

Melo González, María Gabriela

**Calidad microbiológica y
micológica del pimentón
(Capsicum annum L.)
producido en el departamento
de Santa María, provincia de
Catamarca: estrategias
alternativas de control con
extractos vegetales**

**Tesis para la obtención del título de posgrado de
Magister en Tecnología de los Alimentos**

Directora: Arjona, Ramona Mila

Documento disponible para su consulta y descarga en Biblioteca Digital - Producción Académica, repositorio institucional de la Universidad Católica de Córdoba, gestionado por el Sistema de Bibliotecas de la UCC.



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CÓRDOBA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



CALIDAD MICROBIOLÓGICA Y MICOLÓGICA DEL PIMENTÓN (*Capsicum annum L.*) PRODUCIDO EN EL DEPARTAMENTO DE SANTA MARÍA, PROVINCIA DE CATAMARCA. ESTRATEGIAS ALTERNATIVAS DE CONTROL CON EXTRACTOS VEGETALES

Trabajo Final de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Católica de Córdoba conforme a los requisitos para la obtención del título de Magíster en Tecnología de los Alimentos

Autora: MARÍA GABRIELA MELO GONZÁLEZ

CÓRDOBA – ARGENTINA

2015

DIRECTORA DEL TRABAJO FINAL

Dra. Ramona Mila Arjona
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad Nacional de Catamarca

CODIRECTORA DEL TRABAJO FINAL

Mg. Stella Maris Romero
PROPLAME PRHIDEB CONICET
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires.

COMISIÓN DE TRABAJO FINAL

Mg. Rosario Rollan
Mg. Carina Bellardineli
Dr. Marcelo Rosmini

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado gracias a muchas personas que ayudaron y acompañaron desde que decidí embarcarme al maravilloso mundo de la investigación.

A mi esposo Marcelo por su confianza incondicional, por su entereza y paciencia ante mis agobios y por sus incansables palabras de aliento.

A mis padres y hermanos por apoyarme y acompañarme.

A mi directora, Dra. Mila Arjona, por brindarme su confianza, su apoyo, por su generosidad y humildad para enseñarme a realizar un trabajo científico.

A mi co-directora, Mag. Stella Maris Romero, por animarme, ofrecerme su tiempo, sus conocimientos científicos y por su compromiso desde el primer momento.

A mis queridos compañeros de la maestría, Analía Fajardo, María de los Ángeles Díaz Panero, Andrea Tarditti, Raúl Mauro, Guillermo Giambastiani, por la franqueza y los hermosos momentos compartidos.

A mis grandes amigas, Luciana, Iris, Silvana, Niní, Celia, Patricia, Graciela y Silvana C., por animarme y acompañarme.

A Nilda y Lucía, por la ayuda y confianza durante mi estadía en Buenos Aires.

A la Dra. Graciela Vaamonde, por permitirme realizar los análisis microbiológicos y micológicos en el laboratorio de microbiología de los alimentos de la Universidad de Buenos Aires.

A la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Catamarca.

A la Lic. Gabriela Larumbe, por su ayuda y brindarme sus conocimientos.

A la Dra. Andrea Romero, por permitirme utilizar el equipamiento de su laboratorio.

DEDICATORIA

A mis hijos Isaías y Lisandro, amores eternos

A Marcelo, mi amor y compañero de vida

A mis padres, Mirian y Chacho por ser mis ejemplos de vida

INDICE GENERAL

LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABLAS	XI
RESUMEN	XII
SUMMARY	XIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	5
2.1 El pimiento (<i>Capsicum annum</i> L.) para pimentón. Generalidades	5
2.1.1 Situación actual del pimiento para pimentón	6
2.1.2 Localización geográfica	6
2.1.3 Pimentón o Páprika	7
2.1.3.1 Elaboración del Pimentón	7
2.1.3.2 Cultivo, cosecha, secado y molienda	7
2.2 Legislación. Límites microbiológicos	9
2.3 Contaminación microbiana	11
2.3.1 Flora normal de las especias	13
2.3.2 Contaminación bacteriológica	14
2.3.3 Contaminación fúngica	17
2.3.3.1 Micotoxinas	18
2.4 Plantas como antifúngicos naturales	22
2.4.1 Los extractos de plantas y aceites esenciales	22
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	25
3.1 Hipótesis	25
3.2 Objetivo general	25
3.3 Objetivos específicos	25
4. MATERIALES Y MÉTODOS	26
4.1 Muestras	26

4.1.1	Determinación de la actividad acuosa (a_w)	27
4.1.2	Recuento de bacterias aerobias mesófilas (RAM)	27
4.1.3	Recuento de coliformes totales (CT)	28
4.1.4	Determinación de <i>Salmonella</i> spp.	28
4.1.5	Recuento de mohos y levaduras	28
4.1.6	Identificación taxonómica a nivel de género	29
4.1.7	Identificación taxonómica a nivel de especie	29
4.2	Actividad antifúngica de <i>Flourensia blakeana</i> M.O. Dillon	31
4.2.1	Material vegetal	31
4.2.2	Preparación de extractos	31
4.2.3	Evaluación antifúngica	31
4.2.3.1	Microorganismos y medios	31
4.2.3.2	Bioensayos	32
4.2.3.3	Análisis estadístico	32
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
5.1	Determinación de la actividad acuosa (a_w)	34
5.2	Contaminación bacteriana	34
5.2.1	Recuento de bacterias aerobias mesófilas (RAM)	34
5.2.2	Recuento de coliformes totales (CT)	35
5.2.3	Determinación de <i>Salmonella</i> spp.	36
5.3	Contaminación fúngica	36
5.3.1	Selección del medio de cultivo para mohos y levaduras	36
5.3.2	Análisis del recuento de mohos y levaduras	37
5.3.3	Aislamiento de géneros	39
5.3.4	Identificación a nivel de especie	42
5.4	Efectos de extractos de <i>Flourensia blakeana</i>	57
5.4.1	Efectos de extractos de <i>Flourensia blakeana</i> en <i>Aspergillus ochraceus</i>	57
5.4.1.1	Efecto del extracto en hexano	57
5.4.1.2	Efecto del extracto en etanol	57
5.4.1.3	Efecto del extracto en acetona	58
5.4.1.4	Efecto del extracto en cloroformo	59
5.4.2	Efectos de extractos de <i>Flourensia blakeana</i> en	60

<i>Aspergillus parasiticus</i>	
5.4.2.1 Efecto del extracto en cloroformo	60
5.4.3 Efectos de extractos de <i>Flourensia blakeana</i> en	61
<i>Aspergillus niger</i>	
5.4.3.1 Efecto del extracto en hexano	61
5.4.3.2 Efecto del extracto en acetona	62
6. CONCLUSIONES	66
7. ANEXO	67
7.1 Medios de cultivo empleados	67
8. BIBLIOGRAFÍA	71

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grado Celsius
A.O.A.C.	Asociación Oficial de Químicos Analíticos
AE	Aceite esencial
AF	Aflatoxina
a_w	Actividad acuosa
BAM	Manual Analítico Bacteriológico
BRV	Agar Bilis Rojo Violeta
BS	Agar Bismuto-Sulfito
CTS	Caldo Tripteína Soya
CYA	Agar Czapek Extracto de Levadura
g	gramo
h	hora
l	litro
LIA	Agar Hierro Lisina
MEA	Agar Extracto de Malta
ml	mililitro
OTA	Ocratoxina A
PCA	Agar para Recuento en Placa
PDA	Agar Papa Dextrosa
pH	potencial Hidrógeno
ppm	parte por millón
SC	Caldo Selenito Cistina
TET	Caldo Tetracionato
TSI	Agar Triple Azúcar Hierro
UFC/g	Unidad Formadora de Colonias por gramo
XLD	Agar Xilosa Lisina Desoxicolato
ZEA	Zearalenona

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1: Estructura química de aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ y G ₂	19
Fig. 2: Estructura química de ocratoxina A.....	21
Fig. 3: Mapa de la provincia de Catamarca con las principales producciones desarrolladas.....	26
Fig. 4: Porcentaje de mohos encontrados en la totalidad de muestras de pimentón estudiadas, pertenecientes a los distintos establecimientos del departamento Santa María-Catamarca.....	39
Fig. 5: Colonias en CYA, 25°C, 7 días (excepto c, en el cual el medio de cultivo es MEA) en cajas de Petri de 90 mm; a. <i>A. flavus</i> ; b-c. <i>A. niger</i> ; d. <i>A. ochraceus</i> ; e. <i>A. westerdijkiae</i> ; f. <i>P. atramentosum</i> ; g-h. <i>P. chrysogenum</i> (dos cepas distintas); i. <i>P. commune</i>	56
Fig. 6: Efecto de extracto hexánico de <i>Flourensia blakeana</i> a diferentes concentraciones, sobre el % de inhibición del crecimiento micelial de <i>Aspergillus ochraceus</i>	57
Fig. 7: Potencial del extracto en etanol de <i>Flourensia blakeana</i> , sobre el % de inhibición del crecimiento micelial de <i>Aspergillus ochraceus</i> a diferentes concentraciones del extracto.....	58
Fig. 8: Efecto de extracto en etanol de <i>Flourensia blakeana</i> a diferentes concentraciones, sobre el % de inhibición del crecimiento micelial de <i>Aspergillus ochraceus</i>	58
Fig. 9: Efecto de extracto en acetona de <i>Flourensia blakeana</i> a diferentes concentraciones, sobre el % de inhibición del crecimiento micelial de <i>Aspergillus ochraceus</i>	59
Fig. 10: Potencial del extracto en cloroformo de <i>Flourensia blakeana</i> , sobre el % de inhibición del crecimiento micelial de <i>Aspergillus. ochraceus</i> a diferentes concentraciones del extracto en un período de 10 días.....	60
Fig. 11: Efecto de extracto clorofórmico de <i>Flourensia blakeana</i> a diferentes concentraciones, sobre el % de inhibición del crecimiento micelial de <i>Aspergillus ochraceus</i>	60
Fig. 12: Efecto de extracto clorofórmico de <i>Flourensia blakeana</i> a diferentes concentraciones, sobre el % de inhibición del crecimiento micelial de <i>Aspergillus parasiticus</i>	61
Fig. 13: Efecto de extracto hexánico de <i>Flourensia blakeana</i> a diferentes concentraciones, sobre el % de inhibición del crecimiento micelial de <i>Aspergillus niger</i>	62
Fig. 14: Potencial del extracto en acetona de <i>Flourensia blakeana</i> , sobre el % de inhibición del crecimiento micelial de <i>Aspergillus niger</i> a diferentes concentraciones del extracto en un período de 7 días.....	62

Fig. 15: Efecto de extracto en acetona de *Flourensia blakeana* a diferentes concentraciones, sobre el % de inhibición del crecimiento micelial de *Aspergillus niger*.....63

LISTA DE TABLAS

Tabla I: Requisitos microbiológicos a cumplir en Especies y Condimentos según la República Dominicana (2009).....	10
Tabla II: Criterios microbiológicos para Especies y Condimentos Deshidratados.....	10
Tabla III: Criterios microbiológicos y límites de aflatoxinas según la legislación de la Unión Europea.....	11
Tabla IV: Muestras de pimentón (<i>Capsicum annum</i> L.) de las cosechas 2010, 2011 y 2012 de establecimientos productores del departamento Santa María – Catamarca.....	27
Tabla V: Recuento de bacterias aerobias mesófilas (UFC/g), recuento de coliformes totales (UFC/g) y a_w encontrados en las muestras de pimentón producidas en el departamento Santa María – Catamarca.....	35
Tabla VI: Recuento total de mohos y levaduras (UFC/g) y de mohos (UFC/g) encontrados en las muestras de pimentón producidas en el departamento Santa María -Catamarca. Porcentaje de mohos.....	38
Tabla VII: Porcentajes de géneros de hongos filamentosos obtenidos en las muestras de pimentón producidas en el departamento Santa María – Catamarca.....	40
Tabla VIII: Lista de especies identificadas y distribución de las mismas en las distintas muestras de pimentón estudiadas. ¹ Primera cita para Argentina.....	43

RESUMEN

Numerosos estudios informaron sobre la susceptibilidad de las especias a estar contaminadas con bacterias, mohos y levaduras, las cuales revelan ausencia de buenas prácticas agrícolas y de manufactura durante los procesos de cultivo, secado y almacenamiento. Así también, el manejo tradicional con agroquímicos y compuestos sintéticos para el control de mohos fitopatógenos y micotoxigénicos, han ocasionados diversos problemas como la toxicidad de usuarios y daños al medio ambiente. Por esta razón, actualmente existe la tendencia a desarrollar técnicas alternativas, por ejemplo extractos de plantas con efectos antifúngicos. En este contexto se determinó la calidad microbiológica y micológica de pimentón (*Capsicum annum* L.) producido en el departamento de Santa María, provincia de Catamarca, para evaluar el potencial riesgo de la presencia de microorganismos patógenos y especies fúngicas micotoxigénicas y plantear estrategias como alternativas de control con extractos naturales de *Fourensia blakeana*. Se analizaron 15 muestras de tres cosechas diferentes (2010, 2011 y 2012) obtenidas de los principales establecimientos del departamento. Se realizó la determinación de a_w , recuentos de aerobios mesófilos (RAM) en agar para recuento en placa, coliformes totales (CT) en Agar Bilis Rojo Violeta Lactosa y mohos y levaduras en Agar Diclorán Glicerol 18% (DG18). Se siguió la metodología de BAM (1995) para la determinación de *Salmonella* spp. Los resultados de las determinaciones realizadas fueron: a_w , rango comprendido entre 0,2 y 0,5; RAM valores entre $5,0 \cdot 10^5$ y $3,7 \cdot 10^7$ (UFC/g); CT cantidades <10 UFC/g y $5,6 \cdot 10^4$ UFC/g; ausencia de *Salmonella* spp. en todas las muestras analizadas; recuento total de mohos y levaduras en un rango comprendido entre $2,0 \cdot 10^2$ y $1,9 \cdot 10^5$ (UFC/g). El género predominante fue *Aspergillus* (98,2% - 6,6%); *Alternaria*, *Rhizopus* y *Penicillium* también fueron aislados muy frecuentemente. Se identificaron 18 especies pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Alternaria*. El efecto inhibitorio de los extractos de *F. blakeana* indicaron que pueden ser considerados como potenciales antifúngicos sobre *Aspergillus ochraceus*, *A. parasiticus* y *A. niger*, resultando los extractos clorofórmico y hexánico los más activos sobre *A. ochraceus*.

Palabras claves: pimentón – microbiología – micología – extractos naturales – actividad antifúngica

SUMMARY

Several studies reported the susceptibility of spices to be contaminated with bacteria, molds and yeasts, which reveals the absence of good agricultural and manufacturing practices during cultivation, drying and storage processes. Likewise, various problems (for example, toxicity of users and damage to the environment) arises from the traditional management of agrochemicals and synthetic compounds for to control phytopathogenic and mycotoxigenic molds. For that reason, at present there exists the tendency to develop alternative techniques, as, for example, plant extracts with antifungal effects. In this context, microbiological and mycological quality of pepper (*Capsicum annum* L.), from Santa María, Catamarca, was determined to assess the potential risk due to the presence of pathogens and mycotoxigenic fungal species. Alternative control strategies are proposed by using natural extracts of *Fourensia blakeana*. Fifteen samples from three different harvests (2010, 2011 and 2012) obtained from the main department producers were analyzed. Activity water, aerobic mesophilic counts (RAM) on agar plate count (PCA), total coliforms (CT) on Violet Red Bile Lactose Agar, and molds and yeasts in 18% Glycerol Agar Dicloran (DG18) were performed. Determination of *Salmonella spp.* was carried out following BAM methodology (1995). The results obtained were: 0,2 - 0,5 a_w , $5,0 \cdot 10^5$ - $3,7 \cdot 10^7$ CFU/g of RAM; <10 - $5,6 \cdot 10^4$ CFU/g of CT; absence of *Salmonella spp.* in 50 g in all samples analyzed; $2,0 \cdot 10^2$ - $1,9 \cdot 10^5$ CFU/g of molds and yeast. *Aspergillus* was the predominant genus isolated (98,2% - 6,6%); *Alternaria*, *Rhizopus* and *Penicillium* were also isolated very frequently. Eighteen species belonging to *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Alternaria* genera were isolated. The determinations made were: a_w , range between 0,2 and 0,5; $5,0 \cdot 10^5$ and RAM values between $3,7 \cdot 10^7$ (CFU/g); CT amounts <10 CFU/g and $5,6 \cdot 10^4$ CFU/g; absence of *Salmonella spp.* in all samples; total count of molds and yeasts in a range between $2,0 \cdot 10^2$ and $1,9 \cdot 10^5$ (CFU/g); total mold count among $2,0 \cdot 10^2$ and $4,2 \cdot 10^4$ (CFU/g); *Aspergillus* gender was predominant (98,2% - 6,6%); *Alternaria*, *Rhizopus* and *Penicillium* were also isolated very frequently; 18 species of *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Alternaria* were isolated. The inhibitory effect of extracts indicated that *F. blakeana* could be considered as potential antifungal on *Aspergillus ochraceus*, *A. parasiticus*, and *A. niger*. Hexane and chloroform extracts were the most active against *A. ochraceus*.

Keywords: paprika - microbiology - mycology - natural extracts - antifungal activity

INTRODUCCIÓN

Las nuevas tendencias de los consumidores están orientadas a suplantar o reducir la sal en la elaboración de los alimentos, utilizando la gran variedad de hierbas y especias con la que se dispone. Especies como el pimentón, pimienta, azafrán, proveen del gusto y resaltan los sabores de aquellos, sin enmascararlos y logrando que resulten más agradables al paladar.

Sin embargo, este suplemento puede resultar una fuente importante de contaminación microbiana (Mckee, 1995) implicando un riesgo para la salud pública, ya que pueden ser incorporadas directamente y no recibir ningún tratamiento adicional posterior (Banerjee *et al.*, 2003).

Tanto en nuestro país como en otros, el pimentón (*Capsicum annum* L.) es una especia muy utilizada como adobo en carnes y embutidos, además de saborizante y colorante en la cocina doméstica y en la industria alimenticia.

El pimentón procedente de establecimientos pimentoneros está sujeto al análisis de parámetros fisicoquímicos de calidad tales como color, humedad, extracto etéreo, fibra bruta, entre otros, para su posterior clasificación comercial. Estas características se ven modificadas por contaminaciones químicas y biológicas de la materia prima. Entre las alteraciones biológicas se encuentran las causadas por bacterias, hongos y levaduras que se desarrollan durante las diversas etapas del procesamiento tecnológico.

Las especias poseen una flora microbiana natural con un elevado número de bacterias y hongos, resultantes de prácticas sanitarias deficientes durante la producción (De Boer *et al.*, 1985). Numerosas investigaciones a nivel mundial han informado altos niveles de contaminación bacteriana y fúngica en hierbas y especias, por lo que es fundamental un estricto control en todas las etapas de producción y procesamiento, para evitar la alteración de los alimentos y las enfermedades transmitidas por ellos (McKee, 1995).

Muchas especias se cultivan en países en desarrollo o cerca de los trópicos, donde las prácticas de higiene y saneamiento son muy diferentes a las naciones de mayor desarrollo (ASTA, 2011). De este modo, se debe destacar que la producción de pimentón se efectúa en zonas donde el clima predominante es cálido y húmedo.

Debido a las deficientes condiciones de manufactura en la cadena de producción del pimentón (pre cosecha, cosecha, obtención, almacenamiento y distribución), es que resulta una especia vulnerable a la contaminación por mohos filamentosos. Los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* se encuentran con mayor frecuencia, y son los responsables de la descomposición y producción de micotoxinas en los alimentos (Santos *et al.*, 2011).

Además, el desarrollo de una amplia gama de microorganismos como las Enterobacterias, bacterias mesófilas, se ven favorecidas por este clima cálido y húmedo, quienes resultan ser indicadores de higiene y sanidad del lugar donde se cultivan y procesan las especias (Banerjee *et al.*, 2003).

Es de importancia señalar que el pimentón es considerado a nivel mundial como una de las especias más susceptibles de estar contaminadas con aflatoxinas, una familia de micotoxinas cancerígenas, producidas por distintas especies del género *Aspergillus*. Recientemente, en España, Zimbabwe, Brasil y Perú (Almela *et al.*, 2007), se ha encontrado la ocratoxina A, otra micotoxina de gran importancia, en muestras de pimentón.

La contaminación fúngica puede ocurrir durante el cultivo, pero también durante el secado y el almacenamiento si las condiciones son propicias, y se ve favorecida por las prácticas tradicionales del proceso de secado y producción. Durante el secado se debe mantener una baja actividad acuosa y el valor final debe ser menor a 0,60 que es equivalente a un contenido de Humedad Relativa (HR) menor a 60% (ASTA, 2011; Codex Alimentarius 1995; ESA, 2004).

Si bien los hongos son los principales microorganismos contaminantes en especias, debido a su utilización como ingredientes en distintos alimentos, también resulta de interés conocer su calidad bacteriológica. La baja a_w y el bajo pH, son factores que van a determinar la capacidad de los mohos para desplazar a las bacterias y levaduras en la carrera por colonizar el alimento.

En Argentina, la principal zona productora de pimentón comprende la región de los valles Calchaquíes que abarca las provincias de Salta, Catamarca y Tucumán. El departamento Santa María, situado en la provincia de Catamarca, es uno de los principales productores de la región.

Hasta el momento no existen referencias de la calidad microbiológica y micológica del pimentón producido en nuestro país, por lo que resulta de interés conocer estos datos a nivel regional evaluando el potencial riesgo de la presencia de microorganismos patógenos y de hongos, con especial referencia a especies potencialmente productoras de micotoxinas.

En la actualidad, es ampliamente conocido que los programas de seguridad alimentaria se basan en la prevención de la contaminación de alimentos, llevados a cabo mediante la implementación de Buenas Prácticas Agrícolas (BPA), Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control (HACCP).

A pesar de los grandes logros que se han obtenido en el campo de la prevención y control de la contaminación con micotoxinas, en Latinoamérica aún se deben implementar programas de mayor envergadura hacia este objetivo. Se hace necesario realizar más investigaciones sobre la presencia de hongos y sus metabolitos en alimentos para consumo humano, tal es el caso del pimentón, que por sus características microbiológicas y prácticas de manejo durante el ciclo de producción y almacenamiento, asociado a condiciones ambientales desfavorables como alta temperatura y elevada humedad relativa podrían aumentar el riesgo de ocurrencia de la presencia de contaminación fúngica y la potencial producción de micotoxinas.

Así mismo es significativo referirse que actualmente el control de hongos fitopatógenos y toxicogénicos tiende a la aplicación de técnicas alternativas. El manejo tradicional con agroquímicos y compuestos sintéticos han ocasionados diversos problemas como la toxicidad de usuarios, detención de exportaciones por residuos en productos y daños al medio ambiente (Legarreta & Cuéllar, 2002) y a organismos benéficos. Otro aspecto importante es que los agentes fitopatógenos han generado resistencia ante los componentes activos de algunos fungicidas sintéticos (Cooke *et al.*, 2003), ocasionando grandes pérdidas económicas.

Una alternativa económica y eficiente para el control de enfermedades es el uso de productos naturales derivados de las plantas, que no afectan al medio ambiente debido a que sus residuos son degradables, fáciles de utilizar como potenciales agentes de control de patógenos en productos agrícolas y permiten la obtención de productos con calidad de exportación. Los extractos vegetales se han empleado desde tiempos remotos para el control de plagas, insectos y otros agentes fitopatógenos (Gallardo-Guerrero *et al.*, 2010; Jasso De Rodríguez *et al.*, 2007).

Existe una extensa diversidad vegetal en nuestro país, especialmente en la región del Noroeste Argentino (NOA), que puede ser evaluada desde el punto de vista fitoquímico para determinar su actividad biológica sobre hongos fitopatógenos y productores de micotoxinas.

En este contexto se planteó el presente estudio que comprende dos aspectos fundamentales:

- El conocimiento de la calidad microbiológica y micológica del pimentón (*Capsicum annum* L.) producido en el departamento de Santa María, provincia de Catamarca, con especial atención en la presencia de microorganismos patógenos y especies fúngicas productoras de micotoxinas de potencial riesgo para la salud.
- El planteo de nuevas alternativas de control mediante el uso de productos naturales derivados de las plantas y ecológicamente sustentables.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 El pimiento (*Capsicum annum L.*) para pimentón. Generalidades

El pimiento (*Capsicum annum L.*) pertenece a la familia de las Solanáceas, nativo de América, especialmente de la zona de México, Perú y Bolivia, su distribución se ha hecho global con la llegada de los conquistadores a este continente y su introducción en Europa (Nuez Viñals *et al.*, 1996).

Su uso significó un avance coquinario, ya que suplementaría y sustituiría a otra especia muy usada como la pimienta negra (*Piper nigrum L.*), de consideración comercial entre Oriente y Occidente (Nuez Viñals *et al.*, 1996). La demanda mundial de pimiento para pimentón crece a medida que las prácticas de consumo son propensas hacia alimentos inocuos, naturales y funcionales (Nuez Viñals *et al.*, 1996).

El pimiento para pimentón es un cultivo cosmopolita presente en casi la totalidad de las zonas templadas y cálidas, es una planta herbácea anual cuyo fruto es una baya hueca, de color y forma variada, superficie lisa y brillante. Cuando los frutos maduran presentan color rojo, olor característico, forma redondeada o cónica, el cáliz de color verde con cinco o seis dientes y pedúnculo corto y curvado (Nuez Viñals *et al.*, 1996). Las características agrícolas del cultivo están relacionadas con un tipo de suelo rico en materia orgánica, aireados, permeables y profundos. Es insensible a la acidez del suelo adecuándose bien entre un pH de 5,5 y 7 (Vilmorín Díaz, 1977).

En Argentina, esta especie de pimiento se cultiva en las provincias de Salta, Catamarca y Tucumán desde hace más de 70 años, convirtiéndose en un cultivo de relevancia para las economías de esas regiones.

