



INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CENTRO DE CIÊNCIA E QUALIDADE DE ALIMENTOS

GABRIELA CACHONI BRITO

Avaliação da contaminação de pimenta vermelha (*Capsicum frutescens* e *Capsicum baccatum*) e pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius*) por fungos toxigênicos, aflatoxinas e ocratoxina A.

CAMPINAS

2018

GABRIELA CACHONI BRITO

Avaliação da contaminação de pimenta vermelha (*Capsicum frutescens* e *Capsicum baccatum*) e pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius*) por fungos toxigênicos, aflatoxinas e ocratoxina A.

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

Aluno: Gabriela Cachoni Brito

Orientador: Dra. Beatriz Thie Iamanaka

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação defendida pela aluna Gabriela Cachoni Brito e orientada pelo Prof(a). Dr(a). Beatriz Thie Iamanaka.

CAMPINAS

2018

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Bibliotecária Lucilene Paulina da Silva CRB/8 - 8507
Biblioteca Central do ITAL- Instituto de Tecnologia de Alimentos.

B862a Brito, Gabriela Cachoni.

Avaliação da contaminação de pimenta vermelha (*Capsicum frutescens* e *Capsicum baccatum*) e pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius*) por fungos toxigênicos, aflatoxinas e ocratoxina A. Gabriela Cachoni Brito / Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas, SP: ITAL - Instituto de Tecnologia de Alimentos, 2018.

80 f.

Profa. Dra. Beatriz Thie Iamanaka.

1. Pimenta vermelha. 2. *Aspergillus* section *Flavi*. 3. *Aspergillus* section *Nigri*. 4. Ocratoxina A. 5. Aflatoxinas. I. ITAL / CCQA - Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos. II. Brito, Gabriela Cachoni. III. Título.

Título em inglês: The evaluation of contamination in red pepper (*Capsicum frutescens* and *Capsicum baccatum*) and pink pepper (*Schinus terebinthifolius*) by toxigenic fungi, aflatoxins and ochratoxin A.

Key-words: red pepper, *Aspergillus* section *Flavi*, *Aspergillus* section *Nigri*, ochratoxin A, aflatoxins

Titulação: Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Banca Examinadora: Dra. Beatriz Thie Iamanaka (orientador), Dra. Liliana de Oliveira Rocha (Titular), Dra. Marta Hiromi Taniwaki (Titular), Dra. Maria Antonia Calori Domingues (suplente).

Data da Defesa: 12/03/18

Programa de Pós-Graduação: Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida por Gabriela Cachoni Brito, aprovada pela Comissão Julgadora em 12/03/18

Prof. Dra. Beatriz Thie Iamanaka
Instituto de Tecnologia de Alimentos (Presidente)

Dra. Liliana de Oliveira Rocha
Faculdade de Engenharia de Alimentos – Unicamp (titular)

Dra. Marta Hiromi Taniwaki
Instituto de Tecnologia de Alimentos (titular)

Dra. Maria Antonia Calori Domingues
Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição- Esalq –
Universidade de São Paulo (suplente)

A ata de defesa de dissertação de mestrado com as respectivas assinaturas dos membros da banca encontra-se arquivada junto à documentação do aluno.

DEDICATÓRIA

Não poderia ser diferente.

Dedico este trabalho aos meus pais, por se doarem tanto por mim neste período. Por me proporcionarem as condições para a obtenção deste título, e me ensinarem a lutar pelos meus ideais, através do exemplo de vida, dedicação e trabalho árduo a vida toda.

AGRADECIMENTOS

Não foi uma tarefa nada fácil chegar até aqui. Não poderia deixar de agradecer quem me ajudou durante esses dois longos anos. Cada um contribuiu um pouquinho para que, apesar dos percalços eu me mantivesse forte. Uso as próximas linhas para demonstrar toda a minha gratidão e reconhecimento a estas pessoas.

Primeiramente agradeço ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização deste mestrado e a todos os professores que passaram por mim durante esta jornada. Cada ensinamento foi muito valioso e me sinto orgulhosa por ter feito parte desta instituição!

A minha orientadora Dra Beatriz Thie Iamanaka, a Bia, que mesmo na correria de suas funções disponibilizou um tempo para me orientar e auxiliar quando necessário.

Agradeço a todos os funcionários e estagiários do CCQA – Micro, que nas pequenas ações do dia-a-dia contribuíram para o andamento da minha pesquisa.

A secretária da pós-graduação, Maria Elenice Ferreira. Por me receber sempre com um sorriso no rosto na secretária da pós e ser sempre tão solícita!

A bibliotecária Adriana Gomes do Nascimento, muito obrigada! Obrigada por ser sempre tão atenciosa comigo, separando materiais que poderiam ser do meu interesse.

A técnica Larissa Ferranti e as minhas colegas de laboratório, de maneira muito especial a Aline Machado Katsurayama, por ser minha guia nos primeiros passos da pesquisa e pelo companheirismo dentro e fora do laboratório. E também a Cristina Akemi Yassumura. Torço muito por você Cris! Que seus passos no mestrado sejam bem mais leves que os meus. Muito obrigada por todo apoio, todo empréstimo de material e por todo auxílio quando precisei.

Aos meus amigos de longa data por serem minha calma nas horas de turbulência. Por todo o suporte e por não me deixarem desanimar perante todas as provações! Obrigada por ouvirem atentamente cada reclamação, cada dúvida, sempre

oferecendo um ombro amigo e por acreditarem tanto em mim. A amizade de vocês contribuiu (e muito!) para o desenrolar deste trabalho.

Agradeço imensamente meus pais, Maria e Gabriel. Por não terem tido a oportunidade de estudar e darem tanto valor aos meus estudos e a minha formação. Se consegui chegar até aqui é para eles e por eles!

Um sincero obrigada a todos!

RESUMO

O estudo teve por objetivo avaliar a microbiota de condimentos, com ênfase nas espécies toxigênicas de *Aspergillus*, e a contaminação por aflatoxinas e ocratoxina A. Foram estudadas a pimenta calabresa (*Capsicum frutescens*), a pimenta malagueta (*Capsicum baccatum*), na forma seca e fresca, e a pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius*), adquiridas em estabelecimentos comerciais do Estado de São Paulo. As amostras (n=71) foram avaliadas quanto à atividade de água, presença de fungos, potencial toxigênico das cepas de *Aspergillus* e presença de aflatoxinas (AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂) e ocratoxina A. As principais espécies isoladas de pimenta calabresa, rosa e malagueta fresca foram *Aspergillus* section *Nigri*, com média de contaminação de 42UFC/g, 5,3% e 15% respectivamente. Estes estiveram frequentes em 50% das amostras analisadas. *Aspergillus* section *Flavi* foram isolados principalmente de pimenta calabresa e malagueta fresca, contudo a média de contaminação foi baixa, 20UFC/g e 16% respectivamente. Outras espécies como *Eurotium chevalieri*, *Eurotium rubrum* e fungos dematiáceos foram também isolados das amostras. Do total das amostras analisadas, foram isoladas 503 cepas de *Aspergillus*, sendo *Aspergillus* section *Flavi* (n=204), *Aspergillus* da section *Nigri* (n=279) e *Aspergillus* section *Circumdati* (n=20). Dezessete por cento dos isolados de *Aspergillus* section *Nigri* e 75% dos isolados de *Aspergillus* section *Circumdati* foram produtores de ocratoxina A e 17% dos isolados de *Aspergillus* section *Flavi* foram produtores de aflatoxinas. A maior porcentagem de cepas produtoras de aflatoxinas e ocratoxina A foram isoladas da pimenta malagueta fresca (31,3% e 21,1%, respectivamente). Ocratoxina A foi encontrada em alta frequência nas amostras de pimenta malagueta em pó e calabresa (>70%), porém os níveis de contaminação foram baixos (média de 3,42 e 2,25µg/Kg respectivamente). Aflatoxinas foram mais frequentes nas amostras de pimenta malagueta em pó e calabresa (>63%), porém, assim como a ocratoxina A, as médias foram baixas, de 0,54 e 1,81ug/Kg respectivamente.

Palavras-chave: pimenta vermelha, *Aspergillus* section *Flavi*, *Aspergillus* section *Nigri*, ocratoxina A, aflatoxinas

ABSTRACT

The objectives of the study were to evaluate the mycobiota of spices, with emphasis on the toxigenic species of *Aspergillus*, and the contamination by aflatoxins and ochratoxin A. “Calabresa” (*Capsicum frutescens*), “malagueta” (*Capsicum baccatum*), the latter in a dried and fresh state, and pink pepper (*Schinus terebinthifolius*) were studied and purchased in commercial establishments in the State of São Paulo. Water activity, fungal contamination, the toxigenic potential of *Aspergillus* strains and the presence of aflatoxins (AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂) and ochratoxin A were evaluated (n=71). The main species isolated from calabresa, pink and fresh malagueta pepper were *Aspergillus* section *Nigri*, with an average contamination of 42 UFC/g, 5.3% and 15%, respectively. These were present in 50% of the samples analyzed. *Aspergillus* section *Flavi* were mainly isolated from calabresa and fresh malagueta pepper, although average contamination was low, 20 UFC/g and 16% respectively. Other species such as *Eurotium chevalieri*, *Eurotium rubrum* and dematiaceous fungi were also presented in the samples. A total of 503 strains of *Aspergillus* were isolated from all the samples, with *Aspergillus* section *Flavi* (n = 204), *Aspergillus* section *Nigri* (n = 279) and *Aspergillus* section *Circumdati* (n = 20). Seventeen percent of the *Aspergillus* isolates from the *Nigri* section and 75% of the *Aspergillus* section *Circumdati* isolates were ochratoxin A producers, and 17% of the *Aspergillus* section *Flavi* were aflatoxin producers. The highest percentage of aflatoxin and ochratoxin A producing strains were isolated from fresh malagueta pepper (31.3 and 21.1% respectively). Ochratoxin A was found at high frequency in the samples of malagueta powder and calabresa pepper (> 70%), but the contamination levels were low (average of 3.42 and 2.25µg/kg, respectively). Aflatoxins were more frequent in malagueta powder and calabresa pepper (> 63%), but as with ochratoxin A, the averages were low, of 0.54 and 1.81 µg/kg, respectively.

Key words: red pepper, *Aspergillus* section *Flavi*, *Aspergillus* section *Nigri*, Ochratoxin A, aflatoxins

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	01
2. OBJETIVOS	04
2.1 Objetivos específicos	04
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	05
3.1 Pimentas (<i>Capsicum</i> spp.) - características gerais	05
3.1.1 Pimenta Calabresa - <i>Capsicum baccatum</i>	06
3.1.2 Pimenta Malagueta - <i>Capsicum frutescens</i>	07
3.1.3 Pimenta Rosa - <i>Schinus terebinthifolius</i>	08
3.2 Fungos	09
3.2.1 Gênero <i>Aspergillus</i>	09
3.2.2 Micotoxinas	10
3.2.3 Aflatoxinas	11
3.2.4 Ocratoxina A	12
3.3 Legislação Brasileira e Internacional sobre micotoxinas em alimentos	13
3.4 Ocorrência de fungos e micotoxinas em pimentas do gênero <i>Capsicum</i> e pimenta rosa	14
4. REFERÊNCIAS	19
Capítulo 1: Micobiota de pimenta vermelha (<i>Capsicum frutescens</i> e <i>Capsicum baccatum</i>) e pimenta rosa (<i>Schinus terebinthifolius</i>)	28
RESUMO	29
ABSTRACT	30
1. INTRODUÇÃO	31
2. OBJETIVOS	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 Amostras	33
3.2 Plaqueamento direto (pimenta rosa e malagueta fresca)	34
3.3 Diluição decimal seriada (pimenta calabresa, pimenta malagueta em pó)	34
3.4 Isolamento e identificação dos grupos de fungos	34
4. RESULTADOS	35
5. DISCUSSÃO	39

6. CONCLUSÕES	40
7. REFERÊNCIAS	41
Capítulo 2: Ocorrência de fungos toxigênicos e ocratoxina A e aflatoxinas em pimenta calabresa (<i>Capsicum baccatum</i>), pimenta malagueta (<i>Capsicum frutescens</i>) e pimenta rosa (<i>Schinus terebinthifolius</i>)	44
RESUMO	46
1. INTRODUÇÃO	47
2. OBJETIVOS	49
3. MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1 Amostras	49
3.2 Atividade de água das amostras	49
3.3 Amostras em grãos (pimenta rosa e pimenta malagueta fresca) - plaqueamento direto	50
3.4 Amostras em pó –diluição	50
3.5 Isolamento e identificação da microbiota fúngica	50
3.6 Potencial toxigênico das cepas – Aflatoxinas e ocratoxina A	51
3.7 Preparo das amostras – determinação de AFLA e OTA por CLAE	52
3.7.1 Aflatoxinas	52
3.7.2 Ocratoxina A	52
3.7.3 Determinação de Micotoxinas – parâmetros CLAE	53
3.7.4 Otimização da metodologia de aflatoxinas e ocratoxina A nas pimentas	53
4. RESULTADOS	54
5. DISCUSSÃO	58
6. CONCLUSÃO	61
7. REFERÊNCIAS	62
CONCLUSÃO GERAL	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aa – Atividade de água

AFLA - Aflatoxinas

AFB₁ – Aflatoxina B₁

AFB₂ – Aflatoxina B₂

AFG₁ – Aflatoxina G₁

AFG₂ – Aflatoxina G₂

AFTOTAL – Aflatoxinas Totais

AFPA – Aspergillus Flavus and Parasiticus Agar

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CCCF - Committee on Contaminants in Foods

CCD – Cromatografia de Camada Delgada

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CODEX –Codex Alimentarius

CREA - Creatine Sucrose Agar

CYA - Czapek Yeast Extract Agar

CY20S - Czapek Yeast Agar 20% Sucrose

DG18 –Dichloran 18% Glycerol Agar

EC – European Commission

EFSA - European Food Safety Authority

FAO – Food and Agriculture Organization

FO – Frequência de Ocorrência

HACCP –Hazard Analysis and Critical Control Points

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

IAC – Colunas de imunoafinidade

IARC – International Agency for Research on Cancer

JECFA - Joint Expert Committee Additives

LOD – Limite de detecção

LOQ – Limite de Quantificação

MAPA – Ministério da Agricultura e Abastecimento

MEA - Malt Extract Agar

ND – Não Detectado

OTA – Ocratoxina A

PBS – Phosphate Buffered Solution

RASFF - Rapid System for Food and Feed

SHU - Scoville Heat Units

TLC - Thin Layer Chromatography

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

UV – Ultravioleta

ZEA - Zearalenona

WHO - World Health Organization

YESA – Agar Yeast Extract Sucralose

1. INTRODUÇÃO GERAL

As pimentas do gênero *Capsicum spp.* são produzidas no mundo todo, sendo os maiores produtores a Índia, China, México, Estados Unidos, Tailândia, Coréia do Sul (CARVALHO et al., 2006). A Índia e China são os maiores produtores mundiais com uma área de produção equivalente a 1.000.000 hectares, e os maiores consumidores os sul coreanos e tailandeses, com um consumo diário de 5 a 8 g/dia (PINTO et al., 2007). O Brasil apresenta anualmente uma produção de 280 toneladas de pimenta *Capsicum* em uma área equivalente a 13 mil hectares e está entre as dez hortaliças mais cultivadas no país (A LAVOURA, 2016). Estima-se que o consumo diário por pessoa seja de 0,5 gramas (CARVALHO et al., 2006).

No Brasil, a produção deste tipo de pimenta está concentrada nas regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste, estreitando os laços entre a agricultura familiar e agroindústria sendo, portanto, uma atividade econômica de grande importância social (CARVALHO et al., 2006). Das espécies domesticadas, quatro são cultivadas em diferentes regiões do país: *Capsicum annuum* (pimentões e páprica) no Centro-Oeste, Nordeste e Sudeste; *Capsicum chinense* (pimenta bode, biquinho, cumari-do-pará, habanero e murupi) no Centro-Oeste, Nordeste e Norte; *Capsicum baccatum* (pimenta dedo-de-moça, pimenta calabresa, cambuci e cumari verdadeira) nas regiões Sudeste e Sul e *Capsicum frutescens* (pimenta malagueta e tabasco) nas regiões Centro-Oeste, Nordeste e Norte. Além de apresentar grande diversidade de produção do gênero *Capsicum spp.*, seu consumo está relacionado há tempos remotos, desde os indígenas que empregavam as pimentas na sua alimentação, e também como remédio. Hoje elas continuam fazendo parte da alimentação do brasileiro, sendo consumidas frescas, na forma de aperitivos, ou processadas conferindo cor, aroma e sabor aos alimentos (REIFSCHNEIDER,2000; KARAASLAN; ARSLANĞRAY, 2015).

