

# Estudio de la flora fúngica de pimientas en grano

Martins, Jorge Luis; Zapata de Basílico, María de la Luz; Chiericatti, Carolina Andrea; Basílico, Juan Carlos

Cátedra de Microbiología – Dpto. Ingeniería en alimentos – Facultad de Ingeniería Química – U.N.L. – Santiago del Estero 2829 – 3000 Santa Fe (Argentina) – Fax: 0342 – 4571162 – e-mail: jcbasili@fiqus.unl.edu.ar

**RESUMEN:** Se cuantificó e identificó la flora fúngica contaminante de muestras de pimienta blanca (PB), pimienta verde (PV) y pimienta negra (PN) que se comercializan a granel procedentes de Brasil. Se evaluó la carga fúngica total:  $\log_{10}$  Unidades Formadoras de Colonias ( $\log_{10}$  UFC/g) y la frecuencia de granos (%) contaminados: PB  $6.70 \pm 6.84 \log_{10}$  UFC/g ( $98.4 \pm 2.7\%$ ), PV  $5.67 \pm 5.32 \log_{10}$  UFC/g ( $83.3 \pm 23.0\%$ ) y PN  $5.34 \pm 5.51 \log_{10}$  UFC/g (100%) respectivamente. Para evaluar la contaminación interna, los granos fueron previamente desinfectados con hipoclorito de sodio (0.05% de cloro activo) durante 2 min, los valores obtenidos se redujeron a: PB  $4.84 \pm 5.05 \log_{10}$  UFC/g ( $61.9 \pm 45.4\%$ ), PV  $4.32 \pm 3.72 \log_{10}$  UFC/g ( $5.5 \pm 4.9\%$ ) y PN  $3.41 \pm 2.70 \log_{10}$  UFC/g ( $73.0 \pm 42.7\%$ ) respectivamente.

Los principales géneros fúngicos encontrados fueron *Aspergillus* y su teleomorfo asociado *Eurotium*, seguido de *Mucor*, *Penicillium*, *Paecilomyces* y Demateaceas. Las principales especies potencialmente toxicogénicas encontradas fueron: *Aspergillus flavus*, *A. versicolor* y *A. ochraceus*.

**Palabras Claves:** Hongos - pimientas.

**SUMMARY:** Fungal microflora of samples of white (PB), green (PV) and black (PN) pepper was quantified and identified. Martins, Jorge Luis; Zapata de Basílico, Maria de la Luz; Chiericatti, Carolina Andrea; Basílico, Juan Carlos. These samples were taken from bulk productions proceeding from Brasil. Total fungal contents:  $\log_{10}$  Colony Forming Units for g ( $\log_{10}$  CFU/g) and frequency (%) were determined and the results were:  $6.70 \pm 6.84 \log_{10}$  CFU/g ( $98.4 \pm 2.7\%$ ) for PB,  $5.67 \pm 5.32 \log_{10}$  CFU/g ( $83.3 \pm 23.0\%$ ) for PV and  $5.34 \pm 5.51 \log_{10}$  CFU/g (100%) for PN respectively. To determine their internal contamination, grains were previously disinfected with sodium hypochlorite (0.05% active chloride) for 2 min. The contamination was reduced to  $4.84 \pm 5.05 \log_{10}$  CFU/g ( $61.9 \pm 45.4\%$ ) for PB,  $4.32 \pm 3.72 \log_{10}$  CFU/g ( $5.5 \pm 4.9\%$ ) for PV and  $3.41 \pm 2.70 \log_{10}$  CFU/g ( $73.0 \pm 42.7\%$ ) for PN respectively.

The main fungals genera isolated were *Aspergillus* and its associated teleomorph *Eurotium* followed by *Mucor*, *Penicillium*, *Paecilomyces* and Demateaceas. The main potentially toxicogenic species found were *Aspergillus flavus*, *A. versicolor* and *A. ochraceus*.

