfície foram realizados para amostras em pó. Vinte e cinco gramas da amostra foram homogeneizados em Stomacher com 225 ml de água peptonada a 0,1%, por 1 minuto. Foram realizadas diluições seriadas e retiradas alíquotas de 0,1 mL de cada diluição para plaqueamento em superfície em meio DG18. As placas foram incubadas a 25ºC/5-7dias. Foram selecionadas placas contendo entre 15 a 150 UFC (Unidades Formadoras de Colônia) e os resultados foram expressos em UFC/g de amostra (PITT; HOCKING, 2009).

3.5. Isolamento e identificação das espécies

As espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e demais foram purificadas e inoculadas em três pontos equidistantes em meio Czapek Yeast Extract Agar (CYA) (incubadas a 25ºC/5-7 dias), e as espécies de *Eurotium* em meio Czapek Yeast Extract Agar 20% Sucrose (CY20S) (incubadas a 25ºC/14 dias), de acordo com Pitt e Hocking (2009).

As colônias de *Aspergillus* e *Penicillium* foram inoculadas em meio CYA e Malt Extract Agar (MEA), incubados por 7 dias em diferentes temperaturas (5ºC,

25ºC e 37ºC). Para as espécies de *Penicillium* foi realizada também a inoculação em meio Creatine Sucrose Agar (CREA), incubado a 25ºC/5-7 dias. A identificação foi feita segundo Klich e Pitt (1988) para *Aspergillus* spp. e Pitt (2000) para *Penicillium* spp.

Os fungos xerofílicos fastidiosos foram inoculados em meio Malt Yeast Extract 50% Glucose Agar (MY50G) e incubados a 25ºC/7-14 dias, e identificados segundo Pitt e Hocking (2009).

As demais espécies foram identificadas de acordo com as chaves de classificação de Pitt e Hocking (2009) e Samson *et al.* (2010).

Os fungos foram identificados de acordo com suas características morfológicas microscópicas e macroscópicas (cor e diâmetro das colônias, textura, aspecto da superfície, presença de exsudado e pigmento, cor do reverso da colônia, forma das estruturas e forma e tamanho dos conídios) e com a utilização das chaves taxonômicas descritas.

4. RESULTADOS

Das 60 amostras analisadas, apenas 3 (5%) não apresentaram contaminação fúngica.

A média de atividade de água (aw) obtida foi 0,580, com uma variação de 0,427 a 0,736. Para as amostras em grão a média foi de 0,599 e para as amostras em pó foi de 0,561. Apenas 13,33% das amostras excederam o limite de aw seguro de 0,65 estabelecido pela *European Spice Association* (ESA, 2015).

No total foram isolados 2.765 fungos e a pimenta preta apresentou contaminação por 48 espécies ou grupos diferentes de fungos, como mostram as tabelas 1 e 2.

As espécies mais comuns estão dentro do grupo de *Aspergillus* section *Nigri* (1.079 isolados) classificadas como *A. niger* “agregados”, com 68% de frequência de ocorrência nas amostras com desinfecção, 87% nas amostras sem desinfecção e 65% nas amostras em pó. E médias de contaminação foram de 15%, 40,2% e 2,81 x 10^3 UFC/g, respectivamente. A presença da melanina nas estruturas destes fungos negros acaba conferindo resistência aos raios solares e mimetismo com a matriz que também é negra, garantindo a eles sobrevivência frente aos seus competidores

(PITT; HOCKING, 2009). Incluídos na seção *Nigri*, estiveram presentes também *Aspergillus carbonarius* e os agregados do grupo *A. japonicus.*

Em seguida, os fungos de maior ocorrência foram *Eurotium chevalieri* e *A. tamarii,* que foram encontrados em 48% e 45% das amostras com desinfecção, respectivamente. E ambos foram encontrados em 77% das amostras sem desinfecção e 41% nas amostras em pó. As médias de contaminação para estas duas espécies nas amostras com desinfecção foram de 16% e 4% respectivamente e para as amostras sem desinfecção de 46% e 15,7% respectivamente.

Aspergillus flavus e *Rhizopus oryzae* foram encontrados em 42% das amostras com desinfecção e 64,5% nas amostras sem desinfecção. Já nas amostras em pó, eles tiveram 55% e 13% de ocorrência, respectivamente.

Como podemos observar, fungos potencialmente toxigênicos como *A. niger* "agregados" e *A. flavus*, estiveram entre os mais frequentes nas amostras de pimenta preta (tanto em pó quanto em grãos), indicando possível risco a saúde pública.

A média de contaminação fúngica total foi maior (92,1%) nos grãos sem desinfecção, incluindo os fungos potencialmente toxigênicos, em relação aos grãos com desinfecção superficial (51,7%), mostrando a importância da micobiota externa com relação aos fungos potencialmente toxigênicos, uma vez que a pimenta é consumida *in natura*, normalmente sem qualquer tipo de tratamento de descontaminação prévio que possa reduzir a contaminação fúngica, caso esteja presente. Qumer *et al.* (2012) observaram uma redução de até 97% na contagem de *Aspergillus* com dose de radiação gama de 4 kGy.

As figuras 2 A a N apresentam alguns isolados das amostras de pimenta preta analisadas.

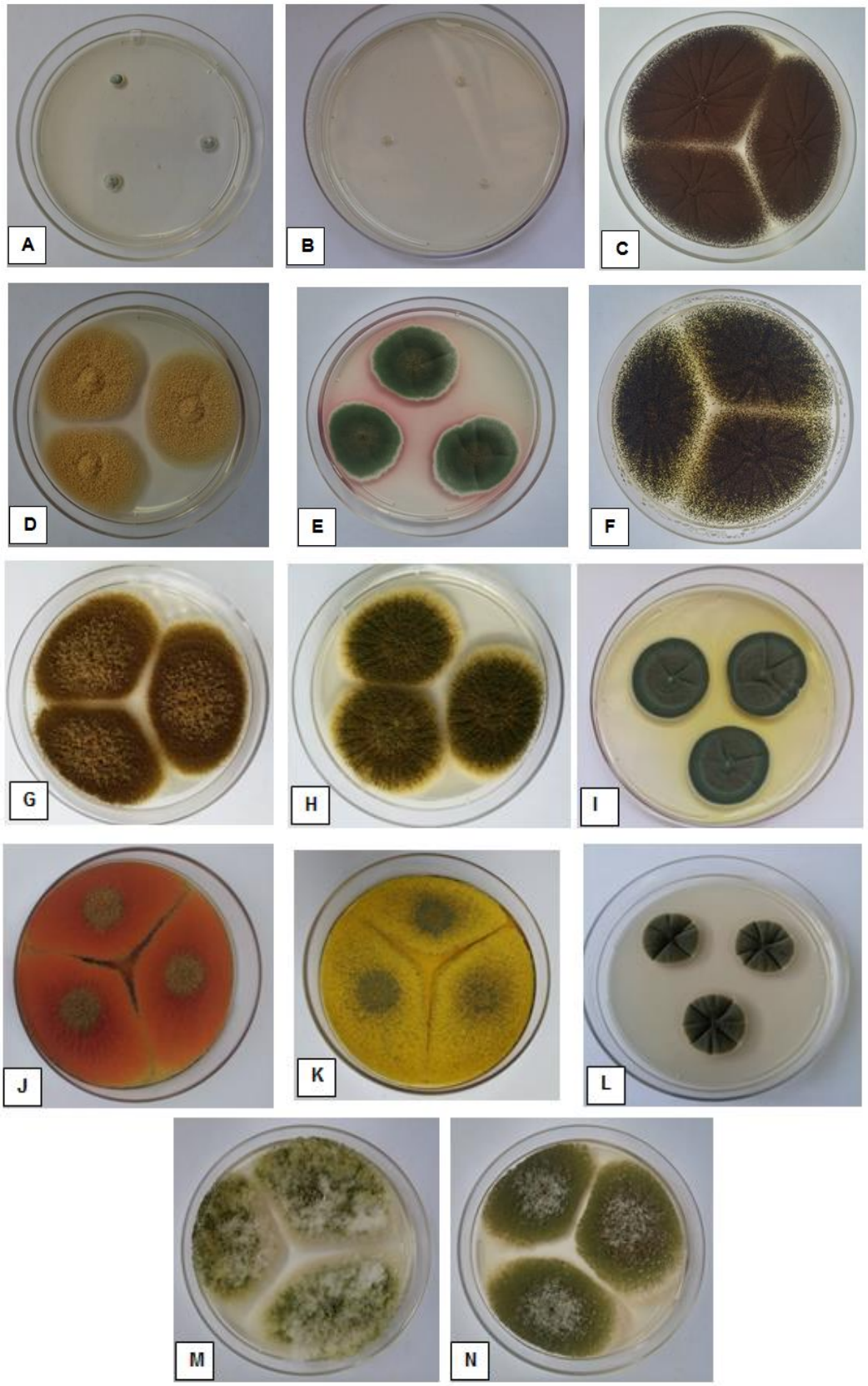


Figura 2. Fungos encontrados nas amostras de pimenta preta. De A - I e L - N, colônias em meio CYA; e J e K, colônias em meio CY20S. A. *A. restrictus*. B. *A. penicillioides*. C. *A. niger* “agregados”. D. *A*. section *Circumdati*. E. *A. nidulans*. F. *A. carbonarius*. G. *A. tamarii*. H. *A. pseudotamarii*. I. *P. citrinum*. J. *Eurotium rubrum*. K. *E. chevalieri*. L. *Cladosporium* sp. M. *A. flavus*. N. *A. parasiticus*.

Tabela 1. Frequência de ocorrência (%), média de infecção e contaminação fúngica (%) e variação da infecção e contaminação (%) de pimenta preta em grão (n=31 amostras) com e sem desinfecção superficial, respectivamente.

Fungos	Pimenta preta em grão (n = 31)					
	Com desinfecção			Sem desinfecção		
	FO (%)	Média de infecção (%)	Variação de infecção (%)	FO (%)	Média de contaminação (%)	Variação de contaminação (%)
***A. niger* "agregados"**	67,74	14,96	0-100	87,1	40,2	0-100
E. chevalieri	48,39	15,87	0-100	77,42	46,32	0-100
A. tamarii	45,16	4,13	0-62	77,42	15,74	0-76
A. flavus	42	3,1	0-48	64,52	13,03	0-84
R. oryzae	42	3,16	0-34	64,52	16,26	0-100
A.* section *Flavi	38,71	2	0-14	64,52	7,23	0-32
E. rubrum	29,03	8,45	0-72	67,74	18,77	0-76
A. corymbifera	29,03	1,16	0-14	19,35	1,61	0-14
Fungos dematiáceos	26	1,03	0-6	6,45	0,13	0-2
***Fusarium* spp.**	25,8	0,9	0-6	3,23	0,06	0-2
A. penicilloides	22,6	5,87	0-66	12,9	1,81	0-42
E. amstelodami	19,35	4,77	0-58	22,6	5,8	0-54
A. carbonarius	16,13	0,4	0-6	9,67	0,32	0-6
A.* section *Circumdati	12,9	0,9	0-10	58,06	6,58	0-44
E. repens	9,68	2,97	0-40	16,13	8,51	0-96
W. sebi	6,45	0,38	0-8	19,35	4,32	0-66
***Penicillium* spp.**	6,45	0,13	0-2	3,23	0,06	0-2
F. equiseti	6,45	0,13	0-2	0	0	0
F. incarnatum	6,45	0,13	0-2	0	0	0
***Scopulariopsis* sp.**	6,45	0,51	0-14	0	0	0
Ascomicetos	6,45	0,2	0-4	0	0	0
A.nidulans	3,23	0,52	0-16	0	0	0
P. citrinum	3,23	0,26	0-8	9,68	0,6	0-14
A. sydowii	3,23	0,06	0-2	6,45	0,84	0-20
A. pseudotamarii	3,23	0,26	0-8	3,23	1,23	0-38
F. oxysporum	3,23	0,32	0-10	3,23	0,06	0-2
A. wentii	3,23	0,13	0-4	3,23	0,06	0-2
P. cinnamopurpureum	3,23	0,06	0-2	0	0	0
F. subglutinans	3,23	0,06	0-2	0	0	0
F. chlamydosporum	3,23	0,06	0-2	0	0	0
A. terreus	3,23	0,06	0-2	0	0	0
***Cladosporium* sp.**	3,23	0,06	0-2	0	0	0
C. sitophila	3,23	0,06	0-2	0	0	0
***A. japonicus* "aggregate"**	0	0	0	9,68	0,32	0-6
A. parasiticus	0	0	0	9,68	0,13	0-2
A. fumigatus	0	0	0	6,45	0,2	0-4

Tabela 1. Continuação.

Fungos	Pimenta preta em grão (n = 31)					
	Com desinfecção			Sem desinfecção		
	FO (%)	Média de infecção (%)	Variação de infecção (%)	FO (%)	Média de contaminação (%)	Variação de contaminação (%)
R. stolonifer	0	0	0	3,23	0,61	0-18
S. racemosum	0	0	0	3,23	0,13	0-4
C. cladosporioides	0	0	0	3,23	0,13	0-4
E. herbariorum	0	0	0	3,23	0,06	0-2
***Talaromyces* spp.**	0	0	0	3,23	0,06	0-2
F. compactum	0	0	0	3,23	0,06	0-2
***Aspergillus* spp.**	0	0	0	3,23	0,06	0-2
***Paecilomyces* sp.**	0	0	0	3,23	0,06	0-2
Hifomicetos	0	0	0	3,23	0,06	0-2

FO = Frequência de ocorrência (n° amostras infectadas ou contaminadas/n° total de amostra analisada)
Média = Soma dos valores médios de infecção ou contaminação das amostras totais/n° total de amostra analisada)

Tabela 2. Frequência de ocorrência e contagem de fungos em pimenta preta em pó (UFC/g).

