

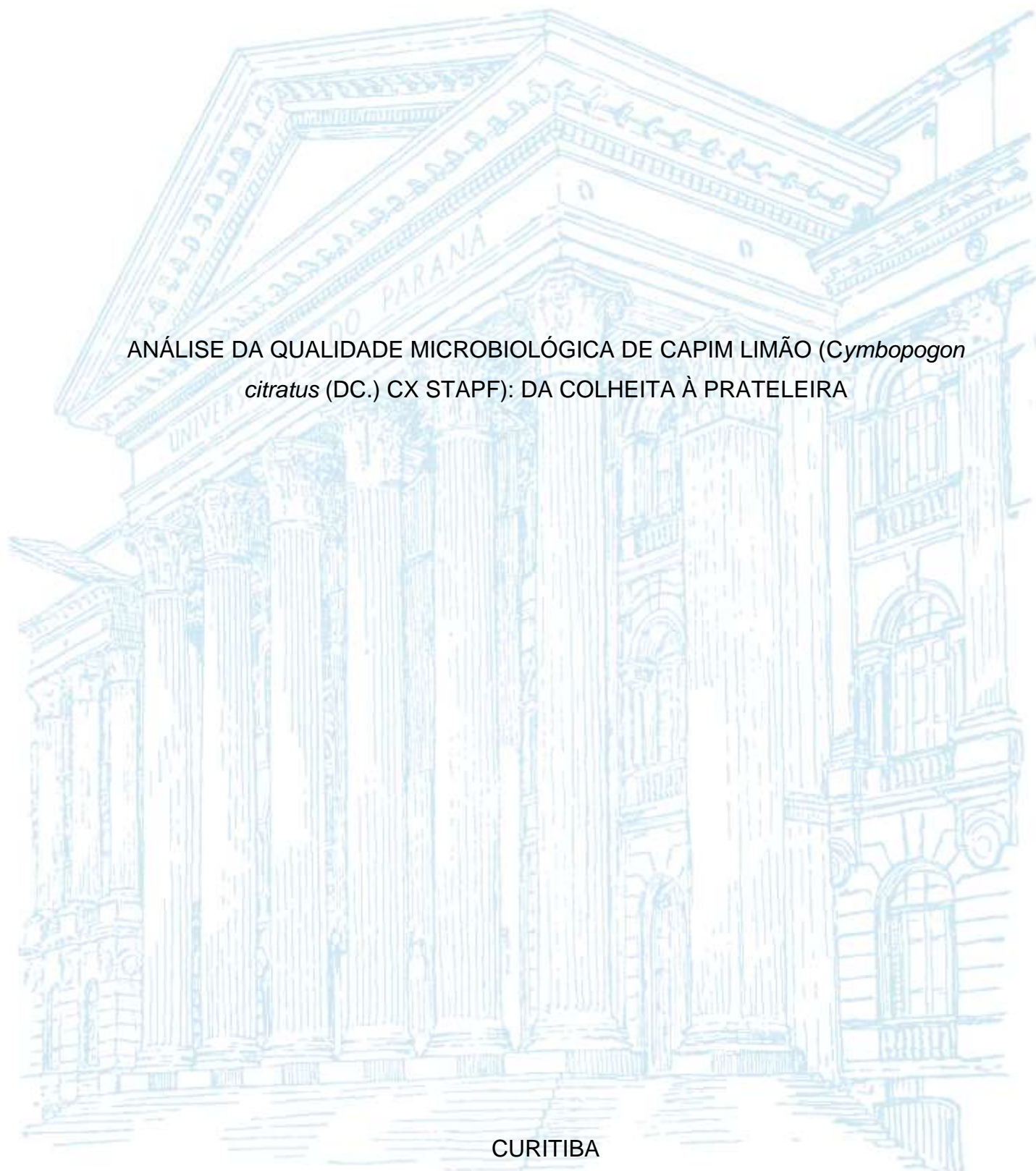
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PHILIPPE FUMANERI TEIXEIRA

ANÁLISE DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE CAPIM LIMÃO (*Cymbopogon
citratus* (DC.) CX STAPF): DA COLHEITA À PRATELEIRA

CURITIBA

2021



PHILIPPE FUMANERI TEIXEIRA

ANÁLISE DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE CAPIM LIMÃO (*Cymbopogon
citratus* (DC.) CX STAPF): DA COLHEITA À PRATELEIRA

Monografia apresentada ao curso de Graduação em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Patricia do Rocio Dalzoto.

CURITIBA

2021

TERMO DE APROVAÇÃO

PHILIPPE FUMANERI TEIXEIRA

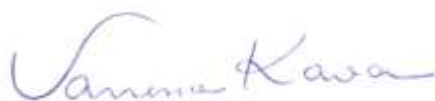
ANÁLISE DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE CAPIM LIMÃO (*Cymbopogon citratus* (DC.) CX STAPF): DA COLHEITA À PRATELEIRA

Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.



Prof(a). Dr(a). Patricia do Rocio Dalzoto

Orientadora – Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná



Prof(a). Dr(a). Vanessa Merlo Kava

Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná.



Prof(a). Dr(a). Lucy Ono

Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 26 de dezembro de 2021.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos mais sinceros aos meus pais, Marlos e Adriana, que sempre me deram apoio e incentivo;

Aos meus avós Joselia e Alceu, por me ensinarem a sempre fazer meu melhor e ter perseverança;

À minha esposa, Lorraine, por estar sempre ao meu lado me acompanhando nos momentos felizes e me dando forças para continuar a jornada da vida;

Ao meu filho, Conrado, por ser um serzinho incrível pelo qual meus dias valem a pena e por ter me ensinado o verdadeiro significado do amor;

À minha orientadora, Patricia, pela paciência e auxílio na realização deste trabalho e contribuição para o desenvolvimento da minha carreira;

Às professoras Vanessa Kava e Lucy Ono, que compuseram a banca avaliadora e fizeram várias contribuições na correção do trabalho;

Aos meus amigos, que me distraíam das dificuldades da vida e me ajudaram a manter a lucidez;

Aos meus colegas de curso, pois sem a ajuda deles a jornada acadêmica teria sido mais difícil.