Outro grupo de condimento que vem conquistando mercado, tanto interno quanto externo é o fruto da aroeira vermelha (*Schinus terebinthifolius*), a pimenta rosa, produzida principalmente na costa Brasileira, nos Estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo e na divisa entre os Estados de Alagoas e Sergipe (BARBOSA et al., 2007; EMBRAPA, 2010). A pimenta rosa tem sido empregada na indústria farmacêutica e cosmética, pelas propriedades antioxidantes e antimicrobianas associadas com a

presença de polifenóis presentes no óleo extraído dos frutos (BENDAOU et al., 2010; ULIANA et al., 2016). Hoje já ganha espaço na culinária, como condimento *gourmet*, principalmente em pratos mais elaborados, como carnes brancas, embutidos e massas e na gastronomia exótica, conferindo sabor diferenciado a sobremesas e bebidas (CARVALHO et al., 2006).

Condimentos, assim como são as pimentas vermelhas são cultivadas em sua maioria em países que apresentam clima tropical e subtropical. Países com esses tipos de climas apresentam altas temperaturas, altas concentrações de chuva e umidade relativa, que são condições favoráveis à proliferação de fungos e conseqüentemente para a produção de micotoxinas, aumentando o risco destes condimentos apresentarem contaminação por estes compostos tóxicos (KABAK; DOBSON, 2017, YOGENDRARAJAH et al., 2014). Muitos frutos, após a colheita não são higienizados, tão pouco armazenados de forma ideal, em condições de baixas temperaturas com monitoramento de umidade, aumentando o risco de contaminação por fungos e toxinas (OZTURKOGU-BUDAK, 2017).

As micotoxinas são substâncias derivadas do metabolismo secundário de determinados grupos de fungos filamentosos, tais como: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, podendo contaminar os alimentos em diferentes etapas, do campo, onde são produzidas ao armazenamento. Falhas no processo de secagem e a alta temperatura e umidade durante o armazenamento podem favorecer o crescimento destas espécies toxigênicas e a produção de toxinas, causando diferentes efeitos danosos na saúde de animais e humanos (KARAASLAN; ARSLANĖRAY, 2015).

Vários países têm estabelecido níveis de micotoxinas presentes em alimentos, destinadas ao consumo humano e animal, incluindo as especiarias (COMMISSION REGULATION, 2006; FREIRE et al., 2007). Pimentas contaminadas com AFLA e OTA podem significar um risco a saúde da população, se estas fizerem parte da sua dieta, ou consumidas com alta frequência. Elas apresentam alto grau de toxicidade, com potencial carcinogênicos, hepatocarcinogênicos, teratogênicos e imunossupressores (IARC, 1993; IARC, 2002).

De acordo com a regulamentação europeia (2006), os limites máximos aceitáveis são de 5 µg/kg para AFB₁, 10 µg/kg para AFLA total e 15 µg/kg para OTA.

Já pelo órgão regulamentador brasileiro, a ANVISA (BRASIL, 2011) estabelece limites de AFLA total e OTA em pimentas de 20 µg/kg e 30 µg/kg respectivamente.

Dentre os estudos relacionados sobre o tema, grande parte das pesquisas relacionadas com a presença de toxinas em pimentas, concentram-se nas regiões da Índia, Sri Lanka, Turquia e Indonésia (SALARI et al., 2012; JESWAL; KUMAR, 2014; YOGENDRARAJAH, 2014; KARAASLAN; ARSLANĀRAY, 2015). Nestes estudos foi relatada a contaminação por ambas as toxinas, variando de ND a 1059,2 µg/kg, para OTA e ND a 219,6 µg/kg para AFLA.

Devido às pesquisas recentemente publicadas sobre a elevada contaminação de especiarias por micotoxinas e com o objetivo de minimizar as perdas econômicas e os problemas de saúde causados após a ingestão destes contaminantes, em 2015, o Codex estabeleceu como prioritária a avaliação de OTA e AFLA em especiarias e condimentos, criando um grupo de trabalho para discussão sobre assunto. O documento estabelece como prioritária a avaliação de OTA e AFLA em especiarias como chilli (pimenta malagueta em pó), páprica, noz-moscada, açafrão, gengibre e as pimentas. Além do Codex, órgãos como a FAO (Food and Agriculture Organization) e o WHO (World Health Organization) criaram bancos de dados que identificam potenciais riscos à saúde da população, associados aos condimentos e ervas secas (FAO, 2013).

Considerando que não há estudos sobre a qualidade das pimentas vermelhas consumidas no Brasil e que pesquisas mostram a contaminação destes produtos por fungos e micotoxinas, faz-se necessário avaliar a contaminação destes produtos em nosso país. Neste presente trabalho, foram avaliados dois gêneros de pimenta *Capsicum*, a pimenta calabresa (*Capsicum baccatum*), a pimenta malagueta fresca e em pó (*Capsicum frutescens*), além da pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius*) quanto à contaminação fúngica e presença de ocratoxina A e aflatoxinas.

2. OBJETIVOS

Investigar a microbiota de pimentas do gênero *Capsicum*, incluindo a pimenta calabresa (*Capsicum baccatum*), pimenta malagueta em pó e fresca (*Capsicum frutescens*) e a pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius*), bem como avaliar a presença de ocratoxina A e aflatoxinas nestas amostras.

2.1 Objetivos específicos

1. Determinar os grupos de fungos presentes nas amostras de pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*), pimenta calabresa (produzida a partir de pimentas da espécie *Capsicum baccatum*) e pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius*) e as espécies de fungos toxigênicos presentes;
2. Otimizar metodologia de análise de aflatoxinas e ocratoxina A nos tipos de pimentas vermelhas citados, utilizando coluna de imunoafinidade e cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência e;
3. Quantificar estes contaminantes nas amostras, avaliando se os níveis de ocratoxina A e aflatoxinas presentes nas pimentas estão de acordo com os estabelecidos pela RDC nº 7/2011 e realizar um levantamento sobre a ocorrência destes contaminantes nestes produtos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Pimentas (*Capsicum* spp.) - características gerais

Pimenta é o nome comum dado a diferentes tipos de plantas, incluindo as piperáceas, as solanáceas e as falsas pimentas que incluem a pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius*) e a pimenta jamaica (*Pimenta officinalis* Lindl.), aos seus frutos e condimentos que apresentam um sabor pungente. São utilizadas para dar sabor, aroma e na conservação de alimentos, pelas suas propriedades bactericidas e fungicidas. As pimentas estão entre as especiarias mais consumidas no mundo todo, pelo sabor característico que é devido à presença de alcalóides que são responsáveis pela picância (CARVALHO et al., 2006).

Nas pimentas *Capsicum* os alcalóides responsáveis pela pungência são a capsaicina e a dihidrocapsaicina (COLLINS; BOSLAND, 1994), presentes na placenta, sementes e pericarpo do fruto (REIFSCHNEIDER, 2000). A Escala Scoville (*ScovilleHeat Units* - SHU) é a responsável pela avaliação do teor de capsaicinóides nas pimentas, podendo variar de zero, para pimentas sem picância, até trezentos mil, para pimentas extremamente picantes. Também apresentam propriedades benéficas à saúde, tais como substâncias vasodilatadoras, analgésicas e energéticas e também vitaminas A, B1, B2, C, E e Niacina e pigmentos vegetais que podem prevenir o câncer (SUN et al., 2007; A LAVOURA, 2016).

A picância está relacionada tanto a sensibilidade do indivíduo quanto ao tipo de pimenta e a forma de consumo, se fresca, seca ou processada (PAULUS et al., 2015). Essa sensação de ardor, que ativa os mesmos receptores da dor, tem como princípio ativo a capsaicina. A capsaicina e os capsaicinóides são produzidos pelo metabolismo secundário, servindo para a planta como barreira contra herbívoros (TAKIKAWA et al., 2002, CARVALHO et al., 2006).

Quanto à botânica, as pimentas do gênero *Capsicum* são hortícolas, pertencem à família botânica Solanaceae e são oriundas das Américas, mais especificamente da região tropical. Geralmente são plantas perenes, autógamas, com autopolinização e, portanto, sem modificação genética. Suas flores são hermafroditas

e são utilizadas em chaves de identificação para a diferenciação das espécies. Os frutos podem se apresentar na forma de bagas com estruturas ocas, e a placenta, que é o tecido interno do fruto, é onde se acumulam os capsainóides (CARVALHO et al., 2006; MADHUMATHY et al., 2007).

Dentro do gênero *Capsicum*, estão presentes cerca de vinte espécies divididas em: domesticadas, semi-domesticadas e selvagens. A partir de espécies selvagens foram domesticadas cinco espécies de *Capsicum*: *C. pubescens*, com a pimenta rocotó, a *C. baccatum*, que tem como um dos representantes mais conhecidos a dedo-de-moça, a *C. annuum*, que inclui os pimentões, as caienas e a jalapeno, *C. chinense*, com a pimenta-de-biquinho e a pimenta-de-cheiro e *C. frutescens* (CARVALHO et al., 2006; PERRY et al., 2007).

Das cinco espécies de *Capsicum* consideradas domesticadas (*C. annum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* e *C. pubescens*) cada uma apresenta características inerentes que as diferenciam das demais. A variedade pode ser vista em relação aos diferentes aspectos apresentados pelos frutos, em sua variedade de cores (vermelhos, verdes, amarelos, alaranjados, arroxeados), formatos (arredondados, alongados, forma piramidal), tamanhos (pequenos, médios e grandes) e os teores de pungência (CARVALHO et al., 2006).

Os principais estados produtores de pimenta no país são: Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Ceará e Rio Grande do Sul, com uma área anual de plantio estimada em dois mil hectares. A produtividade está diretamente relacionada ao tipo de pimenta, podendo variar de 10 a 30 toneladas por hectare (EMBRAPA, 2007).

3.1.1. Pimenta Calabresa - *Capsicum baccatum*

As plantas da espécie *C. baccatum* são arbustos com cerca de um metro de altura. No Brasil, as plantações se concentram na região Sul do país. A pimenta calabresa (Figura 1) é produzida a partir de pimentas da espécie *C. baccatum*, principalmente a pimenta dedo-de-moça (Figura 1), também conhecida como chifre-de-veado ou pimenta vermelha na sua versão seca e moída, sendo uma das pimentas mais consumidas no Brasil, principalmente nas regiões Sul e Sudeste. Os frutos são

longos, com cerca de 7,5 cm de comprimento e apresentam coloração avermelhada quando maduros a sua pungência é considerada mediana, com teor de capsaicina de 0,48% (TAKIKAWA et al., 2002, CARVALHO et al., 2006).



Figura 1: *C. baccatum* em suas duas versões: desidratada (Calabresa) e fresca (dedo-de-moça) (imagem: Google).

Um dos maiores produtores da versão flocada de dedo-de-moça é o município de Turuçu (RS), responsável pela produção e distribuição de 500 toneladas no mercado interno. A produção da pimenta dedo-de-moça em forma desidratada é feita de forma bastante artesanal. As pimentas que vão passar pelo processo de desidratação são trituradas e são secas ao ar livre, em lajes de cimento por cerca de uma semana. Estão sujeitas a intempéries e muitas durante este processo sofrem alteração de cor, aroma ou apodrecimento (CORNEJO et al., 2005; CARVALHO et al., 2006).

3.1.2 Pimenta Malagueta - *Capsicum frutescens*

A pimenta malagueta (Figura 2) é o tipo mais comum da espécie *Capsicum frutescens* com as plantações concentradas nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste, principalmente na Zona da Mata de Minas Gerais. São plantas hortícolas, de porte pequeno, com frutos eretos, alongados e vermelhos e teor de

capsaicina de 0,89%, sendo, portanto, muito picantes (TAKIKAWA et al., 2002; CARVALHO et al., 2006).



Figura 2: *C. frutescens* em suas versões em pó e fresca (imagem: Google).

3.1.3 Pimenta Rosa - *Schinus terebinthifolius*

A pimenta rosa (Figura 3) é pertencente à família Anarcadiaceae de nome científico *Schinus terebinthifolius* é nativa do Brasil, ocorrendo principalmente nas regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul, e também na Argentina, Paraguai e Uruguai. Popularmente é conhecida como aroeira-vermelha, aroeira-pimenteira e pimenta brasileira. Uma das principais características deste condimento é o aroma pungente, caracterizado pela presença dos óleos essenciais presentes nos frutos (BENDAOU et al., 2010, NEVES et al., 2016).



Figura 4: Ramo de aroeira com frutos maduros de pimenta rosa (imagem: Google).

Os frutos dessa árvore se assemelham aos das piperáceas, são globosos e pequenos (4 mm a 5,5 mm) e apresentam coloração avermelhada quando maduros. A aroeira é uma planta perene, com altura entre 5 e 10 metros. É uma planta dióica, com polinização cruzada, onde moscas, abelhas e vespas são responsáveis pela polinização. A frutificação da aroeira está relacionada com a disponibilidade de água, temperaturas mais elevadas e dias mais longos (NEVES et al., 2016).

O óleo obtido da polpa do fruto apresenta usos medicinais e fotoquímicos e as demais partes da planta são utilizadas no tratamento de diferentes tipos de patologias. Hoje a pimenta rosa se destaca pelo seu consumo como condimento, tanto no mercado nacional como internacional (BENDAOU et al., 2010, NEVES et al., 2016; ULIANA et al., 2016).

Os frutos são colhidos de forma manual pela população local, em áreas de restinga dos nos Estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo. Tem sido usada como renda adicional, sendo uma atividade de grande importância socioeconômica. São comercializados a granel na forma de frutos desidratados. A colheita se dá de três formas: através do corte dos galhos, derriça e colheita dos frutos maduros. Apesar do seu grande potencial de mercado, ela é pouquíssima cultivada no país com esta finalidade, sendo grande parte destinada a produção de óleos essenciais e à exportação (NEVES et al., 2016).

3.2 Fungos

3.2.1 Gênero *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* foi descrito pela primeira vez em 1929, pelo micologista P. A. Micheli, e esse nome foi dado devido a semelhança com os instrumentos utilizados por padres para aspergir água benta nos fiéis durante celebrações. São distribuídos em diferentes ambientes ao redor do mundo e tem considerável impacto social e econômico, ora de forma benéfica, com sua aplicabilidade em funções biotecnológicas, ora maléfica, com a patogenia em humanos e animais (KLICH,

2002; SAMSON et al., 2014). São capazes de produzir enzimas, antibióticos, ácidos orgânicos, medicamentos e atuam como fermentadores de alimentos, por outro lado são responsáveis pela perda de produção na agricultura, nos processos pré e pós-colheita, pela produção de compostos tóxicos, além de causarem alergias em animais e humanos, tais como as aspergiloses e patogenias em plantas, animais e humanos (KLICH, 2002; SAMSON et al., 2014).

São organismos filamentosos, classificados como ascomicetos, distinguindo-se dos demais filamentosos pela produção de um micélio septado e com isso conseqüentemente um desenvolvimento lento. Caracterizam-se pela formação de conidióforos com estirpes largas e vesículas arredondadas. Além das características microscópicas e macroscópicas utilizadas para a identificação desses organismos, são empregadas a caracterização fenotípica, através da biologia molecular e quimiotaxonomia. O gênero *Aspergillus* compreende cerca de 344 espécies que podem produzir diferentes tipos de micotoxinas, sendo as principais delas: aflatoxinas, ocratoxina, patulina fumonisinas, ácido ciclopiazônico e esterigmatocistina (PITT & HOCKING, 2009; SAMSON et al., 2014; VARGA et al., 2014).