Fungos	Pimenta preta em pó (n=29 amostras)		
	FO (%)	Média (UFC/g)	Variação (UFC/g)
***A. niger* "agregados"**	65,52	$2,81 \times 10^3$	$0\text{-}4,0 \times 10^3$
A. corymbifera	55,17	$5,43 \times 10^4$	$0\text{-}1,7 \times 10^5$
A. flavus	55,17	$1,21 \times 10^3$	$0\text{-}1,3 \times 10^4$
A.* section *Flavi	48,27	$2,20 \times 10^2$	$0\text{-}4,0 \times 10^3$
E. chevalieri	41,38	$4,88 \times 10^3$	$0\text{-}3,7 \times 10^4$
A. tamarii	41,38	$4,40 \times 10^2$	$0\text{-}3,0 \times 10^3$
A. sydowii	34,50	$3,51 \times 10^3$	$0\text{-}6,0 \times 10^3$
E. rubrum	24,14	$9,52 \times 10^2$	$0\text{-}1,5 \times 10^4$
A. nidulans	24,14	$7,04 \times 10^3$	$0\text{-}1,2 \times 10^5$
A penicillioides	17,24	$5,05 \times 10^3$	$0\text{-}1,0 \times 10^5$
R. oryzae	13,80	$2,73 \times 10^3$	$0\text{-}8,0 \times 10^4$
E. repens	13,80	$2,55 \times 10^2$	$0\text{-}6,0 \times 10^3$
A.* section *Circumdati	13,80	$7,31 \times 10^2$	$0\text{-}1,3 \times 10^4$
W. sebi	10,34	$9,70 \times 10^2$	$0\text{-}2,7 \times 10^4$
***Aspergillus* spp.**	10,34	$1,40 \times 10^2$	$0\text{-}2,0 \times 10^3$
A. fumigatus	10,34	$1,41 \times 10^2$	$0\text{-}3,0 \times 10^3$
E. amstelodami	10,34	$5,00 \times 10^2$	$0\text{-}1,0 \times 10^4$
***Penicillium* spp.**	6,90	$7,00 \times 10$	$0\text{-}1,0 \times 10^3$
S. racemosum	3,45	$5,00 \times 10^3$	$0\text{-}8,0 \times 10^4$
A. terreus	3,45	3,4	$0\text{-}1,0 \times 10^2$
A. versicolor	3,45	$3,4 \times 10$	$0\text{-}1,0 \times 10^3$
A. restrictus	3,45	$6,00 \times 10^2$	$0\text{-}1,7 \times 10^4$
A pseudotamarii	3,45	3,4	$0\text{-}1,0 \times 10^2$
A. parasiticus	3,45	3,4	$0\text{-}1,0 \times 10^2$
A. carbonarius	3,45	$3,4 \times 10$	$0\text{-}1,0 \times 10^3$
P. citrinum	3,45	$3,4 \times 10$	$0\text{-}1,0 \times 10^3$
P. cinnamopurpureum	3,45	3,4	$0\text{-}1,0 \times 10^2$
P. aurantiogriseum	3,45	$3,40 \times 10^2$	$0\text{-}1,0 \times 10^4$

FO = Frequência de ocorrência (n° amostras contaminadas/n° total de amostra analisada)
Média = Soma dos valores médios de contaminação das amostras totais/n° total de amostra analisada)

A frequência de ocorrência (Nº amostras infectadas/Nº total de amostra analisada) de fungos em geral foi de 95%, indicando que em condições inadequadas de temperatura e umidade pode haver a contaminação por fungos, incluindo os toxigênicos, o que pode ser prejudicial à saúde devido à produção de micotoxinas.

5. DISCUSSÃO

Aspergillus flavus e *A. niger* estão entre os fungos predominantes nas amostras de pimenta preta analisadas no presente trabalho, coincidindo com os

trabalhos publicados na literatura no Brasil (FREIRE; KOZAKIEWICZ; PATERSON, 2000; GATTI *et al.*, 2003), na Turquia (VURAL; KAYA; METE, 2004), em Bahrein (MANDEEL, 2005), na Malásia (REDDY; FARHANA; SALLEH, 2011) e na Índia (JESWAL; KUMAR, 2015).

Gatti *et al*. (2003) isolaram um total de 497 fungos pertencentes principalmente aos gêneros *Aspergillus* (53,5%), *Eurotium* (24,5%), *Rhizopus* (12,3%) e *Penicillium* (3,2%) de pimenta preta cultivada no Brasil. Os autores também relataram que o *A. flavus*, produtor de aflatoxinas, era mais frequente do que *A. parasiticus* produtor de aflatoxina e *A. ochraceus* produtor de OTA em pimenta preta.

Tal desenvolvimento fúngico pode estar relacionado com as condições ambientais, como alta umidade relativa e temperatura elevada, típicas de países tropicais como o Brasil, que pode também favorecer a produção de micotoxinas (KABAK; DOBSON, 2017). O processamento, o teor de umidade do produto e a embalagem também podem ter um efeito sobre a contaminação fúngica e os níveis de infecção (PITT; HOCKING, 2009). A *European Spice Association* (ESA) recomenda um valor de umidade dos grãos de pimenta preta de ≤12% (ESA, 2015). É importante que as pimentas atinjam esta margem segura de umidade após a secagem para garantir a qualidade do produto, e sejam mantidas dentro desta umidade recomendada durante todo o armazenamento, transporte e pontos de venda, uma vez que as pimentas apresentam vida de prateleira longa.

Outra fonte de contaminação por fungos pode ser o resultado de métodos inadequados de manuseio, armazenamento e higiene deficiente (ABOU-ARAB *et al.*, 1999).

Sabe-se que frequentemente a pimenta é armazenada por período prolongado, muitas vezes em recipientes não adequados e ambiente mal ventilado, aumentando o teor de umidade das pimentas e, tornando os produtos armazenados mais suscetíveis ao crescimento de fungos e produção de toxinas (CHOURASIA, 1995; GNONLONFIN *et al*., 2013).

Além disso, nos mercados públicos brasileiros, a circulação de pessoas e veículos, carga e descarga de caminhões em espaços confinados são comuns; ficando a pimenta exposta ao ambiente cheio de poeira e esporos fúngicos (DOMSCH; GAMS; ANDERSON, 1980b).

A baixa qualidade das pimentas pretas pode afetar a saúde humana, além de ser uma barreira para a exportação deste produto (MANJULA *et al.*, 2009).

O acompanhamento da qualidade microbiológica da pimenta preta consumida no Brasil é de grande importância uma vez que a constatação do problema de fungos toxigênicos neste produto já foi evidenciada em várias pesquisas realizadas em outros países. A partir desta investigação e levantamento de dados, é possível adotar medidas preventivas em toda a cadeia produtiva da pimenta, visando reduzir este tipo de contaminação e os riscos da presença de micotoxinas.

6. CONCLUSÕES

É importante o conhecimento da micobiota da pimenta preta, para estimar a presença dos fungos toxigênicos.

No presente trabalho foi verificada a presença de vários grupos e espécies de fungos filamentosos, dentre estes: *Aspergillus niger* “agregados”, *Eurotium chevalieri*, *A. tamarii*, *A. flavus* e *Rhizopus oryzae*. Desta forma, o teor de água dos grãos deve ser controlado e monitorado durante toda a cadeia produtiva da pimenta preta, a fim de garantir qualidade e segurança do produto.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ATEHNKENG, J.; OJIAMBO, P. S.; DONNER, M.; IKOTUN, T.; SIKORA, R. A.; COTTY, P. J; BANDYOPADHYAY, R. Distribution and toxigenicity of *Aspergillus* species isolated from maize kernels from three agro-ecological zones in Nigeria. *International Journal of Food Microbiology*, v.122, n.1-2, p.74–84, 2008.

BARUG, D.; EGMOND, H.; LÓPEZ-GARCÍA, R.; OSENBRUGGEN, T.; VISCONTI, A. Meeting the Mycotoxin Menace. The Netherlands: Wageningen Academic Publishers, 2004.

BAYMAN, P.; BAKER, J.; MAHONEY, N. *Aspergillus* on tree nuts: incidence and associations. *Mycopathologia*, v. 155, n. 03, p. 161-169, 2002.

BIANCHI, A., ZAMBONELLI, A.; D'AURELIO, A. Z.; BELLESIA, F. Ultrastructural studies of the effects of *Allium sativum* on phytopathogenic fungi in vitro. *Plant Diseases*, v.81, p.1241-1246, 1997.

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

BONTEMPO, M. Pimenta e seus benefícios à saúde. São Paulo: Alaúde Editorial, 2007. 107p.

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

DEANS, S. G.; RITCHIE, G. Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, v.5, p.165-180, 1987.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. K. Compendium of soil fungi. London: Academic Press, v.1, 857p, 1980a.

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

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

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Manual de Segurança e Qualidade para a Cultura da Pimenta-do-Reino. Brasília: Série Qualidade e Segurança dos Alimentos, 65 p., 2004.

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

ESPÍRITO SANTO. Lei Estadual nº 10.582, de 11 de outubro de 2016. Dispõe sobre o incentivo à produção de pimenta-do-reino de qualidade. *Diário Oficial dos Poderes do Estado*, Vitória, ES, 11 out. 2016. Protocolo 269260, p. 16-17.

EZEKIEL, C. N.; FAPOHUNDA, S. O.; OLORUNFEMI, M. F.; OYEBANJI, A. O.; OBI, I. Mycobiota and aflatoxin B1 contamination of *Piper guineense* (Ashanti pepper), *P. nigrum* L. (black pepper) and *Monodora myristica* (calabash nutmeg) from Lagos, Nigeria. *International Food Research Journal*, v.20, n.1, p.111-116, 2013.

FLANNIGAN, B.; HUI, S. C. The occurrence of aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* in the mould floras of ground spices. *Journal of Applied Microbiology*, v.41, n.3, p.411–418, dec., 1976.

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

FREIRE, F. C. O.; KOZAKIEWICZ, Z.; PATERSON, R. R. M. Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. *Mycopathologia*, v.149, p.13–19, 2000.

GATTI, M. J.; FRAGA, M. E.; MAGNOLI, C.; DALCERO, A. M.; ROSA, C. A. R. Mycological survey for potential aflatoxin and ochratoxin producers and their toxicological properties in harvested Brazilian black pepper. *Food Additives & Contaminants*, v.20, p.1120-1126, 2003.

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

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

ILONDU, E. M.; ILOH, A. C. Inhibition of three fungal isolates from sorrel drink (Zobo) using hurdle technique. *World Journal of Agricultural Science*, v.3, p.339-343, 2007.

JALILI, M.; JINAP, S.; NORANIZAN, A. Effect of gamma radiation on reduction of mycotoxins in black pepper. *Food Control*, v. 21, n. 10, p. 1388–1393, oct., 2010.

JAYASHREE, T.; SUBRASMANYAM, C. Oxidative stress as a prerequisite for aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 29, n. 10, p. 981-985, 2000.

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

KABAK, B.; DOBSON, A. D. W. Mycotoxins in Spices and Herbs: An Update. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.57, n.1, p.18-34, jan. 2017.

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

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

MANDEEL, Q. A. Fungal contamination of some imported spices. *Mycopathologia*, v.159, p.291-298, 2005.

MANJULA, K.; HELL, K.; FANDOHAN, P.; ABASS, A.; BANDYOPADHYAY, R. Aflatoxin and fumonisin contamination of cassava products and maize grain from markets in Tanzania and republic of the Congo. *Toxin Review*, v.28, p.63-69, 2009.

PATEL, S.; HAZEL, C. M.; WINTERSON, A. G. M.; MORTHY, E. Survey of ethnic foods for mycotoxins. *Food Additives & Contaminants*, v. 13, n. 7, p. 833-841, 1996.

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

PITT, J. I. A Laboratory Guide to Common *Penicillium* Species. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization: Sydney, 197 p., 2000.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. Fungi and food spoilage. Springer Science Business Media: New York, 593 p., 2009.

QUMER, I.; MUHAMMAD, A.; RAFIQUE, A. M.; AGUSTIN, A. Mold and aflatoxin reduction by gamma radiation of packed hot peppers and their evolution during storage. *Journal of Food Protection*, v. 4, n. 8, p. 1366-1541, Aug., 2012.

REDDY, K. R. N.; FARHANA, R. I.; SALLEH, B. Occurrence of *Aspergillus* spp. and aflatoxin B1 in Malaysian foods used for human consumption. *J. Food Sci*., 76, p.99-104, 2011.

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

SEENAPPA, M.; STOBBS, L. W.; KEMPTON, A. G. *Aspergillus* colonization of Indian red pepper during storage. Phytopathology: v. 70, p. 218-222, 1980.

SCHATZKI, T. F.; ONG, M. S. Dependence of aflatoxin in almonds on the type and amount of insect damage. *Journal of Food Chemistry*, v. 49, n. 09, p. 4513-4519, 2001.

VURAL, A.; KAYA, N. B. A.; METE, M. Investigation of the yeast and mould floras in some ground spices. *Dicle Tıp Dergisi*, v.31, p.15-19, 2004.

YOGENDRARAJAH, P.; DESCHUYFFELEER, N.; JACXSENS, L.; SNEYERS, P.; MAENE, P.; SAEGER, S.; DEVLIEGHERE, F., MEULENAER, B. Mycological quality and mycotoxin contamination of Sri Lankan peppers (*Piper nigrum* L.) and subsequent exposure assessment. *Food Control*, v.41, p.219-230, 2014.

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

Capítulo 2

Pimenta preta (*Piper nigrum* L.) – Ocorrência de *Aspergillus* section *Flavi* e aflatoxinas em amostras comercializadas no Brasil

RESUMO

Os objetivos deste estudo foram isolar, quantificar e identificar espécies de *Aspergillus* section *Flavi* potencialmente produtoras de aflatoxinas de amostras de pimenta preta em grão e na forma de pó consumidas no país. Além disso, avaliar o potencial toxigênico das cepas isoladas e a presença de aflatoxinas nas amostras estudadas. Foram analisadas 60 amostras no total, 31 em grãos e 29 em pó, sendo 51 a granel e 9 embaladas. Foram utilizadas as metodologias de plaqueamento direto (para grão) e diluição (para amostras em pó) e o meio Dichloran 18% Glicerol para isolar as espécies. O plaqueamento dos grãos foi realizado com e sem desinfecção externa com solução de hipoclorito de sódio 0,4%. As espécies foram identificadas através da análise morfológica. A habilidade de produção de aflatoxinas pelos fungos foi determinada pela técnica de Agar plug associada à Cromatografia de Camada Delgada (CCD). Para a análise de aflatoxinas nas amostras foi feita a extração e limpeza utilizando coluna de imunoafinidade, quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e derivatização pós-coluna com Kobracell. Várias espécies da seção *Flavi* foram identificadas, dentre elas, *Aspergillus flavus*, *A. tamarii*, *A. pseudotamarii* e *A. parasiticus*. A frequência de ocorrência de *A. flavus* nas pimentas em grão foi de 42% nas amostras com desinfecção e 64,5% nas amostras sem desinfecção, e 55% nas amostras em pó. Um total de 42 cepas de *Aspergillus flavus* foram isoladas e 40% foram capazes de produzir aflatoxinas do grupo B. As aflatoxinas foram encontradas em 53% das amostras com níveis variando de 0,10 a 11 µg/kg e 46,6% das amostras apresentaram níveis menores que 0,08 µg/kg.

Palavras-chave: *Piper nigrum*, aflatoxinas, *Aspergillus flavus*.

1. INTRODUÇÃO

Dentre as micotoxinas destacam-se as aflatoxinas, produzidas durante o metabolismo secundário principalmente das espécies *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, além das espécies *A. nomius*, *A. bombycis*, *A. pseudotamari* e *A.ochraceoroseus* (KURTZMAN *et al*., 1987; PETERSON *et al*., 2001; SAMSON *et al.* 2010). Com exceção de *A. flavus* e *A. parasiticus*, as demais espécies mencionadas ocorrem com pouca frequência na natureza (FREIRE *et al*., 2007).

As principais aflatoxinas são denominadas B1, B2, G1 e G2 baseadas em suas fluorescências sob a luz ultravioleta (B = Blue = azul e G = Green = verde) e relativa mobilidade cromatográfica durante cromatografia de camada delgada (FREIRE *et al*., 2007). A aflatoxina B1 é um dos mais potentes carcinogênicos naturais conhecidos e é usualmente a principal aflatoxina produzida por cepas aflatoxigênicas (BENNET; KLICH, 2003).

As aflatoxinas foram consideradas pela *International Agency for Research on Cancer* – IARC (2002) como pertencentes à classe 1, sendo compostos carcinógenos para humanos. A aflatoxina B1 apresentou valores de DL50 variando de 0,3 a 9,0 mg/kg de peso corpóreo em roedores (KHOURY *et al*., 2008).