“Andando por cima da terra,
Conquistando seu próprio espaço,
É onde você pode estar agora”.
(Chico Science, 1996.)

RESUMO

O Capim Limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) é uma das plantas mais utilizadas como fitoterápico, apresentando efeitos ansiolíticos e antioxidantes e auxiliando no tratamento de insônia e problemas digestivos. No Estado do Paraná é uma das principais plantas cultivadas para fins medicinal e aromático. Para garantir suas propriedades medicinais é necessário que o produto tenha qualidade e pureza, sendo livre de contaminação química e microbiológica, uma vez que seu cultivo e manejo de forma adequada interferem na sua eficácia. Assim, este trabalho teve como objetivo observar a qualidade microbiológica e físico-química de amostras de Capim Limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) cx Stapf), sendo duas *in natura*, uma da indústria e em três pontos de venda a granel da cidade de Curitiba – PR. Foram feitas as análises sensoriais de cor, odor e sabor, análises físico-químicas de umidade e cinzas totais e análises microbiológicas de contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos, contagem total de bolores e leveduras, pesquisa de *Escherichia coli* e pesquisa de *Salmonella*. Os resultados das análises sensoriais de cor, odor e sabor mostraram que os produtos estão em acordo com as descrições para a espécie e os resultados das análises físico-químicas mostraram que todas as amostras, com exceção das *in natura*, tiveram valores de umidade dentro da especificação da RDC 272/2005, enquanto todas as amostras tiveram valores de cinzas dentro da especificação da Farmacopéia Brasileira 6ª edição. Para as análises microbiológicas, os microrganismos encontrados foram contados e identificados e não foram encontrados *E. coli* nem *Salmonella* em nenhuma das amostras. Para a contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos, todas as amostras cumpriram os parâmetros de análise, enquanto que para bolores e leveduras apenas as amostras da indústria cumpriram com os parâmetros. Foram identificados fungos dos gêneros *Rhizopus*, *Mucor* e *Fonsecaea*, indicando que o armazenamento e manuseio pós-indústria não se apresenta de forma eficaz.

Palavras-chave: Capim Limão. Qualidade. *Salmonella*. Fitoterápico. Bolores.

ABSTRACT

The Lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) cx Stapf) is one of the most used plants as a herbal medicine, presenting anxiolytic and antioxidant effects and helping treating insomnia, as well as digestive problems. In the State of Paraná is one of the main plants cultivated to medicinal and aromatic purposes. To guarantee its medicinal properties it is necessary the product has quality and purity, being free from chemical and microbiological contaminations, since its cultivation and proper handling interfere in its effectiveness. Thus, this work aims to observe the microbiological and physicochemical quality of samples of Lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) cx Stapf), being two *in natura*, one from industry and in three sales points in the city of Curitiba – PR. Sensory analyzes of color, odor and flavor, physicochemical analyzes of moisture and total ash and microbiological analyzes of total count of aerobic mesophilic microorganisms, total count of molds and yeasts, search for *Escherichia coli* and search for *Salmonella* were carried out. The results of the sensory analysis of color, odor and flavor showed that the products are in accordance with the descriptions for the species and the results of the physicochemical analysis showed that all samples, except for the fresh ones, had moisture values within the specification of RDC 272/2005, while all samples had ash values within the specification of the Brazilian Pharmacopoeia 6th edition. For microbiological analysis, the microorganisms found were counted and identified. Neither *E. coli* nor *Salmonella* were found in any of the samples and all samples fulfilled the analysis parameters for the total count of aerobic mesophilic microorganisms, while for molds and yeasts only the industry samples complied with the parameters and fungi of the genera *Rhizopus*, *Mucor* and *Fonsecaea*, indicating that storage and handling after industry is not effective.

Keywords: Lemongrass. Quality. *Salmonella*. Herbal medicine. Molds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Teste bioquímico Bactray 1 com os frascos dos reagentes.	24
Figura 2 - Amostras de <i>C. citratus in natura</i> e na embalagem de venda.	27
Figura 3 - Reverso de Ágar MacConkey com as culturas bacterianas.	30
Figura 4 - Triplaca ágar XLD, ágar Verde Brilhante e ágar <i>Salmonella</i> Cromogênico.	31
Figura 5 - Ágar TSA com crescimento de colônias não filamentosas.	32
Figura 6 - Ágar Sabouraud com crescimento fúngico após incubação por 3 dias à temperatura de 22,5°C ±2°C.	33
Figura 7 - <i>Rhizopus</i> sp. após crescimento por 7 dias a 28°C em ágar BDA.	36
Figura 8 - <i>Mucor</i> sp. após crescimento por 7 dias a 28°C ágar BDA.	37
Figura 9 - <i>Fonsecaea</i> sp. após crescimento por 7 dias a 28°C ágar BDA.	38
Figura 10 - Fungos sem estruturas de reprodução após crescimento por 7 dias a 28°C ágar BDA.	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados das análises físico-químicas.....	28
Tabela 2 - Resultados das análises microbiológicas.....	29

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 DOENÇAS VEICULADAS POR ALIMENTOS.....	14
2.2 FUNGOS EM ALIMENTOS	15
2.3 ATIVIDADE MICROBIANA DEGENERATIVA DE ALIMENTOS	17
2.4 O CAPIM LIMÃO	17
2.5 NORMAS E PADRÕES DE CONTROLE	18
3 OBJETIVOS	19
3.1 GERAIS.....	19
3.2 ESPECÍFICOS	19
4 METODOLOGIA	20
4.1 MATERIAIS	20
4.2 COLETA DAS AMOSTRAS.....	20
4.3 PREPARO DAS AMOSTRAS	21
4.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	21
4.4.1 Material estranho.....	21
4.4.2 Umidade	21
4.4.3 Cinzas totais.....	22
4.5 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	22
4.5.1 Contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos	23
4.5.2 Contagem de bolores e leveduras.....	23
4.5.3 Pesquisa de <i>Escherichia coli</i>	23
4.5.4 Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp.	23
4.5.5 Contagem das colônias	24
4.6 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS	24
4.6.1 Identificação de bactérias por testes bioquímicos	24
4.6.2 Identificação fúngica.....	26
4.7 DESCARTE DAS AMOSTRAS E MATERIAIS.....	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1 ANÁLISES SENSORIAIS	27
5.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	28
5.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	28