2.1.1 Situación actual del pimiento para pimentón

En el año 2008, la FAO (FAOSTAT, 2008) informó que el área de producción en todo el mundo para *Capsicum* fue 1.766.502 ha, con una producción de 2.799.888 toneladas de la cosecha producto por año. La producción de pimentón varía entre los países, pero por lo general se produce en las zonas tropicales y subtropicales donde el clima es cálido y húmedo (Santos *et al.*, 2011).

2.1.2 Localización geográfica

En nuestro país, el cultivo y la elaboración del pimentón, se sitúan especialmente en la región de los Valles Calchaquíes, en el Noroeste del país, valles que se extienden de norte a sur por las provincias de Salta, Tucumán y Catamarca (Codex Alimentarius CX/SCH 14/01/6). Dentro de los valles el cultivo y la producción de pimentón se realiza en las provincias de Salta, departamentos de Cachi, Molinos y San Carlos; en Catamarca, departamentos de Santa María y Belén; y Tucumán, en Amaicha del Valle (Codex Alimentarius CX/SCH 14/01/6). La producción de pimiento para pimentón es una de las actividades productivas más difundidas en la zona del norte Argentino (Durán *et al.*, 2010)

Existen dos tipos de pimientos difundidos en las zonas de cultivo: los redondos o “bolita salteño” y los largos o “trompa de elefante”. Debido a la mayor disponibilidad de semillas adaptadas al país, y porque brinda un considerable rendimiento por planta, es que el pimiento largo es el mayormente utilizado (Pico Zossi *et al.*, 2013).

El departamento Santa María se ubica en la zona oeste de la provincia de Catamarca, a 2000 metros sobre el nivel del mar (msnm) y posee una extensión de 5.796 km². Las características climáticas de la zona corresponden a precipitaciones medias anuales de 180 mm; una temperatura media de 15 °C (mínima absoluta de -11 °C y máxima absoluta de 42 °C); un período de heladas de siete meses; humedad relativa de 40% y una alta duración de horas de sol. Los suelos son poco estructurados, de profundidad limitada y con escasa cantidad de materia orgánica (<2%) y mayormente se encuentran erosionados (Pico Zossi *et al.*, 2013).

2.1.3 Pimentón o Páprika

El Código Alimentario Argentino (C.A.A.), en el Capítulo XVI Correctivos y Coadyuvantes, Artículo 1233, especifica la denominación de Pimentón o Páprika como el producto obtenido de la molienda de los frutos de Pimiento para pimentón.

La Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos en la Resolución 76/2006 aprobó el Reglamento Técnico sobre Identidad y Calidad de Frutos de Pimiento para Pimentón, definiéndolos como frutos seleccionados y desecados o deshidratados de diversas variedades y cultivares rojos de *Capsicum annum L.*, que resultaron de un proceso de deshidratación natural o artificial de frutos frescos.

2.1.3.1 Elaboración del pimentón

El pimentón es el producto resultante de la molienda de pimientos (*Capsicum annum L.*) rojos, de la variedad dulce, que son recolectados maduros, sanos, limpios y secos, totalmente libres de ataques de plagas o enfermedades.

En la producción de pimentón se diferencian tres fases, siendo la primera vinculada a la siembra, manejo y cosecha del pimiento, la segunda el secado del fruto vía secado natural o mecánico, y la tercera, la molienda, dando origen a un fino polvo de color rojo intenso. Todas las etapas son importantes a la hora de obtener un producto de buena calidad.

2.1.3.2 Cultivo, cosecha, secado y molienda

El pimiento para pimentón es un cultivo de 180 días que se inicia en el mes de agosto con el almácigo y finaliza en los meses de marzo-abril con la cosecha (Orell, 2006).

La cosecha se realiza de forma manual cuando el pimiento está arrugado, la intensidad de color es máxima y el contenido de agua es mínimo (Nuez Viñals *et al.*, 1996), lo cual ocurre en los meses entre marzo y mayo.

El secado tradicional es solar, se realiza al aire libre por exposición directa al sol, y consiste en disponer los pimientos en terrenos ripiosos, elevados y empinados, lo que beneficia el drenaje de agua en el caso de lluvias. Esta operación se extiende aproximadamente 30 días para reducir el contenido de humedad a 10-15% (De, 2003).

Este modo de secado clásico en la zona es popularmente conocido como "secado en cancha", el cual genera la aparición de problemas de carácter fitosanitarios originados por la contaminación de la producción. Algunos ejemplos son el desarrollo de *Salmonella* originada por las cotorras (consideradas plaga), con la consecuente disminución de la calidad del producto final.

Las características operacionales no posibilitan la obtención de un pimiento seco de buena calidad, ya que al aire libre se expone a materias extrañas como tierra, insectos, microorganismos, que reducen la calidad del producto final, además de deteriorarse gran parte del color inicial al descomponerse los pigmentos por acción de la radiación solar.

En la actualidad, mediante el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) y otras instituciones gubernamentales vinculadas al sector agropecuario de la zona, se ha buscado el mejoramiento del producto final mediante la incorporación de tecnología y la implementación de Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) y de Manufactura (BPM) en la cadena de producción para obtener mejores rendimientos y calidad del producto final (Pico Zossi *et al.*, 2013).

En la etapa del secado una innovación tecnológica fue la incorporación de un secadero simple de bajo costo (Pico Zossi *et al.*, 2013), con el cual se disminuyó el tiempo de secado en comparación con el tradicional, obteniendo además pimientos secos de color oscuro y homogéneo. Esto es porque la incidencia solar no es directa en el fruto y porque la humedad (rocío) es detenida por el plástico transparente que forma una cubierta protegiendo el producto (Pico Zossi *et al.*, 2013).

En Australia, Klieber (2000) recomienda, para obtener una calidad óptima y evitar el riesgo de desarrollo fúngico y la producción de aflatoxinas, el corte del pimiento en segmentos, y el secado en rangos de temperatura entre 45-50 °C y una Humedad Relativa de 20% o menos, sin superar la capacidad del equipo.

Las principales variables que determinan la calidad de secado son la cantidad de calor que recibe el producto, la cantidad de aire seco que permite retirar la humedad y la higiene con que se realiza el proceso. El mantenimiento de la higiene durante el secado resulta fundamental dado que puede utilizarse en la preparación de comidas sin previa cocción,

razón por la cual, los hábitos de buenas prácticas en la selección, el lavado del producto previo al secado, pueden prevenir la contaminación del producto durante el proceso.

Una vez finalizada la etapa de secado se clasifica el producto seco separando, por un lado todo el material sano y de color rojo intenso y por otro los frutos descoloridos, manchados o con escaldaduras. La producción es recolectada para su transporte a los establecimientos donde se efectúa la molienda.

El proceso de la molienda se realiza en molinos de piedra hasta lograr un producto suave y reducido. Estos molinos consiguen temperaturas suficientemente elevadas para causar la evaporación de parte del aceite contenido en el pimiento, impactando negativamente sobre la intensidad de su color original.

2.2 Legislación. Límites microbiológicos

El CAA en el artículo 1.233 define al pimentón estableciendo sólo los límites físico-químicos sin demarcar los criterios microbiológicos que deben cumplirse para este tipo de especia.

A nivel internacional se han reportado parámetros microbiológicos en especias:

En la Legislación de la República Dominicana en el Capítulo III “Especificaciones Microbiológicas por Grupo de Alimentos” se establecen límites microbiológicos de acuerdo a la Comisión Internacional de Especificaciones microbiológicas para alimentos (ICMSF); donde los alimentos se clasifican según su origen y/o tecnología aplicada en su elaboración.

Las Especias y Condimentos se encuentran dentro del grupo N° 13, cuyos parámetros microbiológicos son:

Tabla I: Requisitos microbiológicos a cumplir en Especias y Condimentos según la República Dominicana (2009)

Parámetro	Límite por gramo		
	c	m	M
Recuento Aerobios Mesófilos	2	10 ⁶	10 ⁷
Mohos	2	10 ⁴	10 ⁵
<i>Clostridium perfringens</i>	2	10 ²	10 ³
<i>Salmonella</i> en 50 g.	0	-	-

m = valor del parámetro microbiológico para el cual o por debajo del cual el alimento no representa un riesgo para la salud; c=número máximo de unidades de muestra que puede contener un número de microorganismos comprendidos entre “m” y “M” para que el alimento sea aceptable; M = valor del parámetro microbiológico por encima del cual el alimento representa un riesgo para la salud.

En la República de Chile se adoptan los mismos parámetros que en la legislación de la República Dominicana (Instituto de Nutrición y tecnología de los Alimentos - INTA - Universidad de Chile, 1996).

En Lima, Perú, en el año 2008 se aprueba por Resolución del Ministerio de Salud (MINSA) la Norma Técnica N° 71 “Norma Sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano”, siendo la Dirección General de Gestión Ambiental (DIGESA) el órgano técnico-normativo encargado de hacer cumplir la normativa. La Tabla N° II describe los criterios microbiológicos para especias.

Tabla II: Criterios microbiológicos para Especias y Condimentos Deshidratados

Agentes microbianos	Límite por g		
	c	m	M
Aerobios esporulados	2	10 ⁵	10 ⁶
Mohos	2	10 ³	10 ⁴
Coliformes	2	10 ²	10 ³
<i>Escherichia coli</i> (*)	2	10	10 ²
<i>Salmonella</i> sp.	0	Ausencia en 25 g	

(*) Sólo para los productos de consumo directo.

Fuente (Ministerio de Salud de Perú/Dirección General de Gestión Ambiental-V.01)

La Unión Europea (UE) posee el Reglamento N° 165/2010, recomendado por la Comisión Europea febrero de 2010. Este reglamento se ocupa, entre otros, de micotoxinas y metales pesados como cadmio, plomo y mercurio. En el caso de las aflatoxinas, la legislación de la UE solo cubre las especias *Capsicum spp.* (frutos desecados incluidos chiles, chile en polvo, cayena y pimentón), *Piper spp.* (Frutos, con inclusión de pimienta blanca y negra), *Myristica fragrans* (nuez moscada), *Zingiber officinale* (jengibre) y *Curcuma longa* (cúrcuma) (Tabla III). Para las demás especias se aplica la legislación nacional sobre aflatoxinas.

Los límites máximos de contenido de ocratoxina A en determinados productos alimenticios están regulados en la Unión Europea por el Reglamento (CE) 1881/2006 de la Comisión de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios, y sus posteriores modificaciones.

Las cantidades permitidas de OTA en pimentón hasta el 31/12/14 fueron de 30 µg/kg. Pero a partir del 01/01/15, los valores exigidos fueron menores, 15 µg/kg.

Tabla III: Criterios microbiológicos y límites de aflatoxinas según la legislación de la Unión Europea

Parámetro	Enterobacterias	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Bacillus cereus</i>	●Aflatoxina B ₁ ^a	●Aflatoxina B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂ ^a
Criterio	n=5, c=1, m=10	n=5, c=1,	n=5, c=1,	5 µg/kg	10 µg/kg
microbiológico	ufc/g, M=100	m=100 ufc/g,	m=1000		
	ufc/g	M=1000	ufc/g,		
		ufc/g	M=10000		
			ufc/g		

^a*Capsicum spp.* (frutos desecados, enteros o triturados, con inclusión de los chiles, el chile en polvo, la cayena y el pimentón); *Piper spp.* (frutos, con inclusión de la pimienta blanca y negra); *Myristica fragrans* (nuez moscada); *Zingiber officinale* (jengibre); *Curcuma longa* (cúrcuma).

2.3 Contaminación microbiana

La producción de pimentón se realiza en países donde el clima predominante es el tropical y subtropical, en los cuales se carece de buenas prácticas de manufactura. Esto provoca deficientes condiciones de saneamiento durante el transporte, envasado y almacenamiento, acrecentando el riesgo de infección y la proliferación microbiana, alojando bacterias y

hongos, algunos patógenos, deteriorantes y de importancia para la salud pública (Adegoke *et al.*, 1996; Banerjee *et al.*, 2003; Mandeel, 2005; Schweiggert *et al.*, 2005; ASTA, 2011).

El origen del pimentón dio lugar a las primeras obras que informaron sobre su contaminación microbiana. Christensen *et al.*, (1967) fueron pioneros y observaron que muestras de pimienta negra y pimentón provenientes de la India se encontraban fuertemente invadidas por hongos y bacterias.

El crecimiento microbiano puede estar influenciado por la temperatura, el pH y otros factores, pero en este tipo de alimento la a_w resulta ser el factor más importante que controla el crecimiento microbiano. Las bacterias no crecen por debajo de una $a_w = 0,91$, siendo el valor límite para el crecimiento de cualquier microorganismo, de aproximadamente 0,6 (Adams & Moss, 1995).

En los últimos años, la FDA ha observado un aumento en el número de retiros del mercado de especias debido a la contaminación bacteriana. Como consecuencia de esto, se revisó la retención de especias que tuvieron lugar en los Estados Unidos desde 1970 a 2003. Durante el período de estudio, la FDA controló 21 retiros del mercado que involucraron 12 tipos de especias contaminadas con patógenos bacterianos; en todos los casos, excepto en uno, las especias retiradas contenían *Salmonella*. El pimentón fue el más frecuentemente implicado (Vij *et al.*, 2006).

Salmonella es una bacteria patógena que necesita humedad para crecer, pero también, posee la capacidad de perdurar largos períodos de tiempo en ámbitos con a_w baja como son las especias (Pinkas *et al.*, 2014).

La gran mayoría de casos esporádicos y brotes de salmonelosis es causada por alimentos contaminados (Scallan *et al.*, 2011). Esto es de preocupación particular cuando la contaminación con *Salmonella* no puede ser eliminada y la comida se consume sin ningún tratamiento térmico posterior. De este modo, el papel de las especias se puede dilucidar como fuente de enfermedades transmitidas por los alimentos (Zweifel & Stephan, 2012).

Estos organismos perjudiciales proceden del suelo, polvo, insectos y materiales de animales y las oportunidades para su inserción en las especias puede suceder tanto en el

cultivo, cosecha y procesamiento, como en las etapas comprendidas entre la recolección y la compra de un consumidor, implicando las fases de lavado, secado, envasado, almacenamiento o distribución (ASTA, 2011).

Las especies bacterianas y fúngicas en especias incluyen bacterias aeróbicas, bacterias formadoras de esporas, bacterias productoras de toxinas estables a elevadas temperaturas, bacterias proteolíticas y/o amilolíticas y hongos productores de micotoxinas (Baxter, 1986).

Algunas especies de mohos, de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, son productores potenciales de éstas sustancias tóxicas, siendo algunas de ellas las aflatoxinas y ocratoxinas, que tienen efecto mutagénicos, teratogénicos y carcinogénicos en seres humanos y animales (Zinedine *et al.*, 2006).

La actividad bioquímica de los microorganismos que prosperan y se establecen durante el proceso de deshidratación del pimentón puede alterar las características organolépticas, características del producto y participar en procesos metabólicos que ocurren durante el trazado de la deshidratación (Gallardo-Guerrero *et al.*, 2010).

Resulta importante señalar que existen una serie de variantes que afectan el desarrollo microbiano de las especias. Las características físicas intrínsecas son una de ellas, e incluyen la a_w , la flora microbiana típica y componentes antimicrobianos. También son factores de relevancia la particularidad de la población microbiana, las prácticas de manipulación y almacenamiento desde el cultivo hasta el consumidor y los tratamientos para la reducción microbiológica (ASTA, 2011).

2.3.1 Flora normal de las especias

Según Gray y Pinkas en APHA, 2001, hacen referencia a la flora normal de las especias, considerando que la materia prima de origen agrícola, con la que se elaboran las especias, presentan comúnmente numerosas bacterias y hongos, donde algunos poseen la capacidad de causar grandes deterioros y además, provocar serios problemas sanitarios que afectan la salud pública. Es de importancia destacar que el medio ambiente y el modo en que se cultivan, cosechan y producen, como así también la naturaleza química de la especia, influyen en forma directa sobre su calidad microbiológica. Así también, es relevante tener

en cuenta que numerosas células vegetativas mueren durante el proceso de secado, aunque pueden sobrevivir muchas bacterias y hongos.

El elevado número de bacterias y mohos en los productos agrícolas tiene su origen en el suelo, sumando a la contaminación y crecimiento bacteriano, las prácticas de recolección, manejo y producción (Abou Donia, 2008).

2.3.2 Contaminación bacteriológica

A medida que el proceso productivo de las especias avanza en sus diferentes etapas, es importante tener en cuenta cómo se maneja, procesa y almacena el producto para disminuir el potencial deterioro y contaminación desapercibida.

El proceso de secado al sol es simple pero trae consigo condiciones antihigiénicas que provocan elevadas cargas microbianas, especialmente de bacterias mesófilas, bacterias anaerobias esporuladas, mohos y levaduras. La presencia de *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*, revelan serios inconvenientes en el pimentón (Schweiggert *et al.*, 2005).

El recuento de bacterias aerobias mesófilas es usado como indicador de la población bacterial presente en una muestra, su calidad sanitaria, aceptabilidad organoléptica, aplicación de las buenas prácticas de manufactura y, en menor medida como un indicador de seguridad. Puede dar información de las condiciones del proceso de producción, del almacenamiento, manipulación de los alimentos, como así también de la vida útil o los inminentes cambios organolépticos de aquellos. Un recuento bajo no significa que el producto o los ingredientes estén libres de patógenos. Sin embargo, si el alimento muestra valores excesivamente o inusualmente altos, es razonable suponer que los riesgos potenciales para la salud sean elevados, hasta que se pueda descartar a través de ensayos específicos, para detectar patógenos, su confirmación o no.

Gallardo-Guerrero *et al.* (2010) realizaron una caracterización fisico-química y microbiológica sobre el proceso de deshidratación de pimiento rojo para la producción de pimentón, utilizando dos tipos de secadero. Obteniendo recuentos de aerobios mesófilos iniciales entre 10^8 - 10^{11} UFC/g y 10^8 - 10^{10} UFC/g, valores muy similares en ambos secadores. Según la Comisión Internacional sobre Especificaciones Microbiológicas para

los Alimentos (ICMSF) los niveles máximos permitidos de bacterias aerobias mesófilas totales para pimentón debe ser 10^6 - 10^{10} CFU/g. Por lo tanto, estos altos niveles provienen de la contaminación del suelo, el medio ambiente, y heces de aves y otros animales, contaminando el pimiento rojo, ya sea durante el cultivo o durante el tiempo de secado. Banerjee y Sarkar (2003) también obtuvieron valores superiores a los permitidos, aunque sus recuentos fueron inferiores a los encontrados por Gallardo-Guerrero *et al.* (2010), lo que demuestra que los resultados pueden variar dependiendo de la fuente.

La importancia de la contaminación bacteriana reside en que las especias son añadidas frecuentemente a los alimentos sin un tratamiento posterior que asegure su preservación, provocando un aumento exponencial de recuentos microbianos hasta su consumo. Además, no se puede dejar de considerar la importancia de la formación de esporas de las bacterias, las que pueden originar el deterioro de los alimentos enlatados y productos cárnicos procesados, pudiendo eliminarse a través de la esterilización (Schweiggert *et al.*, 2005).

Las especias son productos que poseen baja humedad, con una a_w inferior a 0,60, particularidad que impide el desarrollo de bacterias siempre y cuando las condiciones de almacenamiento sean las apropiadas. Sin embargo si los niveles de a_w son altos, existe la posibilidad de favorecer el ambiente para desarrollo de la flora bacteriana (Pinkas *et al.*, 2014).

Especias como la pimienta negra y el pimentón poseen naturaleza higroscópica, que cuando son almacenadas en espacios con elevada humedad, la a_w de la especia será un reflejo del % de humedad relativa (HR) de las condiciones de almacenamiento (Keller *et al.*, 2013). La normativa recomienda para el almacenamiento de la especias, un valor menor a 60% con relación a la HR (ASTA, 2011; ESA, 2013; Codex Alimentarius 1995).

Las especias comúnmente están contaminadas con mohos de almacenamiento y bacterias xerófilas (Kocic-Tanackov, *et al* 2007; McKee, 1995).

En Austria, se ha reportado en algunas especias como pimienta negra y chiles, valores máximos de bacterias mesófilas aerobias totales mayores a 10^7 UFC/g (Kneifel *et al.*, 1994).

Recientemente se ha detectado en especias como el pimentón, contaminación con *Salmonella*, provocando brotes de origen alimentario y retiros del mercado de estos productos, provocando una eminente preocupación en la salud pública (Gurtler *et al.*, 2014).

En Alemania en el año 1993 se reportaron 1.000 casos de salmonelosis, asociados al consumo de papas fritas condimentadas con pimentón contaminado y pimentón procedente de América del Sur. La misma variedad de serotipos de *Salmonella* fueron encontrados en niveles <1 UFC/g en los alimentos contaminados y en los pacientes que los consumieron (Lehmacher *et al.*, 1995).

Los coliformes son comunes en ambientes de elaboración de alimentos y pueden formar parte de la microflora residente en las instalaciones, sobre todo cuando el saneamiento es inadecuado. La mayor aplicación de las pruebas de coliformes es en la evaluación de la calidad general de un alimento y las condiciones higiénicas presente durante su elaboración.

El grupo de coliformes son organismos aeróbicos o anaeróbicos facultativos, bacilos gram negativos, que fermentan la lactosa y producen ácido y gas a 35 °C en 48 h.

La presencia de elevados niveles de coliformes puede corresponder a una deficiencia en el procesamiento o a una contaminación posterior. Esto no evidencia que haya ocurrido contaminación fecal.

En el año 2007 en Irán se estudió la calidad microbiológica del pimentón, entre otras especias, cuyas muestras fueron tomadas de puestos de venta al por menor, reportándose valores de bacterias aerobias mesófilas, coliformes, *Escherichia coli* y mohos que sobrepasan los límites Nacionales Estándares de Irán (Koohy-Kamaly-Dehkordy *et al.*, 2013).

En Sudáfrica (Baxter y Holzapfel, 1982) experimentaron con 36 especias, hierbas y aditivos alimentarios de distintas fuentes, encontrando en el pimentón, pimienta negra, cilantro, pimienta de Jamaica y pimienta blanca, elevados números de bacterias formadoras de esporas ($>10^6$ UFC), como así también se detectó la presencia de *Enterococcus* spp. La presencia de bacterias aeróbicas formadoras de esporas y mohos es significativa, ya que su supervivencia o la presencia de sus toxinas después del proceso de cocción puede

ocasionar intoxicación alimentaria o deterioro del producto en el que se han utilizado especias.

2.3.3 Contaminación fúngica

Como se mencionó en reiteradas ocasiones, debido a las condiciones de la producción en países donde prevalece el clima cálido y húmedo y a las situaciones desfavorables, como la falta de higiene durante el almacenamiento, los productos derivados de *Capsicum* son susceptibles a la contaminación fúngica y como tal, puede acarrear la acumulación de micotoxinas en estos alimentos. De este modo, los productos como el chile o pimentón pueden estar contaminados con toxinas fúngicas, como las aflatoxinas (AF), ocratoxina A (OTA), zearalenona (ZEA) y otras micotoxinas, lo que conlleva a un riesgo para la salud pública (Santos *et al.*, 2008). Las AF y OTA pueden contaminar el pimentón en cualquier etapa de la producción, desde antes de la cosecha, durante su secado y almacenamiento (Shundo *et al.*, 2009).

En la India, Christensen *et. al.*, 1967 han reportado, en muestras de pimienta negra y de pimentón, una elevada contaminación con hongos, principalmente especies de *Aspergillus*, incluyendo *A. flavus* y *A. ochraceus*.

En el pimentón y en otras especias, los mohos que se encuentran con mayor frecuencia pertenecen al género *Aspergillus* y *Penicillium*, quienes provocan detrimento en los alimentos y además poseen la capacidad de producir micotoxinas (Santos *et al.*, 2011; Bokhari, 2007; El-Kadi *et al.*, 1992; Llewellyn *et al.*, 1981).

La producción de estos metabolitos en el pimentón puede suceder tanto en el campo, en la post cosecha, procesamiento y almacenamiento, siempre que las condiciones del ambiente sean favorables. Los mohos filamentosos capaces de producir estas toxinas pueden clasificarse de acuerdo al lugar adonde las originen. Las micotoxinas que se producen en el campo están relacionadas con hongos que pertenecen a los géneros de *Alternaria* y *Fusarium*. Mientras que, las que se originan en el almacenamiento pertenecen a especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, considerados hongos de almacenamiento (Mandeel, 2005; Christensen *et al.*, 1967).

El potencial de deterioro y la producción de micotoxinas dependen de los tipos de hongos presentes, de la composición del alimento y de las condiciones de manipulación y

almacenaje. En los alimentos secos existe susceptibilidad al deterioro y a la producción de toxinas si su a_w excede los límites y si la temperatura de almacenamiento es adecuada para el desarrollo de mohos (Misra, 1981).

2.3.3.1 Micotoxinas

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos producidas por hongos toxigénicos, que se sintetizan cuando su fase de crecimiento llega a la etapa final y, durante su fase estacionaria. Son moléculas relativamente pequeñas ($P_m < 700$) que se desarrollan en productos vegetales provocando efectos indeseables en plantas y animales (Abarca *et al.*, 2000).

Las micotoxinas son un grupo diverso de compuestos con propiedades tóxicas hacia los seres humanos y animales, causando una amplia gama de efectos agudos y crónicos en la salud colectiva conocida como micotoxicosis. Los géneros que producen estos compuestos, pertenecen a *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* (Khalesi, 2011; Santos *et al.*, 2011).

Las micotoxinas suelen ingresar al cuerpo a través de diversas rutas, por ingestión de alimentos contaminados, por inhalación de esporas toxigénicas y por contacto directo a través de la piel. Son sustancias que poseen una gran estabilidad al calor, por lo que constituyen un riesgo potencial para la salud del hombre y animales. Sus propiedades químicas, biológicas y toxicológicas son diferentes y sus efectos tóxicos son extremadamente variables. La toxicidad crónica para el hombre tiene una gran importancia, ya que está asociado al consumo de pequeñas cantidades de micotoxinas durante periodos prolongados, provocando efectos hepatotóxicos, carcinogénicos, teratogénicos y mutagénicos e inmunotoxicidad. Además, estos compuestos no sólo son peligrosos para la salud de los consumidores, sino que también perjudican la calidad comercial de los productos contaminados, implicando importantes pérdidas económicas (Zinedine *et al.*, 2009; Abarca *et al.*, 2000).