A pimenta preta ou pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) é colhida manualmente e normalmente a secagem é feita ao sol (3 a 6 dias). O armazenamento é feito em armazéns de alvenaria fechados e ventilados adequadamente para evitar a re-contaminação (EMBRAPA, 2004; LEMOS; TREMACOLDI; POLTRONIERI, 2014; FRAIFE FILHO; LEITE; RAMOS, 2015).

Estas etapas são críticas, pois a temperatura, umidade relativa do ar e o teor de umidade do alimento podem levar a deterioração do produto, favorecendo também a contaminação por fungos e consequentemente a produção de micotoxinas (DUARTE; ALBUQUERQUE, 2005; PICCOLO, 2014).

Estudos mostram uma ampla contaminação por aflatoxinas presentes na pimenta preta, constituindo-se em um sério problema de saúde pública (BENNET; KLICH, 2003; BIRCAN, 2005; FAZEKAS; TAR; KOVÁCZ, 2005; FERREIRA; MENDES; OLIVEIRA, 2007; KURSUN; MUTLU, 2010; OZBEY; KABAK, 2012).

Zinedine *et al*. (2006) analisaram 15 amostras de pimenta preta coletadas em Marrocos. A contaminação média encontrada para AFB1 foi de 0,09 µg/kg e valor

máximo de 0,30 µg/kg, com 47% das amostras positivas. Noventa e três por cento das amostras estavam positivas para aflatoxinas totais, com média de 0,21 µg/kg e valor máximo de 0,55 µg/kg.

Jeswal e Kumar (2015) encontraram níveis de contaminação mais elevados ao analisarem 42 amostras de pimenta preta coletadas na Índia. *Aspergillus* foi isolado de todas elas. A espécie mais dominante entre todos os fungos foi *A. flavus* (porcentagem de incidência de 28,3%), e 45,4% deles foram produtores de aflatoxinas, sendo capazes de produzir níveis de 6,3-26,4 µg/L de aflatoxinas em meio de cultura. Trinta e duas amostras estavam contaminadas com aflatoxinas com uma média de 185 ng/g e variação de 4 a 500 ng/g.

Os limites para aflatoxinas estabelecidos na União Europeia é de 5 µg/kg para aflatoxina B1 e 10 µg/kg para aflatoxinas totais em pimentas pretas (EC, 2010).

No Brasil, a Resolução RDC Nº 7, de 18 de Fevereiro de 2011 que dispõe sobre os Limites Máximos Tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos prontos para oferta ao consumidor e em matérias-primas, estabelece para a pimenta preta o limite de 20µg/kg para aflatoxinas totais (BRASIL, 2011).

Nesta Resolução a recomendação proposta é de que sejam atingidos níveis de micotoxinas tão baixos quanto razoavelmente possível recomendando ser aplicadas as melhores práticas e tecnologias na produção, manipulação, armazenamento, processamento e embalagem, de forma a evitar que um alimento contaminado seja comercializado ou consumido.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram isolar, quantificar e identificar as espécies de *Aspergillus* section *Flavi* potencialmente produtoras de aflatoxinas em amostras de pimenta preta em grão e em pó; determinar a atividade de água das amostras; e avaliar o potencial toxigênico das cepas isoladas e a presença de aflatoxinas nas amostras de pimenta comercializadas em mercados brasileiros.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras

Foi adquirido um total de 60 amostras de pimentas pretas (200 a 300g por amostra): 29 em pó e 31 em grão, obtidas em estabelecimentos comerciais dos Estados de São Paulo (39), Maranhão (9) e Rio Grande do Sul (3), no período de Março de 2015 à Outubro de 2016. Dentre estas, 9 eram embaladas, vendidas em supermercados e 51 comercializadas a granel, em mercados públicos.

As amostras foram transportadas ao Laboratório de Micologia do Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos (CCQA) do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), em Campinas.

3.2. Atividade de água

Foi realizada a medição da atividade de água das amostras de pimentas com a utilização do equipamento AquaLab - Decagon, em triplicata a 25ºC (± 1ºC).

3.3. Plaqueamento direto para amostras em grãos

Foi utilizado o método de Plaqueamento direto com desinfecção da superfície da amostra de acordo com Pitt e Hocking (2009) e também sem desinfecção superficial dos grãos.

Cinquenta grãos por amostra foram desinfectados superficialmente com hipoclorito de sódio 0,4% durante 2 minutos e distribuídos em 10 placas de Petri contendo o meio Dichloran 18% Glycerol Agar (DG18). Paralelamente foi realizado o mesmo procedimento, com as mesmas amostras, porém sem desinfecção dos grãos (não realizando a etapa de desinfecção com hipoclorito de sódio). As placas foram incubadas a 25ºC/5-7dias, e a contaminação fúngica foi expressa em porcentagem (%).

3.4. Método de diluição para amostras de pimenta preta em pó

O método de diluição e o plaqueamento em superfície foram realizados para amostras em pó. Vinte e cinco gramas da amostra foram homogeneizados em Stomacher com 225 ml de água peptonada a 0,1%, por 1 minuto. Foram realizadas diluições seriadas e retiradas alíquotas de 0,1 mL de cada diluição para plaqueamento em superfície em meio DG18. As placas foram incubadas a 25ºC/5-7dias. Foram selecionadas placas contendo entre 15 a 150 UFC (Unidades Formadoras de Colônia) e os resultados são expressos em UFC/g de amostra (PITT; HOCKING, 2009).

3.5. Isolamento e identificação de espécies potencialmente aflatoxigênicas

As espécies de *Aspergillus* potencialmente aflatoxigênicas foram purificadas, inoculadas em três pontos equidistantes em meio Czapek Yeast Extract Agar (CYA) e incubadas a 25ºC/5-7dias, de acordo com Pitt e Hocking (2009). Após, estas colônias foram inoculadas em meio CYA e Malt Extract Agar (MEA), incubadas em diferentes temperaturas (25ºC e 37ºC). As cepas foram inoculadas também em meio Aspergillus Flavus e Parasiticus Agar (AFPA) por 7 dias a 25°C. A identificação das espécies foi feita segundo Klich e Pitt (1988) e Samson *et al.* (2010).

Os fungos foram identificados de acordo com suas características morfológicas microscópicas e macroscópicas (cor e diâmetro das colônias, textura, aspecto da superfície, presença de exsudado e esclerócio, cor do reverso da colônia, forma das estruturas e forma e tamanho dos conídios) e com a utilização das chaves taxonômicas descritas.

3.6. Avaliação do potencial toxigênico das cepas

As espécies de *Aspergillus* section *Flavi* foram testadas quanto à produção de aflatoxinas.

Os fungos com potencial para produção de aflatoxinas foram inoculados em meio Yeast Extrat Sucrose Agar (YESA) e incubados a 25ºC/7 dias. Em seguida foi

aplicada a técnica de ágar plug associada à CCD, segundo Filtenborg, Frisvad e Svendensen (1983) para testes de produção de aflatoxinas.

Pedaços de Agar (5-7mm^2) foram removidos da placa de YESA e as toxinas extraídas com uma mistura de clorofórmio/metanol (1:1). Os pedaços foram aplicados nas placas de sílica gel (Merck, Darmstadt, Alemanha) de 20 cm X 10 cm e na mesma placa foi adicionado 5 µL de uma suspensão padrão das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2.

A cromatografia foi realizada com fase móvel de tolueno/acetato de etila/ácido fórmico/clorofórmio (7:5:2:5, v/v/v/v) durante aproximadamente 20 minutos. Após a eluição a placa foi seca e a visualização feita em câmara com lâmpada ultravioleta de comprimento de onda de 365 nm e 254 nm. A determinação qualitativa foi realizada pela comparação da fluorescência e do fator de retenção (Rf) das cepas em relação ao padrão.

3.7. Determinação de aflatoxinas nas amostras de pimenta por CLAE

3.7.1. Preparo da amostra

Cerca de 100g de cada amostra de pimenta em grão foram moídas em moinho (IKA, Modelo A11, Brasil) e peneirados em peneira (Bronzinox, Brasil) de malha 18, até atingirem granulometria < 1mm.

As amostras em pó foram apenas peneiradas (cerca de 100g por amostra), da mesma forma citada acima, para igualar a granulometria.

3.7.2. Extração e limpeza

A toxina foi extraída das amostras (10g) com 60 mL de metanol:água (8:2) e 1g de cloreto de sódio e homogeneizada por 30 minutos em shaker. A filtração foi feita com filtro qualitativo seguido por filtro de fibra de vidro (Vicam, Suécia). O filtrado (4 mL) foi diluído em 24 mL de PBS Tween 0,01% e foi passado na coluna de imunoafinidade (CIA) AflaTest WB (Vicam, USA) em um fluxo de 2-3 mL/min, e lavado com 30 mL de água ultra pura (MilliQ, França).

A eluição da micotoxina foi realizada 8 vezes com 500 µL de metanol grau HPLC, e recolhido em um *vial* âmbar. O extrato foi seco em banho a 40ºC sob fluxo de nitrogênio e ressuspendido com 1 mL metanol:água ultra pura (2:3). Antes da injeção, o extrato foi filtrado com filtro de PVDF com poro de 0,45 µm (Analítica, China). Vinte microlitros foram injetados no Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) com detector de fluorescência (Agilent, EUA). A metodologia foi baseada em Copetti *et al*. (2011).

3.7.3. Parâmetros do HPLC

Foi utilizado o cromatógrafo Agilent 1260 Infinity LC System (Agilent, EUA) com injeção automática e detector de fluorescência de 362 nm de excitação e 455 nm de emissão. A derivatização pós-coluna das aflatoxinas B1 e G1 foi feita em KOBRA®CELL (R-Biopharm Rhône Ltd., Escócia). Foi utilizada uma coluna C18 de fase reversa (Agilent, EUA) (4.6×150 mm) com pré-coluna e temperatura do forno de 40ºC.

Utilizou-se a fase móvel água: acetonitrila: metanol (6:2:3, v/v/v) contendo brometo de potássio (119 mg/L) e ácido nítrico (4M, 350 µL/L), e um fluxo de 1 mL/min (COPETTI *et al*., 2011).

Foi preparada uma solução estoque do padrão de aflatoxinas B1 (0,8202 µg/mL), B2 (0,7350 µg/mL), G1 (0,4714 µg/mL) e G2 (0,2554 µg/mL); e foram feitas diluições sequenciais usadas para a construção de uma curva de calibração de 6 pontos de área do pico *versus* concentração (µg/mL). O volume de injeção foi 20µL tanto para a solução padrão quanto para os extratos das amostras.

3.7.4. Otimização do método

A porcentagem de recuperação foi calculada após a fortificação da amostra de pimenta com o padrão de aflatoxinas totais em 3 níveis: baixo (0,7 µg/kg), médio (6,0 µg/kg) e alto (25,0 µg/kg) em triplicata. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) do método foram calculados analisando 8 repetições de uma amostra de pimenta contaminada com um nível baixo (0,7 µg/kg) de aflatoxinas, de acordo com as recomendações do Eurachem Guides (2014).

4. RESULTADOS

4.1. Ocorrência de *Aspergillus* section *Flavi* nas amostras

Das 60 amostras analisadas, um total de 953 cepas de *Aspergillus* section *Flavi* foram isoladas e testadas quanto à produção de aflatoxinas. As espécies da seção *Flavi* foram identificadas como *Aspergillus flavus*, *A. tamarii*, *A. pseudotamarii*, *A. parasiticus* e as demais como *Aspergillus* section *Flavi* conforme as tabelas 1 e 2 que apresentam a frequência de ocorrência, porcentagem média e variação de contaminação por estas espécies nas amostras em grão e em pó respectivamente.

Estas espécies foram classificadas de acordo com as seguintes características morfológicas: *Aspergillus flavus* apresenta colônia verde (70 mm), conídios lisos (3-5 µm), vesícula grande (20-65 µm), presença de esclerócios, AFPA com reverso laranja e é bisseriado. *A. parasiticus* se diferencia de *A. flavus* por apresentar colônia verde escura (50-70 mm), conídios rugosos (3-5 µm), vesícula pequena (20-35 µm) e ser monosseriado. *A. tamarii* e *A. pseudotamarii* apresentam colônia marrom (65 mm), conídio rugoso (5-7 µm), AFPA com reverso marrom avermelhado e são bisseriados (KLICH; PITT, 1988; SAMSON *et al.*, 2010).

Tabela 1. Frequência de ocorrência (%), média (%) e variação de infecção (%) de *Aspergillus* section *Flavi* nas amostras de pimenta preta em grão (n=31 amostras).

Fungos	Com desinfecção			Sem desinfecção		
	FO (%)	Média de infecção (%)	Variação de infecção (%)	FO (%)	Média de contaminação (%)	Variação de contaminação (%)
A. tamarii	45,2	4,1	0-62	77,4	15,7	0-76
A. flavus	42,0	3,1	0-48	64,5	13,0	0-84
A. section *Flavi*	38,7	2,0	0-14	64,5	7,2	0-32
A. pseudotamarii	3,2	0,3	0-8	3,2	1,2	0-38
A. parasiticus	0	0	0	9,7	0,1	0-2

FO = Frequência de ocorrência (n° amostras contaminadas ou infectadas/n° amostras totais)
Média = Soma dos valores médios de contaminação ou infecção das amostras totais/n° amostras totais)

Tabela 2. Frequência de ocorrência (%), média e variação de contaminação (UFC/g) de *Aspergillus* section *Flavi* nas amostras de pimenta preta em pó (n=29 amostras).

Fungos	**Pimenta preta em pó**		
	FO (%)	**Média (UFC/g)**	**Variação (UFC/g)**
A. flavus	55,2	$1,2 \times 10^3$	$<100\text{-}1,3 \times 10^4$
A.* section *Flavi	48,3	$2,2 \times 10^2$	$<100\text{-}4,0 \times 10^3$
A. tamarii	41,4	$4,4 \times 10^2$	$<100\text{-}3,0 \times 10^3$
A. pseudotamarii	3,4	3,0	$<100\text{-}1,0 \times 10^2$
A. parasiticus	3,4	3,0	$<100\text{-}1,0 \times 10^2$

FO = Frequência de ocorrência (n° amostras contaminadas/n° amostras totais)
Média = Soma dos valores médios de contaminação das amostras totais/n° amostras totais)

A média de atividade da água (aw) obtida foi de 0,580, com uma variação de 0,427 a 0,736; para as amostras em grão a média foi de 0,599 e para as amostras em pó foi de 0,561.

As espécies de maior ocorrência, tanto nos grãos quanto nas pimentas em pó, foram *A. tamarii, A. flavus* e outras não identificadas foram denominadas como *Aspergillus* section *Flavi*. Estas espécies e grupos foram encontrados em 45%, 42% e 39% das amostras com desinfecção e em 41%, 55%, 48% das amostras em pó, respectivamente. A frequência de ocorrência nas amostras sem desinfecção foi de 77% para *A. tamarii* e 64,5% para *A. flavus* e *Aspergillus* section *Flavi* como mostram as tabelas 1 e 2. Por meio destes resultados foi possível verificar que as amostras sem desinfecção apresentam maior média de contaminação por *Aspergillus* section *Flavi* (38,51%) do que aquelas que passaram pelo processo de desinfecção superficial dos grãos (9,35%). A frequência de ocorrência nas amostras sem desinfecão foi de 87,09% e com desinfecção foi de 64,5%. Isso indica que esporos de fungos potencialmente toxigênicos podem estar presentes tanto dentro dos grãos quanto em sua superfície, sendo assim, ao encontrarem condições adequadas para o crescimento, poderão ser capazes também de produzir micotoxinas. Além disso, como a pimenta é normalmente consumida *in natura*, e normalmente sem qualquer tipo de tratamento de descontaminação prévio, pode representar um risco à saúde humana. Qumer *et al.* (2012) observaram uma redução de até 97% na contagem de *Aspergillus* com dose de radiação gama de 4 kGy; e Jalili, Jinap e Noranizan (2010) mostraram uma redução de 43% de aflatoxina B1 em pimenta preta com uma dose de radiação de 60kGy.