**Key words:** Jungi - pepper.

## Introducción

Las pimientas verde, negra y blanca proceden de la misma planta *Piper nigrum*, que crece en regiones tropicales con temperatura y humedad uniformes. La pimienta negra (PN) se obtiene a partir de la cosecha del fruto inmaduro que es desecado al sol. La pimienta verde (PV) se obtiene cuando se seca en corriente de aire seco a la sombra. En tanto que la pimienta blanca (PB) es la baya madura desprovista de cáscara.

Argentina no produce pimientas por carecer de zonas climáticas adecuadas y debe importarlas, siendo Brasil el principal proveedor. De los 9 millones de pesos que importa Argentina en especias, el 40 % corresponde a pimientas (1).

Si bien se conocen estudios de la contaminación fúngica en especias (2,3,4) a nuestro conocimiento no se dispone de datos referidos a los diferentes tipos de pimientas comercializadas en nuestro país. Las condiciones climáticas de nuestra región permiten el desarrollo de la flora fúngica presente en las mismas y la posible producción de

micotoxinas, cuando se sazonan comidas que no se consumen inmediatamente. De allí la importancia de conocer su contaminación fúngica y especialmente con mohos potencialmente toxicogénicos.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la contaminación fúngica de PB, PV y PN, que se comercializan en la ciudad de Santa Fe, Argentina procedentes de Brasil, evaluando la posible presencia de mohos potencialmente toxicogénicos.

## Materiales y Métodos

### Muestreo:

Se analizaron 3 muestras de aproximadamente 150 g de cada una de los tipos de pimienta estudiados PV, PN y PB. Las mismas fueron obtenidas en forma aséptica en bolsas estériles a partir de diferentes comercios de la ciudad de Santa Fe, Argentina, donde son vendidas a granel, siendo inmediatamente transportadas al laboratorio donde se las procesó dentro de las 24 h.

### Recuento fúngico:

#### (a) Siembra por dilución:

Las muestras fueron molidas en condiciones asépticas en un molino a cuchillas (2 x 30 s). Se pesaron 10 g de cada una de ellas y se transfirieron a frascos conteniendo 90 ml de agua de peptona estéril (0.1 %  $v/v$ ). Posteriormente se realizaron diluciones decimales y se distribuyeron 0.1 ml de las mismas en la superficie de placas conteniendo el medio dicloran glicerol 18 % agar (DG 18) (5).

#### (b) Siembra directa:

Cincuenta granos de cada una de las muestras de pimientos fueron sembrados sobre la superficie de placas conteniendo el medio DG 18 (5, 6). Estas muestras serán denominadas ninguno.

#### (c) Desinfección de los granos:

Con objeto de analizar la contaminación fúngica interna de los granos de pimienta se trabajó con todas las muestras en paralelo, siendo los granos previamente desinfectados en su superficie con una solución de hipoclorito de sodio conteniendo 0.05 % de cloro activo durante 2 min (5). Estas muestras serán denominadas desinfectadas.

### Incubación:

Todas las placas fueron incubadas durante 5 días a 28 °C. Concluida la incubación de las muestras sembradas por dilución se realizó el recuento de las colonias y los resultados se expresaron en  $\log_{10}$  Unidades Formadoras de Colonias ( $\log_{10}$  UFC)/g. En las placas sembradas directamente con los granos de pimienta, se observaron los mismos con lupa estereoscópica y se determinó la frecuencia de los mismos que presentaron desarrollo de al menos una colonia fúngica por grano, los resultados se expresaron como porcentaje de granos contaminados.

### Identificación de aislados fúngicos:

Las colonias fúngicas obtenidas fueron inoculadas en DG 18 hasta obtener cultivos puros. Los géneros fúngicos fueron identificados de acuerdo a las pautas propuestas por diferentes autores (5, 7, 8). Para la identificación de las especies de *Aspergillus* y *Eurotium* se utilizó, además bibliografía accesoria (9, 10).

## Análisis estadísticos

Los resultados de contaminación fueron expresados como Media  $\pm$  Desviación Estándar ( $X \pm SD$ ). Se utilizó Análisis de Varianza para evaluar la contaminación fúngica de los granos de los diferentes tipos de pimienta que recibieron o no tratamiento de desinfección. Cuando el Análisis de Varianza mostró significación en al menos  $p < 0.05$ , se utilizó posteriormente el test de Sheffé para comparar estadísticamente los efectos individuales entre grupos, en cuyo caso valores de  $p < 0.05$  fueron considerados significativamente diferentes (11, 12).