Normalmente las AF, OTA y ZEA se forman en los cultivos, como así también durante el almacenamiento. Cuando las condiciones higiénicas son deficientes y no existe un control de la a_w durante el procesamiento, la producción de micotoxinas en pimentón se hace visible ocasionando severos deterioros (Santos *et al.*, 2008).

Aflatoxinas (AF)

Las aflatoxinas (AF) son un tipo de micotoxinas producidas por *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus nomius*. La característica de estas sustancias es que son altamente cancerígenas, provocando elevados efectos tóxicos cuando se ingieren alimentos contaminados con estas toxinas (Kiran *et al.*, 2005).

Las AF afectan al hombre y a los animales provocando efectos tóxicos, tanto agudos como crónicos. Estos efectos son: daño hepático agudo, cirrosis hepática, la inducción de tumores y efectos teratogénicos (Stoloff, 1977). Sin embargo, la información más reciente indica que las consecuencias de la exposición prolongada de AF son más generalizadas, incluyendo la inmunosupresión y la interferencia con la absorción de la proteína (Williams *et al.*, 2004).

Las cuatro principales AF producidas naturalmente son conocidas como B₁, B₂, G₁ y G₂ y ácido ciclopiazónico (Figura 1). Las letras “B” y “G” se refieren a los colores fluorescentes azul y verde, producidos bajo la luz ultravioleta en placas de cromatografía de capa delgada, mientras que los números subíndices 1 y 2 indican compuestos mayores y menores (Pitt & Hocking, 2009). *A. flavus* produce sólo AF B₁ y B₂, y algunas cepas de esta especie originan el ácido ciclopiazónico (ACP). Mientras que *A. parasiticus* y *A. nomius* producen B₁, B₂, G₁ y G₂. Estos cuatro compuestos son comúnmente producidos en los alimentos (Codner *et al.*, 1963; Schroeder, 1966).

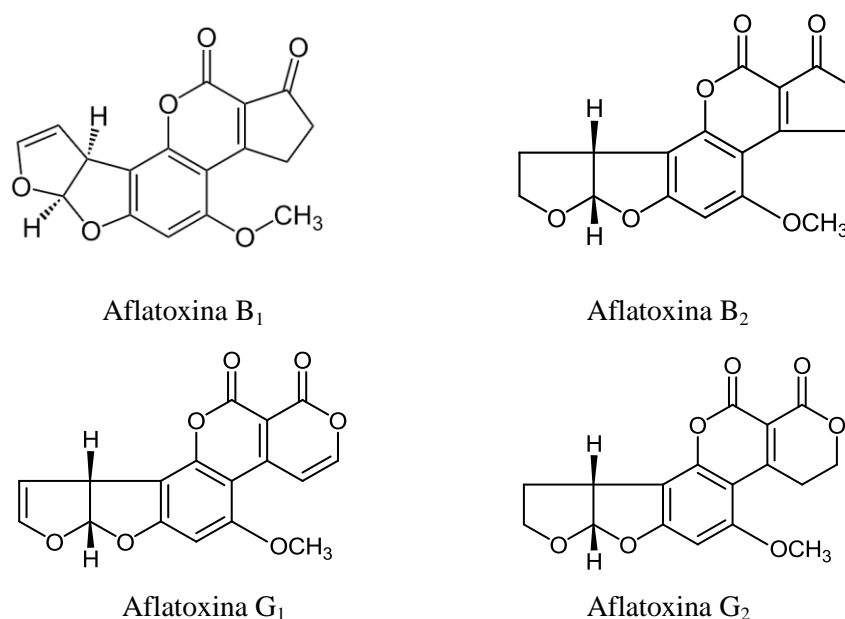


Fig. 1: Estructura química de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂

Se ha expresado preocupación sobre los elevados recuentos de *A. flavus* en especias y sobre la posible ocurrencia de aflatoxinas en estos productos. Si bien las cantidades utilizadas en la mayoría de los alimentos son pequeñas, las especias son añadidas en la preparación de diversos productos, por lo que la presencia de este moho resulta indeseable.

Para impedir la contaminación de productos agrícolas durante el almacenamiento con AF, se debe considerar las condiciones ambientales. Los factores que favorecen el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus* y la posterior producción de aflatoxinas en el almacenamiento se ven favorecidos por la alta humedad (> 85%), alta temperatura (25°C) y la actividad de insectos y roedores (Adegoke & Letuma, 2013).

Un estudio realizado por Horn (2003) reveló que el suelo sirve como depósito para *A. flavus* y *A. parasiticus*, quienes producen aflatoxinas cancerígenas y afectan a los productos agrícolas. También sugiere que el clima y la composición de los cultivos influyen en la densidad de especies y el potencial de producción de aflatoxinas. Los hongos aflatoxigénicos residen en el suelo como conidios, esclerocios y hifas, que actúan como inóculos primarios para infectar directamente maníes o para contaminar las partes aéreas de los cultivos (maíz, semilla de algodón, nueces de árboles), a través del viento y la dispersión por insectos.

Zinedine *et al.* (2006) manifestaron la presencia natural de AF en 55 muestras de pimentón, jengibre, comino y pimienta, comercializadas en Marruecos, niveles elevados de contaminación en el pimentón con un 100% de las muestras positivas y una concentración promedio de 2,88 y 5,23 µg/kg para la AFB₁ y el total de AF, respectivamente. Entre las especias estudiadas el valor máximo fue de la muestra de pimentón (9,68 µg / kg). En este estudio, la incidencia de AF en pimentón y jengibre fue mayor que en el comino y la pimienta.

En el año 2006, en la ciudad de San Pablo, Brasil, se reportaron datos sobre la presencia de AF y OTA sobre 70 muestras de pimentón adquiridas en supermercados locales, resultando una contaminación del 82% con AF, el 61,4% sólo con AFB₁, en niveles que van desde 0,5 µg/kg a 7,3 µg/kg y el 21,5% estaban contaminadas con AF totales con niveles que van de 1,7 µg/kg a 7,0 µg/kg. El 18,6% de las muestras analizadas superaron los límites legales de AFB₁ establecidos por la Comunidad Europea (5 µg/kg) (Shundo *et al.*, 2009).

Ocratoxina A (OTA)

La ocratoxina A (OTA) es una micotoxina nefrotóxica con propiedades cancerígenas, inmunosupresoras, y teratogénicas (Murphy *et al.*, 2006). OTA fue aislada de una amplia gama de productos alimenticios, entre ellos el pimentón (Shundo *et al.*, 2009; Almela *et al.*, 2007).

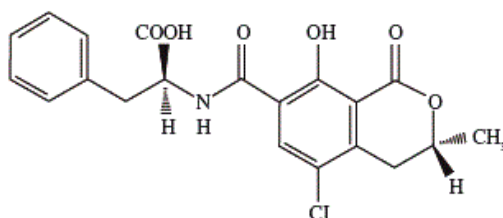


Fig. 2: Estructura química de ocratoxina A

La producción de OTA fue asociada inicialmente con cepas de *Aspergillus ochraceus* encontradas en cereales almacenados (Pitt & Hocking, 1997). Del mismo modo, *Penicillium verrucosum* fue introducido como otro productor de esta toxina (Frisvad, 1986). Sin embargo, *Aspergillus carbonarius* (Horie, 1995) resulta un significativo productor de OTA en sustratos como uvas y sus productos derivados como pasas (Romero *et al.*, 2005), vino y jugos (Leong *et al.*, 2004); también fue encontrado en granos de café (Abarca *et al.*, 2004).

Frisvad *et al.* (2004), informaron a *A. westerdijkiae* como una nueva especie productora de importantes cantidades de OTA en sustratos como el café.

No obstante, los últimos estudios proponen que, independientemente del sustrato, *A. carbonarius* (sección *Nigri*) es la principal especie ocratoxigénica (Kapetanakou *et al.*, 2009).

En un estudio realizado por Santos *et al.*, (2011), en muestras de pimentón, revelaron que los géneros más frecuentes que se encontraron fueron *Aspergillus spp.* (41%) y *Eurotium spp.* (35%) sobre un total de 32 muestras de especias, de las cuales 17 correspondían a pimentón. Las especies que se encontraron pertenecieron al género *Eurotium*: *E. amstelodami*, *E. chevalieri*, resaltando a *E. herbariorum*, *E. repens* y *E. rubrum* y *E. amstelodami* como los más frecuentes (35%). Con respecto al género *Aspergillus*, fueron aislados *A. candidus*, *A. carbonarius*, *A. flavus*, también *A. niger*, *A. niveus*, *A. ochraceus*, *A. tamarii*, y *A. ustus*, siendo *A. niger* el más frecuente. En todas las muestras estudiadas se

identificó la presencia de una amplia gama de micotoxinas: AF, OTA y ZEA. Encontrándose en el pimentón un 82% AF y OTA. Además, hubo una baja frecuencia de *Penicillium* y *Fusarium*, hongos también micotoxigénicos.

2.4 Plantas como antifúngicos naturales

2.4.1 Los extractos de plantas y aceites esenciales

A fin de reducir la utilización de fungicidas químicos sintéticos en los alimentos, se han estudiado varios tratamientos alternativos. Los metabolitos producidos por las plantas son una alternativa prometedora ya que estas pueden originar una amplia variedad de compuestos, ya sea como parte de su desarrollo o en respuesta al estrés o ataque de patógenos.

En los últimos años, se ha cautivado cada vez más el interés, debido a su estado relativamente seguro (muchos de ellos son considerados GRAS por la FDA); ya que son fácilmente degradables en el medio ambiente y no fitotóxicos. Se ha demostrado que los extractos vegetales obtenidos con diferentes disolventes y aceites esenciales son ricos en compuestos potencialmente bioactivos, tales como fitoalexinas, muchos alcaloides, flavonoides, isoflavonoides, taninos, cumarinas, glucósidos, terpenos, fenilpropanos y ácidos orgánicos que tienen actividad antimicrobiana y son fitosanitarios. Los aceites esenciales (AE) son líquidos aceitosos aromáticos obtenidos por hidrodestilación partir de material vegetal (tejidos o semillas) y son por lo general mezclas de varios componentes. Los aceites esenciales y extractos vegetales tienen la ventaja potencial de ser bioactivos en su fase de vapor, una característica que los hace atractivos como posibles fumigantes para la protección de productos almacenados. Su actividad antimicrobiana se relaciona comúnmente con la estructura química de sus componentes, la concentración en la que están presentes, y sus interacciones, que pueden afectar sus propiedades bioactivas. También pueden contener diversos compuestos antioxidantes tales como polifenoles, fenoles, flavonoides, entre otros, que han sido considerados como la base de sus propiedades antimicrobianas. El hecho de que están constituidos por una gran variedad de compuestos les confiere otras ventajas, tales como diferentes modos de acción dependiendo del compuesto involucrado, lo que facilita la capacidad de atacar diferentes géneros de hongos y obstaculizar el desarrollo de resistencia por el patógeno (Da Cruz Cabral *et al.*, 2013).

Existe una amplia investigación sobre la actividad biológica y antifúngica de extractos y aceites esenciales de diversas especies vegetales. Diferentes investigadores han estudiado especies que poseen una interesante actividad antifúngica. Jasso de Rodríguez *et al.*, (2007), observaron que extractos etanólicos de *Flourensia cernua*, *F. microphylla*, *F. retinophylla*, fueron activos sobre *Alternaria sp.*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*. Así mismo, extractos acuosos de manzanilla (*Anthemis nobilis L.*) y malva (*Malva sylvestris L.*) a 0,92 y 0,6 g/ml, respectivamente inhibieron el crecimiento de cuatro hongos *Aspergillus candidus*, *A. niger*, *Penicillium sp.*, y *F. culmorum*, malva fue la más eficaz, ya que una menor concentración era necesaria para la inhibición de los mismos (Magro *et al.*, 2006).

Igualmente, el aceite de *Chenopodium ambrosioides* inhibió el crecimiento micelial de dos cepas de *Aspergillus flavus* aflatoxigénicos a 100 g/ml. Este aceite también inhibe el crecimiento de: *Aspergillus fumigatus*, *Botryodiplodia theobromae*, *Fusarium oxysporum*, *Phythium debaryanum* y *Sclerotium rolfsii* (Kumar *et al.*, 2007). El aceite esencial de *Peumus boldus* fue activo contra *Aspergillus niger*, *A. flavus* y *Fusarium spp.* (Souza *et al.*, 2005).

Aceites esenciales obtenidos de *Carum*, *Cymbopogon nardus*, *Pelargonium roseum*, *Pimenta dioica* y *Thymus vulgaris* fueron eficaces contra crecimiento de las especies de hongos como *Fusarium verticillioides*, *F. oxysporum*, *Penicillium expansum*, *P. brevicompactum*, *A. flavus* y *A. fumigatus*. Vilela *et al.* (2009) demostraron que los AE de *Eucalyptus globulus*, resultaron claramente inhibitorios en el crecimiento de las especies fúngicas como *Aspergillus parasiticus* y *A. flavus*.

Ravikumar Patil *et al.* (2007) informaron que, *A. niger* y *Penicillium spp.* fueron sensibles al extracto etanólico crudo de *Thevetia peruviana*, registrando una reducción del crecimiento radial del 50%. Una considerable reducción en la esporulación fue también observada con AE de hoja de canela con una eficacia del 100% contra *A. niger*, *A. flavus*, *Fusarium moniliforme*, *F. graminearum*, *Penicillium citrinum* y *P. viridicatum* (Singh *et al.*, 2007).

Deba *et al.* (2008) probaron las actividades fungitóxicas de AE de las flores de *Bidens pilosa* contra *Fusarium spp.* La especie más inhibida fue *Fusarium solani*, seguido de *F. oxysporum*.

Naeini *et al.* (2010) observaron que las propiedades anti *Fusarium* varían en cinco AE de hierbas que durante mucho tiempo se han utilizado como especias o fuentes medicinales importantes. La mayor actividad anti *Fusarium* se encontró en el AE de *Cuminum cyminum* y *Zataria multiflora* contra cepas no toxigénicas (*F. solani* y *F. oxysporum*) y toxigénicas (*F. verticillioides*, *F. poae*, *F. equiseti*).

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

El pimentón posee naturalmente contaminantes fúngicos y bacterianos. Entre la microbiota fúngica del pimentón se encuentran especies potencialmente productoras de micotoxinas. Extractos vegetales con actividad antifúngica inhiben el crecimiento de la microbiota del pimentón.

3.2 Objetivos

Objetivos generales

- Evaluar la contaminación bacteriana y fúngica en pimentón (*Capsicum annum L.*) producido en el departamento de Santa María, provincia de Catamarca y plantear estrategias de control con extractos vegetales.

Objetivos específicos

- Conocer los niveles de contaminación bacteriana y fúngica de muestras de pimentón de establecimientos productores de la provincia de Catamarca de tres cosechas diferentes.
- Analizar la posible relación entre la actividad acuosa de las muestras de pimentón con los niveles de contaminación bacteriana y fúngica encontrados.
- Identificar la microbiota presente en muestras de pimentón, con especial referencia a cepas potencialmente productoras de micotoxinas.
- Evaluar la actividad antifúngica de extractos vegetales de una *Flourensia blakeana* obtenidos a partir de diversos solventes frente a hongos contaminantes potencialmente toxicogénicos aislados de las muestras de pimentón.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Muestras

Se utilizaron muestras de pimentón (*Capsicum annuum* L.), pertenecientes a las cosechas 2010, 2011 y 2012, producidas en establecimientos productores del departamento Santa María, Provincia de Catamarca (Tabla III). Las muestras fueron provistas directamente por los productores o adquiridas en comercios minoristas. Las 15 muestras analizadas pertenecen a los 6 establecimientos pimentoneros de mayor importancia del departamento (Fig. 1). Para cada muestra se recolectaron 250 g de pimentón en recipientes estériles, aquellas adquiridas en comercios se conservaron en su envase original (APHA, 1992); fueron mantenidas a 5 °C hasta su análisis.

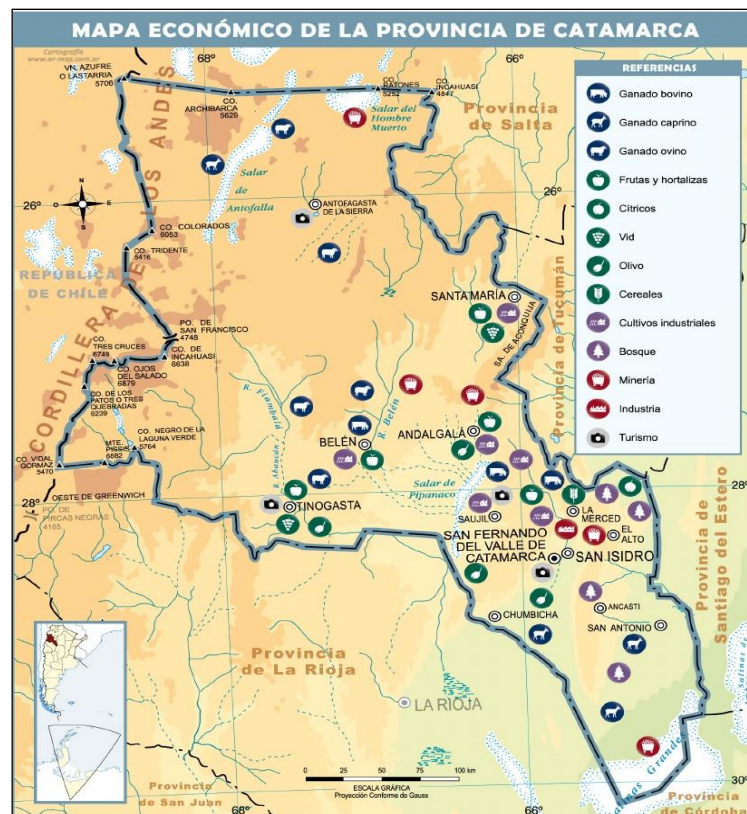


Fig. 3: Mapa de la provincia de Catamarca con las principales producciones desarrolladas.

Fuente: <http://mapoteca.educ.ar/mapa/catamarca/>

Tabla IV: Muestras de pimentón (*Capsicum annum* L.) de las cosechas 2010, 2011 y 2012 de establecimientos productores del departamento Santa María – Catamarca.

Muestras	Procedencia	Año
A10	Santa María	2010
C10	Santa María	2010
D10	Santa María	2010
E10	Santa María	2010
A11	Santa María	2011
B11	Santa María	2011
C11	Santa María	2011
D11	Santa María	2011
E11	Santa María	2011
F11	Santa María	2011
A12	Santa María	2012
C12	Santa María	2012
D12	Santa María	2012
E12	Santa María	2012
F12	Santa María	2012

4.1.1 Determinación de la actividad acuosa (a_w)

En la determinación de la a_w , se efectuó utilizando un higrómetro Aqualab (Decagon Devices CX3 02734) con una precisión de $\pm 0,002$. Las mediciones se realizaron por duplicado.

4.1.2 Recuento de bacterias aerobias mesófilas (RAM)

Se pesó de manera aséptica 1 g de cada muestra y se disolvió en 9 ml de agua peptonada estéril 0,1% mediante un agitador; a partir de esta dilución (1:10) se realizaron diluciones decimales sucesivas hasta 10^{-5} (1:100000). Cuando las muestras resultaron muy contaminadas, se repitieron los ensayos con mayores diluciones decimales. Se sembró en profundidad 1 ml de cada dilución, por duplicado, en placas de 90 mm de diámetro con agar para recuento en placa. Las placas se incubaron a 35 °C durante 48 h (BAM, 2009).

El cálculo de los recuentos se realizó a partir de las diluciones seleccionadas de acuerdo a las reglas de recuento en placa (APHA, 1992).

4.1.3 Recuento de coliformes totales (CT)

A partir de los homogenatos preparados previamente para el RAM, se sembró en profundidad y con sobrecapa 1 ml de las diluciones decimales sucesivas hasta 10^{-3} (1:1000), por duplicado, en placas de 90 mm de diámetro con Agar Bilis Rojo Violeta-lactosa (ABRV-lactosa). Las placas se incubaron a 35 °C durante 24 h. Se contaron las colonias típicas (rojas, mayores a 0,5 mm, con un halo de precipitación) a partir de las diluciones seleccionadas de acuerdo a las reglas de recuento en placa (APHA, 1992).

4.1.4 Determinación de *Salmonella spp.* (Método de referencia para pimentón, AOAC 1995, BAM 1995).

Se pesaron aseptícamente 25 g de cada muestra y se disolvieron en 225 ml de Caldo Tripteína Soya (CTS). Se mezcló por agitación y se incubó a 35 °C durante 24 ± 2 h.

Se transfirió en forma paralela, 1 ml del cultivo de preenriquecimiento a 10 ml de Caldo Selenito Cistina (SC) y a 10 ml de Caldo Tetrionato (TT), respectivamente. Se incubaron a 35 °C durante 24 ± 2 h.

A partir de los medios de enriquecimiento se sembró con ansa calibrada (1 μ l) por estría en placas de Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) y en Agar Bismuto Sulfito (BS). Se incubaron a 35 °C durante 24 ± 2 h.

Se examinaron las placas en busca de colonias sospechosas. En XLD las colonias típicas de *Salmonella* son rosas con o sin centro negro; en BS son marrones a negras con o sin presencia de brillo metálico y con la prolongación del tiempo de incubación puede aparecer el llamado efecto halo. Cuando en las placas de BS hubo ausencia o no se desarrollaron colonias sospechosas se incubó durante 24 h más. Se inocularon dos o más colonias típicas en tubos inclinados de Agar triple azúcar hierro (TSI) y en Agar hierro lisina (LIA), en profundidad y superficie. Se incubaron a 35 °C durante 24 ± 2 h. Adicionalmente se realizaron cultivos en caldo urea a 35 °C durante 24 ± 2 h. Reacción de oxidasa y tinción de gram.

4.1.5 Recuento de mohos y levaduras

Se pesó 1 g de cada muestra y se disolvió en un erlenmeyer con 19 ml de agua peptona 0,1% (Hocking *et al.*, 1997). Se sembró 1 ml de la dilución por recuento combinado en 5 placas con medio DG18 (Agar Diclorán 18 % de Glicerol) y se extendió uniformemente

sobre la superficie con espátula de Drigalsky. El medio DG18 está recomendado para alimentos de baja actividad acuosa, como las especias, ya que permite también el recuento de hongos moderadamente xerófilos (APHA, 1992).

Las placas se incubaron a 25 °C durante 5 días. Cuando las muestras resultaron muy contaminadas, observándose más de 150 colonias por placa, se repitieron los ensayos con mayores diluciones decimales (APHA, 1992).

4.1.6 Identificación taxonómica a nivel de género

Se observaron microscópicamente todas las colonias y se identificaron a nivel de género empleando la clave de Pitt & Hocking (2009). Para la observación microscópica se colocaron los especímenes entre portaobjetos y cubreobjetos con lactofucsina (0,1 % de fucsina disuelta en ácido láctico 85 %).

Aquellas colonias que solo presentaban micelio, o que no pudieron ser identificadas de esta manera, fueron reaisladas en Agar Papa Dextrosa (PDA) e incubadas a 25 °C durante 7 días.

4.1.7 Identificación taxonómica a nivel de especie

Se realizó la identificación a nivel de especie, de cepas pertenecientes a géneros con especies potencialmente toxigénicas.

Los aislamientos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* se sembraron en Agar Extracto de Malta (MEA) y se incubaron 7 días a 25 °C para obtener cultivos bien esporulados. Las esporas de cada cepa fueron recolectadas con un ansa en ángulo recto y se colocaron en 1 ml de una solución acuosa estéril al 0,05 % de Tween 80 y 0,2 % de agar (Pitt y Hocking, 1997). A partir de la suspensión de esporas se sembraron con ansa recta, en tres puntos equidistantes, en distintos medios de cultivo según el género. Las cepas pertenecientes al género *Aspergillus* fueron sembradas en MEA, Agar Nitrato 25 % de Glicerol (G25N) a 25 °C, y en Agar Czapek Extracto de Levadura (CYA) a 25 y 37 °C. A los 7 días fueron identificadas hasta el nivel de especie empleando las claves de Klich M. (2002) y Pitt & Hocking (2009). Las cepas correspondientes al género *Penicillium* fueron sembradas en MEA, Agar Czapek (CZ) a 25 °C y en CYA a 5, 25 y 37 °C, durante 7 días; las especies se identificaron empleando las claves de Pitt (1979a y 1988) y Samson *et al.* (2002). Para este

género, en aquellas cepas pertenecientes al subgénero *Penicillium*, también fue consultado Samson & Frisvad (2004).

Algunos aislamientos de *Penicillium* fueron examinados para comprobar la producción de ácido ciclopiazónico y otros alcaloides al reaccionar con el reactivo de Ehrlich (Lund, 1995) utilizando el método de papel de filtro. Este reactivo se compone de 2 g de 4-dimetilaminobenzaldehído en 96% de etanol (85 ml) y 15 ml 10 N HCl. Con un sacabocados, se cortó un tapón de agar de 4 mm del centro de una colonia crecida en CYA (que se incubó 5-9 días a 25 °C) y se colocó en el micelio un trozo redondo (1 cm de diámetro) de papel de filtro (Whatman N°1) embebido con el reactivo. La formación de un anillo violeta, luego de 2-6 min, revela la producción de ácido ciclopiazónico o alcaloides relacionados. En algunos casos la reacción se produjo después de 7-10 min lo que se consideró como reacción débil. Algunos hongos producen alcaloides que reaccionan con el reactivo de Ehrlich para dar color rosa a rojo o anillos amarillos.

Los aislamientos pertenecientes a especies de *Alternaria* se sembraron en Agar Papa Dextrosa (PDA) y se incubaron durante 5 a 7 días a 25 °C. Los cultivos se transfirieron al medio Agar Agua (Agar 18 %) y se incubaron con ciclos de luz durante 7 a 14 días a 25 °C. A partir de estos últimos, se realizó la identificación mediante la observación de los modelos de esporulación según lo establecido por Simmons y Roberts (1993) y Simmons (2007).