A média de contaminação fúngica foi menor nas amostras embaladas em relação às amostras a granel. Não houve contaminação por *Aspergillus* section *Flavi* nas amostras embaladas em grão, apenas nas amostras em pó com média de 2,57 x 10^2 UFC/g. Já as amostras a granel apresentaram média de contaminação de 10% nos grãos com desinfecção, 41% sem desinfecção e 2,6 x 10^3 UFC/g nas amostras em pó.

4.2. Potencial toxigênico das cepas

Todas as cepas de *A.* section *Flavi* (953) foram testadas quanto à produção de aflatoxinas pela técnica de ágar plug associada à CCD e 20% (*Aspergillus flavus*, *A. pseudotamarii*, *A. parasiticus* e *Aspergillus* section *Flavi*) foram produtores de aflatoxinas do grupo B. Cem por cento dos isolados de *A. parasiticus* (n=4) foram produtores de aflatoxinas dos grupos B e G e 100% das cepas de *A. pseudotamarii* (n=24) foram produtores de aflatoxinas do grupo B. Dentre os isolados de *A. flavus* (n=376) 40% foram produtores de aflatoxina B1 como mostra a tabela 3.

Tabela 3. Porcentagem de espécies produtoras de aflatoxinas B e G nas amostras de pimenta preta em grão e em pó.

Fungos	Com desinfecção			Sem desinfecção			Pó			Total		
	Nº isolados	B + (%)	G + (%)	Nº isolados	B + (%)	G + (%)	Nº isolados	B + (%)	G + (%)	Nº isolados	B + (%)	G + (%)
A.* section *Flavi	27	3,7	0,0	116	2,6	0,0	40	10,0	0,0	183	4,4	0,0
A. flavus	42	50,0	0,0	201	33,3	0,0	133	47,4	0,0	376	40,2	0,0
A. pseudotamarii	4	100,0	0,0	19	100,0	0,0	1	100,0	0,0	24	100,0	0,0
A. parasiticus	0	0,0	0,0	3	100,0	100,0	1	100,0	100,0	4	100,0	100,0
A. tamarii	64	0,0	0,0	245	0,0	0,0	57	0,0	0,0	366	0,0	0,0
Total	137	19,0	0,0	584	15,7	0,8	232	29,7	0,6	**953**	**19,6**	**0,4**

4.3. Ocorrência de aflatoxinas nas amostras de pimenta preta

Os valores de recuperação nas concentrações avaliadas estão apresentados na tabela 4.

Levando em consideração os valores de recuperação para aflatoxinas em diferentes matrizes, recomendados na Diretiva da Comunidade Europeia (EC, 2006), é possível concluir que o método para análise de aflatoxinas utilizado não apresentou resultado satisfatório, principalmente para aflatoxina G2 e modificações precisam ser realizadas.

De acordo com a Diretiva, os valores recomendados para aflatoxinas totais nos níveis <1 µg/kg, 1-10 µg/kg e > 10 µg/kg são de 50-120%, 70-110% e 80-110% respectivamente. Para todos os níveis testados de aflatoxinas totais, baixo (0,7 µg/kg), médio (6,0 µg/kg) e alto (25,0 µg/kg), os valores de recuperação para aflatoxina G2 não foram satisfatórios (variando de 27 a 44%). Para o nível médio, o valor de recuperação das aflatoxinas totais não atingiu o limite mínimo recomendado pela Diretiva, de 70% mas esteve bem próximo (67%). Para o nível alto, embora os valores de recuperação obtidos para aflatoxinas B1, B2 e G1 e aflatoxinas totais tenham sido adequados, estes não atingiram o limite mínimo recomendado de 80%, indicando que há necessidade da realização de alguma alteração no método para a melhoria destes valores. Para o nível baixo, a recuperação das aflatoxinas totais foi satisfatória (92%), estando, portanto dentro do limite recomendado pela Diretiva.

Algumas possíveis causas foram levantadas para os valores muito baixos de recuperação da aflatoxina G2, como a não retenção da mesma na coluna de imunoafinidade utilizada, a presença de sujeira da matriz que possa estar interferindo na detecção, e a dificuldade na extração utilizando os solventes propostos no método. Novos testes serão realizados com o objetivo de melhorar a recuperação do método.

Os valores de limites de detecção (LOD) para B1, B2, G1, G2 e aflatoxinas totais foram de 0,03; 0,02; 0,02; 0,01 e 0,08 µg/kg e os valores de limites de quantificação (LOQ) foram de 0,09; 0,07; 0,08; 0,03 e 0,27 µg/kg respectivamente.

Tabela 4. Recuperação de aflatoxinas (%) utilizando 3 níveis de contaminação.

Nível de aflatoxinas totais (µg/kg)	(n=3)	B1 (µg/kg)	B2 (µg/kg)	G1 (µg/kg)	G2 (µg/kg)	Total de aflatoxinas (µg/kg)
0,7	Média ± DP[1]	0,27 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,11 ± 0,003	0,03 ± 0,008	0,62 ± 0,03
	Recuperação ± DP (%)	112,17 ± 5,18	93,65 ± 5,66	82,80 ± 2,27	27,13 ± 8,19	92,05 ± 4,9
6,0	Média ± DP	1,47 ± 0,03	1,30 ± 0,04	0,76 ± 0,06	0,29 ± 0,03	3,83 ± 0,15
	Recuperação ± DP (%)	72,11 ± 1,89	70,88 ± 2,31	64,70 ± 5,72	44,08 ± 4,52	67,28 ± 2,68
25,0	Média ± DP	6,31 ± 0,21	5,80 ± 0,18	3,11 ± 0,35	1,12 ± 0,16	16,36 ± 0,87
	Recuperação ± DP (%)	70,04 ± 2,41	71,82 ± 2,28	60,06 ± 6,77	39,52 ± 5,64	65,18 ± 3,48

As figuras 1 e 2 mostram os cromatogramas do padrão de aflatoxinas e uma amostra de pimenta preta naturalmente contaminada.

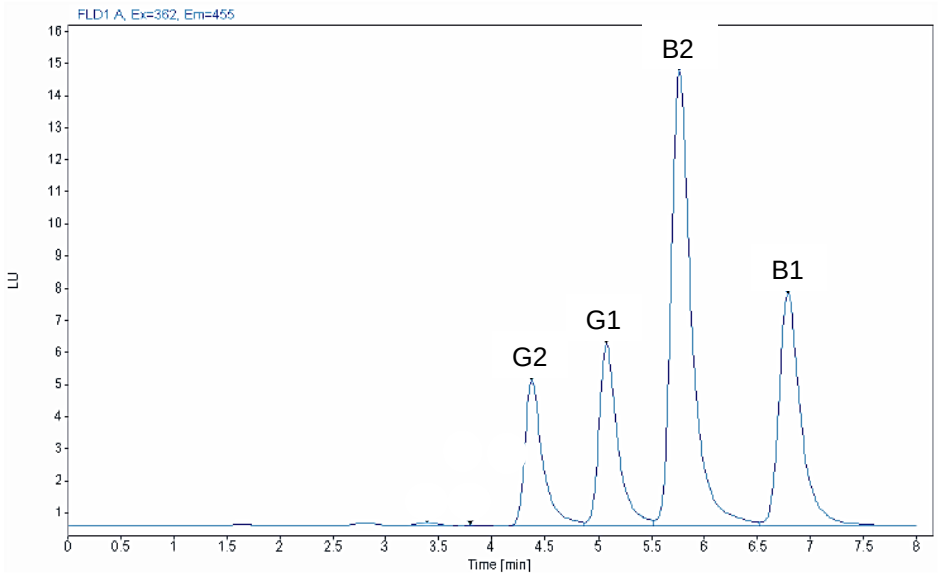


Figura 1. Cromatograma do padrão de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2.

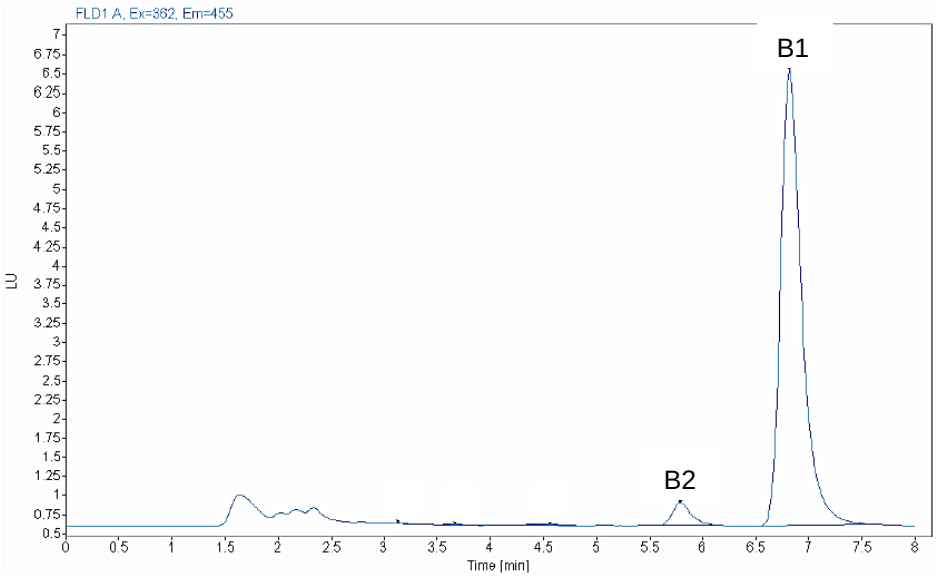


Figura 2. Cromatograma de uma amostra de pimenta preta naturalmente contaminada. B1 = 10,64 µg/kg e B2 = 0,27 µg/kg.

Das 60 amostras analisadas, 32 (53,33%) apresentaram contaminação com aflatoxinas dos grupos B e G com níveis variando de 0,10 a 11 µg/kg, 30 (50%) com aflatoxina B1 com níveis variando de 0,12 a 10,64 µg/kg e 46,6% das amostras apresentaram níveis de aflatoxinas abaixo do LOD (<0,08 µg/kg).

A maior média de contaminação por aflatoxinas totais foi encontrada nas amostras a granel em pó de São Paulo (2,00 µg/kg), apresentando a maior contaminação por aflatoxina B1, 10,64 µg/kg conforme apresenta a tabela 5.

Tabela 5. Média, mediana e variação de contaminação por aflatoxinas em amostras de pimenta preta a granel, adquiridas em São Paulo, Maranhão e Rio Grande do Sul e amostras embaladas adquiridas em estabelecimentos comerciais em São Paulo, em pó e em grãos (µg/kg).

Aflatoxinas		**Embaladas (n=9)**		**São Paulo (n=39)**		**Maranhão (n=9)**		**Rio Grande do Sul (n=3)**	
Amostras positivas (%)		33,33		48,72		88,88		66,66	
		Grão (n=2)	Pó (n=7)	Grão (n=24)	Pó (n=15)	Grão (n=3)	Pó (n=6)	Grão (n=2)	Pó (n=1)
B1	Média (µg/kg)	n.d.*	0,30	0,20	1,80	0,16	0,14	0,07	0,12
	Mediana (µg/kg)	n.d.	n.d.	n.d.	0,34	0,16	1,13	0,07	0,12
	Variação (µg/kg)	n.d.	n.d.-1,41	n.d.-2,0	n.d.-10,64	0,13-0,19	n.d.-0,30	n.d.-0,15	0,12
B2	Média (µg/kg)	n.d.	< LOD	< LOD	0,05	n.d.	< LOD	n.d.	n.d.
	Mediana (µg/kg)	n.d.	n.d.	n.d.	n,d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Variação (µg/kg)	n.d.	n.d.-0,09	n.d.-0,08	n.d.--0,27	n.d.	n.d.-0,08	n.d.	n.d.
G1	Média (µg/kg)	n.d.	< LOD	< LOD	< LOD	n.d.	< LOD	n.d.	n.d.
	Mediana (µg/kg)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Variação (µg/kg)	n.d.	n.d.-0,07	n.d.-0,06	n.d.-0,07	n.d.	n.d.-0,07	n.d.	n.d.
G2	Média (µg/kg)	n.d.	n.d.	0,01	< LOD	0,06	0,06	n.d.	n.d.
	Mediana (µg/kg)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,06	0,04	n.d.	n.d.
	Variação (µg/kg)	n.d.	n.d.	n.d.-0,06	n.d.-0,06	n.d.-0,1	n.d.-0,22	n.d.	n.d.
TOTAL	Média (µg/kg)	n.d.	0,31	0,22	2,00	0,22	0,23	0,07	0,12
	Mediana (µg/kg)	n.d.	n.d	n.d.	0,40	0,22	0,30	0,07	0,12
	Variação (µg/kg)	n.d.	n.d.-1,50	n.d.-2,00	n.d.-11,00	0,20-0,25	n.d-0,40	n.d-0,15	0,12

*Não detectado
LOD = Limite de Detecção (0,03; 0,02; 0,02; 0,01 e 0,08 µg/kg para aflatoxinas B1, B2, G1, G2 e totais, respectivamente).

Tabela 6. Número de amostras contaminadas com aflatoxinas.

Aflatoxina (µg/kg)		N° de amostras	
		Grão (n=31)	Pó (n=29)
B1	< 0,03	20	10
	≥0,03- <1	10	13
	≥1 - <5	1	4
	≥ 5- <10	0	1
	≥10- <15	0	1
	≥15	0	0
Aflatoxinas totais	< 0,08	19	9
	≥0,08- <1	11	14
	≥1 - <5	1	4
	≥5- <10	0	1
	≥10- <15	0	1
	≥15	0	0

LOD = Limite de Detecção (0,03; 0,02; 0,02; 0,01 e 0,08 µg/kg para aflatoxinas B1, B2, G1, G2 e totais, respectivamente).
LOQ = Limite de Quantificação (0,09; 0,07; 0,08; 0,03; 0,27 µg/kg para aflatoxinas B1, B2, G1, G2 e totais, respectivamente).

Todas as amostras estão de acordo com os limites estabelecidos pela RDC Nº 7/2011 para aflatoxinas, de 20µg/kg. Apenas duas amostras (3,33%) não estão em conformidade com os limites estabelecidos pela legislação europeia. Uma amostra apresentou valores de aflatoxina B1 (10,64 µg/kg) e aflatoxinas totais (11 µg/kg) acima da legislação europeia de 5 µg/kg e 10 µg/kg respectivamente, e a outra amostra apresentou valor de aflatoxina B1 de 5,94 µg/kg.

Sete (11,6%) amostras estavam contaminadas com aflatoxinas totais >1µg/kg. Quatro delas (57%) apresentaram média de contaminação por fungos produtores de aflatoxinas de 4,3 x 10^2 UFC/g; e 3 (42,8%) não apresentaram contaminação por fungos produtores de aflatoxinas. Portanto, a produção de aflatoxinas pode ter ocorrido em etapas que antecedem a comercialização e mesmo após a morte destes fungos a toxina permaneceu no produto.

