

ROXANA VIEIRA ARAÚJO ALHADAS

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA EM FUBÁ  
DE MILHO ATRAVÉS DA CONTAGEM DE BOLORES E  
LEVEDURAS E IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS  
POTENCIALMENTE MICOTOXIGÊNICOS**

Monografia apresentada ao Curso de  
Ciências Biológicas da Universidade  
Federal do Paraná para obtenção do grau  
de Bacharel.

Orientadoras: Ida Chapaval Pimentel  
Márcia Regina Beux

CURITIBA  
2003

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos do CEPPA (Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos), por terem cedido o material para a realização deste trabalho. À professora Márcia pela orientação. À Anelise, Fabiana, Janaína e Vavá do laboratório de Microbiologia de Alimentos pela amizade, o carinho, e também por tudo que aprendi nesses meses de convivência. À, Beatriz e pelos momentos de descontração. À Tuca, D. Maria e D. Glória do Preparo de Meios de Cultura por terem feito com que eu me sentisse em casa.

À professora Idinha que sempre esteve além da orientação profissional.

E às pessoas que foram especialmente fundamentais na fase de elaboração e conclusão deste trabalho: Rodriguinho pelas lâminas e pela ajuda nas identificações. Daniel por dedicar um pouco do seu tempo na formatação e montagem das figuras (ficaram super chiques!) e Mariana pela ajuda no Excel.

Aos meus pais pelo suporte: Milton R. Alhadas e Celita Alhadas.

Ao meu irmão Júnior pela companhia e por agüentar os dias de mau humor;

À minha irmã Fabíola por me dar a Juju e a Aninha.

E ao João Gabriel mais do que obrigada eu peço desculpa pelos momentos de ausência.

Às grandes amigas que fiz: Wendy Bishop, Mariana Viana, Letizia Sung, Claudia Nogata, Flavia Sejas, Taysa Bedak e Franciane Correa e Naiana.

Às pessoas que por alguma boa razão cruzaram meu caminho nos anos que passei dentro da Universidade: Letícia Castro, Raphael Rolim, L. Felipe Araújo, Tâmile, Fabio Siqueira, Edílson, Renato Bacchi, Diogo Kita, Cláudio (Peru), Tiago Monteiro, Gustavo, Fernando Matsuno, Gui Maclaren, Rafael Etto, Liana Rodrigues, Igor, Suzana, Kleiton Machado, Priscila Bybyk, Naligia, Simone, Carlinha, Carol Calixto, Dani Forconi, Juzona e Julianny Bitencourt.

Às pessoas que moram no meu coração: Letícia Costa, Thiago Lehmann, Marcello Console, Dalton, Leonardo, Jairo, Daves, Ricardo Volpe, Veridiana Almeida Larissa Donatoni, Ianara, Renato e Moises Chus.

## RESUMO

Os fungos como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Alternaria* têm a capacidade de produzir micotoxinas em alimentos, apresentando assim, um risco potencial à saúde de seus consumidores.

O milho como outros cereais, está sujeito à contaminação por microrganismos, sendo o fubá resultado do processamento deste cereal, podemos supor que este também seja passível de contaminação durante a moagem, a embalagem ou até mesmo no armazenamento do produto. A importância deste tipo de análise está no melhoramento da qualidade deste alimento já que é um produto consumido por crianças da rede pública de ensino e também pela população de baixa renda.

Assim, este trabalho teve como objetivo analisar a qualidade microbiológica de cinco marcas de fubá de milho encontradas nos supermercados de Curitiba, através da quantificação e identificação de fungos potencialmente micotoxigênicos pelo método de plaqueamento em superfície, utilizando-se o meio Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol. Todas as amostras analisadas apresentaram contaminação, sendo elas: **N** (73,0% de *Aspergillus* sp.), **M** (20,7% de *Aspergillus* sp. e 2,0% de *Penicillium* sp), **Y** (16,0% de *Aspergillus* sp. e 0,62% de *Penicillium* sp.), **P** (8,5% de *Aspergillus* sp. e 4,3% de *Penicillium* sp.), **S** (2,0% de *Aspergillus* sp. e 3,1% *Penicillium* sp). A contagem total de bolores e leveduras revelou que três das cinco amostras apresentaram contagem superior ao estabelecido pela Portaria 451 de 19/09 de 1997 do Ministério da Saúde, e foram encontrados fungos produtores de micotoxinas em todas as amostras.

Palavras-chave: Fungos, micotoxinas, fubá de milho.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	I
RESUMO .....	II
1 INTRODUÇÃO.....	3
2 OBJETIVO.....	6
2.1 Objetivo Geral.....	6
2.2 Objetivos Específicos.....	6
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	7
3.1 O Fubá de Milho .....	7
3.3 Bolores .....	8
3.4 Micotoxinas.....	11
3.5 <i>Aspergillus</i> sp. ....	14
3.6 <i>Penicillium</i> sp. ....	15
3.7 <i>Rhizopus</i> sp. ....	16
3.8 <i>Acremonium</i> sp. ....	17
3.9 <i>Cladosporium</i> sp. ....	17
3.10 <i>Cunninghamella</i> sp.....	18
3.11 <i>Paecilomyces</i> sp. ....	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1 Material para Pesagem:.....	20
4.2 Material para Semeadura.....	20
4.3. Material para Assepsia .....	21

<b>4.4. Meios de Cultura (DIFCO MANUAL, 1994)</b> .....	<b>21</b>
4.4.1 Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC) .....	21
4.4.2. Ágar Batata Dextrosado .....	21
<b>4.5. Clarificante (CRUZ, 1981)</b> .....	<b>22</b>
4.5.1. Lactofenol de Amann .....	22
<b>4.6. Corante</b> .....	<b>22</b>
4.6.1. Lactofenol Azul-de-Algodão .....	22
<b>5. MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
<b>5.1. Coleta das Amostras</b> .....	<b>23</b>
<b>5.2. Preparo das Amostras</b> .....	<b>23</b>
<b>5.3. Semeadura das Amostras</b> .....	<b>25</b>
<b>5.4. Isolamento das Colônias</b> .....	<b>27</b>
5.4.1. Isolamento dos Fungos Filamentosos .....	28
<b>5.5. Identificação das Colônias</b> .....	<b>29</b>
5.5.1. Microcultivo.....	29
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>31</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	<b>52</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>53</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Subprodutos de cereais constituem uma importante fonte de alimentos em todo o mundo, incluindo o fubá de milho, que é usado na formulação e fabricação de outros gêneros alimentícios.

Muitos microrganismos podem proliferar nos grãos ou nos produtos finais estocados em condições inadequadas, causando desperdício de alimentos. No período pós-colheita e durante o transporte e armazenamento de produtos agrícolas, o crescimento fúngico pode ser influenciado por muitos fatores, principalmente nível de umidade, temperatura, aeração, danos provocados por insetos, e tempo de armazenamento, entre outros.

Como a atividade de água dos grãos é baixa, mesmo o alto teor de proteínas e carboidratos não é suficiente para permitir o bom crescimento bacteriano. No entanto quando não há favorecimento do crescimento de bactérias do gênero *Bacillus*, os bolores são os primeiros a se desenvolverem (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

Assim, a presença de fungos filamentosos e leveduras viáveis em índices elevados nos alimentos, pode fornecer várias informações, tais como, condições higiênicas deficientes em equipamentos; multiplicação no produto em decorrência de falhas no processamento e/ou estocagem; matéria prima com contaminação excessiva (SILVA, 1998).

Os maiores efeitos do desenvolvimento fúngico em grãos e sementes armazenados são perda do poder germinativo, perda de matéria seca, produção de micotoxinas e alteração do valor nutricional (LAZZARI, 1997).

O principal grupo de fungos, de conhecida capacidade para produzir micotoxinas, inclui espécies de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps*, *Alternaria*, *Pithomyces* e *Stachybotrys*. Sendo os três primeiros os gêneros dominantes.(PELCZAR, et al., 1996).

Estudos em animais mostram que micotoxinas podem trazer sérios riscos à saúde humana. A aflatoxicose leva à inibição mitótica, imunodepressão, carcinogênese e defeitos congênitos. O órgão mais afetado é o fígado, que leva a alterações na absorção de lipídios. O fígado passa a apresentar-se pálido, amarelo, friável, com aspecto gorduroso e pequenas áreas hemorrágicas. A aflatoxina também interfere na absorção de proteínas, vitaminas e minerais devido ao comprometimento de diversos sistemas enzimáticos.

O efeito que a aflatoxinas pode causar em crianças depende do seu estado nutricional e a frequência de ingestão. As principais conseqüências são o aumento da suscetibilidade neonatal à infecções e icterícia; aumento da suscetibilidade de crianças à neoplasias e compromete a resposta imunológica e imunizações profiláticas.

A toxidade da esterigmatocistina é hepática e renal capaz de produzir lesões em ratos e macacos semelhantes às provocadas pela aflatoxina B1. Seus efeitos principais são: proliferação dos ductos biliares, pleomorfismo nuclear, necrose renal, hemorragia e necrose hepática.

Foi estabelecida a ligação entre ocratoxina e danos aos rins e tem potencial carcinogênico.

A esterigmatocistina é hepatocarcinogênica, em ratos produz sarcomas no local de ingestão e neoplasias hepáticas quando assimiladas por sonda estomacal.