## Resultados y Discusión

En la Tabla 1 puede observarse la evaluación de la contaminación fúngica de los diferentes tipos de granos de pimienta estudiados. Los valores de la carga fúngica total encontrada fueron concordantes con los citados por otros autores (2, 3, 4) y más bajos que los encontrados por Hocking (13), quien detectó niveles de hasta  $10^9$  UFC/g. Para descartar la contaminación superficial acompañante e inherente al tipo de comercialización a granel, se procedió a la desinfección de los granos mediante un tratamiento con hipoclorito de sodio previo a la molien-

da de las mismas. Como puede constatar, se observó al menos una reducción de un orden decimal. Cuando se evaluaron los resultados estadísticamente pudo observarse que las bayas de PN desinfectadas muestran una menor contaminación.

Estudios colaborativos interlaboratorios han demostrado que el método de plaqueo debe utilizarse de preferencia para la detección, enumeración y aislamiento de mohos a partir de alimentos particulados como bayas, semillas y nueces (6). Los resultados obtenidos por este método no deben ser comparados directamente con los obtenidos por el método de dilución en placa. Sin embargo, es razonable asumir que una elevada frecuencia de granos contaminados con al menos una especie fúngica, se correlaciona con una invasión extensiva de las mismas. Dentro de los factores a tener en cuenta en la interpretación de los resultados se destaca que, los mohos muestran una gran variabilidad en cuanto a grado de esporulación, lo que contribuye aún más a la imposibilidad de comparar estos dos tipos de evaluación (5, 6).

En la Tabla 1 se puede constatar que la frecuencia de contaminación fue elevada, no pudiéndose observar diferencias significativas entre los diferentes tipos de pimientas estudiadas; en el caso de las muestras de PN incluyó a todas las bayas examinadas. Cuando se estudiaron alícuotas de las mismas muestras desinfectadas superficialmente, se pudo determinar un descenso significativo de la frecuencia de contaminación llegando a valores muy bajos para PV. Si bien las condiciones climáticas de las regiones de cultivo de *Piper nigrum* son favorables para el desarrollo de mohos, los resultados obtenidos sugerirían que la invasión fúngica se produciría cuando las bayas son maduras en la planta (PB), penetrando por debajo de la cáscara o cuando los frutos inmaduros son secados directamente al sol, estando expuestos de esta manera a la acción de la humedad propia de climas tropicales, como es el caso de PN. En cambio cuando las bayas son secadas en corriente de aire caliente seco y en menor tiempo, la flora fúngica que desarrolla bajo estas condiciones no alcanza a penetrar en los frutos. Estas observaciones concuerdan con los resultados obtenidos por otros investigadores (4, 14) si bien las condiciones de estudio de dichos autores fueron diferentes a las nuestras.

En la Tabla 2 puede observarse la frecuencia de los géneros fúngicos aislados a partir de los granos

de los diferentes tipos de pimientas en estudio. El género *Aspergillus* y su teleomorfo *Eurotium* fueron los que se presentaron con mayor frecuencia en todos los tipos de pimientas analizados llegando hasta un 90.8 % en granos de PB. El género *Eurotium* fue predominante en el interior de los frutos. Estos resultados obtenidos fueron coincidentes con los de pimientas cultivadas en Filipinas (5). El alto porcentaje de aislados pertenecientes al género *Aspergillus* y su teleomorfo *Eurotium* fue concordante con las características de crecimiento de los mismos, los cuales prefieren elevadas temperaturas y/o actividad acuosa ( $a_w$ ) reducidas (5). Estas condiciones permiten que estos mohos puedan crecer en forma preponderante sobre los granos de pimienta. Nuestros hallazgos concordaron en este aspecto con los resultados obtenidos por diferentes autores (2, 3, 15, 16) para pimientas provenientes del sudeste asiático, India y Nigeria. Los otros géneros identificados no guardaron un patrón de frecuencias.