Das 60 amostras, 14 (23,3%) apresentaram fungos produtores de aflatoxinas, porém não estavam contaminadas com aflatoxinas. Neste caso provavelmente não houve condições adequadas durante processo da pimenta preta para a produção de aflatoxinas.

5. DISCUSSÃO

Todas as espécies de *Aspergillus* section *Flavi* isoladas, incluindo *Aspergillus flavus*, *A. tamarii* e *A. pseudotamarii* (exceto *A. parasiticus*, que estava presente apenas nas amostras sem desinfecção) estiveram presentes, tanto infectando o grão internamente como contaminantes presentes na parte externa.

Os valores de porcentagem de contaminação foram menores nos grãos lavados com hipoclorito de sódio do que nos grãos sem desinfecção superficial, como apresentado na tabela 1, considerando inclusive as porcentagens das espécies aflatoxigênicas, como *A. flavus* que apresentou 40% das cepas produtoras de aflatoxinas.

Jeswal e Kumar (2015) também analisaram amostras de pimenta preta sem desinfecção superficial dos grãos e encontraram valores próximos do presente trabalho. *Aspergillus flavus* foi o fungo predominante com porcentagem média de incidência de 28,3% e 45,4% deles produziram aflatoxinas.

Já Gatti *et al.* (2003) também analisaram amostras de pimentas pretas sem desinfecção dos grãos e encontraram valores mais baixos do que o presente trabalho. Os fungos com maior frequência de ocorrência foram do gênero *Eurotium* (32%), seguido por *Aspergillus* section *Flavi* (25,1%). A espécie prevalente na seção *Flavi* foi *Aspergillus flavus* (14,6%). Das 56 cepas de *A. flavus*, 13 (23,21%) foram positivas para aflatoxinas pela técnica de Cromatografia de Camada Delgada (CCD).

Outros estudos analisaram amostras de pimenta preta com desinfecção superficial dos grãos e apresentaram valores maiores que o presente trabalho. *A. flavus* também foi o predominante com 43,8% de porcentagem de infecção (FREIRE *et al*., 2000). E para Banerjee *et al.* (1993) *Aspergillus flavus* tiveram uma média de incidência de 31,3% com 100% dos isolados de *A. flavus* produtores de aflatoxina B1, testado pelo método ELISA. Os autores não analisaram aflatoxinas nas amostras de pimenta.

A presença de cepas produtoras acarreta em risco de contaminação por aflatoxinas, se as condições de producão, estocagem e transporte não forem adequadas. E pelo fato de ser um alimento consumido *in natura*, aumentam os riscos de contaminação da população, pois normalmente não envolve um tratamento de descontaminação antes do consumo, que poderia reduzir a quantidade de

aflatoxinas. Qumer *et al.* (2012) observaram uma redução de até 97% na contagem de *Aspergillus* com dose de radiação gama de 4 kGy; e Jalili, Jinap e Noranizan (2010) mostraram uma redução de 43% de aflatoxina B1 em pimenta preta com uma dose de radiação de 60kGy.

Assim como no presente trabalho, a maioria dos estudos com pimenta preta mostrou alta porcentagem de amostras positivas para aflatoxinas, de 27% a 75% variando de 0,3 a 6,6 µg/kg. Os estudos também apresentam de 16,6% a 30,4% de amostras contaminadas com aflatoxina B1, variando de 0,13 a 1,2 µg/kg (BIRCAN, 2005; FAZEKAS; TAR; KOVÁCZ, 2005; FERREIRA; MENDES; OLIVEIRA, 2007; KURSUN; MUTLU, 2010; OZBEY; KABAK, 2012).

A alta frequência de amostras com níveis detectáveis de aflatoxinas demonstra que o produto é susceptível à contaminação por aflatoxinas, e que os fungos produtores estão presentes. Por ser uma toxina carcinogênica qualquer concentração encontrada na pimenta preta pode representar risco a saúde de seus consumidores (EFSA, 2007).

A média de contaminação por aflatoxinas nas amostras embaladas foi 0,24 µg/kg e nas amostras a granel foi 0,70 µg/kg. Bircan (2005) também observou essa diferença ao analisar 15 amostras de pimentas pretas. Vinte por cento das amostras embaladas estavam contaminadas, chegando a 0,3 µg/kg de aflatoxinas e 40% das amostras a granel estavam contaminadas com aflatoxinas, chegando a 2,3µg/kg.

O menor grau de contaminação por micotoxinas nas amostras embaladas e vendidas em supermercados pode estar relacionado com o maior controle de qualidade adotado pelas empresas e principalmente pelo controle de fornecedores e obtenção de certificações que a empresa é exigida, favorecendo melhores condições higiênico-sanitárias destes produtos. Já para as amostras a granel, pode não haver o controle de fornecedores e o aumento da contaminação pode ocorrer ainda nos pontos de vendas, na qual a umidade e temperatura provavelmente não são controladas.

As maiores contaminações por aflatoxinas totais (4,33; 6,17 e 11 µg/kg) foram observadas nas amostras a granel em pó de São Paulo (Tabela 5). A produção de aflatoxinas na pimenta preta pode ocorrer em diferentes etapas da cadeia produtiva, no plantio, colheita, secagem, armazenamento, transporte e comercialização, se não

houver o controle de qualidade apropriado e a manutenção da umidade segura dos grãos (≤ 12%).

Apenas 3% das amostras não estiveram em conformidade com os limites estabelecidos pela legislação europeia. Por ser uma legislação mais restritiva do que a legislação brasileira, isso pode representar problemas para o produtor que visa exportar o seu produto. Medidas preventivas, visando reduzir a contaminação deste produto no Brasil, devem ser tomadas. Recentemente foi criada uma lei estadual (Lei Nº 10.582/2016) para incentivo a produção de pimenta-do-reino de qualidade possibilitando aos pipericultores oferecer ao mercado um produto reconhecido internacionalmente como de qualidade superior (ESPÍRITO SANTO, 2016). A investigação da qualidade microbiológica e da presença de contaminantes como as micotoxinas nas pimentas-do-reino coincidem com os objetivos propostos nesta lei, de melhoria da qualidade deste produto.

6. CONCLUSÕES

As amostras de pimenta preta apresentaram contaminação por fungos da seção *Flavi* e por aflatoxinas. Os níveis de aflatoxinas estavam dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira.

7. REFERÊNCIAS

BANERJEE, A.; MATHEWS, R. P.; PRAKASH, H. S.; SHETTY, H. S. Mycobiota and toxigenic *Aspergillus flavus* associated with developing cardamom and pepper. *Mycological Research*, v.97, n.11, p.1403-1406, 1993.

BENNET, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, DC, v.16, n. 3, p. 497-516, 2003.

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

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre os limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Brasília, DF. 2011.

COPETTI, M. V.; IAMANAKA, B. T.; PEREIRA, J. L.; FUNGARO, M. H.; TANIWAKI, M. H. Aflatoxigenic fungi and aflatoxin in cocoa. *International Journal of Food Microbiology*, v.148, p.141–144, 2011.

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

EC. European Commission. Commission Regulation (EU) No 165/2010 of 26 February 2010 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins, *Official Journal of the European Union*, 2010.

EC. European Community. Commission Regulation No 401/2006 of 23 February 2006. Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, 2006.

EFSA. European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products. *The EFSA Journal*, 446, p.1-127, jan., 2007.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Manual de Segurança e Qualidade para a Cultura da Pimenta-do-Reino. Brasília: Série Qualidade e Segurança dos Alimentos, 65 p., 2004.

ESPÍRITO SANTO. Lei Estadual nº 10.582, de 11 de outubro de 2016. Dispõe sobre o incentivo à produção de pimenta-do-reino de qualidade. *Diário Oficial dos Poderes do Estado*, Vitória, ES, 11 out. 2016. Protocolo 269260, p. 16-17.

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

FAZEKAS, B.; TAR, A.; KOVÁCZ, M. Aflatoxin and ochratoxin A content of spices in Hungary. *Food Additives & Contaminants*, v.22, p.856-863, 2005.

FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; MENDES, E.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Qunatification of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 in pepper by HPLC/fluorescence. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies,* v.27, p.325-334, 2007.

FILTENBORG, O.; FRISVAD, J. C.; SVENDENSEN, J. A. Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 45, p. 581-585, 1983.

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

FREIRE, F. C. O.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F.; MENDES, F. N. P. Micotoxinas: Importância na alimentação e na saúde humana e animal. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos, 110, 48 p., out., 2007.

GATTI, M. J.; FRAGA, M. E.; MAGNOLI, C.; DALCERO, A. M.; ROSA, C. A. R. Mycological survey for potential aflatoxin and ochratoxin producers and their toxicological properties in harvested Brazilian black pepper. *Food Additives & Contaminants*, v.20, p.1120-1126, 2003.

IARC. International Agency for Research on Cancer. WHO IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins naphthalene and styrene. Aflatoxins. v. 82, 590p., feb., 2002.

JALILI, M.; JINAP, S.; NORANIZAN, A. Effect of gamma radiation on reduction of mycotoxins in black pepper. *Food Control*, v. 21, n. 10, p. 1388–1393, oct., 2010.

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

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

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

KURSUN, O.; MUTLU, A. G. Aflatoxin in spices marketed in the west Mediterranean region of Turkey. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, v.9, p.2979-2981, 2010.

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

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

OZBEY, F.; KABAK, B. Natural co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in spices. *Food Control*, v.28, p.354-361, 2012.

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

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

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. Fungi and food spoilage. Springer Science Business Media: New York, 593 p., 2009.

QUMER, I.; MUHAMMAD, A.; RAFIQUE, A. M.; AGUSTIN, A. Mold and aflatoxin reduction by gamma radiation of packed hot peppers and their evolution during storage. *Journal of Food Protection*, v. 4, n. 8, p. 1366-1541, Aug., 2012.

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

ZINEDINE, A.; BRERA, C.; ELAKHDARI, S.; CATANO, C.; DEBEGNACH, F., ANGELINI, S.; DE SANTIS, B.; FAID, M.; BENLEMLIH, M.; MINARDI, V.; MIRAGLIA, M. Natural occurrence of mycotoxins in cereals and spices commercialized in Morocco. *Food Control*, v.17, p.868–874, 2006.

Capítulo 3

Ochratoxin A and its producing fungi in black pepper (*Piper nigrum* L.) consumed in Brazil

Adriana Raquel Persson da Silva, Ligia Manoel Martins e Marta Hiromi Taniwaki, Beatriz Thie Iamanaka

Artigo enviado para a revista "Food Control" no dia 26/01/17

ABSTRACT

The aim of this study was to isolate and identify *Aspergillus* section *Nigri* and *Circumdati* species from black pepper intended for human consumption and marketed in Brazil; investigate the ability of ochratoxin A production by the isolates and assess the presence of ochratoxin A in samples. A total of 60 samples of black pepper were direct plated (grains) and diluted (powder) for determination of percentages of infection and CFU/g of the samples. The potential for ochratoxin A production by the isolates was tested using the agar plug technique and the analysis of ochratoxin A in the samples was assessed using an immunoaffinity column followed by quantification using High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detector (HPLC/FLD). A total of 1,079 *Aspergillus* section *Nigri* and 135 *A.* section *Circumdati* were isolated and 4% and 46.7% were ochratoxin A producers respectively. Sixty-six percent of the samples were contaminated by *Aspergillus* section *Nigri* and 15% by *Aspergillus* section *Circumdati*. Thirteen strains of *Aspergillus* section *Nigri* were identified as *A. carbonarius* and 100% of them were ochratoxin A producers. The average infection of *Aspergillus* section *Nigri* and *Circumdati* were 15.4% and 0.9% respectively. A considerable increase of contamination by these species was observed without surface disinfection, of 40.2% and 6.6% respectively. Ochratoxin A was found in 55% of the samples but in general at low levels, ranging from 0.05 to 13.15µg/kg.

Key words: black pepper; *Piper nigrum* L.; *Aspergillus* section *Nigri; Aspergillus* section *Circumdati*; ochratoxin A.

1. INTRODUCTION

Ochratoxin A (OTA) is a toxin mainly produced by *Aspergillus* and *Penicillium* species and is considered nephrotoxic, teratogenic, immunotoxic and hepatotoxic in domestic and laboratory animals (O' Brien & Doetrich, 2005). Thus it is a mycotoxin classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC,1993) as a possible human carcinogen (category 2B). The Joint WHO/FAO Expert Committee on Food Additives (JECFA) has confirmed the Provisional Tolerable Weekly Intake (PTWI) of 100 ng/kg body weight for this mycotoxin, which corresponds to 14 ng/kg body weight per day (Codex, 1998).

Several species have been reported as ochratoxin A producers, among them: *Aspergillus cretensis, A. flocculosus, A. pseudoelegans, A. roseoglobulosus, A. westerdijkiae, A. sulphureus*, *Neopetromyces muricatus*, *A. ochraceus, A. sclerotiorum*, *A. melleus*, *A. ostianus, A. petrakii*, *A. persii*, *A. carbonarius*, and *A. niger*, in addition to *Penicillium nordicum* and *Penicillium verrucosum* (Pitt, 1987; Abarca et al., 1994; Pitt, 2000; Larsen et al., 2001; Frisvad et al., 2004; Samson et al., 2010).

Some factors may influence the production of ochratoxin A by the reported species. Many spices are produced in tropical climate countries, which have high temperature, humidity and rainfall indices, and these climatic conditions favor the development of fungi and the production of mycotoxins (Prado et al., 2008). Other factors such as plant stress, insect infestation and planting conditions may also influence the formation of mycotoxins (Bayman et al., 2002; Jayashree & Subrasmanyam, 2000; Schatzki & Ong, 2001).

The pepper plant is characterized by being a climbing species that can reach 3 meters in height. When mature, the fruit has 4 to 6 mm in diameter and the rusk becomes reddish (Embrapa, 2004). Harvesting is manual and the pepper undergoes a drying process normally

done in the sun for 3 to 6 days. The conditions of harvest, drying and storage are important for the maintenance of the final quality of the product (Embrapa, 2005).

Several studies have been conducted on the occurrence of ochratoxin A in spices and most of the research is concentrated in some Asian countries such as India, Vietnam, Indonesia, Malaysia and Sri Lanka (IPC, 2004; Kabak & Dobson, 2017). However, few studies have shown the relationship between mycobiota presence and ochratoxin A levels (Jalili, 2010; Ramesh & Jayagoudar, 2014; Jalili, 2016).

Jeswal and Kumar (2015) analyzed different Indian spices (red chilli, black pepper, turmeric, coriander, cumin, fennel, caraway, fenugreek, and dry ginger) to evaluate the occurrence of toxigenic fungi and OTA, in addition to other mycotoxins. *Aspergillus niger* was one of the most dominant species isolated in all types of spices, with an average of contamination ranging from 2.6% to 19.6% (the highest value was found in black pepper). Forty-five percent of *Aspergillus ochraceus* isolated from black pepper produced ochratoxin A, and the amount of OTA found was 154.1μg/kg.

Brazilian legislation establishes the Maximum Tolerated Limits (MTL) for ochratoxin A in spices, including black pepper, with the limit being 30μg/kg (BRASIL, 2011). The European Union limit is 15.0 μg/kg of OTA in black pepper (EC, 2015).