5.4 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS PRESENTES NAS AMOSTRAS	33
5.4.1 Bactérias	33
5.4.2 Fungos	35
6 CONCLUSÕES	40
REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os alimentos são primordiais para a manutenção da vida humana. Deles retiramos os nutrientes essenciais como carboidratos, proteínas e vitaminas que, através de vias metabólicas, fazem a manutenção do organismo (RAJPUT et al., 2019). Carvalho (2016) apresenta a alimentação saudável como um fator importante para o desenvolvimento humano e, na falta, afetando o desenvolvimento físico e intelectual em crianças, como capacidade de concentração, memória, atenção e capacidade de aprendizado. Da mesma forma, segundo Barbosa (2012), doenças crônicas relacionadas com a idade, como diabetes, cálculos biliares, doenças ósseas e articulares e hipertensão arterial, podem ter seus efeitos postergados ou aliviados em idosos que possuem uma alimentação adequada, sendo um fator importante para a saúde e um envelhecimento bem-sucedido. No entanto, os padrões de consumo alimentar no mundo são desiguais, sendo afetados por condições naturais variadas, como clima, tipos de solo, preços, renda, quantidade de alimento disponível, entre outros fatores. Observam-se ainda diferenças entre países desenvolvidos e em desenvolvimento, devido à variação de poder econômico, sendo a alimentação humana considerada também um indicador de qualidade de vida (ABREU et al., 2001; MORATOYA et al., 2013).

Diferente das razões nutricionais, a antropologia apresenta outros modos de utilização dos alimentos: como componentes socioculturais — em hábitos populares ou tradições — e de saúde, — no combate a doenças crônicas como diabetes e hipertensão (CANESQUI, 2007). À vista disso, plantas vêm sendo utilizadas com fins medicinais no mundo todo para tratamento, cura e prevenção de doenças desde a Antiguidade, tendo relatos do uso desde antes de Cristo e, no Brasil, nas tribos indígenas ainda são utilizadas também em rituais de adoração (WANDERLEY et al., 2015; BRAGA, 2011).

A medicina alternativa complementar é muito utilizada em diversos países, sendo a percepção das limitações da medicina convencional e a questão financeira alguns dos motivos pelos quais a busca por alternativas vem crescendo no mundo (ZENI et al., 2017). A publicação das Portarias nº 971, de 03 de maio de 2006 e nº 1.600, de 17 de julho de 2006, pelo Ministério da Saúde, marcaram a utilização das Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS),

estimulando o uso da medicina tradicional, da homeopatia e da fitoterapia, fortalecendo as iniciativas de saúde já existentes no Brasil (BRASIL, 2006).

Uma das plantas utilizadas como fitoterápico é o Capim Limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) devido a seus efeitos ansiolíticos e antioxidantes, além de ser eficaz também no tratamento de insônia e problemas digestivos (BETT, 2013; COSTA et al., 2019). Praticamente em todos os países tropicais há o cultivo dessa planta que é originária da Índia, onde é utilizada principalmente como chá e no Estado do Paraná é uma das principais plantas cultivadas com fim medicinal e aromático (GOMES; NEGRELLE, 2015).

Para garantir suas propriedades medicinais é necessário que o produto tenha qualidade e pureza, sendo livre de contaminação química e microbiológica, uma vez que seu cultivo e manejo de forma adequada interferem na sua eficácia (COSTA et al., 2019). Dessa forma, o mercado tem forçado as empresas a implantarem políticas de gestão da qualidade para satisfazer aos seus consumidores, utilizando das boas práticas de fabricação como ferramenta para se obter padrão de qualidade na produção de alimentos em geral, uma vez que a qualidade dos produtos da indústria alimentícia está relacionada com a saúde e segurança alimentar (VERONEZI; CAVETÃO, 2015; NOGUEIRA; DAMASCENO, 2016).

O presente trabalho avaliou a qualidade microbiológica e físico-química de amostras de Capim Limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) cx Stapf) coletadas *in natura*, na indústria (desidratado) e em três pontos de venda a granel (desidratado) da cidade de Curitiba – PR.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DOENÇAS VEICULADAS POR ALIMENTOS

Alves (2012) aponta que aproximadamente 1,8 milhões de pessoas morriam anualmente devido a diarreias associadas à água e alimentos contaminados, sendo as crianças as mais prejudicadas. Estima-se que 30% da população dos países industrializados sofram de doenças veiculadas a alimentos e que doenças como a gripe aviária, salmoneloses (SHINOHARA et al., 2008) e parasitoses (CUNHA; AMICHI, 2014) trouxeram à tona a necessidade de controle microbiano na indústria alimentícia, enquanto que em 2019, segundo a FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) mais de 600 milhões de pessoas adoeceram e cerca de 420 mil pessoas morreram por doenças ligadas a alimentos. Essa redução deve-se aos avanços tecnológicos e de métodos de processamento que aumentam a segurança alimentar e melhoram a nutrição, subsistência e comércio (FAO, 2019).

Dentre as espécies de microrganismos causadores de doenças alimentares tem-se a *Escherichia coli*, bactéria que habita o trato intestinal humano e de outros animais, sendo provavelmente o patógeno humano mais importante (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015). Existem diversas cepas de *E. coli* e a maioria é inofensiva, porém há as cepas de STEC – *E. coli* produtoras de toxina de Shiga, também conhecidas como *E. coli* enterohemorrágica – que causam cólicas abdominais severas e forte diarreia com presença de sangue, além de febre e vômitos. Em pessoas mais vulneráveis a infecção pode se agravar numa Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU), levando à uma falência renal aguda, anemia hemolítica e a redução do número de plaquetas no sangue (trombocitopenia), prejudicando a coagulação sanguínea (ANS, 2011).