3.2.2. Micotoxinas

As micotoxinas são produzidas durante o metabolismo secundário de algumas espécies de fungos filamentosos. As primeiras intoxicações ocasionadas por elas datam a Idade Média, nos séculos XI e XVI, a partir de pães produzidos com centeio contaminado pelo fungo *Claviceps purpúrea*, resultando em epidemias de ergotismo na população européia (SANTURIO, 2000).

Elas apresentam efeitos que muitas vezes ocorrem em longo prazo, são teratogênicas e imunossupressoras, causando danos nos rins, fígado, sistema nervoso e imunológico, além do sistema gastrointestinal, e podem também ocasionar efeitos agudos, causando a morte de animais e pessoas. As micotoxinas são compostos químicos de baixo peso molecular, e diferentemente dos fungos, não alteram a aparência dos alimentos contaminados. Elas persistem nos alimentos com

suas atividades tóxicas, mesmo após a morte dos fungos que as deram origem (RODRICKS; STOLOFF, 1977; MOSS, 1998, BOK et al., 2004).

A presença destas toxinas em substratos é relacionada a diversos fatores, como os inerentes ao próprio alimento, os intrínsecos (pH, atividade de água, potencial de óxido-redução e composição química) e fatores externos (temperatura, umidade, composição atmosférica), os extrínsecos. Deste último, umidade e temperatura apresentam elevada importância, e devido a isso, países tropicais como o Brasil apresentam considerada incidência de espécies fúngicas (YOGENDRARAJAH et al., 2014). Sua toxicidade depende de uma série de fatores, tais como o tipo, a exposição do indivíduo (quantidade e duração), idade, saúde e sexo do indivíduo exposto, seu estado nutricional e a interação com outros tóxicos (DILKIN; MALLMANN, 2006).

Das micotoxinas conhecidas e já estudadas, as que apresentam elevada relevância tanto economicamente quanto à saúde são as aflatoxinas, pertencente ao grupo 1 pela Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC, 2002) com seu potencial risco a saúde humana e animal, com ações mutagênicas, hepatocarcinogênicas e nefrotóxicas com efeitos a longo prazo. E a ocratoxina A pertencente ao grupo 2B da IARC (1993), com possíveis efeitos carcinogênicos em humanos.

3.2.3. Aflatoxinas

As aflatoxinas foram descobertas na década de 60, na Inglaterra, após o caso conhecido como "*Turkey X Disease*" na qual mais de 100.000 perus e outras aves morreram após a ingestão de farelo de amendoim contaminados com a toxina (BLOUNT, 1961; DE IONGH et al., 1962).

As aflatoxinas são metabólitos tóxicos, moderadamente polares, produzidos principalmente por *A. flavus* e *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. bombycis*, *A. pseudotamari*, *A. ochraceoroseus*, *A. pseudocaelatus* e *A. pseudonomius* (KURTZMAN; HORN; HESSELTINE, 1987; YOKO et al., 2001; BENNET; KLICH, 2003; VARGAS; FRISVAD; SAMSON, 2011; VARGA et al., 2014).

Dentre os 17 compostos já isolados e denominados como aflatoxinas, quatro são mais conhecidos em relação aos aspectos toxicológicos, aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, estes são subdivididos em duas categorias: o grupo B, que apresenta fluorescência azul, quando submetidos à luz ultravioleta, e o grupo G, que apresenta fluorescência verde (FREIRE et al., 2007; KARAASLAN; ARSLANGRAY, 2015).

A exposição a esta toxina pode apresentar efeitos crônicos ou agudos, de acordo com a dosagem e frequência de exposição do indivíduo (CAST, 2003). A AFB₁ é a considerada a mais tóxica e mais potente micotoxina pela IARC (2002), com efeitos carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos. Ela é lipossolúvel e de baixo peso molecular, o que facilita sua absorção no organismo, sendo transportada pela corrente sanguínea até o fígado, onde é biotransformada (DALEZIOS et al., 1973; HSIEH; WONG, 1994). A AFB₁ apresenta valores de DL50 que variam de 0,3 a 9,0 mg/kg de peso corpóreo (KHOURY et al., 2008).

No organismo, a AFB₁ é biotransformada pelas enzimas do citocromo P450 e transformada em outros metabólitos no fígado e acumulada nos tecidos do animal exposto à toxina. Também pode levar a mutações, quando a forma ativada de AFB₁, interagindo com o DNA, se liga a resíduos de guanina, causando alterações de estrutura e interferindo na produção de proteínas e conseqüentemente nas suas atividades biológicas (COULOMBE, 1991).

3.2.4 Ocratoxina A

A ocratoxina foi descoberta em 1965, na África do Sul, por um grupo de cientistas que isolavam cepas de *A. ochraceus* como substâncias que causavam reações tóxicas em animais de laboratório (SCUSSEL, 1998). A ocratoxina A é uma toxina produzida por fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*, sendo as principais espécies: *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae*, *A. welwitschiae*, *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. sclerotium*, e gênero *Penicillium*, dentre estes *Penicillium verrucosum* e *Penicillium nordicum*). Apresenta propriedades nefrotóxicas, neurotóxicas, teratogênicas e imunossupressoras (EUROPEAN COMMISSION, 1998, RINGOT et al., 2006; PITT & HOCKING, 2009; VARGA et al., 2014). Das espécies citadas, *A. ochraceus* continua

sendo considerada a mais importante produtora de OTA em alimentos (VARGA et al., 2014).

Penicillium verrucosum produz OTA em climas temperados e *A. ochraceus* e *A. carbonarius* em climas tropicais (KABAK; DOBSON, 2015). Já foi relatada a sua presença em diversos tipos de vegetais, sendo os principais o café em grãos, cacau, cevada e frutos secos (TOSUN; OZDEN, 2015). Segundo a EC (2002), OTA pode contaminar uma série de alimentos, podendo ocorrer desde o cultivo até a armazenagem, sendo mais frequente um problema pós-colheita. (EFSA, 2007).

Ela é considerada como potencialmente carcinogênica pela IARC (1993), compondo o grupo 2B, com base em evidências carcinogênicas em animais de laboratório.

3.3 Legislação Brasileira e Internacional sobre micotoxinas em alimentos

Vários países apresentam normas referentes aos limites aceitos de micotoxinas em diferentes tipos de alimentos, pelo risco à saúde da população exposta a estes produtos (KABAK; DOBSON, 2015). Segundo a FAO (2004), ao menos 100 países possuem legislação própria para uma ou mais micotoxinas. A União Europeia estabelece para condimentos, incluindo as pimentas do gênero *Capsicum*, o limite de 5µg/kg para AFB₁ e 10µg/kg para AFLA total. Já para OTA o limite é de 15 µg/kg para as especiarias: *Capsicum* spp., *Pipiper* spp., noz moscada, gengibre e mix de condimentos.

No Brasil a RDC nº 07, de 18 de fevereiro de 2011, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece limites máximos da presença de micotoxinas em diversos alimentos. As pimentas, que estão incluídas dentro da categoria das especiarias (pimentas, pimenta em pó, pimenta de caiena, pimentão doce, pimenta branca, pimenta preta, noz-moscada, gengibre, cúrcuma e mix de especiarias com uma ou mais desta lista) o limite máximo tolerável de aflatoxinas é de 20 µg kg⁻¹ e para ocratoxina A o limite máximo é de 30 µg kg⁻¹ (BRASIL, 2011). A tabela 1 apresenta os limites de aflatoxinas em especiarias em diversos países.

Tabela1: Limites de aflatoxinas em diferentes países

Países	AFB ₁ (µg/kg)	AFTOTAL (µg/kg)
União Europeia	5	10
Brasil	-	20
Croácia	20	-
Indonésia	-	20
Uruguai	5	20
Tunísia	2	-
Nigéria	20	-
Cuba	-	5
Malásia	-	35
Índia	30	-
Japão	10	-
Sri Lanka	30	-

Fonte: Kabak e Dobson (2017) com adaptações.

Para a avaliação dos níveis de contaminação de alimentos por micotoxinas, países da Europa apresentam um sistema de informações implantado, denominado Rapid System for Food and Feed (RASFF), que auxilia na disseminação de informações sobre a contaminação dos alimentos. Este sistema possibilita a troca de informações entre os países membros, permitindo que as autoridades atuem de forma rápida e segura, para responder através de medidas, às potenciais ameaças à saúde, ocasionadas pela presença de contaminantes em alimentos (KABAK; DOBSON, 2015).

3.4 Ocorrência de fungos e micotoxinas em pimentas do gênero *Capsicum* e pimenta rosa

Dentre os estudos relacionados com a presença de fungos e micotoxinas em pimentas, estes se concentram prioritariamente em países como: Índia, Sri Lanka, Coreia, Turquia, Irã, Espanha e Hungria, considerados os grandes produtores e consumidores de tal hortaliça, não havendo muitos estudos no Brasil.

O desenvolvimento de fungos nos alimentos, bem como a produção de toxinas, está relacionado ao controle da umidade e temperatura durante os processos, desde a colheita até o armazenamento (KARAASLAN; ARSLANĞRAY, 2015). As

pimentas, assim como os demais condimentos, são produzidas em áreas com condições climáticas propícias ao crescimento de fungos.

Erdogan (2004) analisando amostras de pimenta vermelha, pimenta vermelha em pó e *Isto*, um tipo de pimenta vermelha típica produzida em Sanliurfa, na Turquia, verificou a contaminação por aflatoxinas variando entre 1,1 a 97,5 µg/kg. As amostras com maior contaminação foram àquelas submetidas por processos de secagem diretamente ao solo, prática mais utilizada na Turquia.

Bokhari (2007) analisou a micobiota de 50 amostras de 10 tipos diferentes de condimentos, entre eles a pimenta vermelha. A detecção da presença de cepas toxigênicas foi feita através de placas de TLC, e a quantificação em espectrofotômetro. Dos condimentos analisados, a pimenta vermelha apresentou um maior número de isolados, sendo o *Aspergillus* o gênero mais comum, e o *A. flavus* e *A. niger* os mais prevalentes. Quanto à presença de toxinas, nenhuma das amostras de pimenta vermelha apresentou contaminação por AFLA.

A. flavus, *A. ochraceus*, *A. niger*, *A. versicolor*, *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp. e *Geotrichum candidum* foram fungos isolados e identificados nas amostras de pimenta vermelha e pimenta vermelha em pó comercializadas na Turquia (ERDOGAN, 2004).

A contaminação por AFLA foi verificada em pimentas vermelhas moídas comercializadas em Sanliurfa, na Turquia, onde são bastante consumidas em saladas e pratos locais. A investigação foi feita em amostras adquiridas em diferentes comércios, e a ocorrência de AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂, através de análise utilizando colunas de imunoafinidade e detecção por CLAE. Das 42 amostras analisadas, todas apresentaram contaminação por AFLA, com níveis variando de 0,38 a 86,01 µg/kg, mas apenas 13 apresentaram concentrações maiores que as estabelecidas pelo Codex e EC, de 10 µg/kg (EUROPEAN COMMISSION, 2006), representando 31% das amostras de pimenta vermelha moída. Quanto à presença de AFB₁, quatorze amostras apresentaram concentrações desta toxina em nível maior que 5µg/kg. Os autores relacionaram a incidência das AFLA nas amostras de pimenta à região, que assim como o Brasil, apresenta altas temperaturas, e ao tipo de acondicionamento das pimentas, embalagens plásticas, que poderiam aumentar as condições para o crescimento e desenvolvimento de fungos, e conseqüentemente das toxinas. Os autores também avaliaram como as condições no processo de obtenção das pimentas

vermelhas moídas poderiam influenciar na maior ocorrência de AFLA nas amostras. De acordo com os resultados obtidos, eles observaram que as amostras que passaram pelo processo de secagem em contato direto com o solo apresentaram uma concentração maior de AFLA em comparação com amostras secas em superfícies de concreto (KARAASLAN; ARSLANĖRAY, 2015).

Jeswal e Kumar (2015) analisaram pimentas vermelhas oriundas de Bihar, na Índia, quanto à presença de AFLA, OTA e citrinina. *A. flavus* foi o gênero predominante nas amostras analisadas, e 56% deles apresentaram cepas potencialmente toxigênicas. 85,4% das amostras estavam contaminadas com aflatoxinas. O maior nível encontrado de AFLA foi de 219,6 µg/kg, indicando a alta contaminação por aflatoxinas em pimentas vermelhas.

Singh & Cotty (2017) analisaram pimentas do gênero *Capsicum* secas comercializadas em dois tipos diferentes de mercados: dos Estados Unidos, onde a regulamentação é extremamente controlada quanto a presença de micotoxinas e da Nigéria, onde não há um controle rigoroso, quanto a pré-disposição a presença de aflatoxinas após a colheita. Nos mercados estado-unidenses, AFB₁ foi detectada em 64% das amostras (51 de um total de 55), enquanto 93% (108 amostras de um total de 169) das adquiridas na Nigéria apresentaram contaminação por AFB₁. Além disso, as amostras nigerianas foram as que mais excederam os limites regulatórios (utilizando-se como base os valores dos US), onde 75% apresentaram valores acima de 5 µg/kg e 7% com valores acima de 20 µg/kg. Os autores relacionam essa maior presença de aflatoxinas em determinados mercados a produção dessas pimentas em regiões consideradas favoráveis à infecção, com presença de calor e umidade. Esse fator também estaria relacionado ao processamento pós colheita e as boas práticas, tais como secagem das pimentas, irradiação e fumigação como óxido de etileno, como forma de reduzir e/ou eliminar os fungos propagadores de toxinas. Mercados como os do Estados Unidos, que apresentam regras mais rigorosas quanto a presença dessas toxinas, forçam países exportadores a se adequarem aos seus regulamentos e com isso reduzir a exposição de seus consumidores as toxinas. As altas taxas de toxinas presentes nas pimentas comercializadas nos mercados nigerianos mostram-se estritamente relacionada a falta de regulamentação e fiscalização sobre a presença de toxinas. Ao analisar a comparação entre mercados com forte fiscalização com outros onde ela já não é tão presente, fica evidente que controle de atividades pós

colheita, tais como processamento e armazenamento, pode reduzir significativamente a presença de contaminantes no produto e assim entregar aos consumidores produtos seguros.

Kim et al. (2017) analisaram 56 amostras de pimenta vermelha em pó de três países: Coreia, China e Vietnã, quanto à ocorrência de AFLA, OTA e ZEA, utilizando as técnicas de cromatografia e ELISA. AFLA foram encontradas em quatro amostras, com uma média de AFB₁ de 0,64 µg/kg. Já OTA foi encontrada em seis amostras, com concentração média de 2,38 µg/kg.

Nos flocos de pimenta vermelha comercializados em supermercados e empórios na Turquia e analisados por Tosun & Ozden (2015), foram investigadas a presença de OTA, tanto em flocos embalados quanto a granel. De um total de 75 amostras (sendo 31 embaladas e 44 a granel), todas apresentaram algum nível de contaminação por OTA. Das 31 amostras embaladas, 27 (87,1%), apresentaram contaminação por OTA, com média de 0,4 µg/kg, valores menores que os limites estabelecidos pela regulamentação europeia. Dentre as amostras a granel, todas apresentaram contaminação e quatro excederam o limite estabelecido pela EC (10 µg/kg), com valores entre 15 e 31,7 µg/kg. Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que as amostras comercializadas a granel apresentaram maior contaminação e risco. A maior contaminação destas amostras pode ser decorrente de utilização de matéria prima de menor qualidade, não seleção e segregação de produto contaminado e/ou estocagem não adequada.

A presença de toxinas nos alimentos pode estar relacionada ao desenvolvimento de câncer em seres humanos e animais (IARC, 2010). Com base nisso, Ikoma et al. (2015) analisaram a presença de AFLA e OTA em amostras de pimentas vermelhas oriundas da Bolívia, Chile e Peru, que apresentam elevados índices de câncer na vesícula biliar. As amostras foram analisadas por CLAE, e os resultados obtidos foram relacionados com as áreas de maior incidência deste tipo de doença. Dentre as amostras analisadas, todas apresentaram alguma contaminação por aflatoxinas, mas todas abaixo do limite estabelecido pela EC (10 µg/kg). Já quanto à OTA, duas amostras excederam os limites (15µg/kg). Os autores sugeriram neste estudo associação dos níveis de contaminação obtidos com o desenvolvimento deste tipo de câncer.