Em macacos, dose de 20 mg/Kg por 14 dias a vários meses desenvolve hepatite crônica, hiperplasia e cirrose hepática (LAZZARI, 1997).

A rubratoxina provoca doenças hemorrágicas em animais .

A citrinina é uma micotoxina nefrotóxica como a ocratoxina e causa lesões em muitas espécies de animais. Animais que consomem alimentos contaminados com essas toxinas apresentam diarreia, aumento no consumo de água, poliúria, aumento no tamanho dos rins e nefrose (GIL et al., 1996). A ingestão de citreoviridina em animais, causa convulsões, paralisia dos membros traseiros, vômitos, problemas respiratórios e cardiovasculares (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

A citrinina é uma micotoxina nefrotóxica como a ocratoxina e causa lesões em muitas espécies de animais. Animais que consomem alimentos contaminados com essas toxinas apresentam diarreia, aumento no consumo de água, poliúria, aumento no tamanho dos rins e nefrose (GIL et al., 1996). A ingestão de citreoviridina em animais, causa convulsões, paralisia dos membros traseiros, vômitos, problemas respiratórios e cardiovasculares (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 Objetivo Geral**

Isolamento de fungos potencialmente produtores de micotoxinas em fubá de milho.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Contagem e identificação dos gêneros mais recorrentes potencialmente micotoxigênicos em fubá de milho.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 O Fubá de Milho

O milho (*Zea mays* L.), da família Poaceae, é original das Américas e constitui uma importante cultura agrícola brasileira. Os grãos do milho são muito nutritivos, com uma elevada proporção de carboidratos, gorduras e proteínas digestíveis, industrializado para fins alimentícios, fornece o fubá, a canjica, a canjiquinha e a maisena.

O fubá é produzido pela moagem dos grãos de milho desgerminados (desprovidos da casca e do germe), para que a fração lipídica presente seja eliminada, proporcionando um tempo de conservação maior ao produto.

Este alimento é muito utilizado na merenda escolar (como polenta) e a sua presença na cesta básica, o que significa que a grande maioria da população brasileira usa este produto na sua alimentação.

### 3.2 Leveduras

As leveduras são fungos que se apresentam predominantemente sob a forma unicelular, crescem e reproduzem-se mais rapidamente que os bolores, não realizam fotossíntese e possuem uma parede celular rígida (PELCZAR et al., 1996).

As leveduras têm estado a serviço do homem durante muitos séculos, fermentando os sucos de frutas, levedando o pão e fabricando produtos. Algumas espécies de leveduras, contudo, podem causar doenças nos vegetais e animais, outras decompõem alimentos e, ainda, deteriorar tecidos e outros materiais (PELCZAR et al., 1996).

### 3.3 Bolores

Os fungos são microrganismos eucarióticos quimiorganotróficos. Reproduzem-se, naturalmente, por meio de esporos, com poucas exceções. Os fungos não têm clorofila, e em geral são filamentosos, mas podem ser muitas vezes ramificados. Os filamentos apresentam paredes celulares constituídas por quitina ou celulose (PELCZAR et al., 1996).

O talo de um fungo é tipicamente composto por filamentos microscópios, chamados hifas. O conjunto de hifas recebe a denominação de micélios (PELCZAR et al., 1996).

As hifas que estão subdivididas em células individuais por paredes transversais ou septos são denominadas septadas; as que não possuem parede são denominadas não septadas (KONEMAN et al.,2001).

A porção do micélio que penetra no substrato e é responsável pela absorção de água de nutrientes é o micélio vegetativo; a porção projetada acima do substrato é o micélio aéreo, também denominado micélio reprodutivo, porque a partir dessa porção são originados os corpos de frutificação portadores dos conídios (KONEMAN et al.,2001).

Alimentos armazenados são um campo excelente para a proliferação de fungos, principalmente em países onde os princípios básicos de secagem adequada e armazenamento correto, ainda são desconhecidos ou desprezados. Desenvolvendo-se sobre sementes podem causar perda do seu poder germinativo; podem afetar a qualidade por descoloração, por produzir aromas desagradáveis. Podem também diminuir o valor nutritivo das proteínas, além de prejudicar seriamente seu aspecto externo.

Os bolores revelam notável capacidade de adaptação e crescimento sob condições extremamente variáveis como a umidade e temperatura (o intervalo ótimo se situa entre 25 °C a 30 °C, mas muitas espécies desenvolvem-se em temperaturas de refrigeração a 4 °C a 5 °C ou mesmo abaixo de 0 °C), mas outros fatores podem interferir, como pH (são capazes de desenvolver em alimento no intervalo de 2,0 a 8,5, embora o ótimo se situe na faixa de 4,5 a 5,0), taxa de oxigenação, período de armazenamento, grau de contaminação, condições físicas dos grãos e infecções por

insetos entre outros (LAZZARI, 1997).

Os fungos filamentosos são distribuídos em 4 classes: Zigomicetos, Ascomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos. Dentre os Zigomicetos três gêneros são de importância para alimentos: *Mucor*, *Rhizopus* e *Thamnidium*, nos Deuteromicetos os gêneros: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cladosporium*, nos Ascomicetos o gênero *Byssochlamys* e finalmente na classe dos Basidiomicetos não há nenhuma espécie de importância microbiológica para alimentos.

### 3.4 Micotoxinas

Micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos de algumas espécies de fungos, capazes de produzir efeitos tóxicos em animais e no homem, dependendo dos níveis de consumo. O termo é derivado da palavra grega "Mykes" que significa fungo e "Toxicum" que significa veneno ou toxina (BULLERMAN, 1979).

A ingestão de micotoxinas pode levar animais e o homem a quadros de intoxicação aguda ou crônica. A condição patológica resultante desta ingestão é chamada micotoxicose (SHARMA e SALUMKHE, 1991). A produção de micotoxinas está ligada ao crescimento do fungo; sem o crescimento geralmente a produção não ocorre. Entretanto, a presença do fungo produtor não indica a presença da micotoxina, especialmente se o crescimento não ocorrer. Portanto, o entendimento dos fatores que permitem o crescimento do fungo e a produção de micotoxinas é de grande importância para o desenvolvimento de métodos de controle (BULLERMAN et al., 1984).

Alguns fatores que influenciam a produção de micotoxinas, principalmente por espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* são: composição do substrato, temperatura, teor de água, umidade relativa do ar, atividade de água, pH, atmosfera, competição microbiana, danos causados por insetos, linhagem do fungo contaminante e estresse da planta (BULLERMAN et al., 1984), sendo que a temperatura, a umidade e o tipo de substrato são os mais importantes (MALLOZZI e CORRÊA, 1998).

Todo microrganismo, incluindo os fungos toxigênicos, possuem uma atividade de água e temperatura máxima, ótima e mínima para o crescimento, sendo estes valores

normalmente diferentes para produção de toxina (BULLERMAN et al., 1984). Por exemplo, *Aspergillus flavus* requer uma atividade de água mínima entre 0,78 e 0,80 para o crescimento e 0,83 a 0,87 para produção de toxina (BULLERMAN et al., 1984; MALLOZZI e CORRÊA, 1998), podendo crescer em faixa de temperatura entre 6 °C a 45 °C, mas com ótimo de 30 °C para produção de aflatoxina. Portanto, o simples isolamento e confirmação de fungos micotoxigênicos em alimentos não indicam a presença de micotoxinas (HUSSEIN e BRASEL, 2001), pois tanto o crescimento do fungo como a produção de micotoxinas são dependentes de vários fatores, sendo os limites para a produção normalmente mais estreitos que para o crescimento (FRISVAD & SANSON, 1992).

O homem e animais podem entrar em contato com micotoxinas diretamente através da ingestão de alimento contaminado, ou indiretamente através do consumo de produtos de origem animal, como por exemplo, leite, ovos e carnes (OGA, 1996). A relação entre micotoxinas e a saúde humana é difícil de ser determinada, pois não há evidências diretas do envolvimento, tais como experimentos controlados; há somente dados epidemiológicos e estudos em animais de experimentação (BULLERMAN, 1979).

Não há dúvida sobre o perigo potencial da presença de micotoxinas em alimentos, entretanto, pela dificuldade de sua total eliminação da dieta, como primeiro passo é feita uma avaliação de risco e estimada uma média de consumo diário (MOSS, 1996).

O Brasil possui legislação apenas para regular aflatoxinas, sendo o limite máximo permitido em alimentos regulamentado pelo Ministério da Saúde, resolução

34/76, estabelecendo em 30 ppb a presença de aflatoxinas B1 e G1 e pelo Ministério da Agricultura, resolução 183 de 21/03/96, estabelecendo em 20 ppb a soma das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, sendo que esta portaria internalizou as normas do MERCOSUL, GMC/RES/56/94. Ainda pela resolução 7 de 9/11/88, o Ministério da Agricultura estabeleceu que, para qualquer matéria prima a ser utilizada direta ou indiretamente em rações destinadas ao consumo animal, o limite máximo de aflatoxinas é de 50 ppb. A Tabela 1 mostra os principais toxinas produzidas por fungos e os alimentos em que são mais comumente encontrados.

