

PIMENTA PRETA (*Piper nigrum* L.) – OCORRÊNCIA DE *Aspergillus* SECTION *FLAVI* E AFLATOXINAS

Adriana Raquel Persson da Silva¹; Ligia Manoel Martins¹; Marta Hiromi Taniwaki¹; Beatriz Thie Iamanaka¹

¹ Laboratório de Microbiologia, Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos (CCQA), Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Campinas, São Paulo, Brazil. E-mail: adrianapersson@yahoo.com.br.

Resumo

Os objetivos deste estudo foram isolar, quantificar e identificar espécies de *Aspergillus* section *Flavi* potencialmente produtoras de aflatoxinas de amostras de pimenta preta consumidas no país. O potencial toxigênico das cepas isoladas e a presença de aflatoxinas nas amostras também foram estudadas. Foram analisadas 60 amostras no total, 31 em grãos e 29 em pó. A contaminação fúngica dos grãos foi realizada com e sem desinfecção externa. Várias espécies da seção *Flavi* foram isoladas, dentre elas, *Aspergillus flavus*, *A. tamarii*, *A. pseudotamarii* e *A. parasiticus*, totalizando 989 isolados. 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 373 cepas de *Aspergillus flavus* foram isoladas e 38,3% foram produtoras. As aflatoxinas foram encontradas em 51,6% das amostras com níveis variando de 0,09 a 11 µg/kg. Os níveis de aflatoxinas estavam dentro dos limites estabelecidos pela regulamentação brasileira.

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

Introdução

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

Algumas espécies fúngicas são capazes de produzir metabólitos secundários que podem ser altamente tóxicos e prejudiciais à saúde do homem e outros animais, como as aflatoxinas. Elas são produzidas principalmente por *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*; além das espécies *A. nomius*, *A. bombycis*, *A. pseudotamarii* e *A. ochraceoroseus*. As aflatoxinas são consideradas carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas e podem ser encontradas naturalmente em alimentos e rações e também sua presença tem sido relacionada em pimenta preta (KURTZMAN, HORN; HESSELTINE, 1987; PETERSON *et al.*, 2001; IARC, 2002; ZINEDINE *et al.*, 2006; SAMSON *et al.*, 2010; JESWAL; KUMAR, 2015).

A ANVISA estabeleceu o limite de 20,0 µg/kg em especiarias, incluindo a pimenta preta (BRASIL, 2011). 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).

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.

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.

Material e Métodos

Um total de 60 amostras de pimentas pretas foi adquirido: 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).

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. O método de diluição e o plaqueamento em superfície foram realizados para amostras em pó, de acordo com Pitt e Hocking (2009). Os resultados foram expressos em porcentagem de infecção ou contaminação calculando-se a média (soma dos valores médios de contaminação ou infecção das amostras totais/número de amostras totais).

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

As espécies de *Aspergillus* section *Flavi* foram testadas quanto à produção de aflatoxinas segundo Filtenborg, Frisvad e Svendsen (1983) e para a detecção e quantificação de aflatoxinas nas amostras por Copetti *et al.* (2011).

A porcentagem de recuperação foi calculada após a fortificação da amostra de pimenta com o padrão de aflatoxinas utilizando nível de 0,7 µg/kg em triplicata. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) do método foram calculados (Eurachem Guides, 2014).

Resultados e Discussão

Das 60 amostras analisadas, um total de 989 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 (*Aspergillus* section *Flavi* não identificados) 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.

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 (%)
<i>A. tamarii</i>	45,2	4,2	0-62	83,9	16,2	0-76
<i>A. flavus</i>	42,0	3,1	0-48	64,5	13,0	0-78
<i>A. section Flavi</i>	38,7	2,0	0-14	67,7	8,7	0-32
<i>A. pseudotamarii</i>	3,2	0,3	0-8	3,2	1,0	0-32
<i>A. parasiticus</i>	0	0	0	12,9	0,3	0-2

FO = Frequência de ocorrência (n° amostras contaminadas ou infectadas/n° amostras totais)

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

As espécies/grupo de maior ocorrência, tanto nos grãos quanto nas pimentas em pó, foram *A. tamarii*, *A. flavus* e *Aspergillus* section *Flavi*. Estas espécies e grupos foram encontrados em 45%, 42% e 39% das amostras com desinfecção e em 41,4%, 55%, 51,7% das amostras em pó,

respectivamente. A frequência de ocorrência nas amostras sem desinfecção foi de 84% para *A. tamarii*, 64,5% para *A. flavus* e 67,7% para *Aspergillus* section *Flavi* como mostram as tabelas 1 e 2.

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)	Varição (UFC/g)
<i>A. flavus</i>	55,2	1,1 x 10 ³	<100-1,3 x 10 ⁴
<i>A. section Flavi</i>	51,7	4,8 x 10 ²	<100-4,0 x 10 ³
<i>A. tamarii</i>	41,4	4,4 x 10 ²	<100-3,0 x 10 ³
<i>A. pseudotamarii</i>	3,4	3,4	<100-1,0 x 10 ²
<i>A. parasiticus</i>	3,4	3,4	<100-1,0 x 10 ²

FO = Frequência de ocorrência (n° amostras contaminadas/n° amostras totais)

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; KOZAKIEWICZ; PATERSON, 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.

Todas as cepas de *A. section Flavi* (989) foram testadas quanto à produção de aflatoxinas e 18,7% (*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=5) foram produtores de aflatoxinas dos grupos B e G e 100% das cepas de *A. pseudotamarii* (n=21) foram produtores de aflatoxinas do grupo B. Dentre os isolados de *A. flavus* (n=373) 38,3% foram produtores de aflatoxina B1.

Tabela 3. Número de amostras contaminadas com aflatoxinas totais.

Aflatoxinas Totais (µg/kg)	N° de amostras	
	Grão (n=31)	Pó (n=29)
< 0,08	20	10
≥0,08- <1	10	13
≥1 - <5	1	4
≥5- <10	0	1
≥10- <15	0	1
≥15	0	0

LOD = Limite de Detecção (0,08 µg/kg para aflatoxinas totais).

LOQ = Limite de Quantificação (0,27 µg/kg para aflatoxinas totais).

A média de recuperação para aflatoxinas totais foi de 103% para o nível de 0,7 µg/kg. O limite de detecção (LOD) para aflatoxinas totais foi de 0,08 µg/kg e o limite de quantificação (LOQ) foi de 0,27 µg/kg.

Das 60 amostras analisadas, 30 (50%) apresentaram contaminação com aflatoxinas dos grupos B e G com níveis variando de 0,09 a 11 µg/kg conforme mostra a tabela 3. 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, apresentando a maior contaminação por aflatoxina B1, de 10,64 µg/kg.

Todas as amostras estiveram de acordo com os limites estabelecidos pela RDC N° 7/2011 para aflatoxinas, de 20 µg/kg.

Das 60 amostras, 15 (25%) 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.

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.

Sendo assim, a produção de aflatoxinas na pimenta preta pode ser minimizada adotando as boas práticas agrícolas durante todas as etapas da cadeia produtiva, além da manutenção da umidade segura dos grãos ($\leq 12\%$) (ESA, 2015).

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 regulamentação brasileira.

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.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada n° 7, de 18 de fevereiro de 2011. **Dispõe sobre os limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos**. Brasília, DF. 2011.

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.

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.

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

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

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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

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.

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. Jundiaí: Paco Editorial, 2014. 396p.

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

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

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.