Las especies identificadas se ordenaran de acuerdo a Orden y Familia según la clasificación propuesta por Hibbett *et al.* (2007). Serán nombradas en concordancia al nuevo Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Hongos y Plantas (McNeill *et al.*, 2012). Se describirá información relevante de las mismas, principalmente su potencial riesgo por producción de micotoxinas en alimentos, así como también diferencias observadas con las descripciones de la literatura.

Actividad antifúngica de *Flourensia blakeana* M.O. Dillon

4.2.1 Material vegetal

El material vegetal de *Flourensia blakeana* M.O. Dillon (Dillon, 1984) fue recolectado en la ruta provincial N° 307, entre Amaicha del Valle y Tafí del Valle, provincia de Tucumán, en temporada de verano. Su identificación taxonómica fue realizada en el Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV-CONICET-UNC) y el ejemplar de herbario fue depositado en el Museo Botánico de Córdoba con el registro CORD 1221.

4.2.2 Preparación de los extractos

El material vegetal se secó en oscuridad y en ambientes ventilados con el fin de evitar su alteración y facilitar su posterior molienda.

En el proceso de preparación de extractos, se trabajó con las partes aéreas de *Flourensia blakeana* Dillon, previamente cortados en trozos pequeños; las hojas se molieron en un molino Wiley con un tamiz de 2 mm. Para cada uno de los extractos, se pesó 50 g de muestra vegetal y luego se agregó 350 ml de solvente de extracción (etanol, acetona, cloroformo y hexano) y se dejó en maceración durante 7 días a temperatura ambiente, con agitación manual.

El extracto obtenido se filtró en papel Whatman N°1 y el solvente se separó en un evaporador rotatorio Buchi. El solvente residual se eliminó en un desecador al vacío durante 24 h. Finalmente el extracto fue guardado en un desecador para su posterior uso.

4.2.3 Evaluación antifúngica

4.2.3.1 Microorganismos y medios

Los hongos fueron aislados e identificados en el laboratorio de Microbiología de Alimentos, de la Universidad de Buenos Aires (UBA) según lo descrito en la sección 4.1.7. Los bioensayos fueron realizados con *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus niger*. En los bioensayos se utilizó como medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA).

4.2.3.2 Bioensayos

Los extractos se disolvieron en dimetil sulfóxido (DMSO) (Merck)-agua (1% v/v). Se prepararon en concentraciones de 1000 ppm a partir de la cual se realizaron diluciones de 100 y 500 ppm. Se efectuó un ensayo preliminar con los extractos a concentraciones de 100, 500 y 1000 ppm y con cada especie. Esto fue para seleccionar el extracto activo y el rango de concentración de las diluciones con la que se realizaron los ensayos.

La actividad antifúngica se estudió mediante ensayos *in vitro*, se utilizó como medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA), en cajas de Petri de vidrio de 90 mm de diámetro (Cakir *et al.* 2005; Kordali *et al.*, 2007). Luego de haber seleccionado el extracto activo y el rango apropiado, se efectuaron soluciones con los extractos, disueltos en DMSO-agua (1% v/v) a diferentes concentraciones para cada bioensayo. Se agregó un volumen constante y equivalente de 20 mg/placa en cada caja de Petri con 20 ml de PDA fundido (45-50 °C).

Para evaluar la actividad antifúngica se cortó con un sacabocado un trozo circular, del centro de la colonia, de un cultivo de 7 días de cada uno de los aislamientos a ensayar. Dicho trozo de agar se colocó, con el micelio hacia arriba, en el centro de las cajas de Petri que contenían el medio de cultivo con los extractos en distintas concentraciones.

Las placas se incubaron en oscuridad a 22 ± 2 °C. El diámetro de la extensión (mm) del micelio, o crecimiento radial, se midió a intervalos de 3, 4, 6, 7, 10 o 14 días dependiendo de la especie fúngica. La media de las mediciones de crecimiento fueron calculadas a partir de 3 réplicas de cada una de las especies fúngicas para cada concentración. Se utilizó como control positivo, el crecimiento de la especie ensayada en PDA en iguales condiciones de temperatura e intervalos de días.

4.2.3.3 Análisis estadístico

La significancia estadística se determinó por las pruebas de Duncan y Tukey; el análisis de varianza (ANOVA) se aplicó para determinar si existe una diferencia estadísticamente significativa entre los resultados obtenidos en los ensayos.

Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento de cada especie por cada extracto seleccionado usando la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición (\%)} = C - TC \times 100$$

Donde C es la media de tres réplicas de crecimiento radial (en mm) de los controles y T es la media de tres réplicas del crecimiento radial (en mm) de placas tratadas con soluciones del extracto.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados que se presentan a continuación corresponden a las determinaciones efectuadas y descriptas en la sección de materiales y métodos, sobre las muestras de pimentón (*Capsicum annuum* L.) recolectadas, pertenecientes a las cosechas 2010, 2011 y 2012, producidas en establecimientos productores del departamento Santa María, provincia de Catamarca.

5.1 Determinación de la actividad acuosa (a_w)

Los valores obtenidos de a_w en este estudio manifestaron valores comprendidos entre 0,2 y 0,5 (Tabla V), cuyos valores corresponden a 20 y 50% HR. Estos concuerdan con Fernández-Trujillo & Carabajal (2006) quienes informaron y recomendaron una HR para el pimentón de Murcia (durante su almacenamiento), un rango comprendido entre 50 y 70% HR ($a_w = 0,5-0,7$), alegando el valor óptimo de 50% HR ($a_w = 0,5$), lo cual concuerda con los resultados obtenidos.

5.2 Contaminación bacteriana

5.2.1 Recuento de bacterias aerobias mesófilas (RAM)

Los resultados obtenidos en esta investigación revelaron valores comprendidos entre $5,0 \cdot 10^5$ y $3,7 \cdot 10^7$ (UFC/g) y pueden observarse en la Tabla V. Como se mencionó anteriormente no existen valores límite en el CAA, por lo cual se compara con lo informado por otros autores y regulado en otros países.

De Boer (1985), informó valores $> 10^7$ (UFC/g); Baxter (1982) obtuvo, para muestras de pimentón adquiridos de mayoristas y productores locales, $6,2 \cdot 10^6$ (UFC/g); por su parte Buckenhüskes (2001), alcanzó recuentos entre $1 \cdot 10^5$ y $5 \cdot 10^5$ (UFC/g); Candlish (2001) mostró $4,25 \cdot 10^6$ (UFC/g); mientras que, Koohy-Kamaly-Dehkordy *et al.* (2013) obtuvieron valores que de acuerdo con los criterios microbiológicos para las especias recomendado por la Norma Nacional Iraní (INS), se excedieron de $5 \cdot 10^5$ UFC/g. Además, Banerjee y Sarkar (2003) y Schweiggert *et al.*, (2005), informaron valores entre 10^2 y 10^9 UFC/g. Por

otra parte, la flora normal del pimentón sin ningún tratamiento de conservación, puede tener 10^6 UFC/g de mesófilos aerobios (APHA, 1992).

Los requisitos microbiológicos a cumplir en especias y condimentos según la República Dominicana (2009), para recuento de aerobios mesófilos, está comprendido en un rango entre 10^6 y 10^7 (UFC/g), con lo cual, los resultados obtenidos estuvieron dentro de lo establecido por esta norma. Y en general se observa que están en los rangos informados por otros autores.

No se encontró una relación entre los niveles de contaminación por bacterias aerobias mesófilas y la a_w medida para cada una de las muestras.

5.2.2 Recuento de coliformes totales (CT)

Los resultados obtenidos (Tabla V), mostraron que A10, C10 y E12 arrojaron valores menores a 10 UFC/g, mientras que en el resto de las muestras se encontraron valores comprendidos entre $1,8 \cdot 10^2$ y $>5,6 \cdot 10^4$ UFC/g. De igual manera que para el RAM, se carecen de valores límites para nuestro país.

Tabla V: Recuento de bacterias aerobias mesófilas (UFC/g), recuento de coliformes totales (UFC/g) y a_w encontrados en las muestras de pimentón producidas en el departamento Santa María, Catamarca.

<i>Muestras</i>	<i>RAM (UFC/g)</i>	<i>CT (UFC/g)</i>	<i>a_w</i>
A10	$2,7 \cdot 10^7$	<10	0,424
A11	$8,8 \cdot 10^5$	$7,3 \cdot 10^3$	0,350
A12	$7,4 \cdot 10^5$	$5,0 \cdot 10^2$	0,299
B11	$1,1 \cdot 10^7$	$> 5,6 \cdot 10^4$	0,517
C10	$5,7 \cdot 10^6$	<10	0,488
C11	$2,7 \cdot 10^5$	$2,9 \cdot 10^4$	0,371
C12	$5,6 \cdot 10^6$	$5,6 \cdot 10^2$	0,423
D10	$7,9 \cdot 10^6$	$4,0 \cdot 10^2$	0,325
D11	$5,0 \cdot 10^5$	$4,4 \cdot 10^3$	0,374
D12	$1,1 \cdot 10^6$	$8,1 \cdot 10^4$	0,413
E10	$3,7 \cdot 10^7$	$1,8 \cdot 10^2$	0,534
E11	$1,2 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^2$	0,346
E12	$9,1 \cdot 10^5$	<10	0,413
F11	$1,3 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^3$	0,422
F12	$5,7 \cdot 10^6$	$1,7 \cdot 10^3$	0,374

Candlish *et al.* (2001) informaron para el mismo sustrato $6,1 \cdot 10^4$ UFC/g, valor que supera los encontrados en la presente investigación (con excepción de la muestra B11). Mientras que, Buckenhüskes (2001) manifestó valores menores a 10^2 UFC/g; los cuales, comparado con lo revelado en este estudio, sólo coinciden 5 (A12, C12, D10, E10 y E11) de las 15 muestras.

En Lima, Perú el rango de CT establecido para especias corresponde a 10^2 - 10^3 UFC/g, con lo cual 3 (B11, C11 y D12) de los resultados obtenidos, reflejaron valores fuera del rango establecido por esa norma.

De igual manera que lo observado para RAM, no se evidencia una relación entre la a_w y los niveles de contaminación de coliformes totales.

5.2.3 Determinación de *Salmonella* spp.

En todas las muestras estudiadas se obtuvo ausencia de *Salmonella* spp. Baxter (1982), encontró bacterias gram negativas entre ellas *Salmonella* spp. en 2 de 16 muestras de pimentón. Por otra parte, Lehmacher *et al.* (1995), informaron valores <1 UFC/g, habiendo provocado un brote de salmonelosis.

5.3. Contaminación fúngica

5.3.1 Selección del medio de cultivo para mohos y levaduras

Para la determinación de mohos y levaduras, se utilizó como medio de cultivo agar DG18 (APHA, 1992), que es el indicado para alimentos secos o de baja humedad y es selectivo para hongos xerófilos, los cuales son muy frecuentes en las especias. Estos tienen la capacidad de crecer en condiciones de baja a_w , e incluyen los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. Este medio además de tener una a_w baja obtenida mediante el soluto glicerol, también tiene un antibiótico (cloranfenicol) para inhibir el crecimiento bacteriano y un micostático (diclorán) para disminuir la velocidad de crecimiento de los hongos y optimizar el recuento de los mismos al restringir el tamaño de las colonias (Pitt & Hocking, 1997).

5.3.2 Análisis del recuento de mohos y levaduras

Los resultados obtenidos en las muestras analizadas mostraron un índice de contaminación de mohos y levaduras en un rango comprendido entre $2,0 \cdot 10^2$ y $1,9 \cdot 10^5$ (UFC/g) (Tabla VI).

Los valores obtenidos para mohos, estuvieron en un rango entre $2,0 \cdot 10^2$ y $4,2 \cdot 10^4$ (UFC/g), estos resultaron valores más elevados a excepción de 2 muestras (F11 y F12) comparados con lo encontrado por Santos *et al.* (2011) para el mismo medio de cultivo ($3,8 \cdot 10^2$ UFC/g de pimentón en DG18). Situación similar ocurrió con lo informado por Buckenhüskes (2001), cuyos valores encontrados estuvieron comprendidos entre $2 \cdot 10^2$ y $5 \cdot 10^2$ (UFC/g)

En un estudio realizado por Koohy-Kamaly-Dehkordy *et al.* (2013) en Teherán, informaron valores elevados de mohos ($>5 \cdot 10^3$ UFC/g), similares a los obtenidos en siete muestras del presente estudio (A10, A11, A12, D10, D11, D12 y E11). Por otra parte, Martín *et al.* (2005) obtuvieron recuentos que oscilaron entre <10 y $2,5 \cdot 10^3$ UFC/g, los cuales son consistentes con la mayoría de los resultados aquí encontrados.

Las levaduras estuvieron presentes en todas las muestras en un rango comprendido entre $2,0 \cdot 10^2$ y $1,6 \cdot 10^5$ (UFC/g), excepto en 4 muestras (A11, A12, F11 Y F12) que no hubo desarrollo. Estos valores son similares y en algunos casos menores a los encontrados por De Boer (1985) en el mismo sustrato ($>10^4$ UFC/g). Por otro lado, Martín *et al.* (2005) informaron valores bajos de levaduras, que oscilaron entre 1 a 10^3 UFC/g.

Los mohos estuvieron presentes en todas las muestras estudiadas. La que mostró el porcentaje más bajo fue D11 (5%). A11, A12, F11 y F12 tuvieron el 100% de mohos. En las que se evidenció mayores recuentos fue en A10, B11, C10, C11, E11 y E12 variando entre 81 y 95,8% (figura 4).

Tabla VI: Recuento total de mohos y levaduras (UFC/g), de mohos (UFC/g) y porcentaje de mohos con respecto al total, encontrados en las muestras de pimentón producidas en el departamento Santa María, Catamarca.

Muestras	Mohos y Levaduras (UFC/g)	Mohos (UFC/g)	% Mohos
A10	$2,4 \cdot 10^4$	$2,3 \cdot 10^4$	95,8
A11	$1,5 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^4$	100
A12	$4,2 \cdot 10^4$	$4,2 \cdot 10^4$	100
B11	$4,0 \cdot 10^3$	$3,4 \cdot 10^3$	85
C10	$2,6 \cdot 10^3$	$2,4 \cdot 10^3$	92
C11	$1,2 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^3$	92
C12	$1,2 \cdot 10^4$	$2,1 \cdot 10^3$	17,5
D10	$1,9 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^4$	6
D11	$1,7 \cdot 10^5$	$8,8 \cdot 10^3$	5
D12	$6,6 \cdot 10^4$	$4,2 \cdot 10^4$	64
E10	$1,1 \cdot 10^4$	$3,3 \cdot 10^3$	30
E11	$2,3 \cdot 10^4$	$2,1 \cdot 10^4$	91
E12	$1,6 \cdot 10^3$	$1,3 \cdot 10^3$	81
F11	$2,0 \cdot 10^2$	$2,0 \cdot 10^2$	100
F12	$4,3 \cdot 10^2$	$4,3 \cdot 10^2$	100

De acuerdo al Reglamento Sanitario de Alimentos para la República Dominicana, en Requisitos microbiológicos a cumplir en Especies y Condimentos, las muestras estudiadas se encontraron dentro del rango establecido para mohos ($10^4 - 10^5$ UFC/g). En Lima, Perú el rango establecido en especias para mohos es menor que el determinado en la República Dominicana ($10^3 - 10^4$ UFC/g). Aún así, las cantidades encontradas estuvieron acordes a esta normativa.

No se observó una relación entre la a_w medida para cada muestra y los niveles de contaminación fúngica encontrados.

La importancia de estudiar los mohos en las especias es de gran relevancia debido a la potencial producción de micotoxinas (Llewellyn *et al.*, 1992).

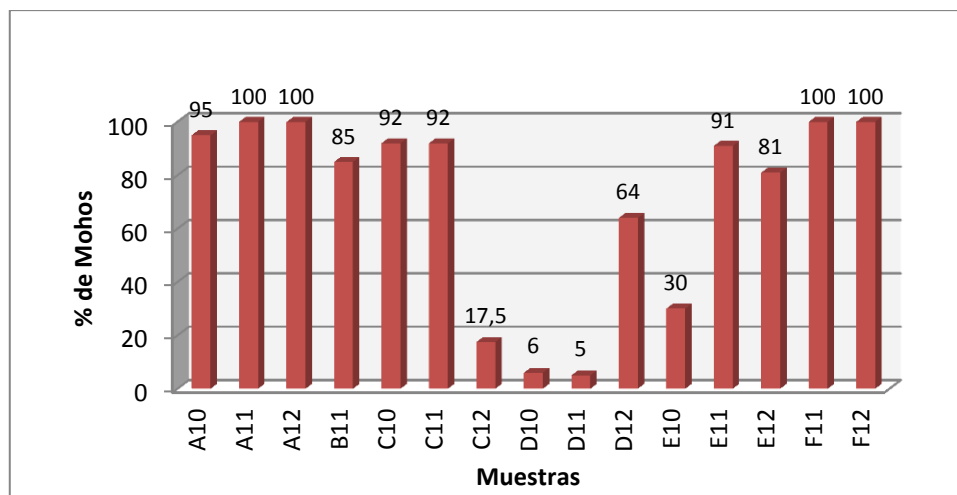


Fig. 4: Porcentaje de mohos encontrados en la totalidad de muestras de pimentón estudiadas, pertenecientes a los distintos establecimientos del departamento Santa María - Catamarca.

5.3.3 Aislamiento de géneros

Los géneros aislados en este estudio, pertenecieron principalmente a mohos de campo (*Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*) y de almacenamiento (*Aspergillus* y *Penicillium*).

En esta investigación no se determinó la producción de micotoxinas, pero se puede sospechar su presencia debido a que fueron aisladas cepas de géneros con especies toxicogénicas, con lo cual es posible que actúen en forma sinérgica, aunque existe poca información acerca de esta interacción y su toxicidad combinada (Speijers & Speijers, 2004).

En la Tabla VII se observan los porcentajes de aislamientos pertenecientes a distintos géneros de todas las muestras estudiadas. Se observaron aislamientos pertenecientes al género *Aspergillus* en todas las muestras analizadas, con excepción de la muestra F11. En esta muestra fueron predominantes los aislamientos del género *Rhizopus*, Zygomycetes de rápido crecimiento, que podrían haber inhibido el crecimiento de otros hongos. El género *Aspergillus* resultó predominante en la mayoría de las muestras, el porcentaje de aislamiento varió entre 98,2% a 6,6%, constituyó el 52% de los aislamientos observados.

Tabla VII: Porcentajes de géneros de hongos filamentosos obtenidos en las muestras de pimentón producidas en el departamento Santa María – Catamarca.

Muestras	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Rhizopus</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Paecilomyces</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Mycelia sterilia</i>
A10	98,3							1,7
A11	79,7	6,3	2,8	9,8	0,7	0,7		
A12	97,0	1,5	1,3				0,2	
B11	52,9			47,1				
C10	75,0		8,3	16,7				
C11	66,7	12,5	12,5	6,3	2,1			
C12	31,1	9,7	55,3					3,9
D10	62,1	12,1	15,5		5,2		3,4	1,7
D11	24,4	4,4	44,4		6,7		20,0	
D12	35,5	2,0	4,4					58,1
E10	76,7	0,6	8,0	9,2	4,3			1,2
E11	6,6	9,4		0,9	0,9			82,1
E12	16,2	20,6	1,5	5,9				55,9
F11	47,7		35,0	60,0				5,0
F12		15,9	9,1	18,2				9,1

Alternaria, *Rhizopus* y *Penicillium* también fueron aislados muy frecuentemente (13,4, 10,9 y 6,7, respectivamente). Mientras que *Alternaria* y *Penicillium* fueron hallados en la mayoría de las muestras, *Rhizopus* no fue observado en casi la mitad de las muestras estudiadas.

Otros géneros minoritarios fueron *Cladosporium*, *Paecilomyces* y *Fusarium*. En más de la mitad de las muestras hubo aislamientos que no pudieron ser identificados (*Mycelia sterilia*) llegando a alcanzar en una de ellas el 82% de las colonias obtenidas.

Los géneros aislados en este estudio concuerdan con los informados por varios autores (Candlish *et al.*, 2001; Christensen *et al.*, 1967; Erdogan, 2004; Hashem y Alamri, 2010; Martín *et al.*, 2005; Sawinsky *et al.*, 1988).

Teniendo en cuenta los porcentajes de los aislamientos del género *Aspergillus* en el total de las muestras por año y por establecimiento, se observó que A10, A11 y A12 fueron las que mostraron los porcentajes más elevados (98,3, 79,7 y 97,7%) respectivamente. Mientras que, en F12 no hubo aislamientos y E11 presentó el porcentaje más bajo (6%).

Con respecto a los aislamientos obtenidos del género *Penicillium*, es notable la diferencia en comparación a los porcentajes de aislamientos de *Aspergillus*. Estos últimos arrojaron mayores resultados. Sin embargo, el porcentaje de aislamiento de *Penicillium* en E10, E11 y E12 fue acrecentando en cosechas sucesivas (0,6, 9,4 y 20,6% respectivamente). Lo contrario sucedió en D10, D11 y D12, es decir, fue decreciendo el porcentaje de aislamiento (12,1, 4,4 y 2,0% respectivamente). A10, C10, B11 y F11 resultaron exentas de éste género.

Los aislamientos logrados en relación al género *Alternaria*, se han distribuido en casi todas las muestras, excepto en A10, B11 Y E11. Los porcentajes más bajos de aislamiento estuvieron entre A12 y E12 (1,3 y 1,5%). Además, entre F11 y F12 se observó una disminución importante de aislamiento (de 35,0 a 9,1%). Mientras que, en C10, C11 y C12, el porcentaje fue en aumento (8,3, 12,5 y 55,3%), encontrando en C12, el valor más elevado de todas las muestras estudiadas.

Con respecto a los aislamientos del género *Rhizopus*, el porcentaje más elevado fue en F11 (60%) y el más bajo en E11 (0,9%).

Los géneros *Cladosporium*, *Paecilomyces* y *Fusarium* fueron aislados en baja proporción. En el caso de *Cladosporium*, F11 representa el porcentaje más elevado (60%) con respecto a todas las muestras estudiadas. El género *Paecilomyces* sólo fue aislado de A11 en un bajo porcentaje (0,7%). Mientras que *Fusarium* estuvo presente en A12, D10 y D11 (0,2, 3,4 y 20,0% respectivamente).

Cabe destacar que A10 fue la que presentó mayor porcentaje de aislamientos de *Aspergillus*, y fue el único género presente. Mientras que F11 obtuvo el menor porcentaje de aislamientos, con ausencia de *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Paecilomyces* y *Fusarium*.

Resulta significativo destacar que en entre las cosechas tomadas para esta investigación (2010, 2011 y 2012), los porcentajes de aislamientos de la mayoría de las muestras por establecimiento, fueron disminuyendo considerablemente de un año a otro, especialmente los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Alternaria*. Es posible que estos resultados indiquen una mejora en la cadena de producción del pimentón por parte del personal responsable de los establecimientos pimentoneros del departamento (cosecha, producción, almacenamiento y distribución en el mercado).

5.3.4 Identificación a nivel de especie

Se realizó la identificación de cepas pertenecientes a géneros con especies potencialmente toxicogénicas. No se informan porcentajes por especies debido a que el aislamiento de las cepas no se realizó en las mismas diluciones para todas las muestras. Los recuentos, y por ende los aislamientos, se hicieron a partir de las diluciones que tenían el rango adecuado de UFC según las reglas de recuento en placa (APHA, 1992). Se observaron 1622 colonias fúngicas, de las cuales 257 resultaron ser micelio estéril. Solo se identificaron a nivel de especie gran parte de los aislamientos de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Alternaria*. En la Tabla VIII se muestran las 18 especies identificadas a partir de estos géneros, y se indican las muestras en las cuales dichas especies fueron encontradas.

Las especies identificadas pertenecen al Phylum Ascomycota y se ordenaron de acuerdo a Orden y Familia según la clasificación propuesta por Hibbett *et al.* (2007).

Tabla VIII: Lista de especies identificadas y distribución de las mismas en las distintas muestras de pimentón estudiadas.

¹ Primera cita para Argentina.

Especie	Muestras														
	A10	A11	A12	B11	C10	C11	C12	D10	D11	D12	E10	E11	E12	F11	F12
<i>Alternaria tenuissima</i>														*	*
<i>Aspergillus amstelodami</i>								*							*
<i>Aspergillus chevalieri</i>			*												
<i>Aspergillus flavus</i>	*	*		*		*					*				
<i>Aspergillus glaucus</i>	*	*													
<i>Aspergillus niger</i>	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		*
<i>Aspergillus ochraceus</i>								*			*			*	
<i>Aspergillus parasiticus</i>							*								
<i>Aspergillus restrictus</i>															*
<i>Aspergillus ruber</i>								*							
<i>Aspergillus terreus</i>						*									
<i>Aspergillus westerdijkiae</i> ¹															*
<i>Penicillium atramentosum</i>												*			
<i>Penicillium chrysogenum</i>		*					*					*			*
<i>Penicillium commune</i>			*										*		
<i>Penicillium crustosum</i>								*							
<i>Penicillium expansum</i>								*							
<i>Penicillium italicum</i>								*							

A partir de la publicación del nuevo Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Hongos y Plantas (McNeill *et al.*, 2012) en el cual fue abolido el anterior artículo 59 que permitía la nomenclatura dual para los hongos pleomórficos, muchos nombres de especies fueron cambiados siguiendo el principio de prioridad. De esta manera, por ejemplo, especies del género *Eurotium* ahora son denominadas *Aspergillus*. El concepto de nombrar las especies teleomorfos como *Aspergillus* ya se viene aplicando en las secciones *Usti*, *Terrei*, *Aspergillus* y *Fumigati* (Samson *et al.* 2011a, b; Hong *et al.* 2012; Hubka *et al.* 2013). En el presente trabajo, para nombrar correctamente a nivel de especie los taxones encontrados, se siguió a Hubka *et al.* (2013), Samson *et al.* (2014) y Visagie *et al.* (2014). A continuación se presentan los nombres actuales y sinónimos de las especies encontradas, se proveen de datos ecológicos y de producción de micotoxinas, y se comparan las características de las cepas observadas con las descripciones de la literatura.