Bactérias do gênero *Salmonella* spp. também causam doenças alimentares. São bastonetes Gram-negativos, anaeróbicos facultativos, não formadores de esporos e oxidase negativas que também habitam o trato intestinal humano e de outros animais e são causadoras da salmonelose ou gastroenterite (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Os fatores de virulência das *Salmonella* estão relacionados a estruturas presentes na bactéria, como as fímbrias, envolvidas no processo de adesão das células aos diferentes tecidos epiteliais, a proteínas bacterianas envolvidas nas respostas secretoras e inflamatórias das mucosas (ou que conferem resistência a reações enzimáticas que ajudam na resposta imunológica) e aos

lipopolissacarídeos (LPS) também relacionados à resistência bacteriana (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015). Os sintomas de infecção por *Salmonella* vão desde diarreia, cólicas abdominais e febre a febre alta, dores de cabeça, letargia, erupções cutâneas e em alguns casos pode ser fatal (FDA, 2019).

2.2 FUNGOS EM ALIMENTOS

Fungos são utilizados como alimentos desde tempos remotos, tendo sua importância nutricional reconhecida no mundo todo, uma vez que cogumelos como o *Agaricus bisporus* (champignon) e *Lentinula edodes* (shitake) são ricos em proteínas, carboidratos e minerais (ATILA; OWAID; SHARIATI, 2017; JAYACHANDRAN; XIAO; XU, 2017). Podem também ser utilizados na produção de alimentos e bebidas, como a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, empregada na fermentação de pães e cervejas (PARAPOULI et al., 2020).

Diversos fungos também podem ser encontrados como contaminantes em alimentos, e sua pesquisa é importante devido ao fato de que alguns produzem micotoxinas e colonizam os alimentos durante os períodos de pré-colheita, colheita e armazenamento. As micotoxinas são produzidas por fungos filamentosos, como *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., e podem ter diversos efeitos graves em humanos e outros animais, se ingeridas, como hemorragias intestinais e renais, tumores renais, tumores hepáticos, edemas cerebral e pulmonar e abortos (SOARES; ABRUNHOSA; VENÂNCIO, 2013). Russomano et al. (2015) encontraram diversas espécies de fungos fitopatogênicos e produtores de micotoxinas em amostras de temperos como açafrão, alecrim e manjeriço; e em chás como boldo, camomila e capim limão, tendo como representantes os gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Cladosporium* e *Rhizopus*. No entanto, a presença do fungo não significa necessariamente a presença de micotoxinas, pois para serem produzidas dependem de condições favoráveis de umidade, temperatura, pH e composição química do alimento (MAZIERO; BERSOT, 2010).

As espécies de *Aspergillus* se dispersam por diversos tipos de substratos, inclusive em alimentos, comumente como agentes degradantes, devido ao fato de secretarem uma ampla gama de enzimas como amilases, xilanases e pectinases. Algumas espécies como *A. niger* e *A. flavus* são produtoras de micotoxinas, como aflatoxinas e ocratoxinas (KRIJGSHELD et al., 2013; BHALLA et al., 2019).

Fusarium é um gênero cosmopolita de fungos ascomicetos filamentosos e inclui muitos patógenos de plantas. São produtores de toxinas como tricotecenos e fumonisinas que contaminam principalmente grãos, tornando-os inadequados para a alimentação (MA et al., 2013; BHALLA et al., 2019).

Os fungos do gênero *Mucor* são encontrados em vegetais frescos e secos, cereais, grãos e frutas e geralmente não são patógenos humanos, porém diversas enzimas são produzidas, como lipases e amilases, responsáveis pela degradação dos alimentos. Em contrapartida, algumas espécies possuem atividade micorrízica, facilitando o crescimento de plantas em ambientes contaminados com metais pesados, atuando como biorremediadores (DOMKA et al., 2019; BOTHA; BOTES, 2014).

Outro gênero de fungos produtores de micotoxinas é o *Penicillium*, que pode estar presente em diversos substratos como solo, madeiras e sementes e no ambiente possuem papel importante como recicladores da matéria orgânica. Podem afetar os humanos de diferentes formas, causando a degradação de alimentos, alergias e infecções, mas também são utilizados de maneira benéfica, produzindo outros metabólitos secundários como antibióticos, antioxidantes, inseticidas, fungicidas e enzimas (TERRASAN, 2007; SILVA et al., 2010).

Trichoderma spp., fungos de vida livre presentes em solos de regiões tropicais e temperadas, são decompositores de matéria orgânica, colonizam a rizosfera e melhoram a saúde das plantas, agindo como indutores de resistência contra doenças que atingem as plantas e melhorando seu crescimento. São muito estudados por sua ação biopesticida, fertilizante e inoculante de solo, sendo vendidos comercialmente para utilização em compostos (BRITO; MILLER; STADNIK, 2010; MACHADO et al., 2012).

Cladosporium spp. são endófitos comuns e são conhecidos por serem patógenos de plantas, causando lesões foliares, comumente associados também à degradação de alimentos. Em humanos são frequentemente associados a infecções cutâneas, pela propriedade de digerir proteínas da epiderme, e também à rinite e asma alérgica (MENEZES et al., 2017).

Fungos do gênero *Rhizopus* podem causar doenças em plantas e são degradadores de alimentos, mas também são utilizados na indústria como agentes fermentadores e na indústria farmacêutica como produtores de remédios ou

catalisadores da produção de drogas. Como patógeno humano também pode causar a mucormicose (ZHENG et al., 2007).