TABELA 1 - TOXINAS PRODUZIDAS POR FUNGOS

Micotoxina	Fonte	Alimento
Aflatoxinas B e G	<i>Aspergillus</i>	amendoim, <b>milho</b> , outros cereais
Aflatoxinas M	Metabólito das aflatoxinas	leite
Fumonisinias	<i>Fusarium</i>	<b>milho</b> e outros cereais
AAL toxinas	<i>Alternaria alternata</i>	tomate
Tricotecenos	<i>Fusarium, Myrothecium</i>	<b>milho</b> e outros cereais
Zearalenonas	<i>Fusarium</i>	<b>milho</b> e outros cereais
Citreoviridina	<i>Penicillium citreoviride</i>	arroz
Ocratoxinas	<i>Aspergillus, Penicillium</i>	<b>milho</b> e outros cereais
Esterigmatocistina	<i>Aspergillus versicolor</i>	<b>milho</b>
Ácido penicílico	<i>Penicillium cyclopium</i>	cereais
Patulim	<i>Penicillium</i>	maçã
Ácido 3-nitropropionico	<i>Arthrinium sp</i>	cana de açúcar
Ergot	<i>Claviceps, Penicillium, Aspergillus, Rhizopus</i>	cerais (arroz)

Fonte: [http:// www.micotoxinas.com.br](http://www.micotoxinas.com.br)

### 3.5 *Aspergillus* sp.

Os *Aspergillus* constituem um grupo de fungos filamentosos hialinos de crescimento rápido que usualmente produzem infecções oportunistas em humanos. Das quase 700 espécies de *Aspergillus* descritas por Rapper e Fennel apenas 19 foram descritas como causadoras de infecções humanas (KONEMAN et al.,2001).

Os conídios são amplamente distribuídos no solo, vegetais em decomposição e em uma variedade de matérias orgânicas (KONEMAN et al.,2001).

Microscopicamente, produzem micélios septados e ramificados, com porções vegetativas submersas no nutriente (PELCZAR et al.,1996). Os conidióforos são relativamente longos, as vesículas são claviformes, e a metade superior é recoberta por uma única fileira de fiálides, das quais partem longas cadeias de conídios esféricos ou ligeiramente ovais que tendem a curvar-se em direção ao eixo central (KONEMAN et al.,2001). Esses conídios podem apresentar várias cores e são características da espécie; e as cores mais comuns são o negro, o marrom e o verde (PELCZAR et al., 1996).

Os aspergilos crescem na presença de altas concentrações de açúcar e de sal, indicando que podem extrair água de substâncias relativamente secas (ROITMAN et al., 1987)

As micotoxicoses causadas por *Aspergillus* sp são as aflatoxinas, ocratoxinas, esterigmatocistina.

### 3.6 *Penicillium* sp.

Os membros deste grupo, também Deuteromycetes, ocorrem amplamente na natureza. Algumas espécies causam apodrecimento ou deterioração de frutas, vegetais, conservas, grãos e pastos, outras são usadas em fermentações industriais e há uma espécie que produz um dos antibióticos mais conhecidos, a penicilina (PELCZAR et al, 1996).

Os fungos deste gênero estão intimamente relacionadas com os do gênero *Aspergillus*, alguns se reproduzem pela formação de ascósporos (LACAZ et al., 1970) e apresentam micélio vegetativo septado que penetram no substrato, produzindo hifas aéreas nas quais se desenvolvem conidióforos. Estes podem ser ramificados e apresentam cabeças em escova, que carregam os esporos. Agrupamentos de esterigmas, usualmente numa posição, formam, a partir de cada um, uma cadeia de conídios. A coloração das colônias maduras é útil na identificação das espécies, que crescem melhor em temperaturas de 15 a 30 °C (PELCZAR et al., 1996).

As Micotoxicoses por *Penicillium* sp são Rubratoxina, Patulina a Citrinina e Citreoviridina

### 3.7 *Rhizopus* sp.

É um tipo de fungo facilmente encontrado no solo, esterco e matéria vegetal. A contaminação no homem pode ser dada pela inalação de esporos transportados pelo ar ou por ingestão de alimentos contaminados. A tendência de invadir vasos sanguíneos pode causar doenças disseminadas e a formação de focos metastáticos em muitos órgãos.

Sua colônia apresenta um rápido crescimento, formando uma colônia algodonosa ou lanosa branco-acinzentada, marrom ou marrom-acinzentada, sem borda definida. À medida que a colônia envelhece, o micélio pode escurecer e adotar o aspecto de pimenta negra, devido à formação de miríades de esporângios (Figura 4).

Microscopicamente, as características distintivas são a presença de hifas largas não septadas (ocasionalmente podem ser observados septos nos cultivos velhos, particularmente nas porções terminais dos esporângióforos), com produção de esporângiosporos no interior dos esporângios. Os esporângios são originados na extremidade de esporângióforos que normalmente são únicos nas espécies de *Rhizopus*, e terminam em uma estrutura denominada columela. Nas espécies de *Rhizopus*, as columelas normalmente colapsam quando maduras, adquirindo a forma de guarda-chuva curvado (KONEMAN et al.,2001).

A presença de estruturas similares às raízes, denominadas rizóides, é uma característica que facilita a identificação do gênero (KONEMAN et al.,2001).

### 3.8 *Acremonium* sp.

As colônias de *Acremonium* sp. têm um aspecto liso, devido à produção de um micélio muito delicado. As colônias podem ser brancas ou de laranja até tons de rosa de diferentes tons de verde-pastel ou amarelo (PITT, et al., 1997).

Os conidióforos das espécies de *Acremonium* são longos, delicados e não septados. Os conídios em cachos localizados nas extremidades dos conidióforos são elípticos (KONEMAN et al.,2001).

### 3.9 *Cladosporium* sp.

As colônias são cinza-escuras, marrons ou negras, de superfície lanosa, felpuda ou aveludada, com pigmentação negra no reverso (KONEMAN et al.,2001). *Cladosporium* sp podem causar feo-hifomicose que são infecções de origem cutânea, subcutânea e sistêmica produzida por fungos que se desenvolvem nos tecidos hospedeiros como elementos miceliares demácios septados, de parede escura (KONEMAN et al.,2001). Ao microscópio, são caracterizados por micélio amarelo-amarronzado escuro, formado por hifas uniformes com paredes paralelas e septos distintos. Os diversos gêneros e espécies são identificados com base em diferenças morfológicas dos corpos de frutificação e na formação de conídios (KONEMAN et al.,2001).

### 3.10 *Cunninghamella* sp.

As espécies de *Cunninghamella* são caracterizadas por possuir esporângióforos ramificados que terminam em uma vesícula esférica, em cuja superfície são formadas esporangíolas secundárias esféricas (esporângios delgados sem columela), unidas individualmente às vesículas por um delicado pedúnculo (KONEMAN, 2001).

Na placa de Petri as colônias têm uma coloração do branco ao bege com o reverso amarelo pálido. Os esporângióforos são longos e suportam uma vesícula solitária terminal e um verticilo irregular subterminal. Estas espécies não produzem micotoxinas, e são comumente associadas aos solos e à matéria em decomposição (PITT; ROCKING, 1997).

### 3.11 *Paecilomyces* sp.

São contaminantes do solo e matéria bruta comumente encontrados em cereais incluindo trigo e farinhas e cevada também ocorre em castanhas, feijão e carne congelada e salame. Há registros de ocorrências de espécies a 5 °C e à 40 °C. As colônias de *Paecilomyces* são muito similares às colônias de *Penicillium* na coloração, que possuem diversas tonalidades de verde pálido. Também encontramos colônias brancas e marrom-amareladas com o reverso claro (PITT; HOCKING, 1997).

As espécies de *Paecilomyces* também formam uma cabeça de ramificação ramificada “*simile-penicillius*”; entretanto, em contraste com as espécies de *Penicillium*,

as extremidades das fiálides são longas e afiladas. Como os conídios dos paecilomices têm formação basípeta, os conídios terminais, mais antigos, tendem a ser maiores e mais escuros do que os proximais (KONEMAN, 2001) e os conídios variam de cilíndricos a elipsoidais (PITT; HOCKING, 1997).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Material para Pesagem:

- Câmara asséptica;
- Bico de Bunsen;
- Balança;
- Becker;
- Colher;
- Tesoura;
- Saquinhos plásticos;
- Amostras ;

### 4.2 Material para Semeadura

- 60 placas de Petri com meio de cultura DRBC;
- Pipetas 10 mL;
- Pipetador 0,1 mL;
- Alça de Drigalski;
- Bico de Bunsen;
- 10 Frascos de diluição com água peptonada 225 mL;

- 20 Frascos de diluição com água peptonada 90 mL;
- Stomacher (homogeneizador).

#### 4.3. Material para Assepsia

- Álcool 70 °GI
- Gaze

#### 4.4. Meios de Cultura (DIFCO MANUAL, 1994)

##### 4.4.1 Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC)

Peptona	5,0g
Glicose	10,0g
Fosfato monopotássico	1,0g
Sulfato de magnésio	0,5g
Dicloran	0,002g
Rosa de bengala	0,025g
Cloranfenicol	0,001g
Ágar	15,0g
Água destilada	1,0L

##### 4.4.2. Ágar Batata Dextrosado

Infusão de batatas	200g
Dextrose	20g
Ágar	15g
Água destilada	1,0L

Neste meio de cultura foi adicionado ácido tartárico 10% antes do plaqueamento para que o pH da solução ficasse num intervalo entre 3,0-3,5. Todos os meios foram autoclavados à 1 atm por 20 minutos.