- **Eurotiales**

- Aspergillaceae*

Aspergillus amstelodami (L. Mangin) Thom et Church. The Aspergilli: 113. 1926
= *Eurotium amstelodami* L. Mangin, Ann. Sci. Nat. Bot. 9: 360. 1909.

Descripciones e ilustraciones: Klich (2002); Pitt & Hocking (2009).

Micotoxinas: hasta el momento no han sido identificadas posibles toxinas (Frisvad & Samson, 1991).

Ecología: ha sido encontrado en una gran variedad de hábitats, asociado por lo general a productos almacenados. Los cereales son un sustrato importante, incluyendo el trigo, harina, productos de panadería, arroz y salvado de arroz, cebada, maíz, copos de cereales y bocado de maíz (Pitt & Hocking, 1997). También fue aislado de uvas y pasas de uvas (Romero *et al.*, 2005; Valero *et al.*, 2007a).

Observaciones: este hongo, muy conocido en micología de alimentos y especialmente en aquellos de baja actividad acuosa, se considera en este momento de posición incierta. La descripción original de *E. amstelodami* por Mangin (1909) fue reemplazada por Thom y Raper (1941) con una descripción diferente e incorrecta. Dos siguientes neotipificaciones del mismo también fueron erróneas y están en conflicto con el protologo de L. Mangin

(1909). Para mayores detalles en la taxonomía ver a Hubka *et al.* (2013). En el presente trabajo se observaron 10 aislamientos provenientes de dos muestras y su identificación corresponde a las descripciones hechas por Klich (2002) y Pitt & Hocking (2009).

Aspergillus chevalieri L. Mangin, Ann. Sci. Nat. Bot. 9: 362. 1909. = *Eurotium chevalieri* L. Mangin 1909.

Descripciones e ilustraciones: Klich (2002); Pitt & Hocking (2009).

Micotoxinas: produce echinulina y neoechinulina que causan rechazo del alimento en cerdos (Pitt & Hocking, 2009).

Ecología: es considerado un hongo muy común, especialmente en las regiones más cálidas. Fue aislado a partir de una gran variedad de alimentos, especialmente cereales, incluyendo trigo y harina, harina de arroz y salvado, maíz y copos de cereales. Así también, se aisló de chocolates rellenos, frijoles y guisantes secos, soja, semillas de girasol, semillas de cacao, especias y pescado curado (Pitt & Hocking, 1997) y en Brasil de pimienta negra (Gatti *et al.*, 2003). En Argentina recientemente, fue aislado a partir de pasas de uva (Romero *et al.*, 2005) y productos de leche evaporada (Char *et al.*, 2005)

Observaciones: fueron aisladas 24 cepas de la misma muestra.

Aspergillus flavus Link

Descripciones e ilustraciones: Klich (2002); Pitt & Hocking (2009).

Micotoxinas: esta especie es la mayor fuente de producción de aflatoxinas en muchos alimentos y materias primas (Pitt & Hocking, 2009). Produce AF B₁, B₂ y algunas cepas ácido ciclopiazónico.

Ecología: *A. flavus* se ha convertido en el hongo de origen alimentario más ampliamente descrito en la literatura, lo que refleja su importancia económica y la relativa facilidad de reconocimiento tanto como su ubicuidad. Es especialmente abundante en las zonas tropicales, y tiene una afinidad particular por los frutos secos y las semillas oleaginosas (Pitt & Hocking, 2009). Fue encontrado en una gran variedad de especias (Elshafie *et al.*,

2002; Gatti *et al.*, 2003; Mandeel, 2005). En Argentina fue aislado de maní proveniente de las provincias de Salta y Formosa (Pildain *et al.*, 2005).

Observaciones: las colonias observadas en CYA25, CYA37 y MEA de los aislamientos identificados resultaron ligeramente menores a los valores promedio, pero dentro del rango en mm, a las observadas por Klich (2002). Se identificaron 37 cepas a partir de 5 muestras (Fig. 5a).

Aspergillus glaucus Link, Ges. Naturf. Freunde Berlin Mag. Neusten Entdeck. Gesammten Naturk 3:16, 1809.

= *Eurotium herbariorum* (F.H. Wigg.) Link 1809.

= *Aspergillus herbariorum* (F.H. Wigg.) E. Fisch. 1897.

Lista no exhaustiva.

Micotoxinas: cladosporina, neoechinulina A y B, eichinulina y otros extrolitos de toxicidad no ampliamente reconocida (Miller & McMullin, 2014).

Observaciones: se encontraron 325 cepas en tres muestras.

Aspergillus niger Tiegh., Ann. Sci. Nat., Bot., ser. 5, 8: 240. 1867, nom. cons.

Descripciones e ilustraciones: Klich (2002); Pitt & Hocking (2009).

Micotoxinas: por lo general ha sido considerado como un hongo benigno y ampliamente utilizado en la producción de enzimas y como ingredientes para la elaboración de alimentos. Denominada una especie GRAS (generalmente considerados como seguros) por la FDA. Sin embargo, Abarca *et al.* (1994) realizaron el primer informe de producción de OTA por esta especie, reportando 2 de 19 cepas de *A. niger* como productoras de esta toxina. Posteriormente en otros estudios, se han encontrado más cepas capaces de producir OTA en diversas condiciones (Bellí *et al.*, 2004; Esteban *et al.*, 2004, 2006a, b; Leong *et al.*, 2006). Frisvad *et al.* (2007) detectaron por primera vez la producción de fumonisina B₂, una micotoxina cancerígena, por esta especie.

Ecología: es una de las especies con más frecuencia reportados en los alimentos (Pitt & Hocking, 1997; Samson *et al.* 2002; Klich, 2002); prevalece más en climas cálidos, tanto en el campo como en el almacenamiento de los alimentos. Su aislamiento es frecuente en productos que han sido secados al sol como es el caso de las especias (Elshafie *et al.*, 2002; Mandeel, 2005), pasas de uvas (Abarca *et al.*, 2003; Leong *et al.*, 2004; Magnoli *et al.*, 2004), pescado ahumado y curado, granos de cacao (Pitt & Hocking, 1997). *A. niger* es el responsable más común de la descomposición pos cosecha en frutas frescas, cítricos, uvas, como así también en frutas secas, nueces (Pitt & Hocking, 1997). En Argentina, Romero *et al.*, 2005 aislaron esta especie y *A. carbonarius* (una especie de la misma sección y productora de OTA) a partir de pasas de uva. Astoreca *et al.*, (2007) aislaron *A. niger*, *A. awamori* y *A. carbonarius* de maní, granos de maíz, uvas secas y granos de café.

Observaciones: esta especie constituye la más frecuentemente encontrada en el presente trabajo, tanto en número como en distribución de muestras. Se observaron un total de 425 cepas en 13 muestras de las 15 analizadas (Fig. 5 b-c).

Aspergillus ochraceus K. Wilh. K., Beitr. Kenntn. Aspergillus: 66. 1877.

Descripciones e ilustraciones: Klich (2002); Pitt & Hocking (2009).

Micotoxinas: esta especie es productora de tres toxinas, ocratoxina A la más importante y componentes mínimos de menor toxicidad, ocratoxinas B y C. En trabajos posteriores se ha demostrado que sólo una minoría de los aislamientos de *A. ochraceus* son toxicogénicos y que otras especies estrechamente relacionadas con éste, como *A. westerdijkiae* y *A. steynii* son los principales productores de ocratoxina A. *A. ochraceus* también produce ácido penicílico (Frisvad *et al.*, 2004) y emodina que fue encontrada en niveles bajos en castañas comercializadas en el mercado canadiense (Overy *et al.*, 2003).

Ecología: una fuente importante de *A. ochraceus* y de especies que están estrechamente relacionadas como *A. westerdijkiae* y *A. steynii*, son los granos de café verde (Mislivec *et al.*, 1983; Tsubouchi *et al.*, 1985; Téren *et al.*, 1997; Urbano *et al.*, 2001; Bucheli y Taniwaki, 2002; Martins *et al.*, 2003; Suárez-Quiroz *et al.*, 2005), lo que puede dar lugar a una concentración de OTA en el café tostado e instantáneo (Jørgensen, 2005; Clark y Snedeker, 2006). Además, son muy comunes en alimentos secos y almacenados como la soja (Pacin *et al.*, 2003; Aziz *et al.*, 2006), pimienta (Gatti *et al.*, 2003) y frutas secas

(Iamanaka *et al.*, 2005). También se han registrado en las especias, como el pimentón (Almela *et al.*, 2007). En Argentina se aisló de semillas de maíz (Sepúlveda y Piontelli, 2005; Magnoli *et al.*, 2006) y soja (Sepúlveda y Piontelli, 2005).

Observaciones: se aislaron 8 cepas provenientes de tres muestras (Fig. 5d).

Aspergillus parasiticus Speare Bull. Div. Pathol. Physiol., Hawaiian Sugar Planters Assoc. Exp. Sta. 12: 38 1912.

Descripciones e ilustraciones: Klich (2002); Pitt & Hocking (2009).

Micotoxinas: la diferencia más importante en cuanto a la producción de micotoxinas entre *A. flavus* y *A. parasiticus*, es que este último produce tanto AF G como B y no produce ácido ciclopiazónico (Vaamonde *et al.*, 2003; Horn, 2003; Frisvad *et al.*, 2005), pero sí ácido kójico, que es un metabolito de baja toxicidad, con amplio uso en medicina y en cosmética (El-Assar, 2006). Además, los aislamientos de *A. parasiticus* producen a menudo concentraciones más altas de aflatoxinas (Pitt, 1993).

Ecología: esta especie, al igual que *A. flavus*, tiene más prevalencia en zonas tropicales y subtropicales y es poco común en las regiones de bajas temperaturas. Fue aislado de maníes, en Argentina (Vaamonde *et al.*, 2003) y en Botsuana (Mphande *et al.*, 2004). En fuentes como el arroz y sus derivados, se informó una baja frecuencia (Sales & Yoshizawa, 2005b). También fue aislado de pimienta negra (Mandee, 2005; Gatti *et al.*, 2003). En Argentina fue encontrado en soja (Vaamonde *et al.*, 2003).

Observaciones: se obtuvieron 29 aislamientos, todos provenientes de una única muestra.

Aspergillus restrictus G. Sm., J. Textile Inst. 22: 115. 1931.

Descripciones e ilustraciones: Raper & Fennell (1965); Klich (2002); Pitt & Hocking (2009).

Micotoxinas: hasta el momento no ha sido informada la producción de micotoxinas por esta especie (Pitt & Hocking, 2009).

Ecología: teniendo en cuenta su baja tasa de crecimiento, y su hábito poco visible, *A. restrictus* fue aislado de los alimentos con bastante frecuencia. La mayoría de los registros han venido de alimentos secos: trigo, arroz, maíz, legumbres secas, nueces, granos de pimienta, embutidos, especias, pimienta, ciruelas secas (Pitt & Hocking, 1997). En estudios más recientes, se informó que también fue aislado de granos de café (Ahmad & Magan, 2003) y pescado curado (Nketsia-Tabiri et al., 2003).

Observaciones: Se obtuvieron 3 aislamientos a partir de una única muestra.

Aspergillus ruber (Jos. König et al.) Thom y Church Ann. *Aspergillus*: 112. 1926.

≡ *Eurotium rubrum* J. König, Spieck. & W. Bremer, Z. Untersuch. Nahr. Genussm. 4: 726 1901.

Descripción e ilustración: Klich (2002).

Micotoxinas: varios informes han sido publicados que indican que *A. ruber* produce numerosos compuestos potencialmente tóxicos (Frisvad & Samson, 1991). Sin embargo, sigue faltando documentación que confirme la toxicidad.

Ecología: es un hongo xerófilo muy ampliamente distribuido, común en las regiones más cálidas. Se reportaron aislamientos en sustratos como pasas de ciruelas, coco, nueces, y un amplio rango de cereales como maíz, arroz, trigo (Lugauskas *et. al.*, 2006). También en vegetales secos, semillas de sésamo, granos de cacao (Pitt & Hocking, 1997). Se aisló fácilmente de la mayoría de los productos alimenticios que se estudió en el Sureste de Asia como maníes, legumbres, con altos niveles en la soja (Pitt *et al.*, 1993; Pitt *et al.*, 1994, Pitt *et al.*, 1998). En Argentina, fue aislada a partir de pasas de uva (Romero et al., 2005).

Observaciones: se obtuvieron 12 cepas de una única muestra.

Aspergillus terreus Thom Am. J. Bot. 5: 85. 1918.

Descripciones e ilustraciones: Klich (2002); Pitt & Hocking (2009).

Micotoxinas: esta especie produce una amplia gama de metabolitos (Frisvad & Samson, 2004; Frisvad & Samson, 1991), pero solamente los territrems tendrían una toxicidad

significativa. Territrems son toxinas tremorgénicas que, a diferencia de todos los demás tremórgenos, carecen de un resto que contiene nitrógeno.

Ecología: aunque no suele producir deterioro en los alimentos, esta especie es de común ocurrencia y puede crecer en alimentos almacenados en climas tropicales y subtropicales. Se encuentra comúnmente en frutos secos (Heidarian *et al.*, 2005), maníes, avellanas, nueces, pecanes (Pitt & Hocking, 1997), en cereales como el maíz (Bhattacharya & Raha, 2002), cebada y arroz con cáscara (Pitt & Hocking, 1997). También se han registrado en fuentes como las especias (Mandeel, 2005) y granos de café almacenados (Ahmad & Magan, 2003).

Observaciones: fueron obtenidas 2 cepas de una única muestra. Las mismas mostraron mayor velocidad de crecimiento en MEA que en la literatura. Sus cabezas conidiales presentaron vesículas de hasta 15 µm de diámetro.

Aspergillus westerdijkiae Frisvad & Samson, Stud. Mycol. 50: 30. 2004.

Descripción e ilustraciones: Frisvad *et al.* (2004).

Micotoxinas: Produce principalmente ocratoxina A y B, ácido penicílico, y otros extrolitos de toxicidad no confirmada (Frisvad *et al.*, 2004).

Ecología: es una especie que produce gran cantidad de OTA. Se aisló de granos de café en Brasil (Morello *et al.*, 2007). También fue aislado de naranjas y jugo de naranjas (Marino *et al.*, 2009). Se informó en un estudio reciente (Gil-Serna *et al.*, 2015) que *A. westerdijkiae* y *Aspergillus steynii* son especies de *Aspergillus* ocratoxigénicas de la sección Circumdati, quienes resultan un riesgo potencial por la producción de OTA en productos alimenticios provenientes de climas cálidos. Algunos autores (Medina *et al.*, 2008; Mühlencoert *et al.*, 2004) han informado que sustratos donde la fuente de carbono es preponderante podría ser una influencia para la producción de esta micotoxina. Estos autores señalaron que las especies de *Aspergillus* antes mencionadas, producen cantidades más altas de toxina cuando la fuente de carbono en el medio es sacarosa y cantidades más bajas cuando el azúcar disponible es la fructosa (Medina *et al.*, 2008; Mühlencoert *et al.*, 2004). En las uvas, además de agua, el azúcar más abundante es la fructosa (Dharmadhikari, 1994), cuya matriz produce una limitada producción de OTA. (Gil-Serna *et al.*, 2015). Por el contrario, *A. westerdijkiae* y *A. steynii* han alcanzado los valores más

altos de crecimiento y producción de OTA en pimentón cuyo sustrato contiene altos valores de sacarosa y glucosa (Prabha *et al.*, 1998) que, como se dijo anteriormente, podría afectar positivamente la producción de OTA. Los sustratos con mayor probabilidad de contaminación por OTA o su importancia en la dieta son los cereales (principalmente cebada) y el pimentón (Gil-Serna *et al.*, 2015). También fue aislado de uvas de origen eslovaco (Tancinová *et al.*, 2014).

Observaciones: esta especie es morfológicamente similar a *Aspergillus ochraceus*, aunque es incapaz de crecer a 37 °C. Los esclerocios de color blanco a crema producidos por *A. westerdijkiae*, difieren del rosa a púrpura vináceo producidos por *A. ochraceus* (Frisvad *et al.*, 2004). Se observó que las colonias en CYA25, de nuestros aislamientos tuvieron un rango de crecimiento de 37-49 mm, menores a los 57 mm descritos en el protocolo (Frisvad *et al.*, 2004). En el presente trabajo se aisló una única cepa. Esta sería la primera cita para Argentina (Fig. 5e).

Penicillium atramentosum Thom, U.S.D.A. Bur. Animal Industr. Bull. 118: 65. 1910.

Descripción e ilustraciones: Samson & Frisvad (2004); Pitt & Hocking (2009).

Micotoxinas: produce la neurotoxina roquefortina y rugulovasine A y B (Cole y Cox, 1981).

Ecología: fue aislado de quesos como el Camembert, morcilla, nueces, a partir de suelo calcáreo y canteras de piedra caliza (Frisvad & Samson, 2004).

Observaciones: se aisló una única cepa (Fig. 5f), la cual mostró reacción de Ehrlich positiva (formación de anillo violeta). En general esta especie da una reacción negativa, con excepción de algunas cepas muy productoras de rugulovasina (Samson & Frisvad, 2004).

Penicillium chrysogenum Thom, U.S.D.A. Bur. Animal Industr. Bull. 118: 58. 1910.

Descripción e ilustraciones: Pitt (1988).

Micotoxinas: produce roquefortina C, toxina PR y ácidos secalónicos, siendo estas dos últimas micotoxinas de almacenaje (Frisvad & Samson, 2004). Sin embargo *P.*

chrysogenum no parece ser una fuente grave de micotoxinas en alimentos (Pitt & Hocking, 2009).

Ecología: ha sido encontrado en una gran variedad de hábitats y es contaminante habitual de alimentos. Esta especie ha sido aislada con mucha frecuencia a partir de cereales como la cebada, trigo, arroz, maíz, (Pitt & Hocking, 1997; Lugauskas *et al.*, 2006) así como también en nueces y especias (Pitt & Hocking, 1997). Es un agente que presenta poca frecuencia de deterioro en el almacenamiento. Ocasionalmente ha producido detrimento en uvas y zanahorias almacenadas (Barkai-Golan, 1974; Snowdon, 1991). En Argentina, Comerio & Mac Cormack (2004) aislaron esta especie en embutidos cárnicos (jamón cocido) almacenados en la base Jubany de la Antártida Argentina.

Observaciones: es una especie generalmente fácil de identificar. Algunos aislamientos pueden carecer de la típica pigmentación amarilla (Pitt & Hocking, 2009) pero no fue el caso de nuestros aislamientos. Se observaron 8 cepas provenientes de 4 muestras (Fig. 5g-h).

Penicillium commune Thom, U.S.D.A. Bur. Animal Industr. Bull. 118: 56. 1910.

Descripción e ilustraciones: Samson & Frisvad (2004); Pitt & Hocking (2009).

Micotoxinas: esta especie produce ácido ciclopiazónico (El-Banna *et al.*, 1987; Polonelli *et al.*, 1987; Frisvad & Filtenborg, 1989).

Ecología: es el principal causante del detrimento en quesos (Lund *et al.*, 1995; Hayaloglu & Kirbag 2007). También fue aislado en niveles bajos de maíz, maní y soja (Pitt *et al.*, 1993; 1994). En la Antártida Argentina fue aislado de extracto de tomate deteriorado (Comerio & Mac Cormack, 2004).

Observaciones: se obtuvieron 5 cepas a partir de dos muestras (Fig. 5i).

Penicillium crustosum Thom, The Penicillia: 399. 1930.

Descripción e ilustraciones: Pitt & Hocking (2009).

Micotoxinas: es el mayor productor de penitrem A, una potente neurotoxina (Pitt, 1979b; Frisvad et al., 2006), que se produce en niveles altos (Sonjak et al., 2005; Frisvad et al., 2006), por lo que la presencia de esta especie en los alimentos es una señal de advertencia (Pitt, 1979b). También produce roquefortina C y ácido terrestre (Frisvad & Samson, 2004).

Ecología: es una especie ubicua, común en los alimentos y los piensos, tanto en las regiones subtropicales y templadas. Fue aislada con frecuencia de frutos secos, carne, queso, verduras, frutas con carozo y pepitas (Sonjak *et al.*, 2005). También ha sido aislado de maíz, carnes procesadas, quesos, galletas, pasteles y zumos de frutas (Pitt & Hocking, 2009). En Indonesia, en sustratos como el arroz, sorgo, soja, pimienta fueron encontrados infectados con esta especie en un 1% (Pitt *et al.*, 1998). En Argentina fue encontrada, entre otras cepas también potencialmente toxigénicas, en granos de amaranto (Bresler *et al.*, 1991).

Observaciones: se obtuvieron 4 aislamientos de una única muestra. Las cepas demostraron típica característica de desprendimiento de costras (masas de conidios) al mover la placa de Petri.

Penicillium expansum Link, Mag. Ges. Naturf. Freunde Berlin 3: 16. 1809.

Descripción e ilustraciones: Samson & Frisvad, (2004); Pitt & Hocking (2009).

Micotoxinas: es un importante productor de citrinina y patulina (Harwig *et al.*, 1973; Ciegler *et al.*, 1977). Crecimiento importante en residuos de remolacha azucarera, cáscaras de papa, jugos de frutas, etc., han dado lugar a toxicosis de animales domésticos (Andersen *et al.*, 2004).

Ecología: ha sido aislado predominantemente en peras y manzanas podridas (Snowdon, 1990). También fue aislado de una amplia gama de otras frutas incluyendo tomates, frutillas, paltas, mangos, uvas (Pitt y Hocking, 1997; Snowdon, 1990). Aislamientos poco frecuentes fueron encontrados en verduras frescas, como cebollas, zanahorias y repollos (Lugauskas *et al.*, 2004). Fueron aislados a partir de maíz, trigo, arroz y cebada (Aziz *et al.*, 2006) y de una variedad de productos de cereales al por menor (Aran y Eke, 1987).

Observaciones: fue aislada una única cepa.

Penicillium italicum Wehmer, Hedwigia 33: 211. 1894.

Descripción e ilustraciones: Samson & Frisvad (2004); Pitt & Hocking (2009).

Micotoxinas: aunque exhibió toxicidad en algunos ensayos biológicos y un aislamiento resultó tóxico en patos, hasta el momento no está probada la toxicidad en mamíferos (Pitt & Hocking, 2009).

Ecología: El hábitat principal de esta especie son los frutos cítricos, en quienes produce una podredumbre destructiva, de considerable importancia económica (Snowdon, 1990).

Observaciones: se obtuvieron 2 cepas de una muestra.

- **Pleosporales**

- Pleosporaceae*

- Alternaria tenuissima* (Kunze) Wiltshire, Trans. Br. mycol. Soc. 18(2): 157 (1933)

- Descripción e ilustraciones: Simmons (2007).

- Micotoxinas: produce varias toxinas, de las cuales el ácido tenuazónico (TA) es el más importante (Logrieco *et al.*, 2003). Este compuesto es tóxico para una amplia gama de plantas y animales, especialmente ratones, embriones de pollo y gallinas (Logrieco *et al.*, 2003). Las toxinas con menor toxicidad son alternariol (AOH), alternariol monometil éter (AME), altenueno (AE) y altertoxina I, II y III (Logrieco *et al.*, 2003). La producción de una o más de estas toxinas ha sido informada en tomates (Bottalico y Logrieco, 1998), cítricos (Logrieco *et al.*, 1990), pimiento y melones (Bottalico y Logrieco, 2001).

- Ecología: fue aislada por Andersen y Frisvad (2004) en tomates mohosos. También es un contaminante común en cereales (Pitt & Hocking, 2009). En Argentina ha sido aislada en tomates (Benavidez Roza *et al.*, 2014).

- Observaciones: se aislaron 42 cepas a partir de 6 muestras.

La presencia de mohos micotoxigénicos no indica necesariamente la presencia de micotoxinas, ya que su producción se verá influenciada por varios factores tales como, la

capacidad toxigénica de la cepa, factores intrínsecos como la a_w y composición del sustrato, y factores extrínsecos como la temperatura y tiempo de incubación.