Se identificaron las especies de los géneros *Aspergillus* y *Eurotium* aisladas dada su elevada frecuencia de aparición y a los potenciales riesgos micotocológicos de algunas de ellas. Como puede observarse en la Tabla 3 se identificaron 10 especies de *Aspergillus* y 3 especies de *Eurotium*. Entre las especies de *Aspergillus* potencialmente toxicogénicas se destaca la presencia de *Aspergillus flavus* productor de aflatoxinas del grupo B (5), el cual se aisló de los tres tipos de pimientas estudiadas. Con menor frecuencia se aisló *A. versicolor* productor de esterigmatocistina en PV y PB, éste es un hongo xerofílico con crecimiento hasta un  $a_w$  de 0.76 (17) y *A. ochraceus* productor de ocratoxina A (18) sólo de PN con una frecuencia que alcanza al 7.4 %. Estas tres especies fúngicas son aisladas frecuentemente a partir de frutos y bayas secos (13, 19, 20, 21).

En los últimos años aislados pertenecientes al género *Aspergillus* sección *Nigri* han acaparado la atención como productores de ocratoxina A. Estos hongos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y son frecuentes contaminantes de productos de origen tropical así como de frutos secados al sol, en los cuales se ha detectado presencia de ocratoxina A (22, 23). *Aspergillus niger* se aisló de la superficie de los tres tipos de granos alcanzando un valor máximo en PN la cual fue también el único tipo de pimienta contaminada con *A. ochraceus*.

Por otra parte se debe destacar la presencia de *A. fumigatus*, el cual es un hongo patógeno que pue-

de ocasionar aspergilosis pulmonar o respuesta alérgica severa por inhalación (24), encontrado en PN, por lo que en este caso se trataría de un riesgo potencial para los operadores de cocinas, los cuales están en contacto directo con inhalaciones de esta especie.

Si bien en este trabajo no se estudió la capacidad toxicogénica de las especies potencialmente productoras de micotoxinas, se considera que el riesgo de contaminar los alimentos directamente con micotoxinas es muy bajo dado que si bien los mohos encontrados pueden crecer a relativamente bajos  $a_w$ , se ha demostrado que las condiciones para producir micotoxinas son más restrictivas (5, 7, 19).

**Tabla 1:** Evaluación de la contaminación fúngica de granos de pimienta blanca (PB), pimienta verde (PV) y pimienta negra (PN) por el método de dilución en placa y por plaqueo directo

Tratamiento de las muestras		PB	PV	PN
		Contaminación fúngica ( $\log_{10}$ UFC)/g		
Ninguno	(3)	6.70 ± 6.84 <sup>a</sup>	5.67 ± 5.32 <sup>a</sup>	5.34 ± 5.51 <sup>a</sup>
Desinfec. <sup>(1)</sup>	(3)	4.84 ± 5.05 <sup>ab</sup>	4.32 ± 3.72 <sup>b</sup>	3.41 ± 2.70 <sup>c</sup>
		Frecuencia de granos contaminados (%) <sup>(2)</sup>		
Ninguno	(3)	98,4 ± 2,7 <sup>a</sup>	83,3 ± 23,0 <sup>a</sup>	100,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
Desinfec.	(3)	61,9 ± 45,4 <sup>c</sup>	5,5 ± 4,9 <sup>b</sup>	73,0 ± 42,7 <sup>a,c</sup>

<sup>(1)</sup>- Granos desinfectados con hipoclorito de sodio, cloro activo 0,05%, 2 min.

<sup>(2)</sup>- (Nº de granos contaminados / 50 granos por muestra) x 100.

<sup>(3)</sup>- Número de muestras en cada grupo.