#### 4.5. Clarificante (CRUZ, 1981)

##### 4.5.1. Lactofenol de Amann

Ácido fênico	10g
Ácido láctico	10g
Glicerina	20g
Água destilada	10mL

#### 4.6. Corante

##### 4.6.1. Lactofenol Azul-de-Algodão

Ácido Láctico	20,0g
Cristais de Fenol	20,0g
Glicerina	20,0g
Azul de algodão (Methyl Blue Difco)	0,05g
Água Destilada	20,0g

Os cristais de fenol foram fundidos em banho-maria, os compostos foram adicionados. Aguardou-se 24 horas e filtrou-se.

## **5. MÉTODOS**

### 5.1. Coleta das Amostras

As amostras foram adquiridas nos estabelecimentos comerciais de Curitiba no mês de Agosto de 2003.

### 5.2. Preparo das Amostras

Antes de abrir as embalagens, a área foi desinfetada com etanol 70%, para remover os contaminantes presentes, usou-se também o etanol 70% para desinfetar a parte que foi aberta para pesagem.

Estes processos de abertura e pesagem devem foram feitos, preferencialmente no interior de câmaras de fluxo laminar, para prevenir qualquer contaminação ambiente da amostra. Todos os instrumentos e utensílios utilizados na abertura das embalagens e retirada das unidades analíticas (colheres e tesouras) foram previamente esterilizados em autoclave à 1 atm por 20 minutos.

Após a abertura das embalagens realizou-se a pesagem das amostras que foram identificadas com letras que eram as iniciais das marcas utilizadas nesta análise (Y, M, N, P e S). De cada amostra foram retiradas duas unidades analíticas de 25g identificadas com os números 1 e 2, perfazendo assim 10 sub-amostras. No prosseguimento da análise, a unidade analítica foi homogeneizada, para permitir diluição e inoculação nos meios de cultura (figura 3). A homogeneização foi precedida

de uma diluição inicial de 1:10 ( $10^{-1}$ ), adicionando-se às 25g de amostra, 225 mL de diluente, utilizando água peptonada 0,1% .

Para a preparação da segunda diluição ( $10^{-2}$ ), transferiu-se 1,0 mL da diluição  $10^1$  para 9,0 mL de água peptonada. As diluições subseqüentes foram obtidas de maneira similar, transferindo-se 1,0 mL da diluição anterior ( $10^{-2}$ ) para mais 9,0 mL de água peptonada 0,1%, obtendo-se assim uma diluição de  $10^{-3}$  (Figura 2).

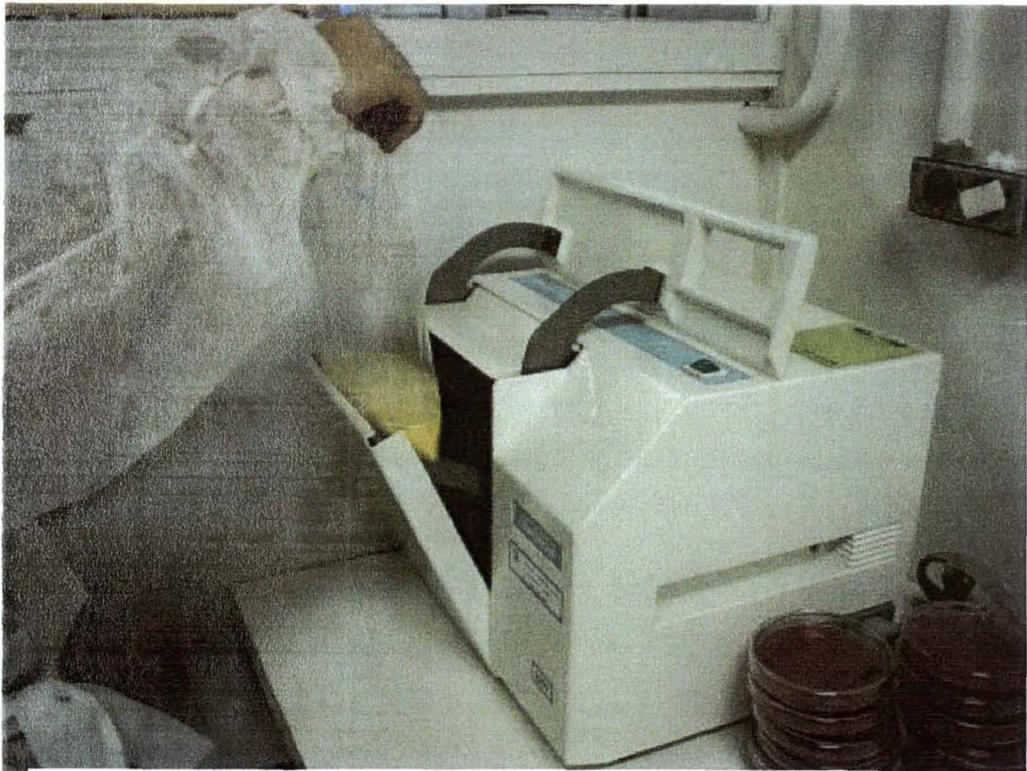
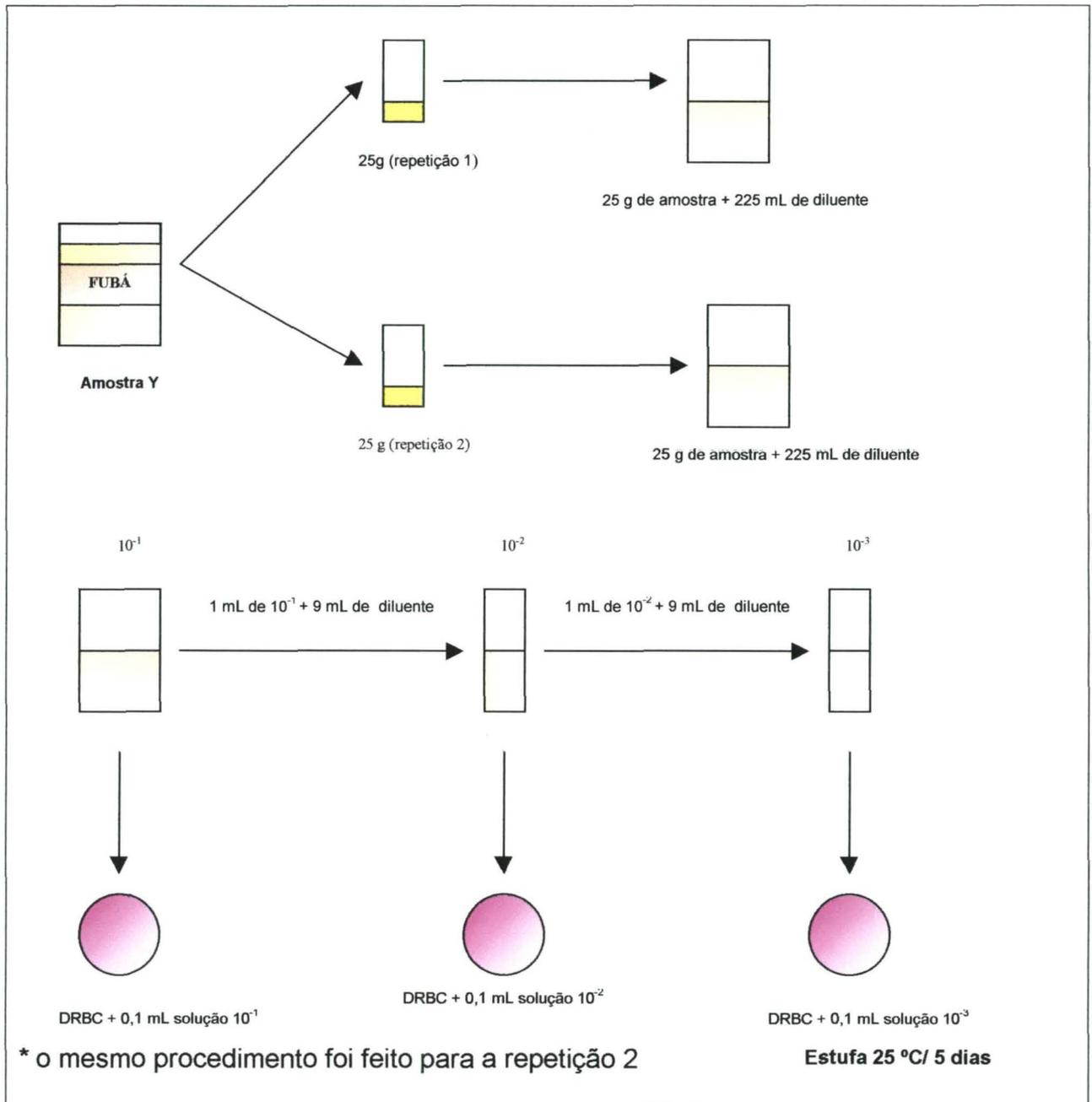


Figura 3:homogeneização no Stomacher



**FIGURA 2:** PROCEDIMENTO PARA PREPARO DAS SOLUÇÕES E SEMEADURA DAS DILUIÇÕES. DE CADA AMOSTRA FORAM RETIRADAS DUAS UNIDADES ANALÍTICAS DE 25G IDENTIFICADAS COM OS NÚMEROS 1 E 2, AS DILUIÇÕES FORAM FEITAS NA SEQÜÊNCIA DE 1:10 ( $10^{-1}$ ), ADICIONANDO-SE ÀS 25G DE AMOSTRA, 225 mL DE DILUENTE E A SEGUNDA DILUIÇÃO ( $10^{-2}$ ), TRANSFERINDO-SE 1,0 ML DA DILUIÇÃO  $10^{-1}$  PARA 9,0 ML DE ÁGUA PEPTONADA E ASSIM POR DIANTE.