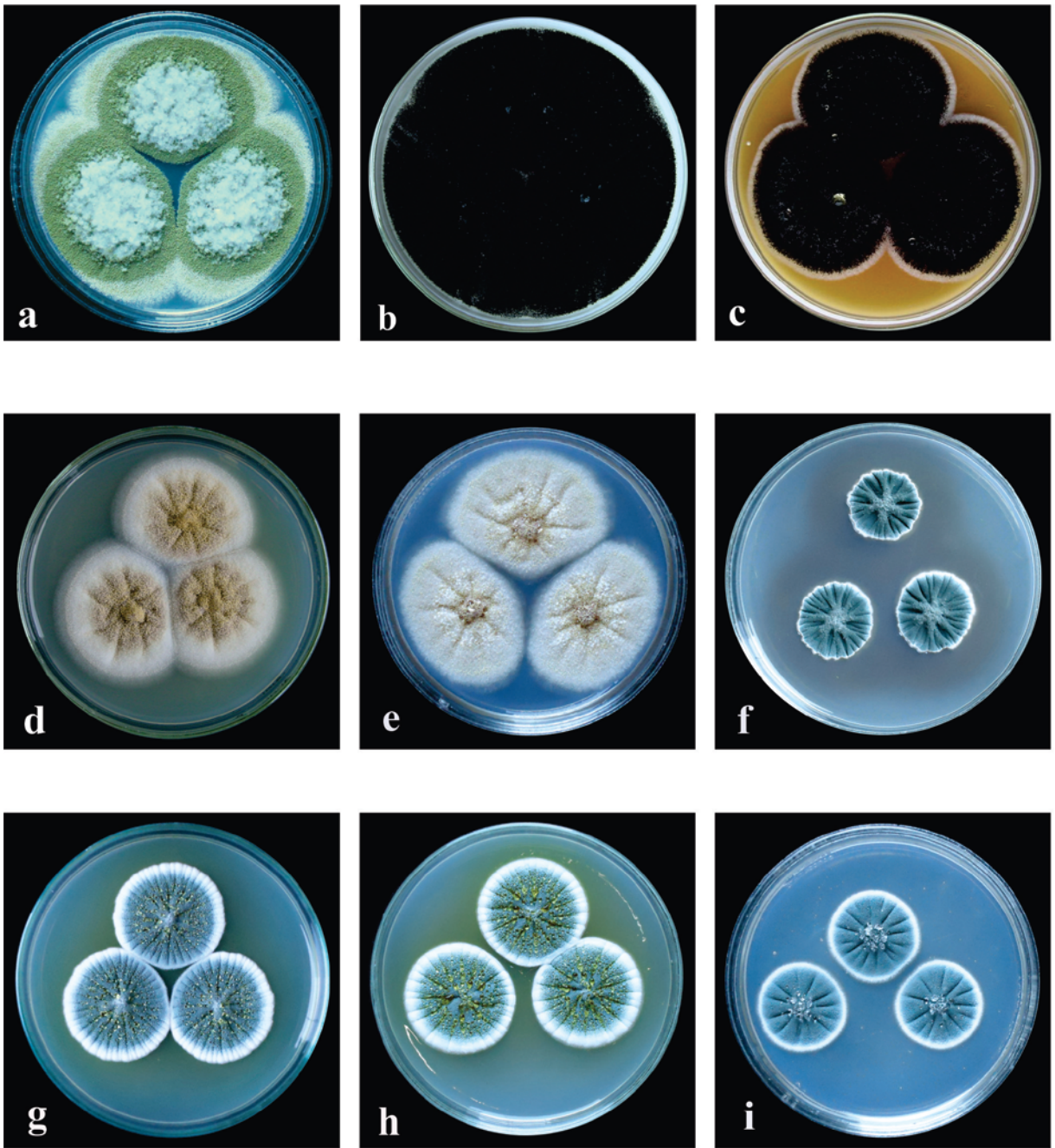


Figura 5: Colonias en CYA, 25°C, 7 días (excepto c, en el cual el medio de cultivo es MEA) en cajas de Petri de 90 mm; a. *A. flavus*; b-c. *A. niger*; d. *A. ochraceus*; e. *A. westerdijkiae*; f. *P. atramentosum*; g-h. *P. chrysogenum* (dos cepas distintas); i. *P. commune*.

5.4 Efecto de extractos de *Flourensia blakeana* en especies de *Aspergillus*.

5.4.1 Efecto de los extractos *Flourensia blakeana* sobre *Aspergillus ochraceus*.

5.4.1.1 Efecto del extracto en hexano.

El efecto del extracto hexánico de *F. blakeana* sobre *A. ochraceus*, se muestra en la Fig. 6. Los datos obtenidos sobre % de inhibición del desarrollo micelial fueron analizados con ANOVA y existen diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en las concentraciones ensayadas de 50, 100, 200 y 300 ppm. En los resultados obtenidos se observa que el mayor % de inhibición micelial se presenta a una concentración de 50 ppm con un 82 % en un periodo de 14 días. El comportamiento a concentraciones de 100, 200 y 300 ppm es similar, manifestando una disminución del % de inhibición con la concentración y con el periodo de tiempo.

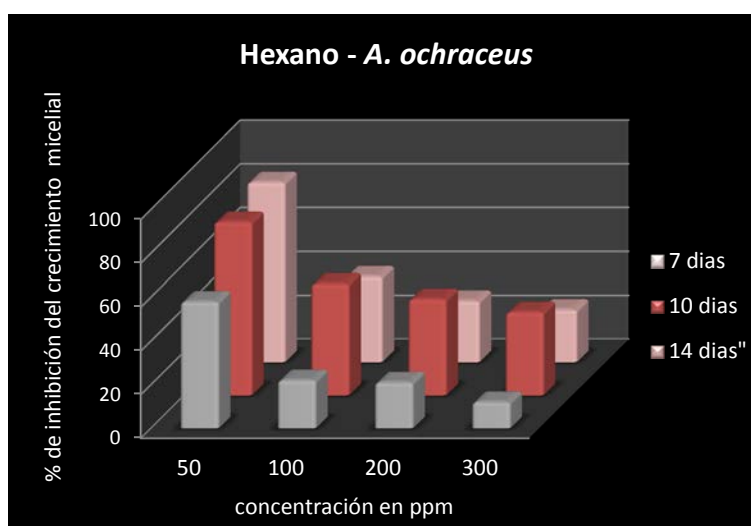


Fig. 6: Efecto de extracto hexánico de *Flourensia blakeana* a diferentes concentraciones, sobre el % de inhibición del crecimiento micelial de *Aspergillus ochraceus*.

5.4.1.2 Efecto del extracto en etanol.

El efecto del extracto en etanol de *F. blakeana* sobre % de inhibición del desarrollo micelial *A. ochraceus* se presenta en las Fig. 7 y 8. Las concentraciones de extracto ensayadas fueron 50, 100, 200 y 300 ppm. En el desarrollo del micelio de los hongos, hubo diferencias altamente significativas ($p \leq 0.05$), en las dosis, y en el período del bioensayo.

Se observa que el mayor % de inhibición micelial se presenta a una concentración de 300 ppm con un 40 % en un período de 10, días. A concentraciones de 50, 100, 200 y 300 ppm, muestran un comportamiento similar presentando un aumento en % de inhibición con la concentración y con el periodo de tiempo.



Fig. 7: Potencial del extracto en etanol de *Flourensia blakeana*, sobre el % de inhibición del crecimiento micelial de *Aspergillus ochraceus* a diferentes concentraciones del extracto.

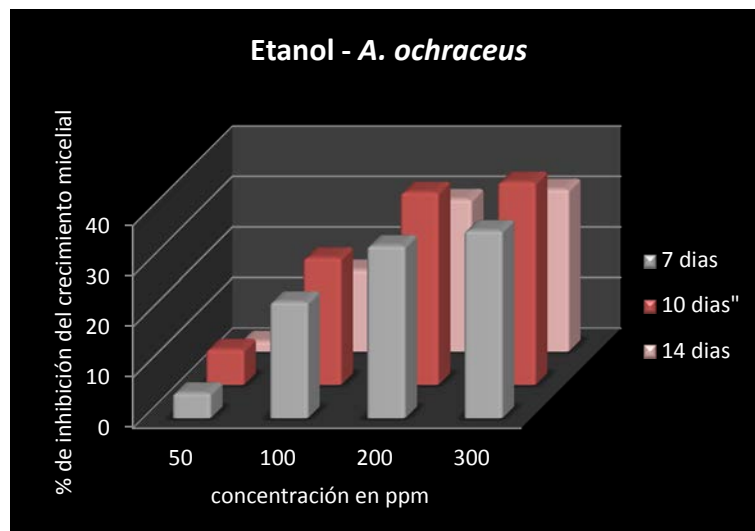


Fig. 8: Efecto de extracto en etanol de *Flourensia blakeana* a diferentes concentraciones, sobre el % de inhibición del crecimiento micelial de *Aspergillus ochraceus*.

5.4.1.3 Efecto del extracto en acetona.

Los resultados extracto en acetona de *F. blakeana* sobre desarrollo micelial de *A. ochraceus* se presenta en la Fig. 9. Las concentraciones de extracto ensayadas fueron 10, 50, 100, 200 ppm. En el crecimiento del micelio de los hongos, hubo diferencias significativas ($p \leq 0.05$), en las dosis, y en el período del bioensayo, se observa que el mayor % de inhibición micelial se presenta a una concentración de 200 ppm con un 40 % en un período de 14 días.

Las concentraciones de 10, 50, 100, 200 ppm, muestran en general un comportamiento similar exhibiendo un aumento en % de inhibición con la concentración y con el periodo de tiempo y difiere del extracto etanólico en el rango de % de inhibición con un mínimo de 25% y un máximo del 40%.

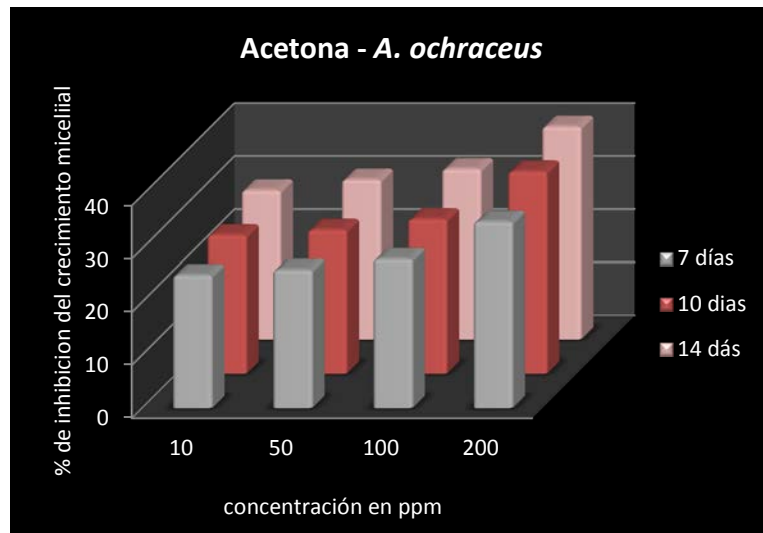


Fig. 9: Efecto de extracto en acetona de *Flourensia blakeana* a diferentes concentraciones, sobre el % de inhibición del crecimiento micelial de *Aspergillus ochraceus*.

5.4.1.4 Efecto del extracto en cloroformo.

El efecto del extracto clorofórmico de *F. blakeana* sobre % de inhibición del desarrollo micelial de *A. ochraceus* se presentan en las Fig. 10 y 11. El crecimiento micelial mostró diferencias significativas ($p \leq 0.05$), para concentraciones de 50, 100, 200 ppm y con el período del bioensayo. Se observa que el mayor % de inhibición micelial se exhibe a 200 ppm con un 90 % en un período de 10 días y las concentraciones de 10, 50 y 100 ppm, presentan un comportamiento similar entre ellas, exhibiendo un aumento en % de inhibición con la concentración y con el periodo de tiempo.

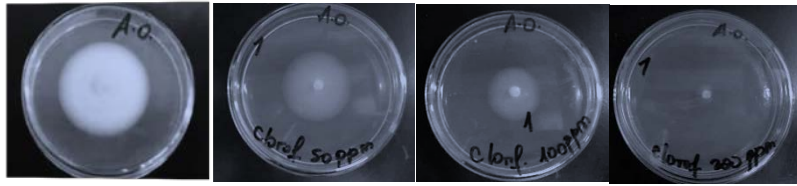


Fig. 10: Potencial del extracto en cloroformo de *Flourensia blakeana*, sobre el % de inhibición del crecimiento micelial de *Aspergillus. ochraceus* a diferentes concentraciones del extracto en un periodo de 10 días.

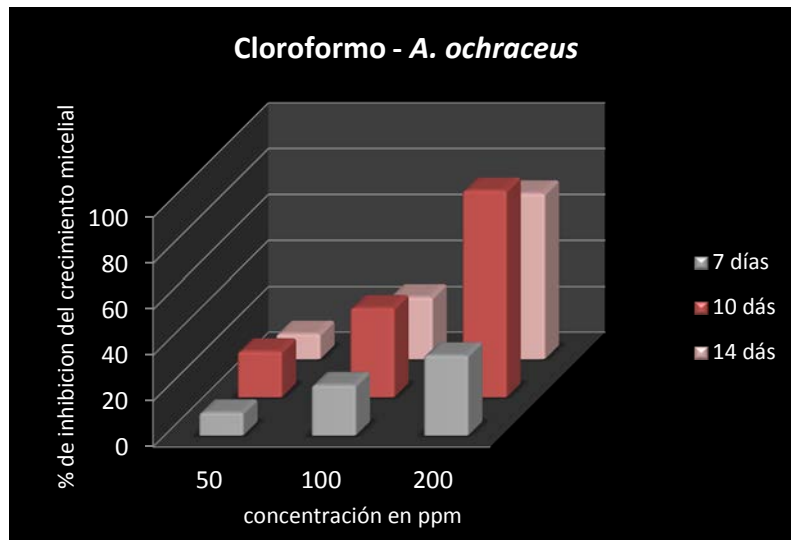


Fig. 11: Efecto de extracto clorofórmico de *Flourensia blakeana* a diferentes concentraciones, sobre el % de inhibición del crecimiento micelial de *Aspergillus ochraceus*.

5.4.2. Efecto de extractos de *Flourensia blakeana* en *Aspergillus parasiticus*.

5.4.2.1 Efecto del extracto en cloroformo.

En la Fig.12 se presenta la acción del extracto en cloroformo de *F. blakeana* sobre crecimiento micelial de *A. parasiticus*. En el desarrollo del micelio, hubo diferencias significativas ($p \leq 0.05$) para las concentraciones de 500 y 1000 ppm y en las concentraciones de 50,100 y 300 ppm no hay diferencias significativas relacionadas con las dosis, y con el período del bioensayo. Se observa que el mayor % de inhibición micelial se presenta a una concentración de 1000 ppm con un 76 % en un período de 3 días.

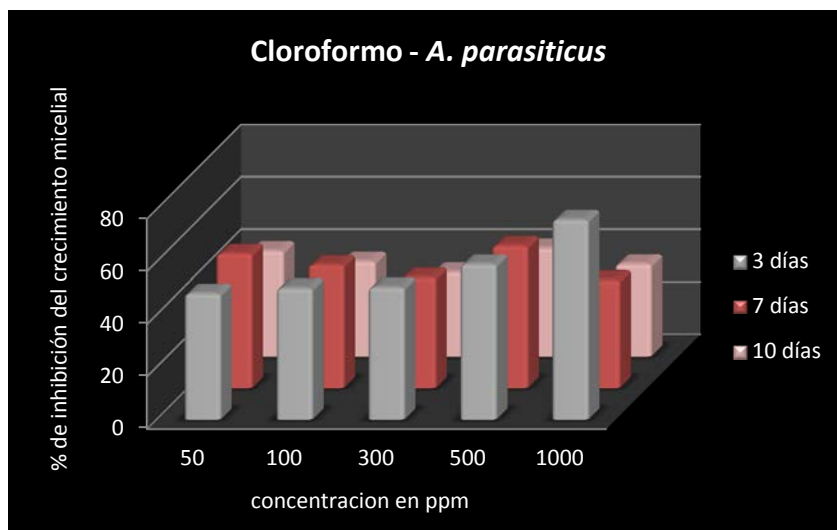


Fig. 12: Efecto de extracto clorofórmico de *Flourensia. blakeana* a diferentes concentraciones, sobre el % de inhibición del crecimiento micelial de *Aspergillus parasiticus*.

5.4.3 Efecto de extractos de *Flourensia blakeana* sobre *Aspergillus niger*.

5.4.3.1 Efecto del extracto en hexano.

En la Fig.13 se observa el efecto del extracto hexánico de *F. blakeana* en la inhibición del crecimiento micelial de *A. niger*. En el desarrollo del micelio de los hongos, hubo diferencias significativas ($p \leq 0.05$), Las concentraciones de extracto fueron 10, 50, 100, 200 y 300 ppm. Se observa que el % de inhibición micelial más importante se presenta a una concentración de 300 ppm con un 27% en un período de 3 días.; para las concentraciones de 50 y 100 ppm muestran niveles relativamente bajos en el % de inhibición y para 200 y 300 ppm la tendencia es muy similar.

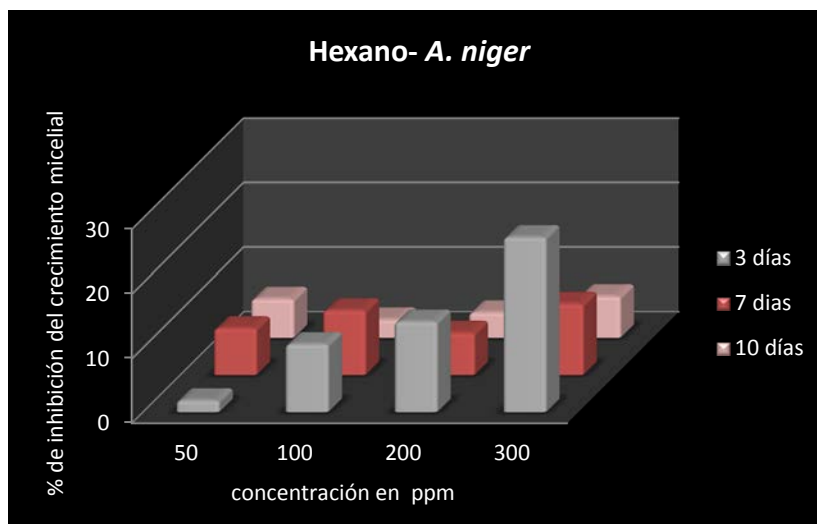


Fig. 13: Efecto de extracto hexánico de *Flourensia blakeana* a diferentes concentraciones, sobre el % de inhibición del crecimiento micelial de *Aspergillus niger*.

5.4.3.2 Efecto del extracto en acetona de *Flourensia blakeana*

El efecto del extracto en acetona de *F. blakeana* sobre % de inhibición del crecimiento micelial de *A. niger* se presenta en las Fig. 14 y 15. En el desarrollo del micelio hubo diferencias significativas ($p \leq 0.05$), en las dosis, y en el período del bioensayo. Las concentraciones de extracto fueron 50, 100, 200 y 300 ppm. Se observa que el mayor % de inhibición micelial se presenta a una concentración de 300 ppm con un 26 % en un período de 3 días. Las concentraciones experimentadas de 50, 100 y 200 ppm, muestran en general un tendencia similar entre ellas exhibiendo un % de inhibición con la concentración y con el periodo de tiempo poco significativos.



Fig. 14: Potencial del extracto en acetona de *Flourensia blakeana*, sobre el % de inhibición del crecimiento micelial de *Aspergillus niger* a diferentes concentraciones del extracto en un periodo de 7 días.

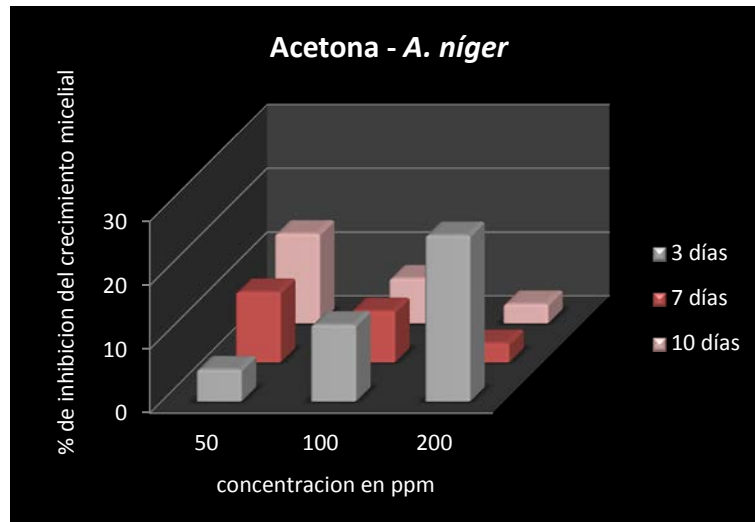


Fig. 15: Efecto de extracto en acetona de *Flourensia blakeana* a diferentes concentraciones, sobre el % de inhibición del crecimiento micelial de *Aspergillus niger*.

En relación con estudios reportados sobre otras especies del género *Flourensia*, para los extractos etanólicos de *F. microphylla*, *F. cernua*, y *F. retinophyllia*, informaron la inhibición en el desarrollo del micelio de tres patógenos: *Alternaria sp*, *Rhizoctonia solani* y *F. oxysporum*. A una dosis entre 1000 y 1500 ppm para lograr una efecto inhibitorio en los patógenos investigados (Jasso Rodríguez *et al.*, 2007).

Así mismo, investigaciones con el aceite de canela, aldehído cinámico natural, aldehído cinámico sintético, aceite de citral y citral fueron probados contra el crecimiento de *A. ochraceus* y producción OTA para ensayos de fumigación y de contacto. El aldehído cinámico natural resultó ser el más eficaz contra *A. ochraceus*, seguido por el aceite de canela, aldehído cinámico sintético, citral, aceite de citral, eugenol, menta, anís, eucalipto y aceites de alcanfor y la inhibición completa del crecimiento fúngico se obtuvo a 150-250 ml/l con la fumigación y 250- 500 ml/l con los ensayos de contacto de aceite de canela, aldehído cinámico natural y sintético, aceite de citral y citral. (Hua *et al.*, 2014).

Por otra parte, también se ha señalado la acción *A. ochraceus* en la conversión del aldehído cinámico en alcohol cinámico, y la actividad antimicrobiana de aldehído cinámico se atribuyó principalmente al grupo carbonilo de su aldehído.

Los resultados obtenidos en el presente estudio en correlación a la acción de antifúngico sobre *A. ochraceus*, en extractos de *Flourensia blakeana* mostraron que el extracto hexánico y clorofórmico exhibieron el mayor potencial inhibitorio entre 50 y 200 ppm con

un 82% en 14 días y 90% en 10 días, respectivamente. Nuestros resultados contrastados con los informados por Hua *et al.* (2014) presentan un efecto inhibitorio en el crecimiento de *A. ochraceus* a concentraciones más bajas, en un rango comprendido entre 50 y 300 ppm.

En cuanto a *Aspergillus parasiticus*, se han reportado investigaciones sobre la actividad antifúngica exhibida por 1,8-cineol y mostró efectos sólo en la concentración más alta, lo que podría indicar que el principal constituyente del aceite no es el único componente responsable de limitar el crecimiento de hongos (Vilela *et al.*, 2009). También se ha observado una falta de actividad antifúngica cuando fueron comparados el AE de *E. globulus* y 1,8-cineol, revelando que el crecimiento de *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* pueden no ser sensibles a un único monoterpeno, sino a una mezcla de dos o más compuestos (Rasooli & Abyaneh, 2004).

En correspondencia con los resultados obtenidos en nuestra investigación, relacionadas a la inhibición de *A. parasiticus* por acción del extracto clorofórmico de *F. blakeana*, el mayor efecto inhibitorio se obtuvo a 1000 ppm con un 76% en un período de 3 días.

Son numerosos las investigaciones reportadas sobre efectos antifúngicos de AE en *A. niger* y otros hongos micotoxigénicos. Rasooli *et al.* (2006) estudiaron el AE de *timo eriocalyx* y el *timo x-porlock*, con especial referencia al mecanismo de la inhibición del crecimiento de *A. niger* a nivel ultraestructural; resultados obtenidos indican una completa eliminación de *A. niger* a 250 y 500 ppm en *T. eriocalyx* y *T. porlock* respectivamente.

Por otra parte la actividad antifúngica del AE de tomillo fue menos eficiente en el control de micelios que cuando se aplica durante 24 horas como fumigantes contra micelio y esporas de *A. flavus*, y *A. ochraceus* (Paster *et al.*, 1995).

En correlación con los resultados alcanzados sobre la inhibición del crecimiento micelial de *A. niger* por acción de los extractos hexánico y clorofórmico de *F. blakeana*, los porcentajes de inhibición mostraron un máximo de 26 y 27% a 300 ppm respectivamente, en un periodo de 3 días.

El estudio de los diversos extractos de *Flourensia blakeana* concluye que los extractos presenta un potencial antifúngico selectivo con la concentración, solvente de extracción y especie de hongo. Se obtuvieron resultados muy interesantes en la inhibición del crecimiento fúngico de *Aspergillus ochraceus*. En el extracto clorofórmico se informa que

el mayor % de inhibición micelial se exhibe a 200 ppm con un 90 % en un período de 10 días y el extracto hexánico inhibe en un 82 % el crecimiento micelial a una concentración de 50 ppm en 14 días.

Igualmente varios compuestos han sido reportados en especies del genero *Flourensia* entre los que se destacan, benzofuranos y benzopiranos, flavonoides, de cadena larga, prenil flavonoides, ácido dehidroflourensico, sesquiterpenos (Aregullin y Rodríguez, 1983; Guerreiro *et al.*, 1979; Mata *et al.*, 2003; Uriburu *et al.*, 2004, 2007). Estos compuestos muy probablemente están presentes en nuestros extractos y pueden ser responsables de la actividad antifúngica. También es posible considerar el efecto sinérgico de componentes menores que puede representar una parte importante de la actividad antifúngica en los extractos vegetales.

En particular, el efecto sobre el crecimiento de los hongos y su posible rol en la biosíntesis de las micotoxinas, son aspectos importantes a dilucidar para poder emplear a estos extractos y compuestos como antifúngicos naturales o como sinergistas de los fungicidas actualmente en uso. La utilización de compuestos para controlar el crecimiento fúngico y/o la producción de toxina, naturalmente presentes en plantas y considerados seguros, pueden resultar menos riesgosos y reducir los efectos desfavorables que provocan la utilización de sustancias químicas de introducción reciente. Además, los compuestos fenólicos al ser metabolitos secundarios de prácticamente todas las plantas pueden ser agentes antifúngicos de fácil obtención, para la aplicación pre y/o post cosecha.

6. CONCLUSIONES

- La presente investigación es un aporte importante como antecedente a nivel regional, sobre los límites de contaminación bacteriana y fúngica en el pimentón, debido a que en nuestro país no existe actualmente un patrón microbiológico para esta especia.
- No se observó relación entre los niveles de contaminación de RAM, CT y hongos con los valores medidos de actividad acuosa, esto probablemente sea porque todos se encuentran en un rango seguro desde el punto de vista microbiológico.
- El predominio de mohos de almacenamiento (*Aspergillus* y *Penicillium*) en las muestras estudiadas, confirman la capacidad de estos géneros de colonizar en sustratos de baja a_w .
- Los hongos de campo (*Alternaria*, *Cladosporium* y *Fusarium*) fueron encontrados en menor porcentaje.
- Se identificaron 18 especies potencialmente toxicogénicas, pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Alternaria*. *Aspergillus niger*, especie potencialmente productora de ocratoxina A, es la que presenta el mayor porcentaje de incidencia y se encuentra distribuida en la mayoría de las muestras analizadas.
- *Aspergillus westerdijkiae*, sería la primera cita para nuestro país.
- El efecto inhibitorio de los diversos extractos de *Fluorensia blakeana*, manifiestan un potencial antifúngico, selectivo con la concentración, solvente de extracción y con el tipo de cepa.
- Los extractos ensayados de *Fluorensia blakeana* inhibieron el crecimiento de hongos contaminantes aislados de muestras de pimentón.