Barani et al. (2016) analisaram 76 amostras de pimenta comercializadas no Irã, incluindo 36 amostras de pimenta vermelha, quanto à ocorrência de AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂. O método empregado foi o CLAE. Em comparação com a pimenta preta, as pimentas vermelhas apresentaram maior contaminação por AFLA totais. AFB₁ estava presente em 32 das 36 amostras de pimenta vermelha e em níveis maiores que os permitidos pela legislação europeia e Iraniana, que é de 5 µg/kg.

Nas amostras analisadas por Salari et al. (2012), a microbiota predominante nas 36 amostras de pimenta vermelha foi de *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.* e *Rhizopus spp.* A presença de toxinas foi analisada de forma qualitativa, em placas de TLC e leitura sob luz UV. Quanto à presença de AFLA, 69% das amostras foram positivas e quanto à de OTA, 17% foram positivas. Segundo os autores, a presença tanto dos microrganismos quanto de toxinas foi decorrente de processos de higiene pré e pós processamento ineficientes, como a armazenagem por longos períodos em locais inadequados.

Estudos realizados na Índia, Irã e Arábia Saudita têm demonstrado a importância da pesquisa sobre a contaminação de pimentas vermelhas por ocratoxina A e aflatoxinas, já que muitos apresentaram concentrações elevadas destes contaminantes, oferecendo riscos a população consumidora. No Brasil, onde há um crescimento do plantio de pimenta, e um aumento do consumo nas diferentes regiões do país, um levantamento sobre a microbiota e a presença destes contaminantes nestes produtos se faz necessário.

4. REFERÊNCIAS

ALLCROFT, Ruth et al. *Groundnut toxicity. Aspergillus flavus toxin (aflatoxin) in animal products: preliminary communication*. **Veterinary Record**, v. 74, p. 863-864, 1962.

BARANI, Afshin; NASIRI, Zeinab; JARRAH, Nafiseh. *Natural occurrence of Aflatoxins in commercial pepper in Iran*. **Food and Agricultural Immunology**, v. 27, n. 4, p. 570-576, 2016.

BARBOSA, L. C. A.; DEMUNER, A. J.; CLEMENTE, A. D.; PAULA, V. F.; ISMAIL, F. M. D. *Seasonal variation in the composition of volatile oils from Schinus terebinthifolius Raddi*. **Química Nova**. v. 30, p. 1959-65, 2007.

BENDAOUD, Houcine et al. *Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of Schinus molle L. and Schinus terebinthifolius Raddi berries essential oils*. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 6, 2010.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* v.16, n.3, p. 497–516, 2003.

BLOUNT, W. P. *Turkey “X” disease*. **Turkeys**, v. 9, n. 2, p. 52-55, 1961.

BOKHARI, Fardos 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.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil Brasília, DF. Seção 1, p. 72, 2011.

BOK, J.W.; KELLER, N.P.; LAE, A. *A regulator of secondary metabolism in Aspergillus spp.* **Eukaryotic Cell**, Washington, v.3, p.527-535, 2004.

CARVALHO, SIC de et al. Pimentas do gênero Capsicum no Brasil. **Brasília: Embrapa Hortaliças. 15p,** 2006. Disponível em: <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/Pimenta_capsicum_spp/comercializacao.html> Acesso em: 10 mai 2016.

CAST (Council of Agricultural Science and Technology). *Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems. Task Force Report*, EUA: CAST, n. 139, 2003.

COLLINS, M.; BOSLAND, P. W. *Measuring chile pungency. Guide H-237. New Mexico State University, Las Cruces, NM*, 1994.

CORNEJO, F. E.; NOGUEIRA, R. I.; WILBERG, V. C. Manual para processamento de pimentas desidratadas. **Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos**, p. 9, 2005.

COULOMBE, R.A. Aflatoxins. In: Sharma, R.P.; Salunkhe, D.K. *Mycotoxins and phytoalexins. Boca Raton: CRC Press*. p.103-143, 1991.

DALEZIOS, J. I.; HSIEH, D. P. H.; WOGAN, G. N. *Excretion and metabolism of orally administered aflatoxin B1 by rhesus monkeys. Food and cosmetics toxicology*, v. 11, n. 4, p. 605-616, 1973.

DE IONGH, H. et al. *Investigation of the factor in groundnut meal responsible for "turkey X disease"*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 65, n. 3, p. 549-551, 1962.

DE todos os sabores e gostos. **A lavoura**. Rio de Janeiro: Sociedade Nacional de Agricultura, v. 119 n. 716, p 8-13, 2016.

DILKIN, P., MALLMANN, C. A. Sinais clínicos e lesões causadas por micotoxinas. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 11, 2004

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 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. Pimenta (*Capsicum* spp.). Brasília: Embrapa Hortaliças, versão eletrônica, 2007. Disponível em: <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/Pimenta_capsicum_spp/>. Acesso em: out. 2017.

ERDOGAN, Ahmet. *The aflatoxin contamination of some pepper types sold in Turkey*. **Chemosphere**, v. 56, n. 4, p. 321-325, 2004.

EUROPEAN COMMISSION (EC). Commission Directive 98/53/EC, 16/07/1998, OJ L 201:93–101, 1998.

EUROPEAN COMMISSION (EC). Commission Regulation (EU) n° 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**, 2006.

EUROPEAN COMMISSION (EC). Commission Regulation (EU) No 165/2010 of 26 February 2010 amending regulation (EC) No 118/2006 setting maximum levels for certain contaminants in food stuffs as regards aflatoxins. **Official Journal of the European Union**, L 50, 8-12, 2010a.

EUROPEAN COMMISSION (EC). Commission Regulation (EU) No 105/2010 of 5 February 2010 amending regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in food stuffs as regards ochratoxin A. **Official Journal of the European Union**, L 35, 7-8, 2010b.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. Food and Nutrition paper n 81, 2004.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Call for data and experts on microbiological hazard associated with spices and dried aromatic herbs, 2013.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Discussion paper on the establishment maximum levels for mycotoxins in spices, 2017.

FREIRE, Francisco das Chagas Oliveira et al. Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal. **Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical**, 2007.

GARCIA, Marcelo Valle; MALLMANN, Carlos Augusto; COPETTI, Marina Venturini. *Aflatoxigenic and ochratoxigenic fungi and their mycotoxins in spices marketed in Brazil*. **Food Research International**, 2017.

HSIEH, D.P.H.; WONG, J.J. *Pharmacokinetics and Excretion of Aflatoxins*. **The toxicology of Aflatoxins**. London, p. 73 -85, 1994.

IKOMA, Toshikazu et al. Ochratoxin A contamination of red chili peppers from Chile, Bolivia and Peru, countries with a high incidence of gallbladder cancer. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 16, p. 5987-91, 2015.

IARC. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH OF CANCER. Ochratoxin A. Summaries & Evaluations, v. 56, CAS n. 303-47-9, p.489, 1993.

IARC. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH OF CANCER. Evaluation of carcinogenic risks of chemical to humans: "Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene". **IARC Monographs**, Lyon, France, v. 82, p. 171-301, 2002.

JESWAL, Punam; KUMAR, Dhiraj. Mycoflora and mycotoxins contamination in spices cultivated in Bihar (India). **Agricultural Science, Engineering and Technology Research**, v.1, n. 5, p. 70-77, 2013.

JESWAL, Punam; KUMAR, Dhiraj. Mycobiota and natural incidence of aflatoxins, ochratoxin A, and citrinin in Indian spices confirmed by LC-MS/MS. **International Journal of Microbiology**, v. 2015, 2015.

KARAASLAN, Mehmet; ARSLANĖRAY, Yusuf. Aflatoxins B1, B2, G1, and G2 contamination in ground red peppers commercialized in Sanliurfa, Turkey. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 187, n. 4, p. 184, 2015.

KABAK, Bulent; DOBSON, Alan DW. Mycotoxins in spices and herbs—An update. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 1, p. 18-34, 2017.

KHOURY, André EL et al. Fungal contamination and Aflatoxin B1 and Ochratoxin A in Lebanese wine—grapes and musts. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 6, p. 2244-2250, 2008.

KIM, Sunyoung et al. Comparison of a newly developed liquid chromatography with tandem mass spectrometry method and enzyme-linked immunosorbent assay for detection of multiple mycotoxins in Red pepper powder. **Journal of food protection**, v. 80, n. 8, p. 1347-1354, 2017.

KLICH, M. A. A identification of common *Aspergillus* species. Netherlands: CBS, 2002.

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.

MADHUMATHY, A. P.; AIVAZI, Ali-Ashraf; VIJAYAN, V. A. Larvicidal efficacy of *Capsicum annum* against *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus*. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 44, n. 3, p. 223, 2007.

MOSS, M. O. Recent studies of mycotoxins. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, n. s1, p. 62S, 1998.

NEVES, E.J. M et al. Cultivo da aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi) para produção de pimenta-rosa. **Embrapa Florestas-Documentos**, n 294, p 27, 2016.

OZTURKOGLU-BUDAK, Sebnem. A model for implementation of HACCP system for prevention and control of mycotoxins during the production of red dried chili pepper. **Food Science and Technology (Campinas)**, n. AHEAD, p. 0-0, 2017.

PAULUS, Dalva et al. Growth, yield and fruit quality of pepper (*Capsicum annum*) at different spacings. **Horticultura Brasileira**, v. 33, n. 1, p. 91-100, 2015

PERRY, Linda et al. Starch fossils and the domestication and dispersal of chili peppers (*Capsicum* spp. L.) in the Americas. **Science**, v. 315, n. 5814, p. 986-988, 2007.

PINTO, Cleide Maria Ferreira; PINTO, Cláudia Lúcia de Oliveira; DONZELES, S. M. Pimenta capsicum: propriedades químicas, nutricionais, farmacológicas e medicinais e seu potencial para o agronegócio. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 3, n. 2, p. 108-120, 2013.

REIFSCHNEIDER, F. J. B. **Capsicum: pimentas e pimentões no Brasil**. Brasília: Embrapa, 2000. Disponível em: <<http://www.cnph.embrapa.br/capsicum/especies.htm>> Acesso em: 18 mai 2016.

REINHOLDS, Ingars et al. Mycotoxins, pesticides and toxic metals in commercial spices and herbs. **Food Additives & Contaminants: Part B**, v. 10, n. 1, p. 5-14, 2017.

RINGOT D, CHANGO A, SCHNEIDER YJ et al. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. **Chem Biol Interact**, 159, 18-46, 2006.

RODRICKS, J. V.; STOLOFF, L. Aflatoxin residues from contaminated feed in edible tissues of food-producing animals. **Mycotoxins and animal health**, v. 67, p. 79, 1977.

SALARI, Rosita et al. Assessment of the microbiological quality and mycotoxin contamination of Iranian red pepper spice. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 14, 2012.

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

SANTURIO, J. M. Micotoxinas e micotoxicoses na avicultura. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, 2000.

SCUSSEL, V.M. Micotoxinas em Alimentos. São Paulo: Insular. p. 19-22, 1998.

SINGH, Pummi; COTTY, Peter J. Aflatoxin contamination of dried red chilies: Contrasts between the United States and Nigeria, two markets differing in regulation enforcement. **Food Control**, v. 80, p. 374-379, 2017.

SUN, T. et al. *Antioxidant activities of different colored sweet bell peppers (Capsicum annuum L.)*. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 2, 2007.

TAKIKAWA, Akiko et al. Antimicrobial activity of nutmeg against Escherichia coli O157. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, n. 4, p. 315-320, 2002.

TANIWAKI, M.H.; SILVA, N. Fungos em alimentos: ocorrência e detecção. Campinas: Núcleo de Microbiologia/ITAL, 2014.

TOSUN, Alperen; OZDEN, Sibel. Ochratoxin A in red pepper flakes commercialised in Turkey. **Food Additives & Contaminants: Part B**, v. 9, n. 1, p. 46-50, 2016.

ULIANA, Michele Pereira et al. Composition and biological activity of Brazilian rose pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 235-240, 2016.

VARGA, J.; FRISVAD, Jens Christian; SAMSON, R. A. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. **Studies in Mycology**, v. 69, p. 57-80, 2011.

VARGA, János et al. Mycotoxin producers in the *Aspergillus* genus: an update. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 59, n. 2, p. 151-167, 2015.

YOGENDRARAJAH, Pratheeba et al. Co-occurrence of multiple mycotoxins in dry chilli (*Capsicum annum* L.) samples from the markets of Sri Lanka and Belgium. **Food Control**, v. 46, p. 26-34, 2014.

YOKO, I. T. O. et al. *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*. **Mycological Research**, v. 105, n. 2, p. 233-239, 2001.

Capítulo 1:

Micobiota de pimenta vermelha (*Capsicum frutescens* e *Capsicum baccatum*) e pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius*)

Artigo enviado para publicação na revista Brazilian Journal of Food Technology em:
18 de Maio de 2018.

RESUMO

Neste trabalho foram avaliadas 71 amostras de pimenta, 51 do gênero *Capsicum*, dentre estas, a pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*, n=21) e calabresa (*Capsicum baccatum*, n=30), e 20 de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius*). Foram utilizados os métodos de plaqueamento direto, com desinfecção superficial (grãos e frutos), e diluição (pó e floculadas) em meio Dichloran 18% Glycerol Agar. Foi realizada a avaliação morfológica para a identificação das espécies. As amostras que apresentaram maior média de contaminação total por fungos foram a pimenta malagueta fresca (65,5%) e a pimenta calabresa ($2,6 \times 10^3$ UFC/g). Um total de 985 isolados foram identificados até espécie ou grupo, e os fungos mais frequentes foram *Aspergillus* section *Nigri* (FO de 50% e média de contaminação de 5,3%) para as amostras de pimenta rosa; fungos dematiáceos (75 e 28,2%), *Aspergillus* section *Flavi* (25 e 15%) e *Aspergillus* section *Nigri* (50 e 16%) para as amostras de pimenta malagueta fresca; e *Eurotium rubrum* (50% e 48 UFC/g), *Aspergillus* section *Nigri* (50% e 42 UFC/g%) e *Aspergillus* section *Flavi* (40% e 20 UFC/g) para as amostras de pimenta calabresa. Nas amostras de pimenta malagueta em pó, as principais espécies presentes foram *Eurotium chevalieri* e *E. rubrum*, e todas as espécies apresentaram média de contagem inferior a 10 UFC/g.

Palavras-chave: pimenta vermelha, pimenta rosa, fungos, microbiota, *Capsicum*, *Schinus terebinthifolius*

ABSTRACT

In this study 71 samples were evaluated: 51 from *Capsicum* genera, including, malagueta pepper (*Capsicum frutescens*, n=21) and calabresa pepper (*Capsicum baccatum*, n=30) and 20 of pink pepper (*Schinus terebinthifolius*). Direct plating, with disinfection (grains and fruits) and dilution (powder and flocculated) in 18% Agar Dichloran Glycerol methodologies were used. For identification of the species, morphological evaluation was carried out. The highest average contamination by total fungi were found in fresh malagueta pepper (65.5%) and calabresa pepper (2.6×10^3 UFC/g). A total of 985 isolates were identified as species or group and the most frequent fungi were *Aspergillus* section *Nigri* (frequency of 50% and average contamination of 5.3%) for pink pepper; dematiaceous fungi (75% and 28.2%), *Aspergillus* section *Flavi* (25% and 15%) and *Aspergillus* section *Nigri* (50% and 16%) for fresh malagueta pepper; and *Eurotium rubrum* (50% and 48UFC/g), *Aspergillus* section *Nigri* (50% and 42UFC/g) and *Aspergillus* section *Flavi* (40% and 20UFC/g) for calabresa pepper. In the powdered malagueta pepper, the main species found were *Eurotium chevalieri* and *Eurotium rubrum*, and all the species showed average contamination lower than 10 UFC/g.

Key-words: red pepper, pink pepper, fungi, mycobiota, *Capsicum*, *Schinus terebinthifolius*

1. INTRODUÇÃO

Os fungos são seres eucarióticos, unicelulares como as leveduras, ou multicelulares como os fungos filamentosos.