Los valores se expresaron como media ± SD

Los valores con letras en supraíndices diferentes son significativamente distintos ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 2:** Frecuencia (%) de géneros fúngicos aislados de granos de pimienta blanca (PB), pimienta verde (PV) y pimienta negra (PN)

Tratamiento de muestras	PB		PV		PN	
	Desinfec. <sup>(1)</sup>	Ninguno	Desinfec.	Ninguno	Desinfec.	Ninguno
<i>Aspergillus</i>	26.3 <sup>(2)</sup>	48.6	0	55.9	15.4	53.0
<i>Eurotium</i>	52.6	42.2	66.7	25.4	38.4	28.8
<i>Penicillium</i>	2.6	2.8	0	13.6	0	3.0
<i>Paecilomyces</i>	2.6	0	0	0	23.1	0
<i>Trichoderma</i>	0	0	0	5.1	0	0
<i>Botryotrichum</i>	5.3	1.8	0	0	0	0
<i>Mucor</i>	0	0	33.3	0	23.1	12.1
<i>Rhizopus</i>	0	0	0	0	0	3.1
<i>Syncephalastrum</i>	0	1.8	0	0	0	0
<i>Demateaceas</i>	10.6	2.8	0	0	0	0
Total	100	100	100	100	100	100

<sup>(1)</sup> Granos desinfectados con hipoclorito de sodio, cloro activo 0,05%, 2 min.

<sup>(2)</sup> (Nº de aislados del género/Nº total de aislados) x 100.

**Tabla 3:** Frecuencia (%) de especies del género *Aspergillus* y su teleomorfo asociado *Eurotium*, aislados de los granos de pimienta blanca (PB), pimienta verde (PV) y pimienta negra (PN)

Tratamiento de muestras	P B		P V		P N	
	Desinfec(1).	Ninguno	Desinfec.	Ninguno	Desinfec.	Ninguno
Especies aisladas						
<i>A. flavus</i>	6,7 <sup>(2)</sup>	20,2	0	12,5	0	13,0
<i>A. niger</i>	0	29,3	0	20,9	0	44,4
<i>A. ochraceus</i>	0	0	0	0	0	7,4
<i>A. versicolor</i>	6,7	1,0	0	12,5	0	0
<i>A. fumigatus</i>	0	0	0	0	28,6	0
<i>A. sydowii</i>	10,0	1,0	0	10,4	0	0
<i>A. caespitosus</i>	10,0	1,0	0	0	0	0
<i>A. restrictu</i>	0	0	0	10,4	0	0
<i>A. tamarii</i>	0	1,0	0	0	0	0
<i>A. candidus</i>	0	0	0	2,1	0	0
<i>E. chevalieri</i>	49,9	12,1	0	10,4	28,6	14,8
<i>E. amstelodami</i>	6,7	23,2	0	10,4	28,6	9,3
<i>E. rubrum</i>	10,0	11,2	100	10,4	14,2	11,1
Total	100	100	100	100	100	100

<sup>(1)</sup> Granos desinfectados con hipoclorito de sodio, cloro activo 0,05%, 2 min.

<sup>(2)</sup> (Nº de aislados de especie/Nº total de aislados) x 100.

## Conclusiones

En este trabajo pudo observarse que los diferentes tipos de pimienta estudiados, provenientes de Brasil, poseen una contaminación fúngica coincidentes con los que se comercializan en otras partes del mundo. Asimismo se destaca un elevado predominio de los géneros *Aspergillus* y *Eurotium*, con presencia de algunas especies potencialmente toxicogénicas. Al respecto es importante tener en cuenta que las pimientos son especias que no sólo se agregan a alimentos previo a su cocción, sino que son adecuadas para sazonar platos ya preparados que no siempre son consumidos rápidamente, pudiendo encontrar los mohos ambiente propicio para desarrollarse y producir micotoxinas.