Semeou-se 0,1 mL de cada diluição ( $10^{-1}$ ;  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ) em placas de Petri com meio Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC) e espalhou-se o inóculo por toda a superfície com auxílio da alça de Drigalski (Figura 4). Foi usado este meio de cultura com o objetivo de inibir o crescimento de bactérias, já que este meio é destinado ao crescimento de fungos e leveduras. O cloranfenicol presente no preparo deste meio é o antibiótico responsável pela inibição do crescimento destes microrganismos (JAY, 1994).

O Rosa de Bengala retarda o crescimento daqueles fungos que normalmente produzem micélio abundante, como *Neurospora* e *Rhizopus* (JAVIS, 1973). As placas foram incubadas em estufa a 25 °C por cinco dias.



Figura 4: Semeadura de 0,1 mL da diluição em placa de DRBC.

#### 5.4. Isolamento das Colônias

Após a incubação foi feita a contagem das colônias, que cresceram em cada uma das 60 placas em meio DRBC. Como as células microbianas muitas vezes ocorrem em agrupamentos, não é possível estabelecer uma relação direta entre número de colônias e o número de unidades formadoras de colônias (UFC), que podem ser tanto células individuais como agrupamentos característicos de certos microrganismos (ITAL, 1995).

Para cálculo do número de unidades formadoras de colônias (UFC), por g da amostra, divide-se o número de colônias pelo volume inoculado 0,1 mL multiplicado pela diluição das placas contadas ( $10^{-1}$ ;  $10^{-2}$  ou  $10^{-3}$ ) (MISLIVEC, 1992).

$$\text{UFC/g} = \frac{\text{número de colônias}}{0,1 \times \text{diluição}}$$

Foi considerado para contagem, somente as placas, da mesma diluição que apresentar de 15 a 150 colônias. Foi contado também separadamente o número de UFC de fungos e leveduras, auxiliando na interpretação dos resultados.

#### 5.4.1. Isolamento dos Fungos Filamentosos

O isolamento dos bolores encontrados nas placas em meio de cultura DRBC, foi feito primariamente a partir de características morfológicas macroscópicas das colônias, como sua forma, coloração e características do micélio.

Cada uma das diferentes colônias encontradas foi isolada em Meio Ágar Batata Dextrose (BDA) em tubos, com o auxílio de alças de inoculação esterilizadas. Esses tubos foram então incubados a 25 °C, por mais 5 dias.

Os fungos filamentosos foram posteriormente repicados dos tubos para placas também com meio BDA, para que a caracterização da colônia (figura 5).



Figura 5: Tubos de BDA com colônias isoladas após 5 dias de incubação a 25°C

## 5.5. Identificação das Colônias

Para cada uma das colônias isoladas foi preparado um microcultivo (Figura 6), técnica esta que permite que estruturas reprodutivas, esporos e disposições dos micélios permaneçam conservadas para sua visualização ao microscópio (KERN & BLEVIS, 1999).

### 5.5.1. Microcultivo

- 1 – Colocar sobre uma placa de Petri, estruturas de vidro em forma de “U” que servirá como apoio para a lâmina;
- 2 – Sobre a lâmina, colocar 2 blocos de ágar batata dextrose, um em cada extremidade da lâmina;
- 3 – Colocar um chumaço de algodão na placa;
- 4 – Inocular nas bordas do bloco de ágar, uma alçada da colônia do fungo isolado;
- 5 – Colocar uma lamínula sobre cada bloco de ágar;
- 6 – Dispensar com uma pipeta uma pequena quantidade de água sobre o chumaço de algodão;
- 7 – Incubar a 25 °C por 5 dias ou até o crescimento parecer visualmente suficiente, a lamínula pode ser retirada com o auxílio de uma pinça, cuidando para que esta não se

rompa;

8 – Colocar a lamínula sobre uma lâmina com uma gota de lactofenol azul de algodão (corante) e veda-se a lâmina com esmalte para que não desidrate e tenha maior durabilidade.

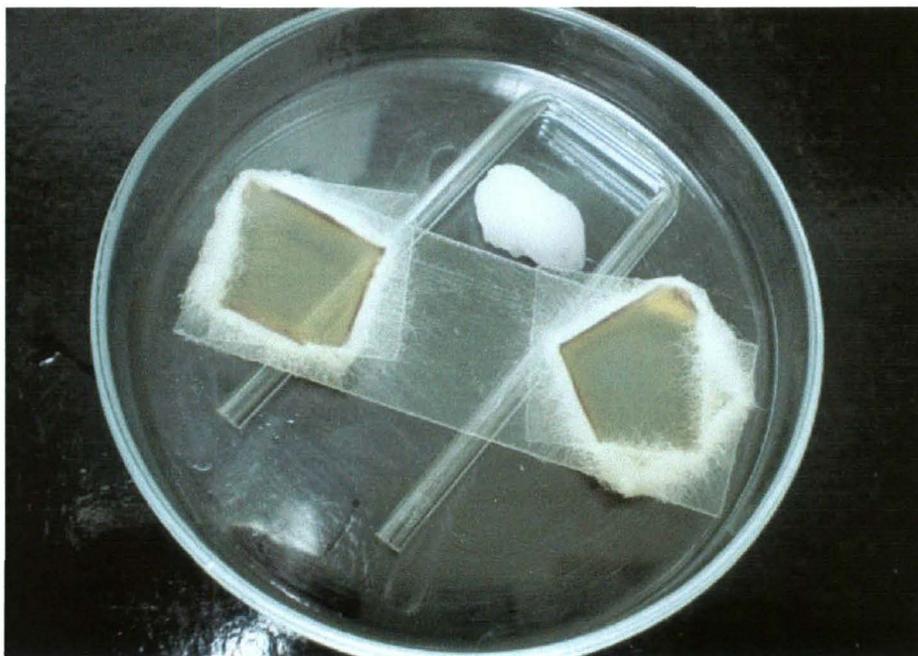


Figura 6: microcultivo após 11 dias de incubação a 25°C.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A identificação dos bolores foi feita primariamente por meio da observação de suas características macroscópicas (coloração do micélio e reverso da colônia, aspecto das hifas e forma das colônias), de acordo com KONEMAN, (2001). A contagem das colônias foi feita através das placas de DRBC (Tabela 2)(figura 7).

Transcorrido o período de incubação, consideramos para contagem, somente as placas, da mesma diluição, que apresentarem de 15 a 150 colônias de acordo com SILVA (1998).

TABELA 2: TRIAGEM DE BOLORES E LEVEDURAS DAS 5 MARCAS DE FUBÁ AMOSTRADAS EM MEIO DICLORAN ROSA DE BENGALA CLORANFENICOL, COM 5 DIAS DE INCUBAÇÃO A TEMPERATURA DE 25°C.

Placa	Fungos	-1	-2	-3	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 4	Tipo 5	Tipo 6	Tipo 7	Tipo 8
Y1A	Bolores	58	-	-	28	4	3	2	1	1	1	1
	Leved	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y2A	Bolores	44	-	-	7	22	-	1	-	-	1	1
	Leved.	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y1B	Bolores	52	-	-	22	15	-	2	-	-	1	0
	Leved	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y2B	Bolores	54	-	-	11	23	-	-	-	-	1	0
	Leved	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1A	Bolores	>	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Leved	>	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2A	Bolores	61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Leved	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1B	Bolores	>	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Leved	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2B	Bolores	56	-	-	2	5	-	-	3	-	-	-
	Leved	27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\* Y, S, P, N e M são letras indicativas das marcas analisadas, os números 1 e 2 são as repetições e as

letras A e B são as duplicatas das repetições.

Placa	Fungos	-1	-2	-3	Tipo 9	Tipo 10	Tipo 11	Tipo 12	Tipo 13	Tipo 14	Tipo 15	Tipo 16
Y1A	Bolores	58	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Leved	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y2A	Bolores	44	-	-	1	1	3	-	-	-	-	-
	Leved.	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y1B	Bolores	52	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-
	Leved	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y2B	Bolores	54	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-
	Leved	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1A	Bolores	>	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Leved	>	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2A	Bolores	61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Leved	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1B	Bolores	>	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Leved	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2B	Bolores	56	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
	Leved	27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\* Y, S, P, N e M são letras indicativas das marcas analisadas, os números 1 e 2 são as repetições e as letras A e B são as duplicatas das repetições.

Placa	Fungos	-1	-2	-3	Tipo 17	Tipo 18	Tipo 19	Tipo 20	Tipo 21	Tipo 22	Tipo 23	Tipo 24
Y1A	Bolores	58	-	-	-	-	-	-	17	-	-	-
	Leved	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y2A	Bolores	44	-	-	-	-	-	-	4	-	3	-
	Leved.	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y1B	Bolores	52	-	-	-	-	-	-	9	-	-	1
	Leved	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y2B	Bolores	54	-	-	2	-	-	-	9	-	4	-
	Leved	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1A	Bolores	>	16	-	-	-	-	-	16	-	-	-
	Leved	>	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2A	Bolores	61	-	-	8	3	1	-	49	-	-	-
	Leved	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1B	Bolores	>	16	-	-	-	-	-	16	-	-	-
	Leved	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2B	Bolores	56	-	-	-	-	-	11	34	-	-	-
	Leved	27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\* Y, S, P, N e M são letras indicativas das marcas analisadas, os números 1 e 2 são as repetições e as letras A e B são as duplicatas das repetições.