Eles podem influenciar no sabor e qualidade dos alimentos, seja de forma benéfica, na produção de queijos, por exemplo, como também ocasionando transformações indesejáveis, como a deterioração. A contaminação de alimentos por estes microrganismos pode ocorrer em diferentes fases, no campo (pré-colheita) ao transporte, armazenamento, distribuição e processamento (pós-colheita), em condições de temperatura e umidade favoráveis (DINIZ, 2002; FRISVAD; NIELSEN; SAMSON, 2006).

São vários os fatores que influenciam o crescimento de fungos nos alimentos, como a atividade de água, solutos, pH, temperatura do processamento e de estocagem do substrato, a atmosfera que o envolve durante o armazenamento e as características deste alimento, tais como as nutricionais e sua consistência (PITT & HOCKING, 2009).

A contaminação de condimentos por fungos geralmente está relacionada a deficiência em processos, como o de secagem, por exemplo (JESWAL; KUMAR, 2013). Alguns estudos mostram que, condimentos secos em condições inadequadas, como próximos ao solo, por exemplo, apresentam níveis de contaminação maiores que os secos em locais adequados ao processo (ERDOGAN, 2004, JESWAL; KUMAR, 2013).

Entre os condimentos susceptíveis à contaminação por fungos, estão as pimentas do gênero *Capsicum*. Segundo Yogendrarajah et al. (2014), as pimentas do gênero *Capsicum* ficam em segundo lugar no consumo mundial de especiarias, atrás apenas da pimenta-do-reino. No mundo cerca de 6 bilhões de pessoas tem o hábito de comer pimentas vermelhas (KIM et al., 2017).

No Brasil, o cultivo de pimenta é uma atividade de grande importância sócio-econômica para o país, pois é responsável pela união da agricultura familiar com as grandes indústrias (EMBRAPA, 2007). A produção nacional das pimentas do gênero *Capsicum* compreendem aproximadamente 280 toneladas em 13 mil hectares, sendo

a produção de pimenta calabresa concentrada na região Sul (CARVALHO et al., 2006; A LAVOURA, 2016). Os frutos da espécie *Capsicum* são muito utilizados na culinária, conferindo cor, sabor e aroma a diferentes pratos (KARAASLAN; ARSLANĞRAY, 2015).

Esses produtos, por serem cultivados em áreas de altas temperaturas e umidade podem ser contaminados por micro-organismos. Essas regiões possuem condições propícias ao surgimento de fungos, tais como alta incidência de chuvas, temperaturas elevadas e umidade (YOGENDRARAJAH et al., 2014). A presença de fungos nos alimentos causa uma queda na sua qualidade, além de oferecer riscos à saúde quando também há a presença dos seus metabólitos tóxicos, as micotoxinas (YOGENDRARAJAH et al., 2014; KABAK; DOBSON, 2017).

No geral, as pimentas frescas passam pela secagem ao sol e são susceptíveis às condições do clima. Este processo pode levar um tempo longo, resultando em uma secagem ineficiente e promovendo o crescimento fúngico. (BOKHARI, 2007; KIM et al., 2017).

Os processos de secagem de pimenta, como a calabresa (*Capsicum baccatum*), por ser realizada por grupos familiares, é realizada de maneira bastante artesanal, o que pode levar a alterações organolépticas e o apodrecimento da matéria-prima (CORNEJO et al., 2005; CARVALHO et al., 2006).

Vários trabalhos relatam a presença de fungos em amostras de pimenta vermelha, sendo os gêneros mais comuns: *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.* e *Rhizopus spp.* (ERDOGAN, 2004; BOKHARI, 2007; JESWAL & KUMAR, 2014).

Alguns estudos envolvendo diferentes tipos de condimentos comercializados na Índia, como anis, pimenta-do-reino, cominho, hortelã pimenta, cardamomo, cravo, gengibre, manjerona e pimenta vermelha, demonstraram as pimentas vermelhas como um rico substrato para o crescimento e desenvolvimento de fungos, com seis gêneros e 12 espécies diferentes, em especial os do gênero *Aspergillus*, como *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus* (BOKHARI, 2007).

As pimentas do gênero *Capsicum* são bastante consumidas em todo o território nacional em diferentes formas e apresentações enquanto a *Schinus terebinthifolius*, vem conquistando espaço em mercados mais sofisticados, os

gourmets. Elas podem ser bons substratos para o crescimento e desenvolvimento de diferentes tipos de fungos filamentosos. Sendo assim este estudo visa avaliar a microbiota presente em cada tipo de pimenta e identificar as principais espécies presentes e avaliar sua ocorrência.

2. OBJETIVOS

Isolar, quantificar e identificar as espécies e grupos de fungos filamentosos presentes em pimentas vermelhas (*Capsicum baccatum* e *Capsicum frutescens*) e pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius*).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras

Foram adquiridas amostras a granel, de 150 g a 250 g, nos mercados de Campinas/SP, Sorocaba/SP e São Paulo/SP, no período de Março/2016 - Dezembro/2017, sendo: 20 amostras de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius*), 30 amostras de pimenta calabresa (produzida a partir de pimentas da espécie *Capsicum baccatum*), 10 amostras de pimenta malagueta em pó (*Capsicum frutescens*) e 11 amostras de pimenta malagueta fresca (*Capsicum frutescens*).

As pimentas foram analisadas no laboratório de micologia e micotoxinas do Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos (CCQA), localizado no Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) em Campinas/SP.

3.2 Plaqueamento direto (pimenta rosa e malagueta fresca)

O plaqueamento foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Pitt & Hocking (2009), na qual 50 grãos ou pedaços de frutos foram submetidos à desinfecção superficial com hipoclorito de sódio 0,4% durante 2 minutos. Os pedaços da pimenta malagueta eram cortados com auxílio de um bisturi, em ambiente estéril, tomando-se o cuidado de selecionar os pedaços de 50 pimentas diferentes. Para

cada amostra 5 placas de Petri contendo o meio *Dichloran 18% Glycerol Agar* (DG18) foram utilizadas, distribuindo as 50 unidades, e incubadas a 25° C por 7 dias. A infecção fúngica foi expressa pela porcentagem de grãos/pedaços infectados.

3.3 Diluição decimal seriada (pimenta calabresa, pimenta malagueta em pó)

Foram pesados 25 g da amostra e esta diluída em 225 mL de água peptonada 0,1% e homogeneizados em Stomacher (Stomacher Laboratory Blender 400, Seward Medical). A partir desta primeira diluição foram preparadas as demais diluições decimais, plaqueando uma alíquota de 0,1 mL em placas Petri contendo o meio DG18, em superfície, e incubadas a 25° C por 7 dias. Caso não houvesse crescimento de bolores, o ensaio foi repetido, diminuindo o limite de detecção do método e plaqueando 1mL da primeira diluição. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por grama da amostra (UFC/g).

3.4 Isolamento e identificação dos grupos de fungos

Os fungos foram inicialmente isolados em meio *Czapek Yeast Extract Agar* (CYA), incubadas por 5 dias a 25° C para a purificação das colônias. A partir desta etapa, os isolados dos gêneros *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Fusarium* e fungos dematiáceos foram inoculados em três pontos equidistantes e incubados a 25°C por 7 dias e as espécies de *Eurotium sp.* foram inoculados da mesma forma em meio *Czapek Yeast Agar 20% Sucrose* (CY20S) por 14 dias a 25° C, de acordo com (PITT & HOCKING, 2009, SAMSON et al., 2010). Para os *Aspergillus*, as características morfológicas foram também avaliadas em meio CYA a 37° C. As espécies de *Penicillium* foram inoculadas em meio CYA, *Malt Extract Agar* (MEA) e *Creatine Sucrose Agar* (CREA) e incubadas a 25° C por 5-7 dias.

Para todos os fungos foram avaliadas as características morfológicas, tais como: forma e tamanho dos conídios, coloração, textura, estrutura, presença de exsudado e reverso das colônias e seguiu-se as chaves de classificação de Klich & Pitt (1988) para as espécies de *Aspergillus* e Pitt (2000) para as espécies de *Penicillium*. Para as demais espécies Samson et al (2010) e Pitt & Hocking (2009).

4. RESULTADOS

Os resultados de frequência de ocorrência (FO), média de infecção (%) e contagem (UFC/g) e variação da contaminação, podem ser observados nas tabelas 1, 2, 3 e 4 para a pimenta rosa, pimenta malagueta fresca, pimenta malagueta em pó e pimenta calabresa, respectivamente.

Foi isolado um total de 985 fungos de todas as amostras, englobando 19 grupos fúngicos distintos. A pimenta rosa e a pimenta malagueta fresca foram as que apresentaram maior diversidade de contaminação, com um total de 12 grupos cada uma. *Aspergillus section Nigri* foi o grupo mais frequente, estando presente em 50% de ambas as amostras.

Das 20 amostras de pimenta rosa analisadas, seis (30%) não apresentaram infecção fúngica, conforme apresenta a tabela 1. A frequência de ocorrência de *Aspergillus section Nigri* foi alta (50 %), mas com baixa média de infecção, de 5,3%. Em seguida os fungos com maior ocorrência foram *Eurotium rubrum*, 30% e média de infecção de 1,2 %; seguido de *Eurotium chevalieri*, 15% e 1,3 % respectivamente. Os demais grupos e espécies de fungos isolados das amostras encontram-se na tabela 1. Dos grupos de fungos toxigênicos, além de *A. section Nigri*, foram também isolados *A. section Flavi*. Este último apresentou FO (3,3%) e média de infecção (0,3%) baixas.

Todas as amostras de pimenta malagueta fresca apresentaram contaminação fúngica (tabela 2). A FO foi maior para os fungos dematiáceos, estando presentes em 75% das amostras analisadas. *Aspergillus section Nigri* e *Aspergillus section Flavi*, apresentaram alta FO, com 50% e 25% respectivamente, e médias de infecção de 15,0% e 16,0%.

Diferente das amostras frescas, as amostras de pimenta malagueta em pó apresentaram FO por fungos de 45% e crescimento de sete diferentes grupos de fungos, dentre eles *Eurotium chevalieri* e *Eurotium rubrum*, ambos com FO de 27% e médias de contagem menores que 10 UFC/g (tabela 3). *A. section Flavi*, *A. section Nigri*, *Eurotium amstelodami*, *Eurotium herbariorum* e *Fusarium sp.*, tiveram baixa FO (9%) e contagem abaixo de 10 UFC/g.

A pimenta calabresa foi a que apresentou a maior contaminação fúngica total, estando presente em 97% das amostras analisadas, e também a maior ocorrência para os diferentes grupos de fungos (tabela 4). *Aspergillus section Nigri*, *Eurotium chevalieri*, *Eurotium rubrum* e *Eurotium amstelodami* apresentaram FO de 50% e as médias de contagem de UFC/g de 42, 35, 48 e 22, respectivamente. *Aspergillus section Flavi* apresentou FO de 40% e média de contagem de 20 UFC/g.

Todas as amostras de pimenta apresentaram algum grau de infecção por *Aspergillus section Nigri* e *Aspergillus section Flavi*, sendo os níveis mais elevados na pimenta calabresa.

Tabela 1. Frequência de ocorrência (%), média de infecção fúngica (%), mediana (%) e variação de infecção de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius*).

PIMENTA ROSA (n=20)	FO (%)	Média de infecção (%)	Variação (%)
<i>Aspergillus section Flavi</i>	3,3	0,3	0-6
<i>Aspergillus tamaritii</i>	10	0,4	0-6
<i>Aspergillus section Nigri</i>	50	5,3	0-20
<i>Eurotium chevalieri</i>	15	1,3	0-14
<i>Eurotium rubrum</i>	30	1,2	0-8
<i>Eurotium herbariorum</i>	5	0,3	0-6
<i>Aspergillus candidus</i>	5	0,1	0-2
<i>Rhizopus oryzae</i>	5	0,1	0-2
<i>Fusarium sp.</i>	10	0,3	0-2
<i>Penicillium sp</i>	5	0,1	0-2
Fungos dematiáceos	10	0,4	0-4
Leveduras	10	0,4	0-6
TOTAL	70	10,2	0-36

FO = Frequência de ocorrência % (número de amostras com a espécie/total de amostras avaliadas)

Tabela 2. Frequência de ocorrência (%), média de infecção fúngica (%), mediana (%) e variação de infecção de pimenta malagueta fresca (*Capsicum frutescens*)

PIMENTA MAGUETA FRESCA (n=12)	FO (%)	Média de infecção (%)	Variação (%)
--------------------------------------	---------------	------------------------------	---------------------

<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	25,0	16,0	0-90
<i>Aspergillus tamaritii</i>	8,3	0,8	0-10
<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	50,0	15,0	0-74
<i>Aspergillus</i> section <i>Circumdati</i>	8,3	3,3	0-40
<i>Aspergillus terreus</i>	8,3	0,2	0-2
<i>Penicillium</i> sp.	8,3	0,3	0-4
<i>Penicillium citrinum</i>	8,3	0,3	0-4
<i>Rhizopus oryzae</i>	8,3	8,3	0-100
<i>Absidia corymbifera</i>	8,3	6,7	0-80
<i>Fusarium</i> sp	8,3	0,2	0-2
<i>Cladosporium</i> sp	8,3	2,8	0-34
Fungos dematiáceos	75,0	28,2	0-100
TOTAL	100,0	65,5	0-100

FO = Frequência de ocorrência % (número de amostras com a espécie/total de amostras avaliadas)

Tabela 3. Frequência de ocorrência (%), média de contagem fúngica (UFC/g), mediana (UFC/g) e variação de contaminação (UFC/g) de pimenta malagueta em pó (*Capsicum frutescens*).

PIMENTA MALAGUETA EM PÓ (n=11)	FO (%)	Média de contagem (UFC/g)	Varição(UFC/g)
<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	9	<10	<10-1x10 ²
<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	9	<10	<10-1x10 ²
<i>Eurotium chevalieri</i>	27	<10	<10-4x10 ²
<i>Eurotium rubrum</i>	27	<10	<10-3x10 ³
<i>Eurotium amstelodami</i>	9	<10	<10-70
<i>Eurotium herbariorum</i>	9	<10	<10-3x10 ²
<i>Fusarium</i> sp.	9	<10	<10-10
TOTAL	45	11	<10-7x10 ²

FO = Frequência de ocorrência % (número de amostras com a espécie/total de amostras avaliadas)

Tabela 4. Frequência de ocorrência (%), média de contagem fúngica (UFC/g), mediana (UFC/g) e variação de contaminação (UFC/g) de pimenta calabresa (*Capsicum baccatum*).

PIMENTA CALABRESA (n=30)	FO (%)	Média de contagem (UFC/g)	Variação(UFC/g)
<i>Aspergillus section Flavi</i>	40	20	<10-3x10 ⁴
<i>Aspergillus section Nigri</i>	50	42	<10-3x10 ⁴
<i>Eurotium chevalieri</i>	50	35	<10-2,5x10 ⁴
<i>Eurotium rubrum</i>	50	48	<10-1,5x10 ⁵
<i>Eurotium amstelodami</i>	50	22	<10-9x10 ⁴
<i>Eurotium herbariorum</i>	17	<10	<10-1x10 ³
<i>Rhizopus oryzae</i>	10	<10	<10-1x10 ²
<i>Rhizopus stolonifer</i>	3	<10	<10-1x10 ³
<i>Penicillium sp</i>	3	<10	<10-1x10 ²
Fungos dematiáceos	3	<10	<10-1x10 ³
TOTAL	97	2,6x10 ³	<10-1,9x10 ⁵

FO = Frequência de ocorrência % (número de amostras com a espécie/total de amostras avaliadas)

5. DISCUSSÃO

Considerando todas as amostras analisadas, os fungos mais relevantes presentes foram *A. section Nigri* e *A. section Flavi*. Outros estudos também reportam o gênero *Aspergillus* como o mais comum entre os encontrados em amostras de pimenta.