In 2015 the Codex Committee on Contaminants in Foods (CCCF) included black pepper in group 1, representing a high priority for evaluation and quantification of mycotoxins, including ochratoxin A (Codex Alimentarius Commission, 2016). Therefore data about the contamination of mycotoxins in black pepper, one of the most used spices consumed all over the world, is very important.

In Brazil, the data about the presence of toxigenic fungi and ochratoxin A in black pepper is limited so the results of this research are very important to the country and they can be used to evaluate the quality of Brazilian black pepper and to compliance with the Brazilian

regulation. The objectives of this study were to isolate, to quantify and to identify the ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Nigri* and *Aspergillus* section *Circumdati* from powder and grain black pepper. Further, to determine the samples water activity and to evaluate the toxigenic potential of the isolated strains and the presence of ochratoxin A in black pepper intended for human consumption marketed in Brazil.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Samples

A total of 60 samples of black peppers were analyzed (200 to 300g per sample): 29 powdered black pepper and 31 black pepper grain samples. Fifty-one were obtained in bulk and 9 samples from different brands, obtained in commercial establishments in the states of São Paulo (39), Maranhão (9) and Rio Grande do Sul (3), from March 2015 to October 2016.

2.2 Water activity determination

The water activity of pepper samples was measured using the AquaLab – Decagon (WA, USA) equipment, in triplicate at 25ºC (± 1ºC).

2.3 Direct plating for grain samples

The direct plating method was used with disinfection according to Pitt & Hocking (2009) and also without disinfection of the sample surface, since black pepper can be consumed “in natura”. Fifty grains per sample were surface disinfected with 0.4% sodium

hypochlorite for 2 minutes. The disinfected grains of each sample were plated onto Dichloran 18% Glycerol Agar (DG18) with 5 grains each. The same procedure was performed for the sample without disinfection (not performing the disinfection with sodium hypochlorite). The plates were incubated at 25°C / 5-7 days, and the fungal infection was expressed as a percentage (%).

2.4 Dilution method

The dilution method was used for powder black pepper samples. Twenty-five grams of the sample were homogenized with 225 mL of 0.1% peptone water for 1 minute. Serial dilutions were performed and aliquots of 0.1 mL of each dilution were plated onto the surface in DG18 medium. Plates were incubated at 25°C / 5-7 days. After that, plates containing 15 to 150 CFU (Colony Forming Unit) were selected and the results are expressed in CFU/g of sample (Pitt & Hocking, 2009).

2.5 Isolation and Identification of the potencial ochratoxigenic species

The potential ochratoxigenic *Aspergillus* species were purified inoculating at three equidistant points in Czapek Yeast Extract Agar (CYA) and incubated at 25°C/5-7 days, according to Pitt & Hocking (2009). Afterwards, these colonies were inoculated in CYA and Malt Extract Agar (MEA) and incubated at different temperatures, and separated as *Aspergillus* section *Nigri* and *Aspergillus* section *Circumdati* according to Klich & Pitt(1988).

The fungi were evaluated according to their microscopic and macroscopic characteristics (diameter, texture, pigmentation, appearance of the surface and the reverse of the colony, shape and size of the structures and conidia) using the described taxonomic keys.

2.6 Evaluation of ochratoxin A production by the strains

Aspergillus section *Circumdati* and *Aspergillus* section *Nigri* isolates were tested by ochratoxin A production potential. The isolates were inoculated in Yeast Extract Sucrose Agar (YESA) and incubated at 25°C/7 days, followed by the agar plug technique associated with Thin Layer Chromatography (TLC), according to Filtenborg et al. (1983). Pieces of agar (5-7mm^2) were removed from the YESA plate and the toxins extracted with a chloroform/methanol mixture (1:1). These pieces were applied to 20 cm x 10 cm silica gel plates (Merck, Darmstadt, Germany). Five microliters of an ochratoxin A standard were added, in the same plate. Chromatography run was performed using mobile phase of toluene/ethyl acetate/formic acid/chloroform (7:5:2:5, v/v/v/v) for approximately 20 minutes. After elution, the plate was dried and the visualization was carried out using a cabin with ultraviolet lamp, at wavelength of 365 nm and 254 nm. The qualitative determination was performed by comparing the fluorescence and the retention factor (Rf) of the spot strains with the ochratoxin A standard.

2.7 Determination of ochratoxinA in black pepper by HPLC

2.7.1 Sample preparation

Approximately 100g of each grain pepper sample were finely ground using a grinder (IKA, Mod A11, Brazil) and sifted in a 18 mesh sieve (Bronzinox, Brazil) until reaching granulometry below 1mm.

2.7.2 Extraction and cleaning

Five grams of the sample were extracted with 100 mL of 3% methanol: bicarbonate (1:1) solution and homogenized for 30 minutes in the shaker. The filtration was carried out using a qualitative filter followed by a glass microfiber filter (Vicam, Sweden). The filtrate (4 mL) was diluted in 20 ml of PBS with 0.01% tween 80. This content was passed through the OchraTest immunoaffinity column (IAC) (Vicam, USA) at a flow rate of 2-3 mL/min, and washed with 20 mL of ultra pure water (MilliQ, France). The elution of the mycotoxin was performed eight times with 500µL of methanol: acetic acid (98:2) in an amber vial. The extract was dried using nitrogen and resuspended with 300µL of the mobile phase acetonitrile: water: acetic acid (51:47:02). Before injection in the HPLC the extract was filtered in 0.45µm PVDF filter (Analítica, China). Twenty microliters were injected in High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with a fluorescence detector (Shimadzu, Japan). The methodology was based on Copetti et al. (2010).

2.7.3 HPLC parameters

The Shimadzu LC-10VP HPLC system (Shimadzu, Japan) was used with manual injection and a fluorescence detector with a wavelength of 333 nm of excitation and 477 nm of emission. The reverse phase C18 Shimadzu Shimpack (4.6×250 mm) column was used at oven temperature at 40°C.The mobile phase was methanol: acetonitrile: water: acetic acid (35:30:34:01) with flow rate of 0.8 mL/min (Copetti et al., 2010, modified).

An ochratoxin A standard was used for the construction of a six point calibration curve of peak areas versus concentration (µg/mL). The recovery was calculated after spiking a blank

black pepper with ochratoxin A standard at 3 levels: low (0.7 µg/kg), medium (11.5 µg/kg) and high (57.4µg/kg) in triplicate.

Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of the method were calculated analyzing eight replicates of blank black pepper spiked with low level (0.7 µg/kg) of ochratoxin A, according to Eurachem Guides (2014).

3. RESULTS

3.1 Fungi contamination

From sixty samples analyzed (29 powder and 31 grain) a total of 1,214 *Aspergillus* section *Nigri* and *Circumdati* were isolated. Table 1 and Table 2 show the frequency of occurrence, the average and range of contamination by these species in the grain and powder black pepper, respectively.

The most common group of species isolated were *Aspergillus* section *Nigri* (1,079 isolates) and the main group, was classified in the "*Aspergillus niger* "aggregate" with 98%of the isolates (1,059). All these isolates showed the morphological characteristics of *Aspergillus niger,* such as, black or slightly brown colony (70 mm) in CYA 25°C after 7 days, biseriate, smooth or slightly rough globose conidia (4-5 µm). *A. carbonarius* corresponded to 1.48% of the isolates. *A. carbonarius* differs from *A. niger* due to conidia size, which diameter varies from 7 to 10 µm, and conidia ornamentation, they are spiny. *Aspergillus niger* "aggregate" and *A. carbonarius* were found in 68%, 87% and 65% and 16%, 9.6% and 3.5% of the samples with disinfection, without disinfection and in powder, respectively.

In addition of those *Aspergillus* section *Nigri* described previously, another group classified as *Aspergillus japonicus* "aggregate" was isolated, only from black pepper grain

and without external disinfection. They were found in 9.7% of these samples and the average of contamination was low, 0.3%. This group was characterized by dark brown and gray colony (70mm) in CYA at 25°C after 7 days, uniseriate, globose and spiny conidia (4-5µm).

The contamination of *A.* section *Circumdati* was lower and 135 representatives were isolated from total samples analyzed. They were found in 13%, 58% and 14% of the disinfected grain samples, non-disinfected and in powder, respectively.

The average of contamination by *Aspergillus* section *Nigri* in disinfected grains was lower (15.4%) than in grains without superficial disinfection (41.3%) and the same occurred with *Aspergillus* section *Circumdati*, that had 0.9% in disinfected grains and 6.58% in non-disinfected grains, showing the importance of these external mycobiota in terms of the presence of ochratoxin A potential producers.

All strains of *A.* section *Nigri* (1,079) and *A.* section *Circumdati* (135) were tested for ochratoxin A production and 8.73% were positives as shown in Table 3.

In spite of a large number of *Aspergillus* section *Nigri* isolates, only 3.9% were ochratoxin A producers. In this group, only *A. carbonarius* strains showed high percentage of ochratoxin A producer isolates, 100%. *Aspergillus niger "*aggregate" had low levels of positive strains, 2.9% and no isolates of *A. japonicus* produced ochratoxin A, which confirms Samson *et al.* (2010) that *A. japonicus* was not ochratoxin A producer.

In relation to *Aspergillus* section *Circumdati*, from a total of 135 isolates, 46.7% of the isolates were ochratoxin A producers.

The average of black pepper water activity obtained was 0.580, with a range of 0.427 to 0.736; for the grain samples the average was 0.599 and for the powder samples it was 0.561.

3.2 Occurrence of OTA in black pepper samples

The ochratoxin A methodology used showed a good recovery and had satisfactory performance at the three defined levels: low (0.76μg/kg), medium (11.50μg/kg) and high (57.45μg/kg). These values achieved are in accordance with the European Community Directive EC Nº 401/2006 (EC, 2006) that established recovery values between 50 and 120% for ochratoxin A levels lower than 1.0μg/kg and between 70 and 110% for 1.0 to 10μg/kg (Table 4). Satisfactory recovery values were obtained at the three established levels (97%, 96% and 88.5%, respectively).

The detection (LOD) and quantification (LOQ) limit of total ochratoxin A were 0.05 μg/kg and 0.16 μg/kg, respectively; with retention time of about 10.5 min. Figures 1 and 2 show the chromatogram of ochratoxina A standard and a natural contaminated black pepper, respectively.

Table 5 shows the ochratoxin A contamination in the black pepper samples. The average of ochratoxin A contamination, considering the total samples (n=60) analyzed, was 0.80μg/kg. Twenty-seven (45%) samples did not showed ochratoxin A contamination (<LOD). All the samples with ochratoxin A contamination (55%) were in accordance with Brazilian (30 μg/kg) and European regulation (15 μg/kg). Twenty-one samples (35%) showed OTA contamination between detection limit (0.05μg/kg) and 1.0μg/kg and 12 (20%) samples had contamination higher than 1.0μg/kg. Only two samples (3.3%) exceed 10 μg/kg, as shown in table 5.

Considering the kind of sample, bulk samples showed a higher OTA contamination with average of 1.13μg/kg when compared to packed samples bought in the supermarket, which had average of 0.48μg/kg.

The four highest contaminated samples (13.2; 10.6; 7.9 and 7.8μg/kg) were bulk samples collected in the market of Campinas and São Paulo cities. Water activity values of these most contaminated samples were 0.639; 0.567; 0.561 and 0.557 respectively, considered low to fungal growth. In this case it is possible that ochratoxin A formation occurred before commercialization, during storage, transport, drying process or in the field.

4. DISCUSSION

Black pepper is a low water activity food which favors the development of xerophilic fungi, including the ochratoxin A producing *Aspergillus* species. The most frequent ochratoxigenic fungi found in the samples analyzed were *Aspergillus niger* "aggregate" Because they produced black spores, they had an advantage over their competitors due to their resistance to sunlight, and they persisted in peppers during sun drying (Pitt & Hocking, 2009).

This work revealed that *Aspergillus carbonarius* and *A. ochraceus* were the largest producers of OTA in black pepper, although *Aspergillus niger* “aggregate” was the most dominant group. Same results were found by Yogendrarajah et al. (2014) which used dilution technique and reported *A. niger* in black pepper with contamination varying from 6 to19.6% and Jeswal & Kumar (2015) that plated different spices without external disinfection and observed contamination of black pepper with *A. ochraceus* (10% of average of contamination) and 45% of them produced ochratoxin A. In our study 46.7% of the *Aspergillus* section *Circumdati* isolates were OTA producers.

As in the present study, Jalili et al. (2010) also showed high contamination in bulk samples. The two most contaminated samples found were black and white bulk pepper samples, with contamination of 13.58 and 12.64μg/kg respectively.

The higher fungal contamination in bulk samples can be a result of an inadequate handling and storage of the product, which can favor the development of fungal and toxin production. Packaged samples which showed lower fungal contamination can be a result of using well selected raw material by the companies. Gama irradiation can be used by the spice companies to reduce fungal and mycotoxin contamination.

The contamination rate of the samples plated without surface disinfection was higher than the infection rate of the samples that were disinfected, including the OTA producing fungi, showing that these species were also in the surface of the grain. Safe moisture content must be maintained during grain storage to avoid the growth of these species.

From a total of 60 samples, 33 (55%) showed contamination (> 0.05 μg/kg) by ochratoxin A with a mean of 0.80μg/kg. Only 4 samples (6.7%) showed contamination > 5μg/kg and lower than 13 μg/kg, but all samples are in accordance with Brazilian and European regulation.

Studies have shown that the mean of black pepper samples contaminated with OTA ranges from 43.5% to 78.57% and the level of OTA contamination varies from ND to 154.1 μg/kg (Jalili et al., 2010; Ramesh & Jayagoudar, 2014; Jeswal & Kumar, 2015; Jalili, 2016).

During the process production of black pepper, contamination can occur mainly during drying as the product is exposed to the sun on tarpaulins on the ground and submitted to climatic conditions and the presence of domestic and wild animals, which can contaminate the pepper with fecal material or urine.

During storage the moisture content must be controlled to avoid oxidative processes leading to aging and consequently deterioration, which also favors the fungal contamination and production of mycotoxins (Piccolo, 2014).

In general, samples of black pepper analyzed in this study showed low ochratoxin A contamination; however some samples presented ochratoxigenic fungi ~~species~~ and the

majority of samples had presence of ochratoxin A, showing the need for surveillance and care during all black pepper production chain.

5. CONCLUSIONS

This study reported the high fungal contamination of black pepper produced and consumed in Brazil. The presence of ochratoxigenic fungi indicates that there is a high risk of ochratoxin A contamination. Moisture content of the grains must be controlled during all the black pepper production chain (lower than 12%) in order to prevent ochratoxin A production and subsequent consumer exposure.

6. ACKNOWLEDGMENTS

This research was financially supported by the Microbiology Laboratory at the Food Technology Institute. We would like to thank Mr. Stephen A. Shaw for the English language reviewing.

7. REFERENCES

Abarca, M. L., Bragulat, M. R., Castella, G., Cabañe, F. J. (1994). Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, Barcelona, 60, 7, 2650-2652.

Bayman, P., Baker, J., Mahoney, N. (2002). *Aspergillus* on tree nuts: incidence and associations. *Mycopathology*, 155, 03, 161-169.

BRASIL. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2011). Resolução da Diretoria Colegiada nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre os limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Brasília, DF.

CODEX COMMITTEE ON CONTAMINANTS IN FOODS. (2016). Discussion paper on the development of maximum levels for mycotoxins in spices and possible prioritization of work. Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Agenda Item 13.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. (1988). Position Paper on Ochratoxin A. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.