7. ANEXO

7.1 MEDIOS DE CULTIVOS EMPLEADOS

Agar Dicloran 18 % Glicerol (DG18) (Pitt y Hocking 2009)

Glucosa	10,0 g
Peptona	5,0 g
KH ₂ PO ₄	1,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
Dicloran (0,2% en etanol, p/v)	1,0 ml
Agar	15,0 g
Cloranfenicol	0,1 g
Agua destilada	800 ml

Para producir este medio, se agrega los ingredientes menores, el agar y 800 ml de agua destilada. Después de hervir por 30 min se agrega 220 g de glicerol (grado analítico), luego se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 min. El pH final deberá estar en el rango 5,5-5,8 y la a_w 0,955.

Agar Czapek Extracto de Levadura (CYA) (Klich, 2002)

K ₂ HPO ₄	1,0 g
Concentrado Czapek	10,0 ml
Extracto de levadura	5,0 g
Sacarosa	30,0 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1000 ml

Concentrado Czapek (con metales traza)

NaNO ₃	30,0 g
KCl	5,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	5,0 g

FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,05 g
Agua destilada	100 ml

Para producir este medio puede usarse sacarosa refinada de mesa pero debe estar libre de óxido de azufre. Se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 min. El pH final es 6,7

Agar Extracto de Malta (MEA) (Pitt y Hocking 2009)

Extracto de malta en polvo	20,0 g
Glucosa	20,0 g
Peptona	1,0 g
Agar	20,0 g
Agua destilada	1000 ml

Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 °C. El pH final del medio es 5,6.

Agar Papa Dextrosa (PDA) (Pitt y Hocking 2009)

Papas	250,0 g
Glucosa	20,0 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1000 ml

Esterilizar en autoclave durante 15 min a 121 °C.

Agar Czapek Extracto de Levadura con 20% de Sacarosa (CY20S) (Pitt y Hocking 2009)

K ₂ HPO ₄	1,0 g
Czapek concentrado	10 ml
Extracto de levadura	5,0 g
Sacarosa	200,0 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1000 ml

Esterilizar en autoclave durante 15 min a 121 °C. El pH final es 5,2.

Concentrado Czapek

NaNO ₃	30,0 g
KCl	5,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	5,0 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g
Agua destilada	100 ml

Czapek concentrado se mantendrá indefinidamente sin esterilización.

Agar Nitrate Glycerol 25% (G25N) (Pitt y Hocking 2009)

K ₂ HPO ₄	0,75 g g
Czapek concentrado	7,5 ml
Extracto de levadura	3,7 g
Glicerol, grado analítico	250,0 g
Agar	12,0 g
Agua destilada	750 ml

Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121° C. El pH final es 7.

AGAR PARA RECUENTO EN PLACA (PCA)

Peptona de caseína	5,0 g
Extracto de levadura	2,5 g
Glucosa D (+)	1,0 g
Agar-agar	14,0 g
Agua destilada	1000 ml

Para producir este medio mezclar todos los ingredientes. Hervir durante 30 min. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121° C. El pH final del medio es de 7,0 ± 0,2.

AGUA PEPTONA TAMPONADA. MANUAL ANALÍTICO DE BACTERIOLOGÍA, 8VA. EDICIÓN, REVISIÓN A, 1998.

Peptona	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Fosfato disódico	3.5 g

Monofosfato de potasio 1.5 g

Agua destilada 1 L

Esterilizar en autoclave durante 15 min a 121 °C. El pH final del medio es de $7,2 \pm 0,2$.

8. BIBLIOGRAFÍA

Abarca, M.L.; Bragulat, M.R.; Castellá, G.; Cabañes, F.J. 1994. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, vol. 60, n° 7, p. 2650-2652.

Abarca, M.L.; Bragulat, M.R.; Castellá, G.; Accensi, F.; Cabañes F. 2000. Hongos productores de micotoxinas emergentes. *Rev. Iberoam. Micol*, vol. 17, p. 563-568.

Abarca, M.L.; Accensi, F.; Bragulat, M.R.; Castellá, G.; Cabañes, F.J. 2003. *Aspergillus carbonarius* as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market. *Journal of Food Protection®*, 2003, vol. 66, n°. 3, p. 504-506.

Abarca, M.L.; Accensi, F.; Cano, J.; Cabañes, F.J. 2004. Taxonomy and significance of black aspergilli. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2004, vol. 86, n° 1, p. 33-49.

Abou Donia, M.A. 2008. Microbiological Quality and Aflatoxinogenesis of Egyptian Spices and Medicinal Plants. *Global Vet* 2008, Vol. 2, n° 4, p. 175-181.

Adams, M.R.; Moss, M.O. 1995. Food microbiology, 1995. *New Age International (P) Limited Publishers, New Delhi, India*.

Adegoke, G.O.; Letuma, P. 2013. Strategies for the prevention and reduction of Mycotoxins in developing countries. *Mycotoxin and Food Safety in Developing Countries. In Tech*, 2013, p. 123.

Adegoke, G.O.; Allamu, A.E.; Akingbala, J.O.; Akanni, A.O. 1996. Influence of sundrying on the chemical composition, aflatoxin content and fungal counts of two pepper varieties *Capsicum annum* and *Capsicum frutescens*. *Febrero de 1996*, Vol. 49, n° 2, p. 113-117.

Ahmad, R.; Magan, N. 2003. Monsooned coffee: impact of environmental factors on fungal community structure, enzyme production profiles and ochratoxin. *Aspects of applied biology*, 2003, vol. 68, p. 161-168.

Almela, L.; Rabe, V.; Sánchez, B.; Torrella, F.; López-Pérez, J.P.; Gabaldón, J.A.; Guardiola, L. 2007. Ochratoxin A in red paprika: relationship with the origin of the raw material. *Food microbiology*, 2007, vol. 24, n° 4, p. 319-327.

American Public Health Association (APHA). 2001. Compendium of methods for the Microbiological Examination of Foods 4th Ed. *American Public Health Association*, vol. 800.

American Public Health Association (APHA). 1992. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods 3th Ed. *American Public Health Association*, Vanderzant, C. & Splittstoesser, D. (Eds.). Washington, DC.

Andersen, B.; Frisvad, J.C. 2004. Natural occurrence of fungi and fungal metabolites in moldy tomatoes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2004, vol. 52, n° 25, p. 7507-7513.

Andersen, B.; Smedsgaard, J.; Frisvad, J.C. 2004. *Penicillium expansum*: consistent production of patulin, chaetoglobosins, and other secondary metabolites in culture and their natural occurrence in fruit products. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2004, vol. 52, n° 8, p. 2421-2428.

Aran, N.; Eke, D. 1987. Mould mycoflora of some Turkish cereals and cereal products. *MIRCEN journal of applied microbiology and biotechnology*, 1987, vol. 3, n° 3, p. 281-287.

Aregullin, M.; Rodriguez, E. 1986. *Phytochemical studies of the genus Flourensia from the Chihuahuan Desert*. Chihuahuan Desert Research Institute.

Astoreca, A.; Magnoli, C.; Ramirez, M.L.; Combina, M.; Dalcero, A. 2007. Water activity and temperature effects on growth of *Aspergillus niger*, *A. awamori* and *A. carbonarius* isolated from different substrates in Argentina. *International journal of food microbiology*, 2007, vol. 119, n° 3, p. 314-318.

Aziz, N.H.; Mattar, Z.A.; Mahrous, S.R. 2006. Contamination of Grains by Mycotoxin-Producing Molds and Mycotoxins and Control by Gamma Irradiation. *Journal of food safety*, 2006, vol. 26, n° 3, p. 184-201.

Banerjee, Mousumi y Sarkar, Prabir K. 2003. Microbiological quality of some retail spices in India. *Food Research International*, 2003, vol. 36, n° 5, p. 469-474.

Barkai-Golan, Rivka. 1974. Species of *Penicillium* causing decay of stored fruits and vegetables in Israel. *Mycopathologia et mycologia applicata*, 1974, vol. 54, n° 1, p. 141-145.

Baxter, R. y Holzapfel, W. H. 1982. A microbial investigation of selected spices, herbs, and additives in South Africa. *Journal of Food Science*, 1982, vol. 47, n° 2, p. 570-574.

- Bellí, N.; Ramos, A.J.; Sanchis, V.; Marín, S. 2004.** Incubation time and water activity effects on ochratoxin A production by *Aspergillus* section *Nigri* strains isolated from grapes. *Letters in Applied Microbiology*, 2004, vol. 38, n° 1, p. 72-77.
- Benavidez Rozo, M.E.; Patriarca, A.; Cabrera, G.; Fernández Pinto, V.E. 2014.** Determinación de perfiles de producción de metabolitos secundarios característicos de especies del género *Alternaria* aisladas de tomate. *Revista Iberoamericana de Micología*, 2014, vol. 31, n° 2, p. 119-124.
- Bhattacharya, K.; Raha, S. 2002.** Deteriorative changes of maize, groundnut and soybean seeds by fungi in storage. *Mycopathologia*, 2002, vol. 155, n° 3, p. 135-141.
- Bokhari, F.M. 2007.** Spices mycobiota and mycotoxins available in Saudi Arabia and their abilities to inhibit growth of some toxigenic fungi. *Mycobiology*, 2007, vol. 35, n° 2, p. 47-53.
- Bottalico, A.; Logrieco, A. 1998.** Toxigenic *Alternaria* species of economic importance. *Mycotoxins in agriculture and food safety*, 1998, p. 65-108.
- Bottalico, A.; Logrieco, A. 2001.** Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in Italy. *Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in plants, food and feeds in Europe, European Commission, COST Action*, 2001, vol. 835, p. 69-104.
- Bresler, G.; Vaamonde, G.; Brizzio, S. 1991.** Natural occurrence of zearalenone and toxicogenic fungi in amaranth grain. *International journal of food microbiology*, 1991, vol. 13, n° 1, p. 75-80.
- Bucheli, P.; Taniwaki, M. H. 2002.** Research on the origin, and on the impact of post-harvest handling and manufacturing on the presence of ochratoxin A in coffee. *Food Additives & Contaminants*, 2002, vol. 19, n° 7, p. 655-665.
- Buckenhüskes, H.J. 2001.** Zur Problematik der mikrobiellen Belastung von Gewürzen und Kräutern sowie aktuelle Ansätze zu deren Verwertung. *XXXVI. Vortragstagung DGQ e.V, Jena*, 2001, vol. 19, p. 20.
- Cakir, A.; Kordali, S.; Kilic, H.; Kaya, E. 2005.** Antifungal properties of essential oil and crude extracts of *Hypericum linarioides* Bosse. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2005, vol. 33, n° 3, p. 245-256.
- Candlish, A.A.; Pearson, S.M.; Aidoo, K.E.; Smith, J.E.; Kelly, B.; Irvine, H. 2001.** A survey of ethnic foods for microbial quality and content aflatoxin. *Food Additives & Contaminants*, 2001, vol. 18, n° 2, p. 129-136.

Char, C.; Guerrero, S.; González, L.; Alzamora, S. M. 2005. Growth response of *Eurotium chevalieri*, *Aspergillus fumigatus* and *Penicillium brevicompactum* in Argentine milk jam. *Food science and technology international*, 2005, vol. 11, n° 4, p. 297-305.

Christensen, C. M.; Fanse, H.A.; Nelson, G.H.; Bates, F.; Mirocha, J.C. 1967. Microflora of Black and Red Pepper. Mayo de 1967, Vol. 15, 3, p. 622-626.

Ciegler, A.; Vesonder, R. F.; Jackson, L.K. 1977. Production and biological activity of patulin and citrinin from *Penicillium expansum*. *Applied and environmental microbiology*, 1977, vol. 33, n° 4, p. 1004-1006.

Clark, H.A.; Snedeker, S.M. 2006. Ochratoxin A: Its cancer risk and potential for exposure. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews*, 2006, vol. 9, n° 3, p. 265-296.

Codex Alimentarius. 1995. International Food Standards: Code of Hygienic Practice for Spices and Dried Aromatic Plants. CAC/RCP 42-1995. <http://www.codexalimentarius.org/standards/list-of-standards/>. Consulta noviembre 2014.

Cole, R. J.; Cox, R.H. 1981. *Handbook of toxic fungal metabolites*. Academic Press., p. 937.

Comerio, R. M.; Mac Cormack, W. 2004. Algunos micromicetos del suelo y de alimentos deteriorados en la Antártida Argentina. *Rev. Iberoam. Micol.*, 2004, vol. 21, p. 128-134.

Cooke, D.E.; Young, V.; Birch, P.R.; Toth, R.; Gourlay, F.; Day, J.P.; Carnegie, S.F.; Duncan, J.M. 2003. Phenotypic and genotypic diversity of *Phytophthora infestans* populations in Scotland (1995–97). *Plant Pathology*, 2003, vol. 52, n° 2, p. 181-192.

Da Cruz Cabral, L.; Fernández Pinto, V.; Patriarca, A. 2013. Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *International journal of food microbiology*, 2013, vol. 166, n° 1, p. 1-14.

De Boer, E., Spiegelberg, W.M.; Janssen, F.W. 1985. Microbiology of spices and herbs. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1985, vol. 51, n° 4, p. 435-438.

De, A.K. 2003. *Capsicum: The genus Capsicum*. London : Taylor & Francis, 2003. p. 296.

Dharmadhikari, M. 1994. Composition of grapes. *Vineyard Vintage View Mo State Univ*, 1994, vol. 9, n° 7/8, p. 3-8.

Dillon, M.O. 1984. *A systematic study of Flourensia (Asteraceae, Heliantheae)*. Field Museum of Natural History, 1984.

Durán, G.; Condori, M.A.; Echazú, R.; Díaz Russo, G. 2010. “Secador solar híbrido para la producción continúa a escala industrial de pimiento para pimentón”. En *IV Conferencia Latino Americana de Energía Solar (IV ISES_CLA) y XVII Simposio Peruano de Energía Solar (XVII-SPES)*, Cusco. 2010. p. 1-5.11.

El-Aasar, S. 2006. Cultural conditions studies on kojic acid production by *Aspergillus parasiticus*. *Int J Agri Biol*, 2006, vol. 8, p. 468-473.

El-Banna, A.A.; Pitt, J.I.; Leistner, L. 1987. Production of mycotoxins by *Penicillium* species. *Systematic and Applied Microbiology*, 1987, vol. 10, n° 1, p. 42-46.

El-Kady, I.A.; El-Maraghy, SS Mohamed; Mostafa, M.E. 1992. Contribution of the mesophilic fungi of different spices in Egypt. *Mycopathologia*, 1992, vol. 120, n° 2, p. 93-101.

Elshafie, A.E.; Al-Rashdi, T.A.; Al-Bahry, S.N.; Bakheit, C.S. 2002. Fungi and aflatoxins associated with spices in the Sultanate of Oman. *Mycopathologia*, 2002, vol. 155, n° 3, p. 155-160.

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

Esteban, A.; Abarca, M.L.; Bragulat, M.R.; Cabañes, F.J. 2004. Effects of temperature and incubation time on production of ochratoxin A by black aspergilli. *Research in Microbiology*, 2004, vol. 155, n° 10, p. 861-866.

Esteban, A.; Abarca, M.L.; Bragulat, M.R.; Cabañes, F.J. 2006a. Effect of water activity on ochratoxin A production by *Aspergillus niger* aggregate species. *International journal of food microbiology*, 2006, vol. 108, n° 2, p. 188-195.

Esteban, A.; Abarca, M.L.; Bragulat, M.R.; Cabañes, F.J. 2006b. Effect of pH on ochratoxin A production by *Aspergillus niger* aggregate species. *Food additives and contaminants*, 2006, vol. 23, n° 6, p. 616-622.

European food Safety Authority (EFSA). 2006. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin A in food. *EFSA J*, 2006, vol. 365, p. 1-56.

European Spice Association (ESA). 2004. European Spice Association Quality Minima Document. <http://www.esa-spices.org/Downloads/esaqmdrev1-2nov07.pdf>. Consulta enero 2013.

FAO/WHO. 2001. Fifty-six meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Safety evaluation of certain mycotoxins in food. FAO Food and Nutrition Paper 74.

Foods, U. S. Drug Administration (FDA) - Bacteriological Analytical Manual (BAM) 2009. [En línea] 2009.

Foods, U. S. Drug Administration (FDA). 1995. *Salmonella* (Capítulo 5). *Bacteriological Analytical Manual (BAM)*, 8th ed. AOAC International, Gaithersburg, Md.

Frisvad, J.C. 1986. Profiles of primary and secondary metabolites of value in classification of *Penicillium viridicatum* and related species. En *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics*. Springer US, 1986. p. 311-325.

Frisvad, J.C.; Filtenborg, O. 1989. Terverticillate penicillia: chemotaxonomy and mycotoxin production. *Mycologia*, 1989, p. 837-861.

Frisvad, J.C.; Samson, R.A. 1991. Mycotoxins produced by species of *Penicillium* and *Aspergillus* occurring in cereals. *Cereal grain: mycotoxins, fungi and quality in drying and storage.*, 1991, p. 441-476.

Frisvad, J.C., Frank, J.M., Houbraeken, J.A.; Kuijpers, A.F.; Samson, R.A. 2004. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Studies in Mycology*, 2004, vol. 50, n° 1, p. 23-43.

Frisvad, J.C.; Samson, R.A. 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in mycology*, 2004, vol. 49, n° 1, p. C174.

Frisvad, J.C.; Skouboe, P.; Samson, R.A. 2005. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B₁, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 2005, vol. 28, n° 5, p. 442-453.

Frisvad, J.C.; Thrane, U.; Samson R.A.; Pitt, J. 2006. Important mycotoxins and the fungi which produce them. En *Advances in food mycology*. Springer US, 2006. p. 3-31.

Frisvad, J.C.; Smedsgaard, J.; Samson, R.A.; Larsen, T.O.; Thrane, U. 2007. Fumonisin B₂ production by *Aspergillus niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, vol. 55, n° 23, p. 9727-9732.

Gallardo-Guerrero, L.; Pérez-Gálvez, A.; Aranda, E.; Mínguez-Mosquera, M.I.; Hornero-Méndez, D. 2010. Physicochemical and microbiological characterization of the

dehydration processing of red pepper fruits for paprika production. *LWT-Food Science and Technology*, 2010, vol. 43, n° 9, p. 1359-1367.

Gatti, M. J.; Fraga, M. E.; Magnoli, C.; Dalcero, A. M.; da Rocha Rosa, C. A. 2003. Mycological survey for potential aflatoxin and ochratoxin producers and their toxicological properties in harvested Brazilian black pepper. *Food additives and contaminants*, 2003, vol. 20, n° 12, p. 1120-1126.

Gil-Serna, J.; Patiño, B.; Cortes, L.; González-Jaen, M.T.; Vázquez, C. 2015. *Aspergillus steynii* and *Aspergillus westerdijkiae* as potential risk of OTA contamination in food products in warm climates. *Food microbiology*, 2015, vol. 46, p. 168-175.

Guerreiro, E.; Kavka, J.; Giordano, O.S.; Gros, E.G. 1979. Sesquiterpenoids and flavonoids from *Flourensia oolepis*. *Phytochemistry*, 1979, vol. 18, n° 7, p. 1235-1237.

Guerrero-Rodríguez, E.; Solís-Gaona, S.; Hernández-Castillo, F. D.; Flores-Olivas, A.; Sandoval-López, V.; Jasso-Cantú, D. 2007. Actividad Biológica in vitro de Extractos de *Flourensia cernua* DC en Patógenos de Postcosecha: *Alternaria alternata* (Fr.: Fr.) Keissl., *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. y *Penicillium digitatum* (Pers.: Fr.) Sacc. *Revista mexicana de Fitopatología*, 2007, vol. 25, n° 1, p. 48-53.

Gurtler, J.B.; Doyle, M.P.; Kornacki, J.L. 2014. The Microbiological Safety of Spices and Low- Water Activity Foods: Correcting Historic Misassumptions. *The Microbiological Safety of Low Water Activity Foods and Spices*. New York: © Springer Science+Business Media, 2014, I, p. 3-13.

Harwig, J.; Chen, Y-K.; Kennedy, B.P.C.; Scott, P.M. 1973. Occurrence of patulin and patulin-producing strains of *Penicillium expansum* in natural rots of apple in Canada. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 1973, vol. 6, n° 1, p. 22-25.

Hashem, M.; Alamri, S. 2010. Contamination of common spices in Saudi Arabia markets with potential mycotoxin-producing fungi. *Saudi journal of biological sciences*, 2010, vol. 17, n° 2, p. 167-175.

Hawksworth, David L. 2012. Managing and coping with names of pleomorphic fungi in a period of transition. *IMA Fungus: The Global Mycological Journal*, 2012, vol. 3, n° 1, p. 15.

Hayaloglu, A.A.; Kirbag, S. 2007. Microbial quality and presence of moulds in Kuflu cheese. *International journal of food microbiology*, 2007, vol. 115, n° 3, p. 376-380.

Heidarian, R.; Nikkhah, M.J.; Peyambari, M.; Ormaz, B. 2005. Study on fungal contamination of pistachio seeds in Kerman province, Iran and some new fungi for Iranian

pistachio mycoflora. En *IV International Symposium on Pistachios and Almonds* 726. 2005. p. 615-618.

Hibbett, D.S.; Binder, M.; Bischoff, J.F. ; Blackwell, M.; Cannon, P.F. ; Eriksson, O.E.; Huhndorf, S.; James, T.; Kirk, P.M. ; Lücking, R.; Lumbsch, H.T.; Lutzoni, François; Matheny, B.; McLaughlin, D.J. ; Powell, M.J.; Redhead, S.; Schoch, C.L.; Spatafora, J.W; Stalpers, J.A. ; Vilgalys, R.; Aime, C. M.; Aptroot, A.; Bauer, R.; Begerow, D.; Benny, G.L. ; Castlebury, L.A.; Crous, P.W. ; Dai, Yu-Cheng ; Gams, W.; Geiser, D.M. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological research*, 2007, vol. 111, n° 5, p. 509-547.

Hong, S.B.; Lee, M.; Kim, DH.; Meijer, M.; Majoor, E.; VanKuyk, P.A.; Samson R.A. 2012. *Aspergillus cibarius* sp. nov., from traditional meju in Korea. *Journal of Microbiology*, 2012, vol. 50, n° 4, p. 712-714.

Horie, Y. 1995. Productivity of ochratoxin A of *Aspergillus carbonarius* in *Aspergillus* section *Nigri*. *Nippon Kingakukai Kaiho*, 1995, vol. 36, p. 73-76.

Horn, Bruce W. 2003. Ecology and population biology of aflatoxigenic fungi in soil. *Toxin Reviews*, 2003, vol. 22, n° 2-3, p. 351-379.

<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm2006949.htm>.

Consulta 5 marzo 2014.

Hua, H.; Xing, F.; Nimal Selvaraj, J.; Wang, Y.; Zhao, Y.; Zhou, L.; Liu, X.; Liu, Y. 2014. Inhibitory Effect of Essential Oils on *Aspergillus ochraceus* Growth and Ochratoxin A Production. 2014.

Hubka, V.; Peterson, S.W.; Frisvad, J.C.; Yaguchi, T.; Kubátová, A.; Kolařík, Miroslav. 2013. *Aspergillus waksmanii* sp. nov. and *Aspergillus marvanovae* sp. nov., two closely related species in section *Fumigati*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2013, vol. 63, n° Pt 2, p. 783-789.

Iamanaka, B.T.; Taniwaky, M.H.; Menezes, H.C.; Vicente, E.; Fungaro, M.H.P. 2005. Incidence of toxigenic fungi and ochratoxin A in dried fruits sold in Brazil. *Food additives and contaminants*, 2005, vol. 22, n° 12, p. 1258-1263.

Instituto de Nutrición y tecnología de los Alimentos - INTA -Universidad de Chile. 1996. <http://www.dinta.cl/>. *Reglamento sanitario de los alimentos DTO. N° 977/96 (D.OF. 13.05.97)*. http://www.dinta.cl/wp-dintacl/wp-content/uploads/DECRETO_977_96-actualizado-a-Sept-2014.pdf. Consulta abril 2015.

Jasso De Rodríguez, D.; Hernández-Castillo, D.; Angulo-Sánchez, J.L.; Rodríguez-García, R.; Villarreal Quintanilla, J.A.; Lira-Saldivar, R.H. 2007. Antifungal activity

in vitro of *Flourensia spp.* extracts on *Alternaria sp.*, *Rhizoctonia solani*, and *Fusarium oxysporum*. *Industrial Crops and Products*, 2007, vol. 25, n° 2, p. 111-116.

Jørgensen, Kevin. 2005. Occurrence of ochratoxin A in commodities and processed food—A review of EU occurrence data. *Food additives and contaminants*, 2005, vol. 22, n° s1, p. 26-30.

Kapetanakou, A.E.; Panagou, E.Z.; Gialitaki, M.; Drosinos, E.H.; Skandamis, P.N. 2009. Evaluating the combined effect of water activity, pH and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus carbonarius* on culture medium and Corinth raisins. *Food Control*, 2009, vol. 20, n° 8, p. 725-732.

Keller, S.E.; VanDoren, J.M.; Grasso, E.M.; Halik, L. 2013. Growth and survival of *Salmonella* in ground black pepper (*Piper nigrum*). 2013, Vol. 34, p. 182-188.

Khalesi, M.; Khatib, N. 2011. The effects of different ecophysiological factors on ochratoxin A production. *environmental toxicology and pharmacology*, 2011, vol. 32, n° 2, p. 113-121.

Kiran, D.R., Narayana, K.J.; Vijayalakshmi, M. 2005. Aflatoxin B 1 production in chillies (*Capsicum annum L.*) kept in cold stores. *African Journal of Biotechnology*, 2005, vol. 4, n° 8, p. 791-795.

Klich, Maren A. 2002. *Identification of common Aspergillus species*. Centraalbureau voor schimmelcultures, 2002.