2.3 ATIVIDADE MICROBIANA DEGENERATIVA DE ALIMENTOS

Além de causarem doenças alimentícias, Huss (1993) relata que um quarto do suprimento de alimento mundial é descartado unicamente pela atividade microbiana e FAO (2021) mostra que a quantidade de alimentos descartados chega a 931 milhões de toneladas. Porte e Maia (2001) citam modificações bioquímicas como escurecimento, alterações na textura original e produção de odores como sendo os responsáveis por essa perda. Os microrganismos utilizam os alimentos como fontes de nutrientes e causam essas alterações, que muitas vezes não são visíveis, o que pode fazer com que os alimentos cheguem ao consumidor final (BAPTISTA; VENÂNCIO, 2003). A cadeia produtiva de alimentos é complexa, passando desde o plantio, distribuição e a chegada ao consumidor final e, mesmo com todas as técnicas de conservação disponíveis, é necessário um maior nível de profissionalização, reduzindo assim a taxa de desperdício (PINTO; LANDGRAF; FRANCO, 2018).

2.4 O CAPIM LIMÃO

O capim limão é uma planta herbácea de folhas estreitas, longas, agudas e ásperas, pertencente à família Poaceae, também conhecida como família das gramíneas, e formam arbustos de até 3m de altura. Seu nome, *C. citratus* deriva do grego, em que *Cymbopogon* significa Kymbe (barco) e Pogon (barba), se referindo às suas flores, e *citratus* deriva do latim, significando folhas com odor de limão (NEGRELLE; GOMES, 2007).

A planta é muito comercializada para a produção de óleos essenciais, onde os compostos citral e monoterpenos são os componentes majoritários, e são utilizados na indústria farmacêutica para a síntese de compostos como a vitamina A. O citral possui propriedades antimicrobianas, inibidor do crescimento de *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Bipolaris* sp. e *Alternaria alternata*, fazendo útil o uso do óleo essencial na fruticultura como controle de doenças no pós colheita de frutos de maracujá (GUIMARÃES et al., 2011; MOURA et al., 2016).

Dalmolin, Persel e Cruz-Silva (2012) apresentam a redução do padrão germinativo de sementes de picão preto – planta invasora em culturas anuais e perenes – pelo uso do extrato de capim limão, e sugerem seu uso como alternativa ao uso de herbicidas sintéticos, e Agnolin, Olivo e Parra (2014) ainda mostram como o uso do óleo essencial de capim limão pode beneficiar a produção agropecuária através do controle de infestações por carrapatos em bovinos leiteiros.

A planta possui alguns efeitos terapêuticos como ação favorecedora da digestão gástrica, analgésica, previne a ocorrência de espasmos no estômago, intestino, útero e bexiga, além de possuir ação calmante e é frequentemente utilizada sob a forma de infusão, apresentando aroma e sabor agradáveis (ZANETI; DUARTE, 2004; LORENZI, 2008).

2.5 NORMAS E PADRÕES DE CONTROLE

A ANVISA é a responsável por estabelecer normas e padrões de controle com a finalidade de garantir a segurança e a qualidade dos alimentos. Com relação aos microrganismos pesquisados nesse trabalho, a RDC 331/2019 e a IN 60/2019 apresentam os padrões de aceitação em que *Salmonella* deve ser totalmente ausente e *E. coli* tem um limite máximo de 10^2 UFC/g. Bolores e leveduras são pesquisados apenas para alguns alimentos, como frutas secas, desidratadas ou liofilizadas, raízes, nozes, amêndoas e sementes comestíveis, por exemplo. Para o Capim limão não há esse padrão por se enquadrar na categoria de chá. A justificativa é de que o foco da ANVISA é a saúde pública, sendo categorizados apenas microrganismos patogênicos ou indicadores de falhas de processamentos, não tendo como foco os organismos relacionados à deterioração dos alimentos, os quais são analisados apenas em produtos em que não há a probabilidade de crescimentos de outros indicadores (ANVISA, 2021).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAIS

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a contaminação microbiana de amostras de chás de capim limão (*C. citratus*), analisando as seguintes formas de apresentação do produto:

In natura: produto analisado logo após a colheita, sem passar por nenhum tipo de tratamento químico ou térmico;

Da indústria: produto coletado da indústria depois de passar por tratamento térmico (dessecação) e antes de passar por processamento e classificação;

Do comércio: produto coletado do comércio, desidratado, pronto para ser vendido a granel para o público em geral.

3.2 ESPECÍFICOS

- Pesquisar a presença de *Escherichia coli* e *Salmonella* sp., visando detectar se as amostras testadas estão em conformidade com a RDC 331/2019 da Anvisa;
- Realizar a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos presentes nas amostras;
- Fazer a contagem de bolores (fungos filamentosos) e leveduras presentes nas amostras;
- Isolar, caracterizar e identificar os fungos filamentosos presentes nas amostras.

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS

Para realização das análises foram utilizados os seguintes materiais:

- Balança semi-analítica para pesar as amostras;
- Proveta de vidro para mensurar a quantidade de caldo utilizado em cada amostra;
- Sacos estéreis para realizar a pesagem e diluição das amostras;
- Bico de Bunsen para manter uma zona estéril e esterilizar as alças utilizadas;
- Micropipeta mecânica monocanal de volume fixo 100µL para transferir a diluição para os meios de cultura;
- Alça de Drigalski para realizar o espalhamento das colônias nas placas de cultura;
- Alça de níquel cromo para transferir as colônias de *Salmonella* para o meio de cultura;
- Estufa microbiológica para manter a temperatura de incubação de $32,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$, favorecendo o crescimento microbiano;
- Estufa micológica para manter a temperatura de incubação de $22,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$, favorecendo o crescimento fúngico;
- Autoclave para descontaminação de materiais;
- Kit Bactray 1 para a identificação bioquímica das bactérias;
- Microscópio óptico para identificação fúngica.

4.2 COLETA DAS AMOSTRAS

A erva Capim Limão (*C. citratus*) foi avaliada em três fases da cadeia produtiva: *in natura* (antes da entrada para produção), desidratada (durante o processo de produção) e desidratada (no comércio varejista). Foram coletadas duas amostras do produto *in natura*, com uma sendo colhida fresca e outra do comércio, uma amostra do produto da indústria e três amostras do comércio varejista de Curitiba, PR. O plano de amostragem foi feito conforme a RDC 331/2019, que permite a utilização do método descrito na Farmacopéia Brasileira 6ª edição: para quantidades inferiores a 10 kg deve ser recolhido no mínimo 125 g de amostra.