Placa	Fungos	-1	-2	-3	Tipo 25	Tipo 26	Tipo 27	Tipo 28	Tipo 29	Tipo 30	Tipo 31
Y1A	Bolores	58	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Leved	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y2A	Bolores	44	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Leved.	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y1B	Bolores	52	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Leved	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y2B	Bolores	54	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Leved	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1A	Bolores	>	16	-	-	-	-	-	-	-	-
	Leved	>	4	-	-	-	-	-	-	-	-
S2A	Bolores	61	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Leved	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1B	Bolores	>	16	-	-	-	-	-	-	-	-
	Leved	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2B	Bolores	56	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Leved	27	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\* Y, S, P, N e M são letras indicativas das marcas analisadas, os números 1 e 2 são as repetições e as letras A e B são as duplicatas das repetições.

Placa	Fungos	-1	-2	-3	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 4	Tipo 5	Tipo 6	Tipo 7	Tipo 8
P1A	Bolores	32	-	-	3	1	-	-	5	-	1	1
	Leved	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P2A	Bolores	34	-	-	3	-	-	-	5	-	-	-
	Leved.	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P1B	Bolores	19	-	-	-	-	-	-	7	-	-	-
	Leved	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P2B	Bolores	26	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-
	Leved	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N1A	Bolores	-	-	26	1	-	-	-	-	-	-	-
	Leved	-	-	57	-	-	-	-	-	-	-	-
N2A	Bolores	>	>	71	-	3	-	-	-	-	-	-
	Leved	>	>	5	-	-	-	-	-	-	-	-
N1B	Bolores	>	>	7	-	-	-	-	-	-	-	-
	Leved	>	>	2	-	-	-	-	-	-	-	-
N2B	Bolores	-	-	49	-	-	-	-	-	-	-	-
	Leved	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\* Y, S, P, N e M são letras indicativas das marcas analisadas, os números 1 e 2 são as repetições e as letras A e B são as duplicatas das repetições.

Placa	Fungos	-1	-2	-3	Tipo 9	Tipo 10	Tipo 11	Tipo 12	Tipo 13	Tipo 14	Tipo 15	Tipo 16
P1A	Bolores	32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Leved	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P2A	Bolores	34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Leved.	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P1B	Bolores	23	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
	Leved	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P2B	Bolores	29	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
	Leved	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N1A	Bolores	-	-	26	-	-	-	-	-	-	-	-
	Leved	-	-	57	-	-	-	-	-	-	-	-
N2A	Bolores	>	>	71	-	-	-	-	3	-	-	-
	Leved	>	>	5	-	-	-	-	-	-	-	-
N1B	Bolores	>	>	27	-	-	-	-	-	-	-	-
	Leved	>	>	2	-	-	-	-	-	-	-	-
N2B	Bolores	-	-	49	-	-	-	-	1	-	-	-
	Leved	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\* Y, S, P, N e M são letras indicativas das marcas analisadas, os números 1 e 2 são as repetições e as letras A e B são as duplicatas das repetições.

Placa	Fungos	-1	-2	-3	Tipo 17	Tipo 18	Tipo 19	Tipo 20	Tipo 21	Tipo 22	Tipo 23	Tipo 24
P1A	Bolores	32	-	-	10	-	-	-	9	-	1	1
	Leved	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
P2A	Bolores	34	-	-	7	-	-	-	15	-	4	-
	Leved.	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P1B	Bolores	23	-	-	5	-	-	3	4	-	2	-
	Leved	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P2B	Bolores	29	-	-	13	-	-	-	7	-	3	-
	Leved	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N1A	Bolores	-	-	26	-	-	-	-	-	-	25	-
	Leved	-	-	57	-	-	-	-	-	-	-	-
N2A	Bolores	>	>	71	1	-	-	3	-	-	63	-
	Leved	>	>	5	-	-	-	-	-	-	-	-
N1B	Bolores	>	>	27	-	-	-	1	-	-	22	-
	Leved	>	>	2	-	-	-	-	-	-	-	-
N2B	Bolores	-	-	49	-	-	-	-	-	-	44	-
	Leved	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\* Y, S, P, N e M são letras indicativas das marcas analisadas, os números 1 e 2 são as repetições e as letras A e B são as duplicatas das repetições.

Placa	Fungos	-1	-2	-3	Tipo 25	Tipo 26	Tipo 27	Tipo 28	Tipo 29	Tipo 30	Tipo 31
P1A	Bolores	32	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Leved	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P2A	Bolores	34	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Leved.	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P1B	Bolores	23	-	-	5	1	1	1	-	-	-
	Leved	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P2B	Bolores	29	-	-	1	1	1	1	1	-	-
	Leved	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N1A	Bolores	-	-	26	-	-	-	-	-	-	-
	Leved	-	-	57	-	-	-	-	-	-	-
N2A	Bolores	>	>	73	3	-	-	-	-	1	-
	Leved	>	>	5		-	-	-	-	-	-
N1B	Bolores	>	>	27	-	-	-	-	-	1	3
	Leved	>	>	2	-	-	-	-	-	-	-
N2B	Bolores	-	-	49	1	-	-	-	-	-	4
	Leved	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\* Y, S, P, N e M são letras indicativas das marcas analisadas, os números 1 e 2 são as repetições e as letras A e B são as duplicatas das repetições.

Placa	Fungos	-1	-2	-3	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 4	Tipo 5	Tipo 6	Tipo 7	Tipo 8
M1A	Bolores	>	18	-	-	5	1	-	-	-	-	-
	Leved	>	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2A	Bolores	>	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Leved.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1B	Bolores	>	19	-	1	-	-	-	-	-	-	-
	Leved	>	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2B	Bolores	>	20	-	-	5	1	-	-	-	-	-
	Leved	>	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Placa	Fungos	-1	-2	-3	Tipo 9	Tipo 10	Tipo 11	Tipo 12	Tipo 13	Tipo 14	Tipo 15	Tipo 16
M1A	Bolores	>	18	-	-	-	-	-	2	-	-	1
	Leved	>	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2A	Bolores	>	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Leved.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1B	Bolores	>	19	-	-	-	1	-	1	-	-	-
	Leved	>	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2B	Bolores	>	20	-	-	-	-	-	2	-	-	-
	Leved	>	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\* Y, S, P, N e M são letras indicativas das marcas analisadas, os números 1 e 2 são as repetições e as letras A e B são as duplicatas das repetições.

Placa	Fungos	-1	-2	-3	Tipo 17	Tipo 18	Tipo 19	Tipo 20	Tipo 21	Tipo 22	Tipo 23	Tipo 24
M1A	Bolores	>	18	-	-	-	-	-	6	-	-	-
	Leved	>	2	-	-	-	-	-		-	-	-
M2A	Bolores	>	12	-	1	-	-	-	8	-	2	-
	Leved.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1B	Bolores	>	19	-	1	-	-	-	12	-	1	-
	Leved	>	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2B	Bolores	>	20	-	3	-	-	-	4	-	1	-
	Leved	>	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Placa	Fungos	-1	-2	-3	Tipo 25	Tipo 26	Tipo 27	Tipo 28	Tipo 29	Tipo 30	Tipo 31
M1A	Bolores	>	18	-	2	-	-	1	-	-	-
	Leved	>	2	-	-	-	-	-	-	-	-
M2A	Bolores	>	12	-	-	-	-	-	1	-	-
	Leved.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1B	Bolores	>	19	-	1	-	-	-	1	-	-
	Leved	>	3	-	-	-	-	-	-	-	-
M2B	Bolores	>	20	-	1	-	-	-	3	-	-
	Leved	>	2	-	-	-	-	-	-	-	-

\* Y, S, P, N e M são letras indicativas das marcas analisadas, os números 1 e 2 são as repetições e as letras A e B são as duplicatas das repetições.

TABELA 3: CONTAGEM TOTAL DE BOLORES E LEVEDURAS.