Kneifel, W.; Berger, E. 1994. Microbiological criteria of random samples of spices and herbs retailed on the Austrian market. *Journal of Food Protection®*, 1994, vol. 57, n° 10, p. 893-901.

Kocic-Tanackov, S.D.; Dimic, G.R. ; Karalic, D. 2007. KOCIĆ-TANACKOV, Sunčica D.; DIMIĆ, Gordana R.; KARALIĆ, Dragana. Contamination of spices with moulds potential producers of sterigmatocystine. *Acta periodica technologica*, 2007, n° 38, p. 29-35.

Koohy-Kamaly-Dehkordy, P.; Nikoopour, H.; Siavoshi, F.; Koushki, M.; Abadi, A. 2013. Microbiological Quality of Retail Spices in Tehran, Iran. 1 de Mayo de 2013, Vol. 76, 5, p. 843-848.

Kordali, S.; Kotan, R.; Cakir, A. 2007. Screening of antifungal activities of 21 oxygenated monoterpenes in-vitro as plant disease control agents. *Allelopathy Journal*, 2007, vol. 19, n° 2, p. 373-391.

Kumar, R.; Mishra, A.k.; Dubey, N.K.; Tripath, Y.B. 2007. Evaluation of *Chenopodium ambrosioides* oil as a potential source of antifungal, antiaflatoxigenic and antioxidant activity. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, vol. 115, n° 2, p. 159-164.

Legarreta, M.R.; Cuéllar, J.L. 2002. Impacto ambiental del uso de plaguicidas en huertos de manzano del noroeste de Chihuahua, México. *Revista mexicana de Fitopatología*, 2002, vol. 20, n° 2, p. 168-173.

Lehmacher, A., Bockemühl, J.; Aleksic, S. 1995. Nationwide outbreak of human salmonellosis in Germany due to contaminated paprika and paprika-powdered potato chips. diciembre de 1995, Vol. 15, 3, p. 501-511.

Leong, S-L.; Hocking, A.D.; Pitt, J.I. 2004. Occurrence of fruit rot fungi (*Aspergillus* section *Nigri*) on some drying varieties of irrigated grapes. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 2004, vol. 10, n° 1, p. 83-88.

Leong, S-L.; Hocking, A.D.; Scott, E.S. 2006. Effect of temperature and water activity on growth and ochratoxin A production by Australian *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates on a simulated grape juice medium. *International journal of food microbiology*, 2006, vol. 110, n° 3, p. 209-216.

Llewellyn, G.; Mooney, R.; Cheatle, T.; Flannigan, B. 1992. Mycotoxin contamination of spices—an update. *International biodeterioration & biodegradation*, 1992, vol. 29, n° 2, p. 111-121.

Logrieco, A.; Visconti, A.; Bottalico, A. 1990. Mandarin fruit rot caused by *Alternaria alternata* and associated mycotoxins. *Plant Disease*, 1990, vol. 74, n° 6, p. 415-417.

Logrieco, A.; Bottalico A.; Mulé, G.; Moretti, A.; Perrone, G. 2003. Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *European Journal of Plant Pathology*, 2003, vol. 109, n° 7, p. 645-667.

Lugauskas, A.; Repeckiene, J.; Novosinskas, H. 2004. Micromycetes, producers of toxins, detected on stored vegetables. *Annals of agricultural and environmental medicine: AAEM*, 2004, vol. 12, n° 2, p. 253-260.

Lugauskas, A.; Raila, A.; Railiene, M.; Raudoniene, V. 2006. Toxic micromycetes in grain raw material during its processing. *Annals of agricultural and environmental medicine*, 2006, vol. 13, n° 1, p. 147-161.

Lund, F. 1995. Differentiating *Penicillium* species by detection of indole metabolites using a filter paper method. *Letters in Applied Microbiology*, 1995, vol. 20, n° 4, p. 228-231.

- Magnoli, C.; Astoreca, A.; Ponsone, L.; Combina, M.; Palacio, G.; Rosa, C.A.R.; Dalcero, A.M. 2004.** Survey of mycoflora and ochratoxin A in dried vine fruits from Argentina markets. *Letters in applied microbiology*, 2004, vol. 39, n° 4, p. 326-331.
- Magnoli, C.; Hallak, C.; Astoreca, A.; Ponsone, L.; Chiacchiera, S.; Dalcero, A.M. 2006.** Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in commercial corn kernels in Argentina. *Mycopathologia*, 2006, vol. 161, n° 1, p. 53-58.
- Magro, A.; Carolino, M.; Bastos, M.; Mexia, A. 2006.** Efficacy of plant extracts against stored products fungi. *Revista iberoamericana de micología*, 2006, vol. 23, n° 3, p. 176-178.
- Mandeel, Qaher A. 2005.** Fungal contamination of some imported spices. *Mycopathologia*, 2005, vol. 159, n° 2, p. 291-298.
- Marino, A.; Nostro, A.; Fiorentino, C. 2009.** Ochratoxin A production by *Aspergillus westerdijkiae* in orange fruit and juice. *International journal of food microbiology*, 2009, vol. 132, n° 2, p. 185-189.
- Martín, A.; Aranda, E.; Benito, M.J.; Pérez-Nevado, F.; Córdoba, M.G. 2005.** Identification of Fungal Contamination and Determination of Mycotoxigenic Molds by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography in Smoked Paprika. Abril de 2005, 4, págs. 815-822.
- Martins, M. L.; Martins, H. M.; Gimeno, A. 2003.** Incidence of microflora and of ochratoxin A in green coffee beans (*Coffea arabica*). *Food Additives and Contaminants*, 2003, vol. 20, n° 12, p. 1127-1131.
- Mata, R.; Bye, R.; Linares, E.; Mací, M.; Rivero-Cruz, I.; Pérez, Olga; Timmermann, Bárbara N. 2003.** Phytotoxic compounds from *Flourensia cernua*. *Phytochemistry*, 2003, vol. 64, n° 1, p. 285-291.
- McKee, L. H. 1995.** Microbial contamination of spices and herbs: a review. *LWT-Food Science and Technology*, 1995, vol. 28, n° 1, p. 1-11
- McNeill, J.; Barrie, F.R.; Buck, W.R.; Demoulin, V.; Greuter, W.; Hawksworth, D.L.; Herendeen, P.S.; Knapp, S.; Marhold, K.; Prado, J.; Prud'homme van Reine, W.F.; Smith, G.F.; Wiersema, J.H.; Turland, N.J. 2012.** International Code of Nomenclature for Algae, Fungi, and Plants. *International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code)*, 2012.
- Medina, A.; Mateo, E.M.; Valle-Algarra, F.M.; Mateo, F.; Mateo, R.; Jiménez, M. 2008.** Influence of nitrogen and carbon sources on the production of ochratoxin A by

ochratoxigenic strains of *Aspergillus spp.* isolated from grapes. *International journal of food microbiology*, 2008, vol. 122, n° 1, p. 93-99.

Miller, J.D.; McMullin, D.R. 2014. Fungal secondary metabolites as harmful indoor air contaminants: 10 years on. *Applied microbiology and biotechnology*, 2014, vol. 98, n° 24, p. 9953-9966.

Ministerio de Salud de Perú/Dirección General de Gestión Ambiental-V.01. Norma Sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano. 2007. <http://www.minsa.gob.pe> Consulta abril 2015.

Mislivec, P.B.; Bruce, V.R.; Gibson, R. 1983. Incidence of toxigenic and other molds in green coffee beans. *Journal of Food Protection*, 1983, vol. 46, p. 969-973.

Morello, L.G.; Sartori, D.; Oliveira Martínez de, A.L.; Carneiro Vieira, M.L.; Pelegrinelli Fungaro, M.H.2007. Detection and quantification of *Aspergillus westerdijkiae* in coffee beans based on selective amplification of β -tubulin gene by using real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, vol. 119, n° 3, p. 270-276.

Mphande, F.A.; Siame, B.A.; Taylor, J. E. 2004. Fungi, aflatoxins, and cyclopiazonic acid associated with peanut retailing in Botswana. *Journal of Food Protection*®, 2004, vol. 67, n° 1, p. 96-102.

Mühlencoert, E.; Mayer, I.; Zapf, M.W.; Vogel, R.F.; Niessen, L. 2004. Production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus*. En *Molecular Diversity and PCR-detection of Toxigenic Fusarium Species and Ochratoxigenic Fungi*. Springer Netherlands, 2004. p. 651-659.

Murphy, P.A., Hendrich, S.; Landgren, C. 2006. Food mycotoxins: an update. *Journal of food science*, 2006, vol. 71, n° 5, p. R51-R65.

Naeini, A; Ziglari, T.; Shokri, H.; Khosravi, A.R. 2010. Assessment of growth-inhibiting effect of some plant essential oils on different *Fusarium* isolates. *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology*, 2010, vol. 20, n° 3, p. 174-178.

Nketsia-Tabiri, J.; Adu-Gyamfi, A.; Montford, K.G.; Gbedemah, C.M.; Sefa-Dedeh, S. 2003. Optimising processing conditions for irradiated cured fish. *International Atomic Energy Agency Technical Document*, 2003, vol. 1337, p. 207-216.

Nuez Viñals, F.; Gil Ortega, R.; Costa García, J. 1996. *El cultivo de pimientos, chiles y ajíes*. Madrid : Mundi - Prensa, 1996. p. 607.

Orell R. 2006. PNHFA 4162. Proyecto Específico: Desarrollo de bases para la producción y comercialización de aromáticas- condimenticias de fruto diferenciada. Situación inicial, p. 11 -15. Documentación interna INTA.

Overy, D.P; Seifert, K.A.; Savard, M.E.; Frisvad, J.C. 2003. Spoilage fungi and their mycotoxins in commercially marketed chestnuts. *International journal of food microbiology*, 2003, vol. 88, n° 1, p. 69-77.

Pacin, A.M.; González, H.H.L.; Etcheverry, M.; Resnik, S.L.; Vivas, L.; Espin, S. 2003. Los hongos asociados a los alimentos y piensos procedentes de Ecuador. *Mycopathologia*, 2003, vol. 156, n° 2, p. 87-92.

Paster, N.; Menasherov, M.; Ravid, U.; Juven, B. 1995. Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. *Journal of Food Protection®*, 1995, vol. 58, n° 1, p. 81-85.

Ravikumar Patil, H.S.; Makari, H.K.; Gurumurthy, H. 2008. *In vitro* antimicrobial activity of ethanol extract of *Thevetia peruviana*. *BioTechnology: An Indian Journal*, 2008, vol. 2, n° 1.

Pico Zossi, R.; Fernández Górgolas, M. del C.; Cruz, R.; Romero, D. 2013. *Revista de Divulgación Técnica Agrícola y Agroindustrial*. Facultad de Ciencias Agrarias-U.N.Ca. 2013, n° 42. Santa María, Catamarca: Argentina. REDITA – FCA (UNCa) ISSN: 1852 – 7086.

Pico Zossi, R.; Lescano, M. 2006. “Proceso de secado de pimiento para pimentón en secadero simple de bajo costo. Santa María. Catamarca”. Manuscrito inédito. Agronomía de Zona perteneciente a la Dirección Provincial de Extensión Rural - Ministerio de Producción y Desarrollo; Delegación Santa María de la Universidad Nacional de Catamarca, Agencia de Extensión Rural INTA-Santa María, Programa PRODERNOA y Dirección de Producción de la Municipalidad de Santa María. 2006.

Pildain, M. B.; Cabral, D.; Vaamonde, G. 2005. Poblaciones de *Aspergillus flavus* en maní cultivado en diferentes zonas agroecológicas de la Argentina, caracterización morfológica y toxigénica. *Rev Invest Agropec*, 2005, vol. 34, p. 3-19.

Pinkas, J.M.; Keller, S.E. 2014. *The Microbiological Safety of Low Water Activity Foods and Spices*. s.l. : Springer Science+Business Media, 2014, p. 99-114.

Pitt, John I. 1979a. The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. *The genus Penicillium and its teleomorphic states Eupenicillium and Talaromyces.*, London: Academic Press, 1979, p. 634.

Pitt, John I. 1979b. *Penicillium crustosum* and *P. simplicissimum*, the correct names for two common species producing tremorgenic mycotoxins. *Mycologia*, 1979, p. 1166-1177.

Pitt, John I. 1988. *A laboratory guide to common Penicillium species*. 2a ed., PO Box 52, North Ryde, NSW 2113, Australia: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing.

Pitt, J.I.; Hocking, A.; Bhudhasamai, K.; Miscamble, B.; Wheeler, K.; Tanboon-Ek, P. 1993. The normal mycoflora of commodities from Thailand. 1. Nuts and oilseeds. *International journal of food microbiology*, 1993, vol. 20, n° 4, p. 211-226.

Pitt, John I. 1993. Corrections to species names in physiological studies on *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Food Protection*®, 1993, vol. 56, n° 3, p. 265-269.

Pitt, J.I.; Hocking, A.; Bhudhasamai, K.; Miscamble, B.; Wheeler, K.; Tanboon-Ek, P. 1994. The normal mycoflora of commodities from Thailand. 2. Beans, rice, small grains and other commodities. *International Journal of Food Microbiology*, 1994, vol. 23, n° 1, p. 35-53.

Pitt, J.I.; Hocking, A.D. 1997. *Fungi and Food Spoilage*, 2nd ed. London: Blackie Academic & Professional. New South Wales, Australia.

Pitt, J.I.; Hocking, A.D.; Miscamble, B.F.; Dharmaputra, O.S.; Kuswanto, K.R.; Rahayu, E.S.; Dardjono. 1998. The mycoflora of food commodities from Indonesia. *Journal of Food Mycology*, 1998, vol. 1, p. 41-60.

Pitt, J.I.; Samson, R.A.; Frisvad, J. C. 2000. List of accepted species and their synonyms in the family Trichocomaceae. *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*, 2000, p. 9.

Pitt, J.I.; Hocking, A.D. 2002. *Fungi and food spoilage*. New York: Springer Science & Business Media. 519 p.

Pitt, J.I.; Hocking, A.D. 2009. *Fungi and Food Spoilage*. *Fungi and Food Spoilage: ISBN 978-0-387-92206-5*. Springer-Verlag US, 2009, 2009, vol. 1.

Polonelli, L.; Morace, G.; Rosa, R.; Castagnola, M.; Frisvad, J.C. 1987. Antigenic characterization of *Penicillium camemberti* and related common cheese contaminants. *Applied and environmental microbiology*, 1987, vol. 53, n° 4, p. 872-878.

Prabha, T.N.; Neelwarne, B.; Tharanathan, R.N. 1998. Carbohydrate changes in ripening *Capsicum annuum* in relation to textural degradation. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 1998, vol. 206, n° 2, p. 121-125.

Raper, K.B.; Fennell, D.I. The genus *Aspergillus*. *The genus Aspergillus.*, 1965, p. 686.

Rasooli, I; Abyaneh, M.R. 2004. Inhibitory effects of Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Food control*, 2004, vol. 15, n° 6, p. 479-483.

Rasooli, I.; Rezaei, M.B.; Allameh, A. 2006. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-porlock*. *Food Control*, 2006, vol. 17, n° 5, p. 359-364.

Reglamento Sanitario de Alimentos para la República Dominicana. 2009. [En línea]. <http://otcasea.gob.do/wp-content/uploads/2009/06/propuesta-regl-sanitario-alimentos-rd.pdf>. Consulta julio 2014.

Reglamento (EU) N° 165/2010 de la Comisión de 26 de febrero de 2010 que modifica, en lo que respecta a las aflatoxinas, el Reglamento (CE) N° 1881/2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios, 27.2.2010 (2010).

Romero, S.M.; Comerio, R.M.; Larumbe, G.; Ritieni, A.; Vaamonde, G.; Fernández Pinto, V. 2005. Toxigenic fungi isolated from dried vine fruits in Argentina. *International journal of food microbiology*, 2005, vol. 104, n° 1, p. 43-49.

Salari, R.; Habibi Najafi, M.; Boroushaki, M.T.; Ali Mortazavi, S.; Fathi Najafi, M. 2012. Assessment of the Microbiological Quality and Mycotoxin Contamination of Iranian Red Pepper Spice. *Journal of Agriculture Science and Technology*, 2012, Vol. 14, p. 1511-1521.

Sales, A.C.; Yoshizawa, T. 2005. Mold counts and *Aspergillus* section *Flavi* populations in rice and its by-products from the Philippines. *Journal of Food Protection*®, 2005, vol. 68, n° 1, p. 120-125.

Samson, R.A.; Peterson, S.W.; Frisvad, J.C.; Varga, J. 2011. New species in *Aspergillus* section *Terrei*. *Studies in mycology*, 2011, vol. 69, p. 39-55.

Samson, R.A.; Varga, J.; Meijer, M.; Frisvad, J.C. 2011. New taxa in *Aspergillus* section *Usti*. *Studies in Mycology*, 2011, vol. 69, p. 81-97.

Samson, R.A.; Hoekstra, E.S.; Frisvad, J.C.; Filtenborg, O. 2002. Introduction to food- and airborne fungi. En *Introduction to food-and airborne fungi*. Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, 2002. 389 p. Ilus.

Samson, R.A.; Frisvad, J.C. 2004. *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes and mycotoxins and other extrolites. *Studies in mycology*, 2004, vol. 49.

Samson, R.A.; Visagie, C.M.; Houbraken, J.; Hong, S.-B.; Hubka, V.; Klaassen, C.H.W.; Perrone, G.; Seifert, K.A.; Susca, A.; Tanney, J.B.; Varga, J.; Kocsubé, S.; Szigeti, G.; Yaguchi, T.; Frisvad, J.C. 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in mycology*, 2014, vol. 78, p. 141-173.

Santos, L.; Marín, S.; Sanchis, V.; Ramos, A.J. 2008. Capsicum and Mycotoxin Contamination: State of the Art in a Global Context. 2008, Vol. 14, 1, p. 5-20.

Santos, L.; Marín, S.; Matero, E.M.; Gil-Serna, J.; Valle-Algarra, F.M.; Patiño, B.; Ramos, A.J. 2011. Mycobiota and co-occurrence of mycotoxins in *Capsicum* powder. 2011, Vol. 151, p. 270–276.

Sawinsky, J.; Halász, A.; Hornok, L. 1988. Propagation of some *Fusarium* strains and study of their zearalenone production on ground paprika. *Acta Alimentaria*, 1988, vol. 17, n° 4, p. 309-317.

Scallan, E.; Hoekstra, R.M.; Angulo, F.J.; Tauxe, R.V.; Widdowson, M-A.; Roy, S.L.; Jones, J.L.; Griffin, P.M. 2011. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerg Infect Dis*, 2011, vol. 17, n° 7.

Schweiggert, U.; Mix, K.; Schieber, A.; Carle, R. 2005. An innovative process for the production of spices through immediate thermal treatment of the plant material. 2005, Vol. 6, p. 143 – 153.

Sepúlveda O.C.; Piontelli L., E. 2005. Poblaciones de *Aspergillus* en semillas de maíz y soja de importación Argentina: énfasis en la sección Flavi. *Bol. micol*, 2005, vol. 20, p. 41-55.

Shundo, L.; Almeida, A.P. de; Alaburda, J.; Lamardo, L.C.A.; Navas, S.A.; Ruvieri, V.; Sabino, M. 2009. Aflatoxins and ochratoxin A in Brazilian paprika. *Food Control*, 2009, vol. 20, n° 12, p. 1099-1102.

Simmons, E.G.; Roberts, R.G. 1993. *Alternaria* themes and variations (73). *Mycotaxon*, 1993, vol. 48, p. 109-140.

Simmons, E.G. 2007. *Alternaria, An Identification Manual. Utrecht: CBS Fungal Biodiversity Centre, 775 p. ISBN 978-90-70351-68-7. [http://dx. doi. org/10.1016/j.mycres.2008.06.012](http://dx.doi.org/10.1016/j.mycres.2008.06.012), 2007.*

Smith, J.E.; Lewis, C.; Anderson, J.C.; Salomons, G.L. 1994. *Mycotoxins in human nutrition and health*. [ed.] European Commission. 1994. pág. 300.

Singh, G.; Maurya, S.; Lampasona, M.P. de; Catalán, C.A. 2007. A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils,

oleoresins and their constituents. *Food and Chemical Toxicology*, 2007, vol. 45, n° 9, p. 1650-1661.

Snowdon, A.L. 1991. A Colour Atlas of Post-harvest Diseases and Disorders of Fruits Vegetables. Vol. 2. Vegetables. London: Wolfe Scientific.

Snowdon, A.L. 2010. *Post-Harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables: Volume 1: General Introduction and Fruits*. CRC Press.

Sonjak, Silva; Frisvad, Jens Christian; Gunde-Cimerman, Nina. 2005. Comparison of secondary metabolite production by *Penicillium crustosum* strains, isolated from Arctic and other various ecological niches. *FEMS microbiology ecology*, 2005, vol. 53, n° 1, p. 51-60.

Souza, E.L.de; Oliveira Lima, E.de; Luna Freire, K.R.de; Sousa, C.P.de. 2005. Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of various moulds isolated from foods. *Brazilian archives of Biology and Technology*, 2005, vol. 48, n° 2, p. 245-250.

Speijers, G.J.A.; Speijers, M.H. 2004. Combined toxic effects of mycotoxins. *Toxicology letters*, 2004, vol. 153, n° 1, p. 91-98.

Stoloff, Leonard. 1977. Aflatoxins an overview. *Mycotoxins in human and Animal Health*, 1977, pp. 7-28.

Suárez-Quiroz, M.; De Louise, B.; Gonzalez-Rios, O.; Barel, M.; Guyot, B.; Schorr-Galindo, S.; Guiraud, J-P. 2005. The impact of roasting on the ochratoxin A content of coffee. *International journal of food science & technology*, 2005, vol. 40, n° 6, p. 605-611.

Tancinová, D.; Rybárik, E.; Mašková, Z.; Barboráková, Z.; Felšöciová, S. 2014. Species of genus *Aspergillus* on grape Slovak origin. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2014, vol. 3, p. 291.

Téren, J.; Palágyi, A.; Varga, J. 1997. Isolation of ochratoxin producing *Aspergilli* from green coffee beans of different origin. *Cereal Research Communications*, 1997, p. 303-304.

The American Spice Trade Association (ASTA). 2011. Clean, Safe Spices: guidance from the American Spice Trade Association. Washington, D.C. <<http://www.astaspice.org/food-safety/clean-safe-spices-guidance-document>> Consultada el 02/04/2015.

Tsubouchi, H.; Terada, H.; Yamamoto, K.; Hisada, K.; Sakabe, Y. 1985. Caffeine degradation and increased ochratoxin A production by toxigenic strains of *Aspergillus*

ochraceus isolated from green coffee beans. *Mycopathologia*, 1985, vol. 90, n° 3, p. 181-186.

Urbano, G. R.; Taniwaki, M. H.; Leitão, M. F. de F; Vicentini, M. C. 2001. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in raw Brazilian coffee. *Journal of Food Protection*®, 2001, vol. 64, n° 8, p. 1226-1230.

Uriburu, M.L.; De la Fuente, J.; Palemo, J.; Gil, R.R.; Sosa, V.E. 2004. Constituents of two *Flourensia* species. *Phytochemistry*, 2004, vol. 65, n° 14, p. 2039-2043.

Uriburu, M.L.; Gil, R.R.; Sosa, V.E.; De la Fuente, J.R. 2007. Prenylflavonoids from *Flourensia fiebrigii*. *Phytochemistry*, 2007, vol. 68, n° 9, p. 1295-1299.

Vaamonde, G.; Patriarca, A.; Fernández Pinto, V.; Comerio, R.; Degrossi, C. 2003. Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* section *flavi* from different substrates in Argentina. *International journal of food microbiology*, 2003, vol. 88, n° 1, p. 79-84.

Valero, A.; Sanchis, V.; Ramos, A.J.; Marin, S. 2007. Studies on the interaction between grape-associated filamentous fungi on a synthetic medium. *International journal of food microbiology*, 2007, vol. 113, n° 3, p. 271-276.

Vij, V.; Ailes, E.; Wolyniak, C.; Angulo, F.J.; Klontz, K.C. 2006. Recalls of spices due to bacterial contamination monitored by the US Food and Drug Administration: the predominance of *Salmonellae*. *Journal of Food Protection*®, 2006, vol. 69, n° 1, p. 233-237.

Vilela, G.R.; de Almeida, G.S.; D'Arce, M.A.B.R.; Moraes, M.H.D.; Brito, J.O.; da Silva, M.F.das G.F.; Silva, S.C.; de Stefano Piedade, S.M.; Calori-Domingues, M.A.; da Gloria, E.M. 2009. Activity of essential oil and its major compound, 1, 8-cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare. *Journal of Stored Products Research*, 2009, vol. 45, n° 2, p. 108-111.

Vilmorín Díaz, F. de. 1977. *El Cultivo del Pimiento Dulce tipo bell*. México. Editorial Diana.

Visagie, C.M.; Houbraken, J.; Frisvad J.C.; Hong, S.-B.; Klaassen, C.H.W.; Perrone, G.; Seifert, K.A.; Varga, J.; Yaguchi, T.; Samson, R.A. 2014. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in mycology*, 2014, vol. 78, p. 343-371.

Williams, J.H.; Phillips, T.D.; Jolly, P.E.; Stiles, J.K.; Jolly, C.M.; Aggarwal, D. 2004. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential

health consequences, and interventions. *The American journal of clinical nutrition*, 2004, vol. 80, n° 5, p. 1106-1122.

Zinedine, A.; Brera, C.; Elakhdari, S.; Catano, C.; Debegnach, F.; Angelini, S.; De Santis, B.; Faid, M.; Benlemlih, M.; Minardi, V.; Miraglia, M. 2006. Natural occurrence of mycotoxins in cereals and spices commercialized in Morocco. 2006, Vol. 17, 11, p. 868-874.

Zinedine, A.; Jordi, M. 2009. Occurrence and legislation of mycotoxins in food and feed from Morocco. 2009, Vol. 20, p. 334-344.

Zweifel, C.; Stephan, R. 2012. Spices and herbs as source of *Salmonella*-related foodborne diseases. *Food Research International*, 2012, vol. 45, n° 2, p. 765-769.