Para cada amostra foram realizadas as análises de *Escherichia coli*, *Salmonella* sp, contagem total de aeróbios mesófilos e bolores e leveduras, conforme descritas na Farmacopeia brasileira 6ª edição.

4.3 PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras foram coletadas e acondicionadas em embalagens plásticas em temperatura ambiente e transportadas até o Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LabMicro) do Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná, onde foram analisadas considerando a quantidade de material estranho, porcentagem de umidade, porcentagem de cinzas totais, contagem do número total de microrganismos aeróbios mesófilos, contagem de bolores e leveduras e presença de *E. coli* e *Salmonella* sp. As análises foram feitas em duplicata.

4.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

4.4.1 Material estranho

A análise de material estranho foi feita conforme metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira 6ª edição, espalhando a amostra em camada fina sobre superfície plana e separando, manualmente os materiais estranhos ao produto, inicialmente a olho nu e, em seguida, com auxílio de lente de aumento (cinco a dez vezes). O material separado foi pesado e a porcentagem de matéria estranha foi determinada com base no peso da amostra submetida ao ensaio.

4.4.2 Umidade

Para essa análise há três pesagens: cadinho calcinado, cadinho com produto e cadinho com produto dessecado. O cadinho previamente calcinado foi pesado (P1), então foram transferidos de 2 a 5 gramas de produto para ele e foi pesado novamente (P2). Após a pesagem o cadinho foi transferido para uma estufa de secagem, onde foi mantido por 5 horas a 105°C, até peso constante. Após esse período o cadinho foi acondicionado num dessecador até esfriar, e então pesado novamente (P3) e foi feito o cálculo de porcentagem de umidade, conforme a fórmula a seguir:

$$\% \text{ UMIDADE} = \left(\frac{(P2 - P3)}{P4} \right) \times 100$$

P1 = peso do cadinho vazio, em g;

P2 = peso do cadinho contendo a amostra antes da dessecação, em g;

P3 = peso do cadinho contendo a amostra após a dessecação, em g;

P4 = peso da amostra, em g (P2 – P1).

4.4.3 Cinzas totais

Para essa análise há três pesagens: cadinho calcinado, cadinho com produto e cadinho com produto dessecado. O cadinho previamente calcinado foi pesado (P1), a balança foi tarada, então foram transferidos 3 gramas de produto para ele e foi pesado novamente (P2). Após a pesagem o cadinho foi transferido para a mufla onde foi mantido por 30 minutos a 200°C, 60 minutos a 400°C e 90 minutos a 600°C, até peso constante. Após esse período o cadinho foi acondicionado num dessecador até esfriar, e então pesado novamente (P3) e foi feito o cálculo de porcentagem de cinzas, conforme a fórmula a seguir:

$$\% \text{ CINZAS} = \left(\frac{(P3 - P1)}{P2} \right) \times 100$$

P1 = peso do cadinho vazio, em g.

P2 = peso da amostra, em g.

P3 = peso do cadinho contendo a amostra após a incineração em mufla, em g.

4.5 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Cada amostra teve 10g do produto transferido para um saco estéril onde foram adicionados 90mL de Caldo TSB (triptona de soja), uma base nutricional que suporta o crescimento de uma grande variedade de microrganismos anaeróbicos, aeróbicos facultativos e fungos, para fazer sua diluição e enriquecer a amostra.

4.5.1 Contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos

Para essa análise foi transferido 0,1mL da diluição, logo após a suspensão, utilizando a pipeta monocal de volume fixo, para a placa de Ágar TSA (Tryptic Soy Agar), sendo espalhado por toda a placa com a alça de Drigalski e então incubada na posição invertida em estufa microbiológica durante 24h na temperatura de $32,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$. Processo realizado em duplicata.

4.5.2 Contagem de bolores e leveduras

Para essa análise foi transferido 0,1mL da diluição, logo após a suspensão, utilizando a pipeta monocal de volume fixo, para a placa de Ágar Sabouraud-dextrose, sendo espalhado por toda a placa com a alça de Drigalski e incubada na posição normal em estufa micológica durante 4 dias na temperatura de $22,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$. Processo realizado em duplicata.

4.5.3 Pesquisa de *Escherichia coli*

Para essa análise foi transferido 0,1mL da diluição, logo após a suspensão, utilizando a pipeta monocal de volume fixo, para a placa de Ágar MacConkey, sendo espalhado por toda a placa com a alça de Drigalski e incubada na posição invertida em estufa microbiológica durante 24h na temperatura de $32,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$. Processo realizado em duplicata.

4.5.4 Pesquisa de *Salmonella* sp.

Para essa análise foi transferido 0,1mL da diluição, após incubação em estufa microbiológica por 24 horas, utilizando a pipeta monocal de volume fixo, para o caldo Rappaport Vassiliadis para enriquecimento da amostra e acondicionada em estufa microbiológica durante 24h na temperatura de $32,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$. Após esse período foi realizada a semeadura na TRIPLACA (Ágar Verde Brilhante, XLD e *Salmonella* cromogênico) com a alça de níquel cromo, fazendo estrias simples do meio menos seletivo para o mais seletivo e incubada na posição invertida em estufa

microbiológica durante 24h na temperatura de $32,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$. Processo realizado em duplicata.

4.5.5 Contagem das colônias

O resultado de todos os testes foi o número de colônias multiplicado por 10^2 , sendo 10 (fator de diluição 10:1 utilizado) X 10 (fator de correção em decorrência do volume utilizado na semeadura) e o resultado obtido foi em UFC/g.

4.6 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

4.6.1 Identificação de bactérias por testes bioquímicos

Após a finalização das análises e a leitura das placas foi realizada a identificação dos microrganismos, realizando testes bioquímicos para as bactérias e utilizando a técnica do microcultivo para os fungos.

Figura 1 - Teste bioquímico Bactray 1 com os frascos dos reagentes.



Fonte: Imagem do autor (2021).