Em pimentas vermelhas estudadas por Bokhari (2007), as espécies mais comuns foram *A. niger* e *A. flavus*, com contagens médias de 1,5x10³ e 7,8x10² UFC/g, respectivamente. Entre os condimentos, a pimenta vermelha foi também aquela que apresentou maior contaminação fúngica, seis gêneros e 12 espécies diferentes de fungos foram isolados.

Nos diferentes tipos de pimentas estudados por Erdogan (2004), o autor verificou a prevalência de *A. niger* e *A. flavus* em amostras de pimenta em pó e flocos.

Além destas espécies foram isoladas *Penicillium spp.*, *Rhizopus sp* e *A. ochraceus*, *A. versicolor* e *G. candidum*. O autor atribui o elevado crescimento de fungos nas amostras ao processo de secagem realizado no solo, utilizado na Turquia.

Amostras de pimentas chilli analisadas por Jeswal e Kumar (2015) apresentaram o desenvolvimento de 12 espécies/grupos diferentes, e assim como os resultados deste estudo, relatou incidência maior de grupos como *A. flavus* (32,3%) e *A. niger* (15,3%). Além destes, *Penicillium citrinum* (12,6%) e *Aspergillus versicolor* (11,4%) também estiveram presentes.

As amostras de pimenta calabresa (*Capsicum baccatum*), apresentaram maior contaminação fúngica comparado com as demais. Já quanto à diversidade de grupos, as pimentas rosa e malagueta fresca foram as que apresentaram crescimento de diferentes espécies e grupos.

Houve um crescimento significativo de espécies de *Eurotium*, tais como *E. chevalieri*, *E. amstelodami*, *E. rubrum* e *E. herbariorum*, principalmente nas amostras secas, rosa, malagueta em pó e calabresa. Eles estão entre os fungos xerofílicos mais prevalentes em condimentos (TANIWAKI e SILVA, 2014). No estudo de SANTOS et al. (2011), com amostras de páprica, páprica defumada e pimenta vermelha, também ocorreu o crescimento de espécies de *Eurotium*. Na pimenta vermelha, das 11 amostras analisadas, 36% dos isolados eram *Eurotium*. Os tipos encontrados nas amostras foram: *E. amstelodami*, *E. chevalieri*, *E. herbariorum*, *E. repens* e *E. rubrum*, sendo o mais comum o *E. amstelodami*. Neste estudo, diferentemente, as espécies mais comuns foram *E. chevalieri* e *E. rubrum*.

Aspergillus section *Nigri* foi o mais frequente (50%) nos três dos 4 tipos de pimentas analisadas (pimenta rosa, pimenta malagueta fresca e pimenta calabresa).

Estudos mais recentes realizados no Brasil com outros tipos de condimentos, tais como alho, alecrim, canela, erva-doce, orégano, pimenta peperoni, pimenta branca e pimenta preta, demonstraram também a ocorrência de *A. flavus* e *A. niger*. Neste trabalho as autores relatam maior diversidade de fungos produtores de toxinas (*A. carbonarius*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. nomius*, *A. parasiticus* e *A. ochraceus*) em pimenta branca e preta (GARCIA et al., 2017). No presente estudo, a pimenta malagueta na forma fresca foi a que apresentou maior diversidade em relação aos

fungos potencialmente toxigênicos, dentre estes *A. section Nigri*, *A. section Flavi* e *A. section Circumdati*.

6. CONCLUSÕES

As pimentas são substratos adequados para o crescimento de diferentes gêneros de fungos, principalmente os *Aspergillus*. Boas práticas de fabricação, devem ser adotadas desde o campo até a comercialização, para este tipo de condimento, e são essenciais para a manutenção tanto da qualidade sensorial como também em relação à segurança alimentar, evitando as condições para o crescimento e desenvolvimento de fungos e conseqüente produção de micotoxinas.

7. REFERÊNCIAS

BOKHARI, Fardos 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.

CARVALHO, SIC de et al. **Pimentas do gênero Capsicum no Brasil**. Brasília: Embrapa Hortaliças. 15p, 2006. Disponível em: <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/Pimenta_capsicum_spp/comercializacao.html> Acesso em: 10 mai 2016.

CORNEJO, F. E.; NOGUEIRA, R. I.; WILBERG, V. C. **Manual para processamento de pimentas desidratadas**. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, p. 9, 2005.

DE todos os sabores e gostos. **A lavoura**. Rio de Janeiro: Sociedade Nacional de Agricultura, v. 119 n. 716, p 8-13, 2016.

DINIZ, S.P.S.S. **Micotoxinas**. 1. ed. São Paulo: Rural, 2002.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Pimenta (Capsicum spp.)**. Brasília: Embrapa Hortaliças, versão eletrônica, 2007. Disponível em:

<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/Pimenta_capsicum_spp/>. Acesso em: out. 2017.

ERDOGAN, Ahmet. **The aflatoxin contamination of some pepper types sold in Turkey**. Chemosphere, v. 56, n. 4, p. 321-325, 2004.

FILTENBORG, O. L. E., FRISVAD, J. C., & SVENDSEN, J. A. **Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures**. Simple Screening Method for Molds Producing Intracellular Mycotoxins in Pure Cultures, v. 45 n.2, p. 581–585, 1983.

FRISVAD, J.C., NIELSEN, K.F.; SAMSON, R.A. **Recommendations concerning the chronic problem of identification of species associated with mycotoxigenic fungi in foods and feeds**. In: HOCKINGS, A.A.; PITT, J.I.; SAMSON, R.A.; THRANE, U. (Ed). Advances in food Mycology, New York: Springer p. 33-46, 2006.

GARCIA, Marcelo Valle; MALLMANN, Carlos Augusto; COPETTI, Marina Venturini. **Aflatoxigenic and ochratoxigenic fungi and their mycotoxins in spices marketed in Brazil**. Food Research International, 2017.

JESWAL, Punam; KUMAR, Dhiraj. **Mycoflora and mycotoxins contamination in spices cultivated in Bihar (India)**. Agricultural Science, Engineering and Technology Research, v.1, n. 5, p. 70-77, 2013.

JESWAL, Punam; KUMAR, Dhiraj. **Mycobiota and natural incidence of aflatoxins, ochratoxin A, and citrinin in Indian spices confirmed by LC-MS/MS**. International Journal of Microbiology, v. 2015, 2015.

KARAASLAN, Mehmet; ARSLANĖRAY, Yusuf. **Aflatoxins B1, B2, G1, and G2 contamination in ground red peppers commercialized in Sanliurfa, Turkey**. Environmental monitoring and assessment, v. 187, n. 4, p. 184, 2015.

KABAK, Bulent; DOBSON, Alan DW. **Mycotoxins in spices and herbs—An update**. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 57, n. 1, p. 18-34, 2017.

KIM, Sunyoung et al. **Comparison of a newly developed liquid chromatography with tandem mass spectrometry method and enzyme-linked immunosorbent assay for detection of multiple mycotoxins in Red pepper powder**. Journal of food protection, v. 80, n. 8, p. 1347-1354, 2017.

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

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

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

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

SANTOS, L. et al. **Mycobiota and co-occurrence of mycotoxins in Capsicum powder**. International journal of food microbiology, v. 151, n. 3, p. 270-276, 2011.

TANIWAKI, M.H.; SILVA, N. **Fungos em alimentos: ocorrência e detecção**. Campinas: Núcleo de Microbiologia/ITAL, 2014.

YOGENDRARAJAH, Pratheeba et al. **Co-occurrence of multiple mycotoxins in dry chilli (*Capsicum annum* L.) samples from the markets of Sri Lanka and Belgium**. Food Control, v. 46, p. 26-34, 2014.

Capítulo 2:

Ocorrência de fungos toxigênicos e ocratoxina A e aflatoxinas em pimenta calabresa (*Capsicum baccatum*), pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*) e pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius*)

RESUMO

Foram analisadas 71 amostras de pimenta vermelha e rosa durante o período de Março de 2016 a Dezembro de 2017, obtidos de estabelecimentos comerciais do Estado de São Paulo, dentre estas, 30 amostras de pimenta calabresa (*Capsicum baccatum*), 11 de pimenta malagueta fresca, 10 de pimenta malagueta em pó (*Capsicum frutescens*) e 20 de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius*). Os fungos potencialmente toxigênicos foram testados em relação à produção de aflatoxinas e ocratoxina A, pelo método de “ágar plug” associado à técnica de cromatografia de camada delgada (CCD). Foi analisada a presença de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ e ocratoxina A nas amostras, utilizando coluna de imunoafinidade e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção de fluorescência. Um total de 503 cepas potencialmente toxigênicas foram isoladas, dentre estas 195 *Aspergillus* section *Flavi* e 36,1% foram capazes de produzir aflatoxinas, 279 *Aspergillus* section *Nigri* e 21,1% foram produtoras de OTA e 20 isolados de *Aspergillus* section *Circumdati*, e 15% das cepas foram produtoras de OTA. As médias de contaminação por aflatoxinas para as amostras de pimenta calabresa, pimenta malagueta fresca e em pó foram de 1,81; 0,53; 0,54 µg/kg respectivamente. E de ocratoxina A foram 2,25; 0,64 e 3,42 µg/kg respectivamente. Para a pimenta rosa, a contaminação foi baixa, com média de aflatoxinas menor que o limite de detecção do método (0,13 µg/kg) e média de ocratoxina de 0,08 µg/kg. A maior contaminação por aflatoxinas e ocratoxina A foi encontrada na amostra de pimenta calabresa, de 17,71 µg/kg e 27,85 µg/kg respectivamente. Todas as amostras analisadas estavam de acordo com a Resolução 07/11 e apresentaram contaminação menor que 20 µg kg⁻¹, para AFLA e 30 µg kg⁻¹ para OTA.

1. INTRODUÇÃO

Micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos, com atividades mutagênicas, carcinogênicas e teratogênicas produzidas por fungos das espécies *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, contaminando os alimentos no campo, durante o armazenamento e transporte, quando as condições de umidade, oxigênio e temperatura são ideais. São termoestáveis, resistentes aos processos térmicos e responsáveis por intoxicações em animais e humanos quando alimentos contaminados são ingeridos (PITT; HOCKING, 1986; COULOMBE, 1991; BENNET & KLICH, 2003; BRASIL, 2011; REINHOLDS, 2017).

As micotoxinas podem estar presentes nos alimentos e seus derivados, sendo um risco em potencial à saúde pública, como também causar perdas econômicas. São metabólitos comumente presentes em sementes, oleaginosas, temperos e grãos (TOSUN & OZDEN, 2015).

Nos condimentos, de maneira geral, a contaminação por espécies fúngicas toxigênicas está relacionada às deficiências em algumas etapas de produção, como na higienização e limpeza, ou na seleção da matéria prima, secagem inadequada e más condições de estocagem (KARAASLAN; ARSLANĞRAY, 2015).

Dentre as micotoxinas de maior relevância estão as aflatoxinas. Elas são consideradas como pertencentes ao grupo 1 da IARC (2002), carcinogênicas para humanos. São produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* dentre estes, *A. flavus* e *A. parasiticus*, e espécies mais recentemente descobertas como produtoras, *A. nomius*, *A. bombycis*, *A. pseudotamari*, *A. ochraceoroseus*, *A. pseudocaelatus* sp. e *A. pseudonomius* sp (KURTZMAN; HORN; HESSELTINE, 1987; YOKO et al., 2001; BENNET; KLICH, 2003; VARGA; FRISVAD; SAMSON, 2011).

A ocratoxina A é produzida pelos fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*, dentre estes *A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *Penicillium verrucosum* e *Penicillium nordicum* (EUROPEAN COMMISSION, 1998; RINGOT et al., 2006), apresentando riscos nefrotóxicos, hepatológicos, neurotóxicos e teratogênicos. São classificados pela IARC (1993) como potencialmente carcinogênicos, enquadrados no grupo 2B. São responsáveis pela contaminação de diferentes grupos de alimentos, incluindo café, cacau e condimentos (EUROPEAN COMMISSION, 2002).

Por ser considerado um problema de saúde pública, alguns órgãos em diferentes países estabelecem limites, tanto para aflatoxinas quanto para ocratoxina A em diferentes grupos de alimentos. Para especiarias, os limites estabelecidos como máximo tolerável são de 5µg/kg para AFB₁ e 10µg/kg para AFLA total, e para OTA o limite é de 15 µg/kg, pela European Commission e de 20 µg kg⁻¹ para aflatoxinas e de 30 µg kg⁻¹ para ocratoxina A pela ANVISA, órgão regulamentador brasileiro (EUROPEAN COMMISSION 2006; BRASIL, 2011).

No Brasil, o cultivo de pimenta faz parte da agricultura familiar e estreita laços com as grandes indústrias (CARVALHO et al., 2006). Por este motivo, muitas etapas do processamento de pimentas são feitas de formas rústica e artesanal. As pimentas são trituradas e secas ao sol, sobre lajes cimentadas ao ar livre por uma semana, sujeitas às mudanças climáticas, que podem influenciar tanto suas características organolépticas, como também o desenvolvimento de micro-organismos (CORNEJO et al., 2005). O clima tropical, característico do local onde as pimentas são produzidas, o que inclui alta temperatura e elevada precipitação, pode favorecer o desenvolvimento de micro-organismos como os fungos (SALARI et al., 2012; YOGENDRARAJAH, 2014).

A presença de fungos toxigênicos, aflatoxinas e ocratoxina A em pimentas é relatada em diferentes estudos. Pimentas analisadas da Arábia Saudita, Índia e Turquia, apresentaram predominância de *Aspergillus*, principalmente *A. flavus* e *A. niger*, potencialmente produtores de aflatoxina e ocratoxina A, respectivamente (BOKHARI, 2007; JESWAL; KUMAR, 2014; TOSUN; OZDEN, 2015). Em amostras de pimenta chilli analisadas por Jeswal & Kumar (2014), as espécies isoladas foram *A. flavus* e *A. ochraceus*, e 56% e 41,6 % dos isolados foram produtores de aflatoxinas e ocratoxina A respectivamente. A contaminação por aflatoxinas e ocratoxina foi verificada em 85,4% e 72,2% das amostras analisadas, com valores máximos de 219,6 ng/g e 97,1 ng/g, respectivamente.

O conhecimento sobre a contaminação de especiarias por micotoxinas é importante para a regulamentação e estabelecimento de limites em cada país. A disponibilidade de dados, que ainda são escassos aqui no Brasil, é de grande importância e aumenta as informações sobre a ocorrência e distribuição destes contaminantes nestes alimentos no país.

2. OBJETIVOS

Isolar e quantificar espécies de *Aspergillus* section *Flavi*, *Aspergillus* section *Nigri* e *Aspergillus* section *Cicumdati* presentes nas pimentas do gênero *Capsicum* e pimenta rosa, identificar as cepas potencialmente produtoras de toxinas e avaliar a presença de aflatoxinas e ocratoxina A nas amostras do gênero *Capsicum* (*baccatum* e *frutescens*) e pimenta rosa (*Schinus terenbithifolius*)

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras

Foram adquiridas amostras a granel, de 150 g a 250 g, em mercados de Campinas/SP, Sorocaba/SP e São Paulo/SP, no período de Março/2016 - Dezembro/2017, sendo: 20 amostras de pimenta rosa (*Schinus terenbinthifolius*), 30 amostras de pimenta, 10 amostras de pimenta calabresa (*Capsicum baccatum*), 10 amostras de pimenta malagueta em pó (*Capsicum frutescens*) e 11 amostras de pimenta malagueta fresca (*Capsicum frutescens*).

As pimentas foram analisadas no laboratório de micologia e micotoxinas do Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos (CCQA), localizado no Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), em Campinas/SP.

3.2 Atividade de água das amostras

A atividade de água de cada amostra de pimenta foi medida com o aparelho Aqualab (Decagon, Devices Inc., Pullman, WA) em triplicata a 25°C ($\pm 1^\circ\text{C}$).

3.3 Amostras em grãos e pedaços (pimenta rosa e pimenta malagueta fresca) - plaqueamento direto

O plaqueamento dos grãos e pedaços foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Pitt & Hocking (2009), na qual as amostras foram submetidas à desinfecção superficial em hipoclorito de sódio 0,4% durante 2 minutos. Os pedaços da pimenta malagueta foram cortados com auxílio de um bisturi, em ambiente estéril, tomando-se o cuidado de selecionar os pedaços de 50 pimentas diferentes. Para cada amostra 5 placas de Petri contendo o meio *Dichloran 18% Glycerol Agar* (DG18) foram utilizadas, distribuindo 50 grãos ou pedaços dos frutos no total e incubadas a 25° C por 7 dias. A infecção fúngica foi expressa em porcentagem de grãos/pedaços infectados.