## Bibliografía

- 1- Subsecretaría de Agricultura, Ganadería y forestación. 1997. Aromáticas: comercio de productos aromáticos y medicinales. Importación y exportación por grupos. Panorama Agrícola. 11 (Nov.): 15-19.
- 2- Muhamad, L. J., Ito, H., Watanabe, H. and Tamura, N. 1986. Distribution of microorganisms in spices and their decontamination by gamma-irradiation. *Agric. Biol. Chem.* **50**: 347-355.
- 3- King, A. D., Hocking, A. D. and Pitt, J. I. 1981. The mycoflora of some Australian foods. *Food Technol. Aust.* **33**: 55-60.
- (4) Atanda, O. O., Akano, D. A. and Afolabi, J. F. 1990. Mycoflora of dry tatase pepper (*Capsicum annum* L.) stored for sale in Ibadan markets. *Lett. Appl. Microbiol.* **10**: 35-37.
- 5- Pitt, J. I., Hocking, A. 1997. "Fungy and Food Spoilage". Blackie Academic & Professional. University Press. Great Britain. England. 1-593.
- 6- Samson, R., Hocking, A., Pitt, J., King, A. 1992. "Modern methods in Food Mycology". Elsevier Press. Amsterdam. The Netherlands. 1-388.
- 7- Samson, R., Hoekstra, E., van Oorschot, C. 1984. "Introduction to Food-Borne Fungi". CBS, Baarn. Netherlands. 1-248.
- 8- Carmichel, J., Kendrick, W., Conners I., Siegler, L., 1980. "The genera of Hyphomycetes". Alberta Press, Canadá. 1-386.
- 9- Klich, M. A.; Pitt, J. I. 1994. "A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs". Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Science, North Ryde, Australia. 1-115.
- 10- Hocking, A. D. and Pitt, J. I. 1988. Two new species of xerophilic fungi and a further record of *Eurotium halophilicum*. *Mycologia.* **80**: 82-88.
- 11- Software Statgraphics Plus for Window 3.0. 1997. Statistical Graphics Corp.
- 12- Walpole, R., Myers, R. 1997. "Probabilidad y estadística". Mac Grow Hill. New York, 4ª Ed. 1-273.
- 13- Hocking, A. D. 1981. Improved media for enumeration of fungi from foods. *CSIRO Food Res. Q.* **41**: 7-11.
- 14- Misra, N. 1981. Influence of temperature and relative humidity on fungal flora of some spices in storage. *Z. Lebensm-Unters. Fosh.* **172**: 30-31.
- 15- Shrivastava, A. and Jain, P. C. 1992. Seed mycoflora of some spices. *J. Food Sci. Technol. India.* **29**: 228-230.
- 16- Nkama, I., Badau, M. H., Collison, E. K., Mian, W., Igene, J. O. and Negbenebor, C. A. 1994. Mycoflora of some dried spices and condiments sold in Maiduguri market, Nigeria. *J. Food Sci. Technol. India.* **31**: 420-422.
- 17- Magan, N., Lacey, J. 1984. Effect of temperature and pH on water relations of field and storage fungi. *Transactions of the British Mycological Society.* **82**: 71-81.
- 18- Höhler, D. 1998. Ochratoxin A in food and feed: occurrence, legislation and mode of action. *Z. Ernährungswiss.* **37**: 2-12.
- 19- ICMFSF 1996. "Microorganisms in food 5". Microbiological specifications of food pathogens. Blackie Academic professional. London. England. 1-511.
- 20- Garrido, M. D., Jordano, R., Martinez, P., Jodral, M. and Pozo, R. 1988. Fungal contamination of commercial spices. *Alimentaria.* **81**: 83-84.
- 21- Llewellyn, G. C., Mooney, R. L., Cheate, T. F. and Flannigan, B. 1992. Mycotoxin contamination of spices an update. *Int. Biodeter. Biodegr.* **29**: 111-121.
- 22- Nakajima, M., Tsubouchi, H., Miyabe, M. and Ueno, Y. 1997. Survey of aflatoxin B<sub>1</sub> and ochratoxin A in commercial green coffee beans by high-performance liquid chromatography linked with immunoaffinity chromatography. *Food Agr. Immunol.* **9**: 77-83.
- 23- Burdaspal, P.A., Legarda, T.M. 1999. Ochratoxin A in wines and grape products originated from Spain and other european countries. *Alimentaria.* **36**: 107-113.
- 24- Fisher F. and Cook N.B. 1998. "Fundamentals of diagnostic mycology". W.B. Saunders Company. Ph, USA. 1-352.