Placa	Fungos	-1	-2	-3	UFC/g
Y1A	Bolores	58	-	-	$5,8 \times 10^3$
	Leveduras	-	-	-	-
Y2A	Bolores	44	-	-	$3,8 \times 10^3$
	Leveduras	19	-	-	$1,9 \times 10^3$
Y1A	Bolores	52	-	-	$5,0 \times 10^3$
	Leveduras	-	-	-	-
Y1B	Bolores	54	-	-	$5,4 \times 10^3$
	Leveduras	6	-	-	$6,0 \times 10^2$
S1A	Bolores	>	16	-	$1,6 \times 10^4$
	Leveduras	>	4	-	$4,0 \times 10^3$
S2A	Bolores	61	-	-	$6,1 \times 10^3$
	Leveduras	11	-	-	$1,1 \times 10^3$
S1B	Bolores	>	16	-	$1,6 \times 10^4$
	Leveduras	-	-	-	-
S2B	Bolores	56	-	-	$5,6 \times 10^3$
	Leveduras	27	-	-	$2,7 \times 10^3$

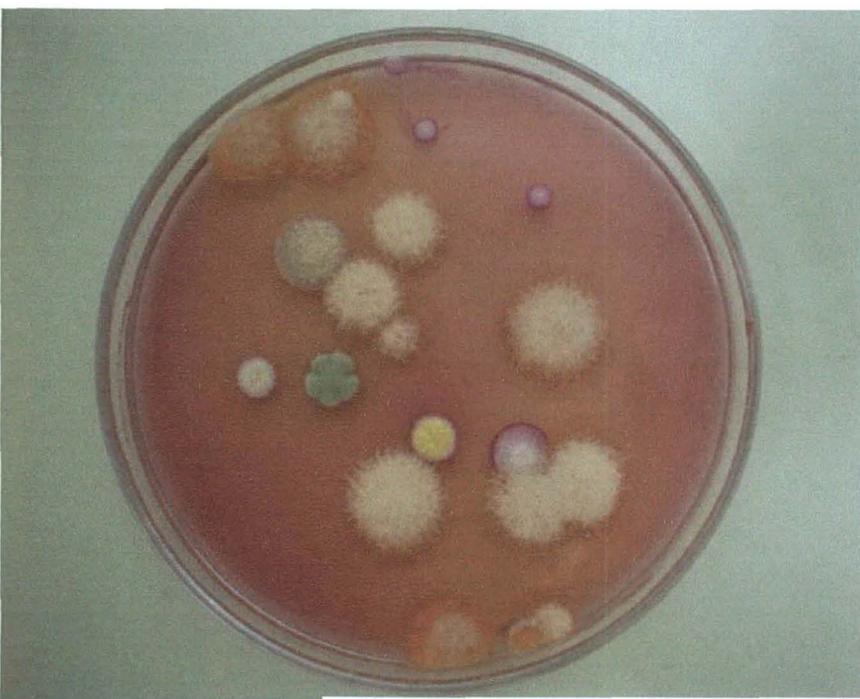
\* Y, S, P, N e M são letras indicativas das marcas analisadas, os números 1 e 2 são as repetições e as letras A e B são as duplicatas das repetições.

Placa	Fungos	-1	-2	-3	UFC/g
P1A	Bolores	32	-	-	$3,2 \times 10^3$
	Leveduras	11	-	-	$1,1 \times 10^3$
P2A	Bolores	34	-	-	$3,4 \times 10^3$
	Leveduras	3	-	-	$3,0 \times 10^2$
P1B	Bolores	19	-	-	$1,9 \times 10^3$
	Leveduras	3	-	-	$3,0 \times 10^2$
P2B	Bolores	26	-	-	$2,6 \times 10^3$
	Leveduras	12	-	-	$1,2 \times 10^3$
N1A	Bolores	-	-	26	$2,6 \times 10^5$
	Leveduras	-	-	57	$5,7 \times 10^5$
N2A	Bolores	>	>	71	$7,1 \times 10^5$
	Leveduras	>	>	5	$5,0 \times 10^4$
N1B	Bolores	>	>	7	$7,0 \times 10^4$
	Leveduras	>	>	2	$2,0 \times 10^4$
N2B	Bolores	-	-	49	$4,9 \times 10^5$
	Leveduras	-	-	-	-

\* Y, S, P, N e M são letras indicativas das marcas analisadas, os números 1 e 2 são as repetições e as letras A e B são as duplicatas das repetições.

Placa	Fungos	-1	-2	-3	UFC/g
M1A	Bolores	>	13	-	$1,3 \times 10^4$
	Leveduras	>	2	-	$2,0 \times 10^3$
M2A	Bolores	>	10	-	$1,0 \times 10^4$
	Leveduras	-	-	-	-
M1B	Bolores	>	19	-	$1,9 \times 10^4$
	Leveduras	>	3	-	$3,0 \times 10^3$
M2B	Bolores	>	16	-	$1,6 \times 10^4$
	Leveduras	>	2	-	$2,0 \times 10^3$

\* Y, S, P, N e M são letras indicativas das marcas analisadas, os números 1 e 2 são as repetições e as letras A e B são as duplicatas das repetições.



**Figura 7:** Placa de DRBC com fungos crescidos após 5 dias de incubação a 25°C.

Após a montagem das laminas do microcultivo, foi possível a análise microscópica das estruturas da colônia (se as hifas são contínuas ou septadas), bem como suas estruturas reprodutivas (forma e coloração de esporos e corpos de frutificação) (PITT e HOCKING, 1997).

A identificação foi prosseguida e identificamos 7 bolores diferentes, mostrados na tabela 4.

TABELA 4 – CONTAGEM E IDENTIFICAÇÃO DOS BOLORES DAS 5 MARCAS DE FUBÁ AMOSTRADAS EM MEIO DICLORAN ROSA DE BENGALA CLORANFENICOL, COM 5 DIAS DE INCUBAÇÃO A TEMPERATURA DE 25°C.

<b>Placa</b>	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Acremonium</i> sp.	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Rhizopus</i> sp.
Y1A	31	1	23	2	0
Y2A	11	0	26	1	0
Y1B	22	0	26	2	0
Y2B	17	2	34	0	0
S1A	0	0	16	0	0
S2A	8	2	52	0	0
S1B	0	1	16	0	0
S2B	2	3	39	0	0
P1A	13	5	10	0	0
P2A	10	5	15	0	0
P1B	5	7	5	1	0
P2B	13	4	7	1	0
N1A	0	0	0	0	0
N2A	1	0	11	0	3
N1B	1	0	1	0	4
N2B	0	0	0	0	0

M1A	1	1	11	0	0
M2A	1	0	8	0	0
M1B	4	0	14	0	0
M2B	4	0	9	0	0

\* Y, S, P, N e M são letras indicativas das marcas analisadas, os números 1 e 2 são as repetições e as letras A e B são as duplicatas das repetições.

Placa	<i>Paecilomyces</i> sp.	<i>Cunninghamella</i> sp.	UFC/g
Y1A	0	0	$5,7 \times 10^3$
Y2A	0	0	$3,8 \times 10^3$
Y1B	0	0	$5,0 \times 10^3$
Y2B	0	0	$5,3 \times 10^3$
S1A	0	0	$1,6 \times 10^4$
S2A	0	0	$6,2 \times 10^3$
S1B	0	0	$1,6 \times 10^4$
S2B	0	0	$1,7 \times 10^3$
P1A	0	0	$2,8 \times 10^3$
P2A	0	0	$3,0 \times 10^3$
P1B	1	0	$1,8 \times 10^3$
P2B	1	0	$2,5 \times 10^3$
N1A	0	0	0
N2A	0	1	$1,6 \times 10^5$
N1B	0	1	$7,0 \times 10^4$
N2B	0	0	0
M1A	0	0	$1,3 \times 10^4$
M2A	0	1	$1,0 \times 10^4$
M1B	0	1	$1,9 \times 10^4$
M2B	0	3	$1,6 \times 10^4$

Para o controle microbiológico de qualidade, fez-se uma média aritmética do número de colônias de leveduras e bolores encontradas em cada uma das amostras de

fubá, a partir das placas com meio DRBC nas diluições que apresentaram de 15 a 150 colônias de acordo com SILVA, 1998. Os números encontrados foram (Tabela 4):

TABELA 5: MÉDIA DE BOLORES E LEVEDURAS (%) DAS QUADRUPPLICATAS DAS AMOSTRAS DE FUBÁ ANALISADAS:

Marcas Amostradas	Total de Fungos em UFC/g	Média Total de fungos	Média de Bolores	% Bolores	Média de Leveduras	% de leveduras
Y	$2,0 \times 10^4$	$5,8 \times 10^3$	$5,2 \times 10^3$	0,86	$6,2 \times 10^2$	0,11
S	$4,4 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$	2,0	$1,9 \times 10^3$	0,12
P	$9,4 \times 10^3$	$3,5 \times 10^3$	$2,8 \times 10^3$	0,47	$7,2 \times 10^2$	0,34
N	$2,3 \times 10^5$	$5,7 \times 10^4$	$3,8 \times 10^5$	65,0	$1,6 \times 10^5$	27,8
M	$5,8 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4$	$1,7 \times 10^4$	3,0	$1,8 \times 10^3$	0,30

Foram identificados como *Aspergillus* sp., os fungos inicialmente nomeados de tipos 1, 3, 10, 11, 17; como *Penicillium* sp. os tipos, 5, 9, 14, 16, 19, 31.; como *Acremonium* sp. os tipos, 2, 7, 8, 12, 15, 18, 21; como *Cladosporium* sp. os tipos, 4, 27; como *Rhizopus* sp. o tipo 30; como *Paecilomyces* sp. o tipo 26 e *Cunninghamella* sp. o tipo 29 (Tabela 5). Os tipos 6,13, 20, 22, 23, 24, 25 e 28 foram identificados como leveduras.

48



Figura 8: Placa de BDA com colônias isoladas crescidas em 5 dias em incubação a 25°C. (A) *Aspergillus* sp e (B) *Acremonium* sp.

TABELA 6: MÉDIA DE BOLORES POTENCIALMENTE MICOTOXIGÊNICOS NAS QUADRUPLICATAS DAS AMOSTRAS DE FUBÁ ANALISADAS.