3.5 Amostras em pó –diluição

De cada uma das amostras de pimenta vermelha em pó, foram pesados 25 g e diluídos em 225 mL de água peptonada a 0,1% e homogeneizados em Stomacher (Stomacher Laboratory Blender 400, Seward Medical). A partir desta primeira diluição foram preparadas as demais diluições decimais, plaqueando uma alíquota de 0,1 mL em placas Petri contendo o meio DG18, em superfície, e incubadas a 25° C por 7 dias. Caso não houvesse crescimento de bolores, o ensaio foi repetido, diminuindo o limite de detecção do método e plaqueando 1mL da primeira diluição. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por grama da amostra (UFC/g).

3.6 Isolamento e identificação dos fungos

Os fungos foram inicialmente isolados em meio Czapek Yeast Extract Agar (CYA), e as placas incubadas por 5 dias a 25° C para a purificação das colônias. A partir desta etapa, os isolados de *Aspergillus* foram inoculados em três pontos

equidistantes em meio CYA e incubados a 25°C e 37°C por 7 dias, de acordo com PITT & HOCKING, 2009, SAMSON et al. 2010.

Para todos os fungos foram avaliadas as características morfológicas, microscópicas e macroscópicas observadas, tais como: forma e tamanho dos conídios, coloração, textura, estrutura, presença de exsudado e reverso das colônias e seguiu-se as chaves de classificação de Klich & Pitt (1988) para as espécies de *Aspergillus*.

3.7 Potencial toxigênico das cepas – Aflatoxinas e ocratoxina A

A partir dos resultados da microbiota, foram analisados o potencial toxigênico nos isolados. Para avaliar a produção de aflatoxinas B₁ B₂ G₁ e G₂ e OTA, as cepas de *Aspergillus section Flavi*, *Aspergillus section Nigri* e *Aspergillus section Cicumdati* foram isoladas em meio YESA (Yeast Extrat Sucrose Agar) em três pontos equidistantes e incubadas a 25°C por 7 dias. As cepas de *Aspergillus section Flavi* também foram isoladas em meio AFPA (Aspergillus Flavus and Parasiticus Agar) em três pontos equidistantes e incubada a 25°C por 7 dias e observando se havia a formação de uma pigmentação amarelo-laranja no reverso das colônias. O teste do potencial toxigênico foi realizado através da técnica de ágar plug e cromatografia de camada delgada (CCD), descrita por Filtenborg, Frisvad e Svendensen (1983), que consiste em remover um pedaço de ágar da placa de YESA e extrair as toxinas com uma mistura de 1:1 clorofórmio:metanol. Os pedaços recortados foram aplicados na placa de sílica gel (Merck, Darmstadt, Alemanha), com medidas de 20x10cm, juntamente com os padrões de aflatoxinas e ocratoxina A. Seguiu-se a separação das toxinas em uma cuba com a fase móvel tolueno: acetato de etila: ácido fórmico: clorofórmio (7:5:2:5 v/v/v/v), por 20 minutos.

A leitura foi realizada em câmara UV nos comprimentos de onda 365nm e 254nm, de maneira qualitativa, comparando o fator de retenção, cor e intensidade da fluorescência das cepas em relação ao padrão.

3.7 Análise de aflatoxinas e ocratoxina A

3.7.1 Aflatoxinas

A análise de aflatoxinas foi realizada de acordo com Stroka et al. (2000) com algumas modificações.

Foram pesados 12,5 g da amostra triturada em moinho (IKA, Brasil) adicionando 1,25 g de NaCl e 75 mL de Metanol:Água, na proporção 8:2, para as amostras de pimenta calabresa, pimenta malagueta em pó e pimenta malagueta fresca. Para a amostra de pimenta rosa, o solvente de extração utilizado foi acetonitrila. O conteúdo foi agitado por 30 minutos em agitador horizontal (New Brunswick Scientific Company, EUA), e todo o volume foi filtrado primeiramente em papel filtro quantitativo e depois em filtro de vidro qualitativo. Em seguida, 10 mL do filtrado foram misturados com 60 mL de tampão PBS (pH= 7,0). Todo o conteúdo foi passado pela coluna de imunoafinidade AflaTest WB (Vicom, Suécia), com fluxo de 1 gota por segundo. A toxina foi eluída com metanol grau HPLC em duas etapas, com 500µL seguido de 750 µL e 1750 µL de água destilada foi unida à solução. O extrato foi recolhido em frasco âmbar, e mantido sob congelamento até a detecção.

3.7.2 Ocratoxina A

A análise de ocratoxina A foi realizada de acordo com Vargas et. al., 2005, com algumas modificações

Foram pesados 12,5 g de cada amostra triturada em moinho (IKA, Brasil) e adicionados 100 mL de Metanol:Bicarbonato 3%. O conteúdo foi agitado por 30 minutos em um agitador horizontal (New Brunswick Scientific Company, EUA) e a solução filtrada primeiramente em papel filtro quantitativo e depois em filtro de vidro qualitativo (Vicom, Suécia). Em seguida, 4 mL do filtrado foram transferidos para um balão volumétrico contendo 100 mL de PBS. O obtido foi transferido para uma coluna de imunoafinidade OchraTest (Vicom, Suécia), com fluxo de 1 gota por segundo. O balão foi lavado com 30 mL de água ultrapura (Millipore, França). A coluna foi eluída com 1mL de Metanol grau HPLC, quatro vezes, completando 4 mL. O extrato foi

recolhido em frasco âmbar, e o conteúdo seco com nitrogênio líquido e mantido sob congelamento até a detecção.

3.7.3 Determinação de Micotoxinas – parâmetros CLAE

Para a determinação das micotoxinas AFLA e OTA presentes nas diferentes amostras de pimenta, foi utilizado o Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência da marca Agilent 1260 Infinity LC System (Agilent, EUA), com detector de fluorescência. O volume injetado foi de 20 µL.

Para AFLA, a separação cromatográfica foi feita com a utilização de coluna C18 4.6x150mm, 5µm (Agilent, EUA) e pré-coluna C18 4.6x20mm, fase móvel água: acetonitrila: metanol (6:2:3, v/v/v), com brometo de potássio (119 mg/L) e ácido nítrico (4M, 350 µL/L), fluxo isocrático de 1 mL/min. A temperatura atingida pela coluna foi de 40° C e as condições para a detecção de fluorescência de 362nm (excitação) e 455nm (emissão). Para a derivatização das toxinas AFB₁ e AFG₁, foi associado o Kobracell (R-Biopharm, Alemanha). O tempo de corrida para as amostras foi de 8 min.

Para OTA foi utilizada coluna C18 4.6x100mm, 3,5µm (Agilent, EUA) para a separação cromatográfica (Agilent, EUA), fase móvel de água, metanol, acetonitrila e ácido acético (39:30:30:01), respectivamente, com fluxo isocrático de 0,8 mL/min. A temperatura da coluna foi de 40°C e o tempo de corrida foi de 16 min.

3.7.4 Otimização da metodologia de aflatoxinas e ocratoxina A nas pimentas

Para a otimização da metodologia, apenas amostras de pimenta calabresa sem contaminação foram fortificadas com padrões de aflatoxinas e ocratoxina A, em dois níveis, em triplicata. Para AFLA, os níveis de contaminação utilizados foram de 5 µg/kg e 15 µg/kg, e para OTA os níveis foram de 7 µg/kg e 30µg/kg. A partir destes resultados foram calculados os valores de recuperação para cada nível. Foram calculados os limites de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) de acordo com Eurachem (2014), realizando 8 extrações de amostras fortificadas com níveis

baixos de aflatoxinas e ocratoxina A e cálculo do desvio padrão e desvio padrão relativo.

A cada dia de ensaio foi realizado um controle com uma amostra fortificada com cada micotoxina e os valores de recuperação avaliados. Para os demais tipos de pimentas, foi realizado um controle diário e os valores de recuperação obtidos.

4. RESULTADOS

Na tabela 1 encontram-se os valores médios da atividade de água das amostras. Com exceção da pimenta malagueta fresca, todas as demais apresentaram baixa atividade de água.

Tabela 1. Aa das amostras de pimenta rosa, pimenta calabresa, pimenta malagueta em pó e pimenta malagueta fresca

Pimentas	Varição	Média
Pimenta Rosa	0,373-0,747	0,533
Pimenta Calabresa	0,446-0,786	0,560
Pimenta Malagueta em pó	0,305-0,554	0,491
Pimenta Malagueta Fresca	0,548-0,992	0,945

A tabela 2 apresenta os fungos toxigênicos isolados das amostras e a porcentagem de cepas produtoras.

Tabela 2. Fungos produtores de AFLA e OTA (número de isolados e porcentagem de produtores) em pimenta rosa, pimenta calabresa, pimenta malagueta em pó e pimenta malagueta fresca.

FUNGOS	PIMENTA ROSA		PIMENTA CALABRESA		PIMENTA MALAGUETA EM PÓ		PIMENTA MALAGUETA A FRESCA		TOTAL	
	n	%	N	%	n	%	n	%	n	%
	<i>Aspergillus section Flavi</i>	3	0	104	4,8	1	0	96	31,3	204
<i>Aspergillus section Nigri</i>	53	0	135	0	1	0	90	21,1	279	6,8
<i>Aspergillus section Cirdumdati</i>	0	0	0	0	0	0	20	15	20	75,0

Das 71 amostras de pimenta analisadas, foi isolado um total de 503 cepas potencialmente toxigênicas, sendo *Aspergillus* section *Flavi* (n=195), *Aspergillus* section *Nigri* (n=279) e *Aspergillus* section *Circumdati* (n=20).

As espécies toxigênicas de maior ocorrência foram *Aspergillus* section *Nigri* e *Aspergillus* section *Flavi*, principalmente nas amostras de pimenta calabresa e pimenta malagueta fresca. *Aspergillus* section *Circumdati* foi isolado apenas de pimenta malagueta fresca. Além destas espécies, foi isolado *Aspergillus tamarii* de pimenta rosa e pimenta malagueta fresca, contudo a contaminação por estas espécies foi baixa (n=9). Os isolados não foram produtores de aflatoxinas.

Tabela 3. Frequência de ocorrência (%), média de infecção fúngica (%), mediana (%) e variação de contaminação por *Aspergillus* section *Nigri*, *Aspergillus* section *Flavi* e *Aspergillus* section *Circumdati* nas amostras de pimenta rosa e pimenta malagueta fresca

Amostras	Fungos	FO (%)	Média de infecção (%)	Varição (%)
Pimenta rosa (n=20)	<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	3,3	0,3	0-6
	<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	50	5,3	0-20
Pimenta magueta fresca (n=12)	<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	25,0	16,0	0-90
	<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	50,0	15,0	0-74
	<i>Aspergillus</i> section <i>Circumdati</i>	8,3	3,3	0-40

FO = Frequência de ocorrência % (número de amostras com a espécie/total de amostras avaliadas)

Tabela 4. Frequência de ocorrência (%), média de contaminação fúngica (UFC/g), mediana (UFC/g) e variação de contaminação por *Aspergillus* section *Nigri*, *Aspergillus* section *Flavi* e *Aspergillus* section *Circumdati* nas amostras de pimenta calabresa e pimenta malagueta em pó

Amostras	Fungos	FO (%)	Média (UFC/g)	Varição (UFC/g)
Pimenta malagueta em pó (n=11)	<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	9	<10	<10-1x10 ²
	<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	9	<10	<10-1x10 ²

Pimenta calabresa (n=30)	<i>Aspergillus section Flavi</i>	40	20	<10-3x10 ⁴
	<i>Aspergillus section Nigri</i>	50	42	<10-3x10 ⁴

FO = Frequência de ocorrência % (número de amostras com a espécie/total de amostras avaliadas)

A pimenta calabresa foi a amostra que apresentou maior número de amostras contaminadas por *Aspergillus section Flavi* e *Aspergillus section Nigri*. Estas espécies estiveram presentes em 40 e 50% das amostras respectivamente. Um total de 239 cepas foram isoladas (104 *A. section Flavi* e 135 *A. section Nigri*) e, embora a frequência de ocorrência tenha sido alta, a média de contaminação foi baixa, de 20 e 42UFC/g respectivamente, conforme apresenta a tabela 4.

A. section Flavi e *A. section Nigri* estiveram também presentes nas amostras de pimenta malagueta fresca, com frequência de ocorrência de 25% e 50%, respectivamente. A maior frequência de cepas produtoras foi obtida nesta amostra, 31,3% dos isolados de *A. section Flavi* foram produtores de aflatoxinas, 21,1% dos isolados de *A. section Nigri* foram produtores de ocratoxina A e 15% das cepas de *A. section Circumdati* foram produtores de ocratoxina A. Para a pimenta calabresa, apenas 4,8% dos isolados de *A. section Flavi* foram produtores de aflatoxinas e nenhum isolado de *A. section Nigri* foi produtor de ocratoxina A.

A tabela 5 apresenta os valores de recuperação de aflatoxinas e ocratoxina A nas amostras analisadas para cada nível testado.

A Diretiva da Comunidade Europeia nº1881/2006 dispõe que os resultados dos valores recomendados para AFTOTAL nos diferentes níveis são: 50-120% para <1,0µg/kg; 70- 110% para 1,0-10µg/kg e 80-110% >10µg/kg. Nos dois níveis testados (5,0 µg/kg e 15µg/kg), todos os valores de recuperação foram considerados satisfatórios. Para OTA, a Diretiva nº401/2006 da Comunidade Europeia (EC) estabelece para níveis <1,0µg/kg: 50-120% e para 1,0-10µg/kg: 70-110%. Para os dois níveis testados (7 µg/kg e 30 µg/kg), os resultados obtidos foram satisfatórios.

Tabela 5. Ensaios de recuperação de aflatoxinas e ocratoxina A

	Concentração (ng/g)	Recuperação (%)				Concentração (ng/g)	Recuperação (%)			
		rep 1	rep 2	rep 3	Média		rep 1	rep 2	rep 3	Média
B1	0,34	96,13	113,29	89,26	99,56	1,02	91,55	90,40	92,69	91,55
B2	0,31	94,19	104,36	98,26	98,93	0,93	91,09	87,02	91,09	89,73
G1	0,20	98,27	114,80	103,78	105,61	0,59	98,81	95,20	97,04	97,02
G2	0,12	55,70	65,23	64,50	61,81	0,37	70,85	65,96	70,85	69,22
Total	0,97	90,82	104,65	91,93	95,80	2,91	90,25	87,20	90,29	89,24
OTA	0,88	87,68	90,82	100,23	92,91	3,79	97,29	75,34	81,48	84,70

Os limites de detecção (LOD) obtidos para aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ foram de 0,05; 0,05; 0,03 e 0,01 µg/kg respectivamente e de 0,013 µg/kg para aflatoxinas totais. E os limites de quantificação (LOQ) foram de 0,10; 0,16; 0,08 e 0,03 µg/kg, respectivamente e para aflatoxinas totais de 0,43 µg/kg. Para a ocratoxina A o LOD foi de 0,07 µg/kg e o LOQ 0,24 µg/kg.

Na tabela 6 estão apresentados os resultados de AFLA e OTA das amostras de pimenta analisadas.

A contaminação por aflatoxinas e ocratoxina A foi maior nas amostras de pimenta calabresa, confirmando com a maior contaminação por cepas de *Aspergillus* section *Flavi* e *Aspergillus* section *Nigri*. 63% e 73% das amostras de malagueta em pó e 68% e 71% das amostras de calabresa apresentaram contaminação por AFLA e OTA, respectivamente. Em relação à pimenta rosa a frequência de amostras contaminadas pelas mesmas toxinas foi bem mais baixa, 95% não apresentaram contaminação por AFLA e a média de contaminação por OTA foi baixa, de 0,08 µg/Kg, próxima ao limite de detecção do método (0,07 µg/Kg).