Copetti, M. V., Pereira, J. L., Iamanaka, B. T., Pitt, J. I., Taniwaki, M. H. (2010). Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in cocoa during farm processing. *International Journal of Food Microbiology*,143, 67-70.

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

European Community Commission Regulation (EU) 2015/1137Amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards the maximum level of Ochratoxin A in *Capsicum* spp. spices. *Official Journal of the European Union*, L 185, 11-12.

European Community Commission Regulation (EC) No 401/2006. Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L 70, 12-34.

Embrapa. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. (2004) Manual de Segurança e Qualidade para a Cultura da Pimenta-do-Reino. Brasília: Série Qualidade e Segurança dos Alimentos, 65 p.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. (2005). Sistema de Produção da Pimenteira-do-reino. Duarte, R. M. L. & Albuquerque, C. F. Embrapa Amazônia Oriental, Sistemas de Produção. Available at: http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/PimenteiradoReino/paginas/colheita.htm

Filtenborg, O., Frisvad, J. C., Svendensen, J. A. (1983).Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. *Applied Environmental Microbiology*, 45, 581-585.

Frisvad, J. C., Frank, J. M., Houbraken, J. A. M. P., Kuijpers, A. F. A., Samson, R. A. (2004). New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati Studies in Mycology*, 50, 23–43.

IARC. International Agency for Research on Cancer.(1993). Ochratoxin A. Summaries & Evaluations, 56, 489p.

IPC (International Pepper Community). (2004). The World Pepper Industry. Indonesia. Available at http://www.ipcnet.org/n/map/?path=map&page=cmp

Jalili, M., Jinap, S., Radu, S. (2010). Natural occurrence of ochratoxin A contamination in commercial black and white pepper products. *Mycopathologia*, Malaysia, 170, 251–258.

Jalili, M. (2016). Natural occurrence of ochratoxin A contamination in commercial spices in Tehran. *Nutrition and Food Sciences Research*, Iran, 3, 25-30.

Jayashree, T., Subrasmanyam, C. (2000). Oxidative stress as a prerequisite for aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Free Radical Biology & Medicine*, 29, 981-985.

Jeswal, P., Kumar, D. (2015). Mycobiota and natural incidence of aflatoxins, ochratoxin A, and citrinin in Indian spices confirmed by LC-MS/MS. *International Journal of Microbiology*, 2015, 1-8.

Kabak, B., Dobson, A. D. (2017). W Mycotoxins in spices and herbs: an update. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57, 18-34.

Klich, M. A., Pitt, J. I. (1988). A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their Teleomorphs. CSIRO Division of Food Science and Technology: Sydney, Australia, 116p.

Larsen, T. O., Svendsen, A., Smedsgaard, J. (2001). Biochemical caracterization of ochratoxin A – producing strains of the genus *Penicillium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 3.630-3.635.

O'Brien, E., Doetrich, D. R. (2005). *Toxicology*, 35, 33-60.

Piccolo, M. P. (2014). Ciência e Tecnologia de Alimentos: Produção e Sustentabilidade. 1ª Edição. Editora: Paco Editorial, 396p.

Pitt, J. I.,Hocking, A. D. (2009). Fungi and food spoilage. Springer Science Business Media: New York, 593 p.

Pitt, J. I. (1987). *Penicillium viridicatum, Penicilium verrucosum* and production of ochratoxin A. *Applied Environmental Microbiology*, 53, 266-269.

Pitt, J. I. (2000). Toxigenic fungi: which are important? Medical Mycology. 38, Suplement 1, 17–22.

Prado, G., Oliveira, M. S., Moreira, A. P. A., Lima, A. S., Souza, R. A., Alves, M. C. (2008). Determinação de aflatoxina B1 em pimenta (*Piper nigrum* L.) e orégano (*Origanum vulgare* L.) por cromatografia em camada delgada e densitometria. *Química Nova*, 31, 514-517.

Ramesh, C.,Jayagoudar, S. (2014).Determination of ochratoxin A in spices from Dharwad by high performance liquid chromatography. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 4, 42-52.

Samson, R. A.; Houbraken, J.; Thrane, U.; Frisvad, J. C.; Andersen, B. (2010). Food and indoor Fungi. Uthrech, NL: CBS Fungal Biodiversity Center, 390p.

Schatzki, T. F.; Ong, M. S. (2001).Dependence of aflatoxin in almonds on the type and amount of insect damage. *Journal of Food Chemistry*, 49, 4513-4519.

Yogendrarajah, P., Deschuyffeleer, N., Jacxsens, L., Sneyers, P., Maene, P., Saeger, S., Devlieghere, F., Meulenaer, B. (2014). Mycological quality and mycotoxin contamination of Sri Lankan peppers (*Piper nigrum* L.) and subsequent exposure assessment. *Food Control*, 41, 219-230.

Capítulo 3

Ochratoxin A and its producing fungi in black pepper (*Piper nigrum* L.) consumed in Brazil

(Tables and figures)

Captions

Table 1. Contamination of black pepper grains (n=31 samples) by *Aspergillus* section *Nigri* and *A.* section *Circumdati*.

Table 2. Contamination of powdered black pepper (n=29 samples) by *Aspergillus* section *Nigri* and *A.* section *Circumdati*.

Table 3.Ochratoxin A producing fungi in black pepper samples.

Table 4.Recovery of ochratoxin A (%) using three different contamination levels.

Table 5.Ochratoxin A contamination in the black pepper samples.

Figure 1.Chromatogram of ochratoxin A standard.

Figure 2. Chromatogram of a natural ochratoxin A contaminated black pepper sample (13,15 µg/kg).

Table 1.

	Black pepper grains (n = 31)					
	With disinfection			Without disinfection		
Fungi	FO (%)	Average of infection (%)	Range of infection (%)	FO (%)	Average contamination (%)	Range of contamination (%)
***A. niger* "aggregate"**	67.7	15.0	0-100	87.1	40.2	0-100
A. *carbonarius*	16.1	0.4	0-6	9.6	0.3	0-4
A. section *Circumdati*	12.9	0.9	0-10	58.1	6.6	0-44
A. *japonicus* "aggregate"	0	0	0	9.7	0.3	0-6

FO = Frequency of occurrence (n° contaminated or infected samples/n° total samples)

Average = Sum of average contamination or infected values of total samples/ n° total samples)

Table 2.

Fungi	Powdered black pepper (n = 29)		
	FO (%)	Average (CFU/g)	Range (CFU/g)
***A. niger* "aggregate"**	65.5	$2.8x10^3$	$<10^2$- $4.0x10^3$
A. section *Circumdati*	13.8	$7.3x10^2$	$<10^2$ -$1.3x10^4$
A. carbonarius	3.5	34	$<10^2$ - $1.0x10^3$

FO = Frequency of occurrence (n° contaminated samples/n° total samples)

Average = Sum of average contamination values of total samples/ n° total samples)

Table 3.

Fungi	Grain				Powder		Total	
	With Disinfection		Without Disinfection					
	Isolates (n)	OTA + (%)	Isolates (n)	OTA+ (%)	Isolates (n)	OTA+ (%)	Isolates (n)	OTA+ (%)
A. niger "aggregate"	231	0.9	621	3.7	210	2.7	1062	2.9
A. carbonarius	7	100	5	100	1	100	13	100
A. japonicus *“*aggregate"	0	0	4	0	0	0	4	0
A. section *Circumdati*	14	42.7	98	50	23	34.8	135	46.7
Total	**252**	**6.0**	**728**	**10.6**	**234**	**6.4**	**1214**	**8.8**

Table 4.

Ochratoxin A (µg/kg)	(n=3)	Ochratoxin A (µg/kg)
0.76	Average ± SD[1]	0.74±0.01
	Recovery ± SD (%)	97.17±1.83
11.50	Average ± SD	11.06±0.31
	Recovery ± SD (%)	96.28±2.73
57.45	Average ± SD	50.86±6.29
	Recovery ± SD (%)	88.54±10.95

[1] SD= Standard deviation

Table 5.

Ochratoxin A (µg/kg)	N° of samples	
	Grain	Powder
< 0.05	15	12
≥0.05- <1.0	10	11
≥1.0 – <5.0	3	5
≥5.0 – <10.0	2	0
≥10.0 – <15.0	1	1
≥15.0	0	0

Figure 1.

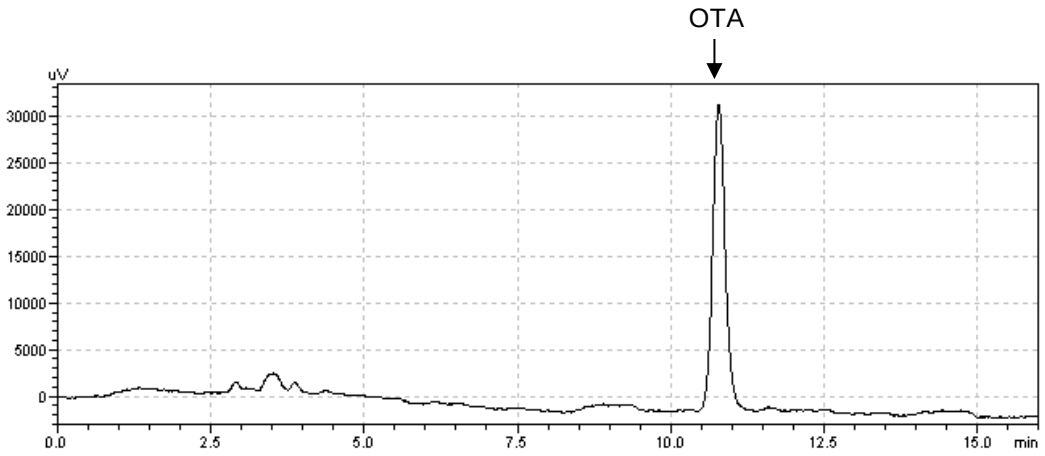
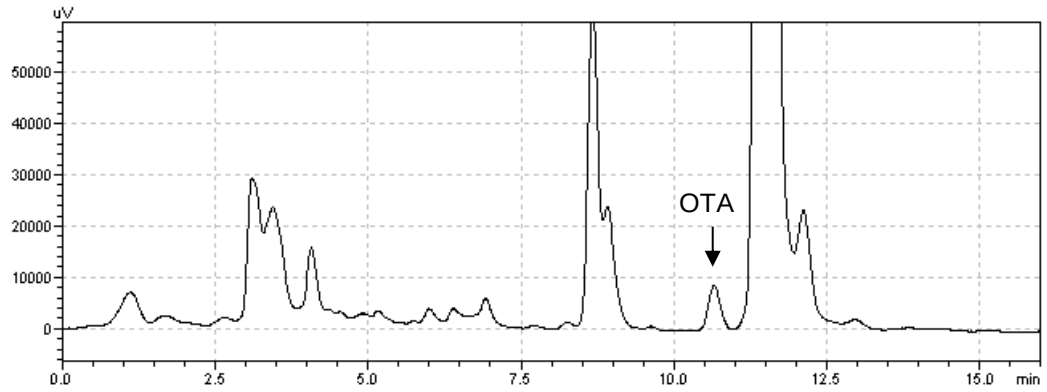

OTA
uV
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
12.5
15.0
min

Figure 2.


uV
50000
40000
30000
20000
10000
0
OTA
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
12.5
15.0
min

4. CONCLUSÃO GERAL

Com o presente estudo pudemos concluir que fungos potencialmente toxigênicos e produtores de aflatoxinas e ocratoxina A estiveram presentes na pimenta preta, tanto no interior quanto na superfície dos grãos, indicando haver potencial de risco para a saúde pública dos consumidores de pimenta preta.

As amostras embaladas demostraram estar menos contaminadas com fungos e micotoxinas, indicando um controle mais rigoroso da matéria-prima que é utilizada pela indústria. Outro possível procedimento que as indústrias podem estar utilizando é a adoção de métodos de descontaminação, como a radiação ionizante ou ozonização. A irradiação de alimentos é regulamentada no país pela ANVISA (RDC nº 21/2001) desde 2001 e para especiarias esta técnica é aprovada. Além da irradiação, outra prática que pode ser utilizada é a ozonização. Esta técnica é considerada segura pela FDA, contudo no Brasil só é regulamentada para uso em água (Portaria nº 25/76).

Já as amostras a granel estiveram mais contaminadas. Neste caso, é possível que não tenha havido a seleção dos fornecedores e de matéria-prima, que utilizem as boas práticas agrícolas, como secagem, armazenamento, transporte e embalagem adequados.

Embora algumas amostras tenham apresentado níveis elevados de OTA e aflatoxinas, todas estas não ultrapassaram o limite de aflatoxinas e ocratoxina A estabelecidos na legislação brasileira. Além disso, a maioria das amostras estava contaminada com níveis abaixo dos valores recomendados ou com valores menores que o limite de detecção do método.

Vinte amostras (33,33%) apresentaram co-ocorrência de aflatoxinas totais e ocratoxina A. Doze amostras (20%) apresentaram contaminação apenas por aflatoxinas totais e 13 amostras (21,66%) apresentaram contaminação apenas por ocratoxina A. O restante, 15 amostras (25%) não apresentaram contaminação por tais micotoxinas.

No presente trabalho, algumas amostras apresentaram fungos produtores de aflatoxinas e ocratoxina A, porém não estavam contaminadas com tais micotoxinas. Portanto, provavelmente não houve condições adequadas durante processo da pimenta preta para a produção destas micotoxinas.

Por outro lado, existiram amostras que estavam contaminadas com as micotoxinas analisadas e não apresentaram os fungos produtores. Neste caso, a produção de aflatoxinas e ocratoxina A pode ter ocorrido em etapas que antecederam a comercialização e mesmo após a morte dos fungos as micotoxinas permaneceram no produto.

A adoção de boas práticas durante o plantio, colheita e secagem, e manutenção dos baixos valores de atividade de água (<0,65) durante o armazenamento, transporte e comercialização da pimenta preta, devem ser monitorados, uma vez que os fungos estão presentes na superfície dos grãos e na pimenta em pó conforme verificado neste trabalho.

5. REFERENCIAS

ABARCA, M. L.; BRAGULAT, M. R.; CASTELLÁ, G.; CABAÑES, F. J. Ochratoxin A Production by Strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.60, n. 7, p.2650-2652, jul., 1994.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. 2001.

ATEHNKENG, J.; OJIAMBO, P. S.; DONNER, M.; IKOTUN, T.; SIKORA, R. A.; COTTY, P. J; BANDYOPADHYAY, R. Distribution and toxigenicity of *Aspergillus* species isolated from maize kernels from three agro-ecological zones in Nigeria. *International Journal of Food Microbiology*, v.122, n.1-2, p.74–84, 2008.

BANERJEE, A.; MATHEWS, R. P.; PRAKASH, H. S.; SHETTY, H. S. Mycobiota and toxigenic *Aspergillus flavus* associated with developing cardamom and pepper. *Mycological Research*, v.97, n.11, p.1403-1406, 1993.

BAYMAN, P.; BAKER, J.; MAHONEY, N. *Aspergillus* on tree nuts: incidence and associations. *Mycopathologia*, v. 155, n. 03, p. 161-169, 2002b.

BAYMAN, P.; BAKER, J. L.; DOSTER, M. A.; MICHAILIDES, T. J.; MAHONEY, N. E. Ochratoxin production by the *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus*. *Applied Environmental Microbiology*, v. 68, p. 2.326-2.329, 2002a.