Marcas Amostradas	Média de <i>Aspergillus</i> sp	%	Média de <i>Penicillium</i> sp	%
Y	$2,0 \times 10^3$	16,8	$7,5 \times 10$	0,62
S	$2,5 \times 10^2$	2,0	$3,7 \times 10^2$	3,1
P	$1,0 \times 10^3$	8,5	$5,2 \times 10^2$	4,3
N	$5,0 \times 10^3$	41,6	0	0
M	$2,5 \times 10^3$	20,7	$2,5 \times 10^2$	2,0

A tabela 6 nos fornece dados para quantificar os fungos potencialmente micotoxigênicos encontrados nas amostras de fubá. Podemos observar que todas as amostras analisadas apresentam contaminação por *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp., sendo que a amostra N foi a que apresentou maior índice de contaminação por *Aspergillus* (41,6%) e a amostra P a maior contaminação por *Penicillium* (4,3%).

A presença do fungo não indica a presença de micotoxina, pois há vários fatores que influenciam a produção destas, como temperatura, atividade de água e composição do substrato, segundo BULLERMAN (1984). Não temos dados sobre as condições de armazenamento das amostras, não podemos assim estimar a umidade relativa do ar nem temperatura do estabelecimento, portanto não podemos indicar a presença da micotoxina.

TABELA 7: MÉDIA DOS BOLORES INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO ENCONTRADOS NAS QUADRUPPLICATAS DAS AMOSTRAS DE FUBÁ ANALISADAS.

<b>Marcas Amostradas</b>	<b>Média de <i>Cladosporium</i> sp.</b>	<b>%</b>	<b>Média de <i>Rhizopus</i> sp.</b>	<b>%</b>	<b>Média de <i>Acremonium</i> sp.</b>	<b>%</b>
Y	6,2 x 10	0,23	0	0	5,0 x 10	3,3
S	0	0	0	0	2,9 x 10 <sup>2</sup>	19,3
P	2,5 x 10	0,1	0	0	6,8 x 10 <sup>3</sup>	1,73
N	0	0	1,7 x 10 <sup>4</sup>	33,0	2,1 x 10 <sup>2</sup>	14,0
M	0	0	0	0	2,9 x 10 <sup>2</sup>	18,8

<b>Marcas Amostrada</b>	<b>Média de <i>Paecilomyces</i> sp.</b>	<b>%</b>	<b>Média de <i>Cunninghamella</i> sp.</b>	<b>%</b>
Y	0	0	0	0
P	0	0	2,5 x 10	0,05
S	5,0 x 10	0,1	0	0
N	0	0	5,0 x 10 <sup>3</sup>	9,4
M	0	0	0	0

A Tabela 7 nos mostra a quantidade de fungos indicadores de contaminação que encontramos nas amostras analisadas. Com esses dados podemos dizer também que todas as amostras tiveram contaminação devido às más condições de armazenamento, ou estocagem.

De acordo com DEIBEL E SWANSON (2001), boas práticas no processamento, tanto pode servir de controle como também reduzir os níveis de microrganismos patogênicos e produtores de esporos em grãos e cereais durante seu estoque e processamento. O mesmo autor sugere que o limite máximo de fungos e leveduras em fubá de milho deve estar entre  $10^2$ – $10^4$  UFC/g, baseado na rotina do controle de qualidade industrial. A Portaria do Ministério da Saúde de 19 de Setembro de 1997, que não vigora nos dias de hoje, estabelecia que os números não deveriam ser superiores a  $10^4$  UFC/g.

Após a análise das amostras de fubá coletadas nos estabelecimentos comerciais de Curitiba obtivemos dados muito acima do permitido pela Portaria do Ministério da Saúde a amostra **Y**, por exemplo, apresentou uma contagem de  $2,0 \times 10^4$  a amostra **S**  $4,4 \times 10^4$  a amostra **N**  $2,3 \times 10^5$  e a **M**  $5,8 \times 10^4$ . O que nos sugere que a qualidade dos produtos disponíveis para a população não é boa. Todas as amostras apresentaram contaminação por fungos potencialmente produtores de micotoxinas o que é um risco para a população, principalmente a de baixa renda que não possui uma alimentação que supra todas as suas necessidades, ficando assim mais suscetíveis aos efeitos das micotoxinas. Também é importante lembrar que este alimento é distribuído na rede pública de ensino, criança são mais frágeis e, portanto sofrem mais severamente os

seus efeitos.

## 7 CONCLUSÃO

A partir dos dados encontrados, observamos que todas as marcas analisadas apresentaram algum tipo de contaminação, inclusive com fungos potencialmente micotoxigênicos como *Aspergillus* sp e *Penicillium* sp. Os outros fungos encontrados são indicadores de más condições de armazenamento e processamento ou são fungos comumente encontrados nos solos como *Rhizopus* sp. e *Cunninghamella* sp.

Os números indicam que todas as marcas amostradas possuem uma contagem superior as que antigamente eram permitidas pelo Ministério da Saúde (Tabela 3), o que é mais importante ressaltar é que a amostra N possuía uma contagem muito acima do permitido ( $2,3 \times 10^5$ ) e é esta a marca que o governo estadual destina à rede pública de ensino como parte na merenda escolar no estado do Paraná. A partir daí não podemos deixar de questionar a existência de um controle de qualidade por parte do Governo Federal no que se refere a quantificação de bolores e leveduras nos alimentos.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATUI, M.B. **Monitoramento de Matérias Estranhas, Fungos e Micotoxinas em Milho em grão, grits e fubá.** Tese apresentada à coordenação de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de concentração em Entomologia da UFPR, Curitiba, 1996, p. 105.
- BULLERMAN, L.B. **Significance of mycotoxins to food safety and human health.** *J. Food Prot.*, v.42, n.1, p.65-86, 1979.
- BULLERMAN, L.B.; SCHROEDER, L.L.; PARK, K.Y. **Formation and control of mycotoxins in food.** *J. Food Prot.*, v.47, n.8, p.637-646, 1984.
- COULOMBE, R.A. Aflatoxins. In: SHARMA R.P.; SALUNKHE, DK.(Eds.) **Mycotoxins and Phytoalexins.** London: CRC Press, 1991. p.103-144.
- CRUZ, L. C. H. **Micologia Veterinária.** Itaguaí: UFRJ, Imprensa Universitária, p. 202, 1981.
- DEIBEL K.E.; SWANSON K.M.J. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods – Cereal and Cereal Products.** 4 ed. Washington: American Public Health Association, p.549, 2001.
- DIFCO MANUAL. **Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiology.** 10 ed. Detroit, Michigan, 1984.
- GONÇALEZ. E., M. M., PINTO, J. D. FELICIO. **Análise de Micotoxinas no Instituto Biológico de 1989 A 1999.** Instituto Biológico, Centro de Sanidade Animal. V. 63, p. 15-

19, 2001.

FRANCO, B. D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996.

FRISVAD, J.C. SAMSON, R.A. **Filamentous in foods and feeds: ecology, spoilage, and mycotoxin production**.

GIL, L.H.V. G e LIMA, G.J.M.M., **Agropecuária Catarinense**, v.9, p. 51-55, 1996.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. – **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro, Editora Guanabara-Koogan, 1996.

HUSSEIN, S.H. BRASEL, J.M. **Toxicology, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals**. *Toxicology*, v.167, p.101-134, 2001.

JAY, J. M. **Microbiologia Moderna de los Alimentos**. 3 ed. Zaragoza: Acribia, 1994.

KERN, M.E.; BLEVIS, K.S. **Micologia Médica**. 2ª ed. São Paulo: Editora Premier, p. 256, 1999.

KONEMAN, ELMER; ALLEN. S; JANDA W.,SCHRECKENBERGER. P; WINN. W. **Diagnóstico Microbiológico**. São Paulo: MEDSI – Editora Médica e Científica Ltda. p 10000-1011, 2001.

LACAZ, C.S.; MINAMI, P. S.; PURCHIO, A. **O Grande Mundo dos Fungos**. São Paulo: Editora Polígono, p. 248, 1970.

LAZZARI, F.A Umidade, **Fungos e Micotoxinas na Qualidade das Sementes, Grãos e Rações**. 2ª ed. Curitiba. P. 148, 1997.

LEITÃO, M.F.F.; HAGLER, L.C. S. M

MALLOZZI, A.B. CORRÊA, B. **Fungos Toxigênicos e Micotoxinas**. *Bol. Técn. Inst.*

*Biol.*, São Paulo, n.12, p.5- 26, 1998.

MISLIVEC, P.B.; BEUCHAT, LR.; CAUSIN, M. A. Yeast and Molds. In APHA. **Compendium of Methods for the Microbiological examination of foods**, 3 ed. Washington, 1992).

MOSS, M.O. Mycotoxic fungi. In: ADRIAN, R.E. (Ed.) **Microbial food poisoning**. London: Chapman & Hall, 1996. p.75-93.

OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1996.

PELCZAR, M.J; REID, R.; CHAN, E.C.S. **Microbiologia**: conceitos e aplicações. São Paulo: Mc Graw-Hill, v.1, p 524, 1996.

PITT, J.I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. 2ª ed. London: Blackie Academic & Professional; Academic Press, 1997.

ROITMAN, I; TRAVASSOS, L.R.; AZEREDO, J.L. **Tratado de Microbiologia**. São Paulo: Manole, p. 180, 1987.

SHARMA, R.P.& SALUNKHE, D.K. **Introduction to mycotoxins**. In: SHARMA, R.P. & SALUNKHE, D.K. (Ed.) **Mycotoxins and Phytoalexins**. London: CRC Press, 1991. p.3-11.

SILVA, N. **Manual de Métodos da Análise Microbiológica de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, p 28, 1998

SILVEIRA, V. D. **Micologia**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Ed. Interamericana, p. 325, 1981.