Os testes bioquímicos foram realizados utilizando o Sistema Bactray 1, que é destinado a identificação de bacilos Gram-negativos com oxidase negativa, fermentadores ou não de glicose. Nesse sistema são realizados os seguintes testes:

ATIVIDADE DA β -GALACTOSIDASE (ONPG) - a hidrólise da beta-galactosidase (o-nitrofenol- β -galactosideo) para galactose na presença do o-nitrofenol desenvolvendo coloração amarela.

ARGININA (ADH) - arginina dehidrolase transforma a arginina em citrulina e amônia. Isto ocasiona uma elevação do pH do sistema com a conseqüente mudança do indicador de amarelo para púrpura.

LISINA (LDC) - lisina descarboxilase transforma a lisina num composto básico de amina primária (cadaverina) e CO_2 . Esta amina produz uma elevação do pH do sistema com a conseqüente mudança do indicador de amarelo para púrpura.

ORNITINA (ODC) - ornitina descarboxilase transforma a ornitina num composto básico de amina primária (putrescina) e CO_2 . Esta amina produz uma elevação do pH do sistema com a conseqüente mudança do indicador de amarelo para púrpura.

TIOSSULFATO DE SÓDIO (H_2S) - o sulfeto de hidrogênio é produzido pela hidrólise enzimática do tiossulfato. Na presença do citrato férrico forma um precipitado negro.

UREIA (URE) - a urease hidrolisa enzimaticamente a ureia com produção de amônia e CO_2 .

VOGES-PROSKAUER (VP) - este é um teste para verificação da produção de acetoína, produto este intermediário da degradação da glicose. Sua presença é indicada pela cor vermelha ou rosa, formada pela reação do complexo hidróxido de potássio e alfa naftol.

L-FENILALANINA (PD) - a desaminação da fenilalanina, produzida pelo ácido fenil pirúvico, forma uma cor verde na presença de cloreto férrico.

REAÇÃO DE INDOL (IND) - a metabolização do triptofano pela triptofanase resulta na produção de indol formando um complexo de cor rosa ou vermelho com o reagente de Kovac's.

CITRATO DE SÓDIO (CIT) - consiste na utilização de citrato como única fonte de carbono, o qual quando metabolizado, resulta num produto alcalino de coloração azul ou verde azulado.

4.6.2 Identificação fúngica

Após o crescimento fúngico em ágar Sabouraud Dextrose, os fungos foram inspecionados e repicados isoladamente em Ágar BDA e após o período de incubação foram analisados visualmente para descrição da macromorfologia ou morfologia colonial, que considera características como cor, aspecto, tipo de crescimento, produção de pigmentos, entre outras.

Em seguida, foi realizado o microcultivo para observação da micromorfologia, com metodologia descrita por Kern e Blevins (1999). Dois cubos de Agar Batata Dextrose (BDA) foram depositados em uma placa de Petri com lâminas de vidro esterilizadas. O micélio fúngico foi inoculado com a alça de níquel-cromo nas bordas dos cubos e, em seguida, cobertos com uma lamínula esterilizada. Para manter a umidade dentro da placa e facilitar o crescimento fúngico foi colocado um pedaço de algodão embebido em água destilada esterilizada e então a placa foi mantida por 7 a 14 dias em estufa microbiológica a 28°C. A leitura ocorreu em duas etapas, com 7 e 14 dias de incubação. Uma das lamínulas foi retirada com uma pinça e colocada sobre uma lâmina com uma gota de lactofenol de Aman, para ser observada ao microscópio, visando identificar as estruturas de reprodução do fungo. Esse processo foi repetido no 14º dia de incubação e os fungos que não produziram estruturas reprodutivas foram classificados como *Mycelia sterilia* (CALUMBY et al., 2019; KANIA, 2004).

4.7 Descarte das amostras e materiais

Os meios de cultura e sacos estéreis, depois de utilizados, foram acondicionados num saco de autoclave e os tubos de ensaio com meio enriquecido em outro, de modo a facilitar o descarte. Ambos os itens foram autoclavados, a fim de eliminar a contaminação microbiana, por 20 minutos a 121°C (1,01 bar) e somente após a autoclavagem o saco de autoclave com os meios de cultura e sacos estéreis foi descartado e os tubos de ensaio foram lavados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises sensoriais

O capim limão tem suas características intrínsecas, as quais devem ser mantidas no produto durante todo o processo, desde a colheita até a venda direta ao consumidor final e até a sua validade. Tais características, segundo a Farmacopéia Brasileira, são: coloração verde-claro a verde-grisáceo, odor característico de citral e sabor característico. Todas as amostras apresentaram essas características, demonstrando que o produto não sofreu grandes alterações durante o processo de secagem e armazenamento.

Figura 2 - Amostras de *C. citratus* *in natura* e na embalagem de venda.



LEGENDA: A – amostras *in natura*; B – amostra da indústria; C,D e E – amostras do comércio a granel.

Fonte: Imagem do autor (2021).

5.2 Análises físico-químicas

Segundo a Farmacopeia Brasileira 6ª edição, o capim limão deve apresentar uma quantidade de matéria estranha inferior a 1% da amostra total, enquanto segundo a RDC 14/2014, deve apresentar menos que 75 fragmentos de insetos indicativos de falhas das boas práticas (não considerados indicativos de risco) em 25 g de amostra, 1,5% de areia ou cinzas insolúveis em ácido e 5 ácaros mortos em 10 g de amostra. Nenhuma das amostras apresentou qualquer material estranho.

Para umidade, o limite imposto pela RDC 272/2005 é de 12% para produtos de vegetais desidratados, sendo respeitado por todas as amostras desidratadas, excetuando-se as amostras *in natura*, conforme destacado na Tabela 1 - Resultados das análises físico-químicas.

Não há nenhuma legislação específica para cinzas totais e, dessa forma, foi utilizado como parâmetro o limite imposto pela monografia da Farmacopeia Brasileira 6ª edição, que é de no máximo 9%. Nenhuma das amostras teve como resultado valor maior do que o especificado, porém duas amostras chegaram a valores próximos ao limite, conforme destacado na Tabela 1 - Resultados das análises físico-químicas.