A frequência de AFLA e OTA foi maior na amostra de pimenta malagueta em pó, e mais de 60% das amostras apresentaram alguma contaminação, quando comparada à amostra fresca (8,3% AFLA e 25% OTA). A média de contaminação por OTA foi também maior, de 3,4 µg/Kg para a amostra seca e 0,64 µg/Kg para fresca. Este fato pode ser explicado pela alta contaminação de fungos produtores de aflatoxinas e ocratoxina A na amostra fresca. Estes estando presentes e havendo possibilidade de crescimento, podem produzir estas toxinas que permanecem no produto seco.

Tabela 4. Média, mediana variação e frequência de ocorrência de aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂ e totais e ocratoxina A em pimentas rosa, malagueta fresca, malagueta em pó e calabresa.

		B1	B2	G1	G2	Total	OTA
Rosa	Média (ng/g)	<LD	<LD	ND	ND	<LD	0,08
	Mediana (ng/g)	ND	ND	ND	ND	ND	<LD
	Variação	ND-0,29	ND-0,07	ND	ND	ND-0,37	ND-0,72
	FO (%)	5,00	5,00	-	-	5,00	45,00
Malagueta fresca	Média (ng/g)	0,51	<LD	ND	ND	0,53	0,64
	Mediana (ng/g)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Variação	ND-6,17	ND-0,17	ND	ND	ND-6,34	ND-0,27
	FO (%)	8,33	8,33	-	-	8,33	25,00
Malagueta em pó	Média (ng/g)	0,31	0,13	0,07	0,03	0,54	3,42
	Mediana (ng/g)	0,28	0,17	ND	ND	0,56	2,38
	Variação	ND-0,84	ND-0,27	ND-0,53	ND-0,13	ND-1,38	ND-8,88
	FO (%)	63,64	63,64	27,27	27,27	63,64	72,73
Calabresa	Média (ng/g)	1,68	0,11	0,01	<LD	1,81	2,25
	Mediana (ng/g)	0,30	ND	ND	ND	0,37	0,58
	Variação	ND-16,55	ND-1,15	ND-0,17	ND-0,14	ND-17,71	ND-27,85
	FO (%)	67,74	35,48	6,45	3,23	67,74	70,97

Limite de detecção de aflatoxinas (LD): B₁, B₂, G₁, G₂ e Total: 0,05, 0,05, 0,03, 0,01 e 0,015 ng/g; OTA: 0,07 ng/g

5. DISCUSSÃO

Neste estudo foram isolados três grupos de fungos potencialmente produtores de toxinas: *A. section Flavi*, *A. section Nigri* e *A. section Circumdati*. Dentre estes, os mais comuns foram *A. section Nigri* e *A. section Flavi*. A presença destes fungos toxigênicos e de aflatoxinas e ocratoxina A em pimentas já foi relatada em diversos estudos em diferentes países (ERDOGAN, 2004; SALARI et al., 2012, JESWAL & KUMAR, 2014; KARAASLAN, ARSLANGRAY, 2015; KIM et al.; TOSUN & OZDEN, 2015; SINGH & COTTY, 2017).

Bokrari (2007), analisando amostras de pimenta vermelha, encontrou predominância de fungos do gênero *Aspergillus*, dentre estes os mais comuns, o *A. niger*, seguido de *A. flavus*. Apesar da presença destas espécies, não foi detectada a

ocratoxina A e aflatoxinas nas amostras, e sim a esterigmatocistina, em níveis variando de 11 a 25 µg/Kg.

Pimentas em flocos e em pó estudadas por Erdogan (2004) apresentaram contaminação por *A. niger* (59,1%) e *A. flavus* (52,3%) em pimenta em flocos e *A. niger* (57,7%) em pimenta em pó. Comparando com o nosso estudo, a frequência ocorrência de amostras de pimenta calabresa contaminadas com *Aspergillus section Flavi* e *A. section Nigri* foi semelhante, de 40 e 50% respectivamente. O autor realizou a investigação apenas de aflatoxinas nas amostras e obteve 16% das amostras contaminadas, variando de 1,1 a 97,5 µg/Kg.

AFB₁ é uma das toxinas mais preocupantes, por seus efeitos hepatocarcinogênicos. O máximo tolerável em especiarias é de 20 µg/kg, segundo a Resolução 07/11. Apenas uma amostra de pimenta calabresa apresentou valor próximo ao limite, de 16,5 µg/Kg. Comparando com dados da literatura, alguns autores relatam grau de contaminação semelhante ou maior.

Ikoma et al. (2015) detectaram a presença de AFB₁ em apenas 3 amostras de pimenta vermelha, contudo com valores abaixo dos estabelecidos pela comunidade europeia (<5µg/Kg). Já nas amostras de pimenta vermelha moída analisadas por Karaaslan e Arslangray (2015), 36,8% das amostras estavam acima dos limites estabelecidos pela EC.

Os valores encontrados por Kim et al. (2017) para pimenta vermelha em pó foram baixos, com uma concentração média de AFB₁ de 0,64 µg/kg e apenas 7,14% das amostras contaminadas por AFLA.

O maior valor de AFTOTAL (17,7µg/kg) obtido neste estudo foi bem menor quando comparado à 219,6µg/kg, obtido em amostras de pimenta vermelha analisadas por Jeswal e Kumar (2014). Das 55 amostras de pimenta chilli analisadas por estes autores, 47 estavam contaminadas com AFTOTAL e 85,4% delas estavam contaminadas com quantidades mais elevadas que as estabelecidas pela comunidade europeia. Nas pimentas Chilli estudadas pelos autores, a contaminação por OTA foi elevada, 72% das amostras apresentaram contaminação, sendo o maior valor quantificado de toxina de 97,1µg/kg.

Das amostras de Saliurfa, na Turquia, 90% foram positivas para AFLA, e 34% excederam os limites aceitáveis de contaminação. A maior concentração em $\mu\text{g}/\text{kg}$ foi de 86,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, demonstrando a alta contaminação das amostras desta região e comprovando um risco alto de consumo das mesmas. Os níveis mais elevados, segundo os autores, podem ser decorrentes das altas temperaturas na região onde esses condimentos são produzidos, junto ao armazenamento em embalagens plásticas, que mantém os níveis de umidade na amostra.

OTA foi a toxina mais comumente presente nas amostras avaliadas (60,6 %). A co-ocorrência das toxinas avaliadas neste estudo foi relativamente baixa, presente em 24 do total de amostras de pimentas analisadas (33,8%), outros estudos, como o realizado por Santos et al. (2010) quanto a co-ocorrência de AFLA, OTA e zearalenona em 35 amostras de pimentas do mercado espanhol, obtiveram 65% de amostras com mais de uma toxina. A ocorrência de AFLA e OTA pode ocorrer concomitantemente, já que ambas são produzidas nas etapas de processamento e estocagem. Neste estudo, pimenta malagueta em pó a maior ocorrência de AFLA e OTA simultaneamente (72,7%). No estudo sobre co-ocorrência de AFLA e OTA em pimentas em pó e em flocos analisadas por OZBEY & KABAK (2012), demonstrou que quando as amostras apresentavam altos índices de contaminação por OTA, também apresentavam por AFLA. A combinação de mais toxinas pode viabilizar a potencialização do seu efeito tóxico. No caso das amostras do presente estudo este padrão não se repetiu. Amostras com contaminações elevadas por uma das duas toxinas apresentaram valores menores de contaminação pela outra.

A co-ocorrência de AFLA e OTA neste estudo foi verificada em apenas 34% do total das amostras analisadas, diferentemente dos resultados de OZBEY & KABAK (2012), destacando a pimenta malagueta em pó com 73% de co-ocorrência, e a pimenta calabresa, com 45%. Apenas 1 amostra de pimenta rosa e pimenta malagueta fresca apresentaram contaminação de OTA e AFLA a níveis detectáveis. A amostra de pimenta malagueta fresca que apresentou co-ocorrência de AFLA e OTA, foi a única amostra contaminada para este tipo de pimenta, e a concentração obtida foi 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para cada micotoxina. A contaminação da amostra ainda na condição fresca, pode ter sido decorrente do desenvolvimento do fungo ainda na planta ou durante o transporte e armazenamento do produto.

As amostras de pimenta calabresa analisadas neste estudo apresentaram maior contaminação por OTA (71%), e a maior concentração encontrada foi de 27,8 µg/Kg. Nesta amostra não houve contaminação por AFLA. De acordo com a Resolução 07/11, esse valor está dentro do limite tolerado para ocratoxina A em especiarias, porém bem próximo do limite de 30 µg/Kg. O elevado grau de contaminação por ambas as toxinas, AFLA e OTA, em amostras de pimenta calabresa, pode ter correlação às más condições de secagem das mesmas. A produção de pimenta calabresa no Brasil ocorre a partir da pimenta dedo-de-moça fresca. Como a maioria é realizada por pequenos produtores e de forma artesanal, neste caso as condições podem não ser padronizadas e controladas e este fato pode contribuir para o desenvolvimento de fungos e conseqüentemente das toxinas produzidas por eles.

6. CONCLUSÃO

As pimentas são susceptíveis ao crescimento de diferentes tipos de fungos toxigênicos, contudo a presença destes fungos não necessariamente está relacionada à presença de substâncias tóxicas. Neste estudo os níveis de aflatoxinas e ocratoxina A nas amostras foram baixos, dentro dos limites estabelecidos pela Resolução 07/11. Apesar disso, é extremamente importante a manutenção das boas práticas durante as etapas da pré e pós-colheita, para promover a redução da contaminação por estas micotoxinas em especiarias, controlando a qualidade e segurança destes alimentos e diminuindo o risco aos seus consumidores.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* v.16, n.3, p. 497–516, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil Brasília, DF, 22 fev. 2011a. Seção 1, p. 72.

CARVALHO, SIC de et al. Pimentas do gênero *Capsicum* no Brasil. **Brasília: Embrapa Hortaliças. 15p,** 2006. Disponível em: <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/Pimenta_capsicum_spp/comercializacao.html> Acesso em: 10 mai 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.

CORNEJO, F. E.; NOGUEIRA, R. I.; WILBERG, V. C. Manual para processamento de pimentas desidratadas. **Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos**, p. 9, 2005.

COULOMBE, R.A. Aflatoxins. In: Sharma, R.P.; Salunkhe, D.K. *Mycotoxins and phytoalexins*. Boca Raton: CRC Press. p.103-143, 1991.

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

FILTENBORG, O. L. E., FRISVAD, J. C., & SVENDSEN, J. A. *Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures*. **Simple Screening Method for Molds Producing Intracellular Mycotoxins in Pure Cultures**, v. 45 n. 2, p. 581–585, 1983

GARCIA, Marcelo Valle; MALLMANN, Carlos Augusto; COPETTI, Marina Venturini. *Aflatoxigenic and ochratoxigenic fungi and their mycotoxins in spices marketed in Brazil*. **Food Research International**, 2017.

KARAASLAN, Mehmet; ARSLANĖRAY, Yusuf. *Aflatoxins B1, B2, G1, and G2 contamination in ground red peppers commercialized in Sanliurfa, Turkey*. **Environmental monitoring and assessment**, v. 187, n. 4, p. 184, 2015.

KLICH, M. A.; PITT, J. I. *A Laboratory Guide to common Aspergillus species and their Teleomorphs*. CSIRO Division of Food Science Tecnology: Sydney, Australia, 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.

MONSON, Melissa S.; COULOMBE, Roger A.; REED, Kent M. *Aflatoxicosis: lessons from toxicity and responses to aflatoxin B1 in poultry*. **Agriculture**, v. 5, n. 3, p. 742-777, 2015.

OZBEY, Fatih; KABAK, Bulent. *Natural co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in spices*. **Food Control**, v. 28, n. 2, p. 354-361, 2012.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. *Mycotoxins in foods: implications for human health*. In: WAHLQVIST, M. L.; TRUSWELL, A. S. (Ed.). **Recent advances in clinical nutrition**. London: John Libby, p. 161-168, 1986.

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

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

REINHOLDS, Ingars et al. *Mycotoxins, pesticides and toxic metals in commercial spices and herbs*. **Food Additives & Contaminants: Part B**, v. 10, n. 1, p. 5-14, 2017.

SALARI, Rosita et al. *Assessment of the microbiological quality and mycotoxin contamination of Iranian red pepper spice*. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 14, 2012.

SANTOS, L. et al. *Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in Capsicum powder samples available on the Spanish market*. **Food Chemistry**, v. 122, n. 3, p. 826-830, 2010.

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

SINGH, Pummi; COTTY, Peter J. *Aflatoxin contamination of dried red chillies: Contrasts between the United States and Nigeria, two markets differing in regulation enforcement*. **Food control**, v. 80, p. 374-379, 2017.

STROKA, J., ANKLAM, E., JORISSEN, U. & GILBERT, J. *Immunoaffinity Column cleanup with liquid chromatography using post-column bromination for determination of aflatoxins in peanut butter, pistachio paste, fig paste and paprika*

powder: collaborative study. Journal of the Association of Official Analytical Chemists International, 83, 320–340, 2000.

TANIWAKI, M.H.; SILVA, N. Fungos em alimentos: ocorrência e detecção. Campinas: Núcleo de Microbiologia/ITAL, 2014.

TOSUN, Alperen; OZDEN, Sibel. *Ochratoxin A in red pepper flakes commercialised in Turkey. Food Additives & Contaminants: Part B*, v. 9, n. 1, p. 46-50, 2016.

VARGAS, E.A.; SANTOS, E.A. & PITTET, A. *Determination of ochratoxin A in green coffee by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatography collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, v. 58, p. 773-779, 2005.

VARGA, J.; FRISVAD, Jens Christian; SAMSON, R. A. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. **Studies in Mycology**, v. 69, p. 57-80, 2011.

YOGENDRARAJAH, Pratheeba et al. *Co-occurrence of multiple mycotoxins in dry chilli (*Capsicum annum L.*) samples from the markets of Sri Lanka and Belgium. Food Control*, v. 46, p. 26-34, 2014.

YOKO, I. T. O. et al. *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*. **Mycological Research**, v. 105, n. 2, p. 233-239, 2001.

CONCLUSÃO GERAL

No presente trabalho foram obtidas as seguintes conclusões:

- Os fungos mais comuns presentes em pimenta vermelha seca (*Capsicum frutescens* e *Capsicum baccatum*) foram *Aspergillus* section *Nigri*, *Eurotium chevalieri*, *Eurotium rubrum*, *Aspergillus* section *Flavi*. Em pimenta vermelha fresca (*Capsicum frutescens*) o principal grupo foi o de fungos dematiáceos, *Aspergillus* section *Nigri* e *Aspergillus* section *Flavi*. Para a pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius*), as principais espécies foram *Aspergillus* section *Nigri*, *Eurotium rubrum* e *Eurotium chevalieri*;
- Todos os tipos de pimentas apresentaram amostras com contaminação por fungos potencialmente toxigênicos, dentre estes da seção *Nigri* e *Flavi*. Destacando a pimenta malagueta fresca que apresentou a maior contaminação por cepas produtoras de aflatoxinas e ocratoxina A;
- A amostra de pimenta calabresa e malagueta em pó apresentaram maiores níveis de contaminação por aflatoxinas e ocratoxina A, com média de 1,81 e 2,25 µg/Kg e 0,54 e 3,42 µg/Kg;
- Todas as amostras analisadas estavam de acordo com os limites de aflatoxinas e ocratoxina A estabelecidos pela RDC 07/11. Contudo duas amostras de pimenta calabresa apresentaram níveis de contaminação de aflatoxinas (16,5 µg/Kg) e ocratoxina A (27,8 µg/Kg) próximos dos limites estabelecidos pela referida legislação, de 20 e 30 µg/Kg, respectivamente.
- A ocorrência de amostras de pimentas contaminadas por aflatoxinas e ocratoxina A no mercado e a incidência de fungos potencialmente produtores nestes alimentos, indica o potencial de risco para a saúde pública dos seus consumidores. Desta maneira confirma-se a necessidade de adoção de boas práticas durante a produção de pimentas, principalmente o monitoramento dos níveis de umidade durante toda a sua cadeia produtiva.