BENNETT, J. W. An overview of the genus Aspergillus. In: Aspergillus: Molecular Biology and Genomics. (Machida M, Gomi K, eds) Caiser Academic Press, Portland: 1–17, 2010.

BENNET, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. Clinical Microbiology Reviews, Washington, DC, v.16, n. 3, p. 497-516, 2003.

BHARDWAJ, R. K.; GLAESER, H.; BECQUEMONT, L.; KLOTZ, U.; GUPTA S. K.; FROMM, M. F. Piperine, a major constituent of black pepper, inhibits human P-glycoprotein and CYP3A4. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.302, n.2, p.645–650, 2007.

BIRCAN, C. The determination of aflatoxins in spices by immunoaffinity column extraction using HPLC. *Int. J. Food Sci. Technol.,* v.40, p.929-934, 2005.

BONTEMPO, M. Pimenta e seus benefícios à saúde. São Paulo: Alaúde Editorial, 2007, 107p.

BRAKHAGE, A. A. Systemic fungal infections caused by *Aspergillus* species: epidemiology, infection process and virulence determinants. *Current Drug Targets*: v. 6, n. 8, p. 875–886, dec., 2005.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre os limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Brasília, DF, 2011.

BREITHOLTZ-EMANUELSSON, A.; OLSEN, M.; OSKARSSON, A.; PALMINGER, I; HULT, K. Ochratoxin A in cow's milk and in human milk with corresponding human blood samples. *Journal of AOAC International*, v.76, n.4, p.842–846, 1993.

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

CNNPA. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução Nº 12, de 24 de julho de 1978. Condimentos ou temperos. *Diário Oficial da União,* 1978.

CODEX COMMITTEE ON CONTAMINANTS IN FOODS. Discussion paper on the development of maximum levels for mycotoxins in spices and possible prioritization of work. Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Agenda Item 13, 2016.

DESER. Departamento de estudos sócio-econômicos. Secretaria de Agricultura Familiar. Curitiba, nov., 2008.

DUANGJAI, A.; INGKANINAN, K.; PRAPUTBUT, S.; LIMPEANCHOB, N. 2012. Black pepper and piperine reduce cholesterol uptake and enhance translocation of cholesterol transporter proteins. *Journal of Natural Medicines*, v.67, n.2, p.303-310, 2012.

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

DUARTE, M. L. R.; POLTRONIERI, M. C.; CHU, E. Y.; OLIVEIRA, R. F.; LEMOS, O. F.; BENCHIMOL, R. L.; CONCEIÇÃO, H. E. O.; SOUZA, G. F. A cultura da-pimenta-do-reino. 2ª Ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. Coleção Plantar, 55, 73p.

EC. European Community. Commission Regulation 2015/1137of 13 July 2015.Amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards the maximum level of Ochratoxin A in *Capsicum* spp. spices.*Official Journal of the European Union*, 2015.

EC. European Commission. Commission Regulation (EU) No 165/2010 of 26 February 2010 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins, *Official Journal of the European Union*, 2010.

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

ESPÍRITO SANTO. Lei Estadual nº 10.582, de 11 de outubro de 2016. Dispõe sobre o incentivo à produção de pimenta-do-reino de qualidade. *Diário Oficial dos Poderes do Estado*, Vitória, ES, 11 out. 2016. Protocolo 269260, p. 16-17.

EZEKIEL, C. N.; FAPOHUNDA, S. O.; OLORUNFEMI, M. F.; OYEBANJI, A. O.; OBI, I. Mycobiota and aflatoxin B1 contamination of *Piper guineense* (Ashanti pepper), *P. nigrum* L. (black pepper) and *Monodora myristica* (calabash nutmeg) from Lagos, Nigeria. *International Food Research Journal*, v.20,n.1, p.111-116, 2013.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Manual de Segurança e Qualidade para a Cultura da Pimenta-do-Reino. Brasília: Série Qualidade e Segurança dos Alimentos, 65 p., 2004.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT, Crops. Pepper (*Piper* spp.). 2014. Available from: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> Cited: 13 apr. 2017.

FARIAS, A. X.; ROBBS, C. F.; BITTENCOURT, A. M.; ANDERSEN, P. M.; CORRÊA, T. B. S. Contaminação endógena por *Aspergillus* spp. em milho pós-colheita no Estado do Paraná. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 35, n. 3, p. 617- 621, 2000.

FAZEKAS, B.; TAR, A.; KOVÁCZ, M. Aflatoxin and ochratoxin A content of spices in Hungary. *Food Additives & Contaminants*, v.22, p.856-863, 2005.

FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; MENDES, E.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Qunatification of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 in pepper by HPLC/fluorescence. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies,* v.27, p.325-334, 2007.

FILGUEIRA, O. Embrapa Amazônia Oriental. Pimenta-do-reino – Pós-colheita e Armazenamento, fev., 2014.

FLANNIGAN, B.; HUI, S. C. The occurrence of aflatoxina-producing strains of *Aspergillus flavus* in the mould floras of ground spices. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 41, n. 3, p. 411 – 418, dec., 1976.

FREIRE, F. C. O.; KOZAKIEWICZ, Z.; PATERSON, R. R. M. Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. *Mycopathologia*, v.149, p.13–19, 2000.

FREIRE, F. C. O.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F.; MENDES, F. N. P. Micotoxinas: Importância na alimentação e na saúde humana e animal. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos, 110, 48 p., out., 2007.

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

GATTI, M. J.; FRAGA, M. E.; MAGNOLI, E. C.; DALCERO, A. M.; ROCHA ROSA C. A. Mycological survey for potential aflatoxin and ochratoxin producers and their toxicological properties in harvested Brazilian black pepper. *Food Additives and Contaminants*, v.20, n.12, p.1120–1126, dec., 2003.

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

HOLMBERG, T.; BREITHOLTZ-EMANUELSSON, A.; HAGGBLOM, P.; SCHWAN, O.; HULT, K. Penicillium verrucosum in feed of ochratoxin A positive swine herds. *Mycopathologia*, v.116, p.169- 176, 1991.

HOMMA, A. K. O. Extrativismo, Biodiversidade e Biopirataria na Amazônia. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2008.

IARC. International Agency for Research on Cancer. WHO IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins naphthalene and styrene. Aflatoxins. v. 82, 590p., feb., 2002.

IARC. International Agency for Research on Cancer. Ochratoxin A. Summaries & Evaluations, v. 56, CAS n. 303-47-9, p. 489. 1993.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA): pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. Rio de Janeiro: Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, v. 29, n. 10, 83 p., out., 2016.

INCAPER. Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural. Ministério divulga instruções para plantio de pimenta-do-reino em 4 estados 2014.

IPC. International Pepper Community. Brazil: export of whole pepper by region and country of destination, 2001 – 2010. Nov., 2011.

IPC. International Pepper Community. Country profile: Brazil. 2014.

IPC. International Pepper Community. Pepper (*Piper nigrum* L.) the most important spice in the world. Indonesia, 2010.

IPC. International Pepper Community. The World Pepper Industry, Indonesia, 2004.

JALILI, M.; JINAP, S.; NORANIZAN, A. Effect of gamma radiation on reduction of mycotoxins in black pepper. *Food Control*, v. 21, n. 10, p. 1388–1393, oct., 2010.

JALILI, M.; JINAP, S.; RADU, S. Natural Occurrence of Ochratoxin A Contamination in Commercial Black and White Pepper Products. *Mycopathologia*, Malaysia, v.170, p.251–258. 2010.

JALILI, M. Natural Occurrence of Ochratoxin A Contamination in Commercial Spices inTehran. *Nutrition and Food Sciences Research*, Iran, v.3, n.3, p.25-30.jul./sep. 2016.

JAYASHREE, T.; SUBRASMANYAM, C. Oxidative stress as a prerequisite for aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 29, n. 10, p. 981-985, 2000.

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

KABAK, B.; DOBSON, A. D. W Mycotoxins in Spices and Herbs: An Update. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.57, n.1, p.18-34, jan. 2017.

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

KURSUN, O.; MUTLU, A. G. Aflatoxin in spices marketed in the west Mediterranean region of Turkey. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, v.9, p.2979-2981, 2010.

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

LARSEN, T. O.; SVENDSEN, A.; SMEDSGAARD, J. Biochemical caracterization of ochratoxin A – producing strains of the genus *Penicillium*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, p. 3.630-3.635, 2001.

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

LEWIS, L.; ONSONGO, M.; NJAPAU, H.; SCHURZ-ROGERS, H.; LUBER, G.; KIESZAK, S.; NYAMONGO, J.; BACKER, L.; DAHIYE, A. M.; MISORE, A.;

DECOCT, K.; RUBIN, C. Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in Eastern and Central Kenya. *Environmental Health Perspectives*, v.113, n.12, p.1763–1767. 2005.

LIMA, J. S. S.; OLIVEIRA, R. B.; ROCHA, W.; OLIVEIRA, P. C.; QUARTEZANI, W. Z. Análise espacial de atributos químicos do solo e da produção da cultura pimenta-do-reino (*Piper nigrum,* L.). *IDESIA* (Chile), v.28, n.2, p.31-39, Mai.-Ago., 2010.

LOURINHO, M. P.; COSTA, C. A. S.; SOUZA, L. C.; SOUZA, L. C.; OLIVEIRA NETO, C. F. Conjuntura da pimenta-do-reino no mercado nacional e na região norte do Brasil. *Enciclopédia Biosfera*, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.10, n.18; p. 1016-1031, 2014.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 10, de 15 de Maio de 2006, Anexo I- Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade da Pimenta-do-reino. *Diário Oficial da União*, 2006.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Lei Nº 9.972, de 25 de Maio de 2000. Institui a classificação de produtos vegetais, subprodutos e resíduos de valor econômico, e dá outras providências. Brasília, DF, 2000.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Política Agrícola. Departamento de Gestão de Risco Rural. Portaria nº 380, de 18 de outubro de 2011. Aprovar o Zoneamento Agrícola de Risco Climático para a cultura de pimenta do reino no Estado do Espírito Santo, 2011.

OZBEY, F.; KABAK, B. Natural co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in spices. *Food Control*, v.28, p.354-361, 2012.

PATEL, S.; HAZEL, C. M.; WINTERSON, A. G. M.; MORTHY, E. Survey of ethnic foods for mycotoxins. Food Addit. Contam.: v. 13, n. 7, p. 833-841, 1996.

PAWAR, N. V.; PATIL, V. B.; KAMBLE, S. S.; DIXIT, G. B. First Report of *Aspergillus niger* as a Plant Pathogen on *Zingiber officinale* from India. *Plant Disease*, v. 92, n. 9, p. 1368– 1368, set. 2008.

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

PERAKIS, C., LOULI, V.; MAGOULAS, K. Supercritical fluid extraction of black pepper oil. *Journal of Food Engineering*, v.71, n.4, p.386-393, 2005.

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

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. Fungi and food spoilage. Springer Science Business Media: New York, 593 p., 2009.

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

PITT, J. I. The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, v. 32, n. s 1, p. 17–32, 1994.

PITT, J. I. Toxigenic fungi: which are important? *Medical Mycology*, v.38, Suplement 1, p.17–22. 2000.

POHLAND, A. E. Mycotoxins in review. *Food Additives & Contaminants*, v.10, p.17-28, 1993.

PRADO, G.; OLIVEIRA, M. S.; MOREIRA, A. P. A.; LIMA, A. S.; SOUZA, R. A.; ALVES, M. C. Determinação de aflatoxina B1 em pimenta (*Piper nigrum* L.) e

orégano (*Origanum vulgare* L.) por cromatografia em camada delgada e densitometria. *Química Nova,* São Paulo, v. 31, n. 3, p. 514-517, 2008.

QUMER, I.; MUHAMMAD, A.; RAFIQUE, A. M.; AGUSTIN, A. Mold and aflatoxin reduction by gamma radiation of packed hot peppers and their evolution during storage. *Journal of Food Protection*, v. 4, n. 8, p. 1366-1541, Aug., 2012.

RAMESH, C.; JAYAGOUDAR, S. Determination of Ochratoxin A in spices from Dharwad by High Performance Liquid Chromatography.*Asian Journal of Plant Science and Research*, India, v.4, n.1, p.42-52. 2014.

RESTAINO, L.; FRAMPTON, E. W.; HEMPHILL, J. B.; PALNIKAR, P. Efficacy of Ozonated Water against Various Food-Related Microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, n. 9, p. 3471–3475, sept., 1995.

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

SCHATZKI, T. F.; ONG, M. S. Dependence of aflatoxin in almonds on the type and amount of insect damage. *Journal of Food Chemistry*, v. 49, n. 09, p. 4513-4519, 2001.

SEENAPPA, M.; STOBBS, L. W.; KEMPTON, A. G. *Aspergillus* colonization of Indian red pepper during storage*. Phytopathology*, v. 70, p. 218-222, 1980.

SILVA, B. S. O.; NETO, A. P. D.; SILVA, M. B. Pimenta-do-reino: importância da defesa fitossanitária para a sustentabilidade da atividade na região norte do Espírito Santo. *Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)*, v.1, n.1, p.88-92, jul., 2011.

SOVOVÁ, H., JEZ, J., BÁRTLOVÁ, M.; ST'ASTOVÁ, J. Supercritical carbon dioxide extraction of black pepper. *The Journal of Supercritical Fluids*, v.8, n.4, p.295- 301, 1995.

SRINIVASAN, K. Black Pepper and its Pungent Principle-Piperine: A Review of Diverse Physiological Effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.47, p.735–748, 2007.

STEVENS, D. A.; KAN, V. L.; JUDSON, M. A.; MORRISON, V. A.; DUMMER, S.; DENNING, D. W.; BENNETT, J. E.; WALSH, T. J.;PATTERSON, T. F.; PANKEY, G. A. Practice guidelines for diseases caused by *Aspergillus*. *Clinical Infectious Diseases*, v. 30, n. 4, p. 696–709, 2000.

TEREN, J.; VARGA, J.; HAMARI, Z.; RINYU, E.; KEVEI, F. Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. *Mycopathologia*, v. 134, p. 171-186, 1996.

USDA. USDA Foreign Agricultural Service. Technical Regulations on Mycotoxin and Heavy Metals MRLs in Foods. Vietnam, Report number VM3070, 2013.

VASAVIRAMA K.; UPENDER, M. Piperine: a valuable alkaloid from piper species. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v.6, n.4, 2014.

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

YOGENDRARAJAH, P.; DESCHUYFFELEER, N.; JACXSENS, L.; SNEYERS, P.; MAENE, P.; SAEGER, S.; DEVLIEGHERE, F., MEULENAER, B. Mycological quality and mycotoxin contamination of Sri Lankan peppers (*Piper nigrum* L.) and subsequent exposure assessment. *Food Control*, v.41, p.219-230, 2014.

ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, v.15, p.129–144, 2011.

ZHAO, J.; CRANSTON. P. M. Microbial decontamination of black pepper by ozone and the effect of the treatment on volatile oil constituents of the spice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.68, p. 11-18, 1995.

ZINEDINE, A.; BRERA, C.; ELAKHDARI, S.; CATANO, C.; DEBEGNACH, F., ANGELINI, S.; DE SANTIS, B.; FAID, M.; BENLEMLIH, M.; MINARDI, V.; MIRAGLIA, M. Natural occurrence of mycotoxins in cereals and spices commercialized in Morocco*. Food Control*, v.17, p.868–874, 2006.