Tabela 1 - Resultados das análises físico-químicas.

Amostras	Local de coleta	Material Estranho	Umidade (%)	Cinzas totais (%)
Amostra 1	<i>In natura</i>	Não encontrado	75,4	2,6
Amostra 2	<i>In natura</i>	Não encontrado	62	2,1
Amostra 3a	Indústria	Não encontrado	11,6	6,7
Amostra 3b	Indústria	Não encontrado	11,5	6,9
Amostra 4a	Comércio 1	Não encontrado	9,7	8,8
Amostra 4b	Comércio 1	Não encontrado	9,6	8,7
Amostra 5a	Comércio 2	Não encontrado	12	8,7
Amostra 5b	Comércio 2	Não encontrado	9,7	9
Amostra 6a	Comércio 3	Não encontrado	9,2	6,5
Amostra 6b	Comércio 3	Não encontrado	83	6,5

Fonte: O autor (2021).

5.3 Análises microbiológicas

A metodologia das análises foi feita conforme descrito na Farmacopeia Brasileira 6ª edição em conjunto com a RDC 331/2019 e IN 60/2019, que fornecem os limites microbianos para alimentos. Segundo a ANVISA, as análises de contagem total de aeróbios mesófilos e bolores e leveduras não se aplicam a todos os

produtos, inclusive para chás (categoria em que o capim limão se enquadra), com a justificativa de que essas análises interferem apenas na durabilidade/degradação do produto e, portanto, não há limite microbiano para elas. Apesar disso, essas análises foram incluídas no presente trabalho, pois a quantidade de organismos aeróbios mesófilos no produto possibilita verificar com qual facilidade um microrganismo patogênico pode se proliferar no alimento e os bolores e leveduras podem estar relacionados à presença de micotoxinas.

A Tabela 2 - Resultados das análises microbiológicas. apresenta os resultados das análises microbiológicas, apresentando em destaque os maiores valores para contagem total de aeróbios mesófilos e contagem de bolores e leveduras.

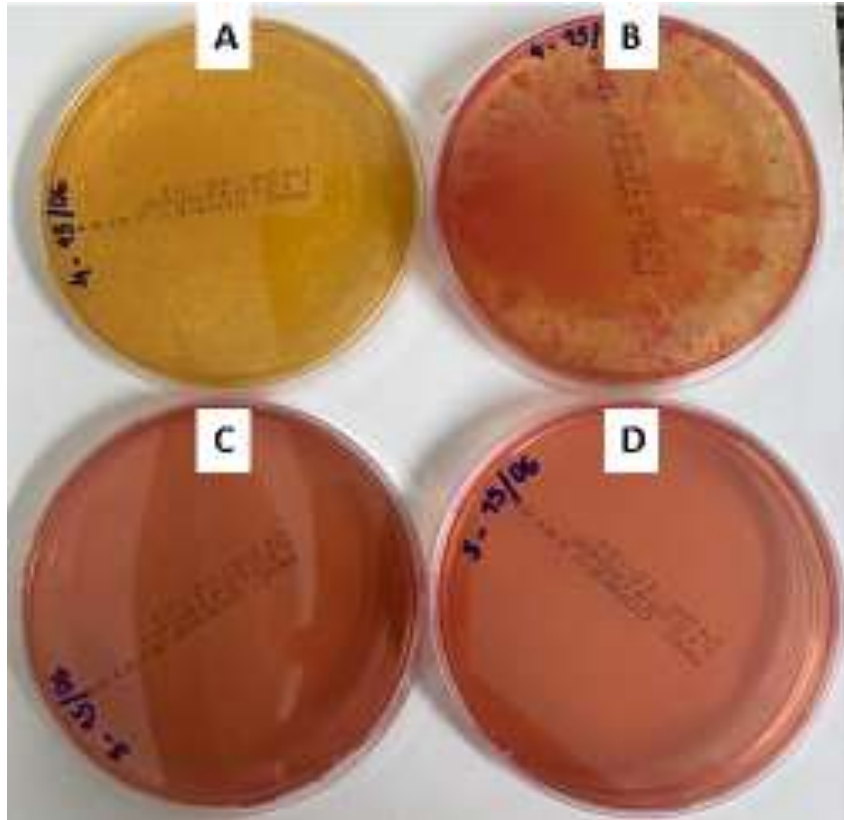
Tabela 2 - Resultados das análises microbiológicas.

Amostras	Local de coleta	Contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos	Contagem de bolores e leveduras	Pesquisa de <i>E. coli</i>	Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp.
Amostra 1	<i>In natura</i>	8,7x10 ⁴ UFC/g	3,2x10 ⁴ UFC/g	Ausente	Ausente
Amostra 2	<i>In natura</i>	6,4x10⁵ UFC/g	7,3x10⁴ UFC/g	Ausente	Ausente
Amostra 3a	Indústria	1,3x10 ⁵ UFC/g	1x10 ² UFC/g	Ausente	Ausente
Amostra 3b	Indústria	1,9x10 ⁵ UFC/g	1x10 ² UFC/g	Ausente	Ausente
Amostra 4a	Comércio 1	5,7x10⁵ UFC/g	3,2x10 ⁴ UFC/g	Ausente	Ausente
Amostra 4b	Comércio 1	6,7x10⁵ UFC/g	4,2x10⁴ UFC/g	Ausente	Ausente
Amostra 5a	Comércio 2	2,2x10 ⁴ UFC/g	1,6x10 ⁴ UFC/g	Ausente	Ausente
Amostra 5b	Comércio 2	1,2x10 ⁴ UFC/g	4x10⁴ UFC/g	Ausente	Ausente
Amostra 6a	Comércio 3	2,8x10 ⁴ UFC/g	2,1x10 ⁴ UFC/g	Ausente	Ausente
Amostra 6b	Comércio 3	4,5x10 ⁴ UFC/g	2x10 ⁴ UFC/g	Ausente	Ausente

Fonte: O autor (2021).

Em nenhuma das amostras foi identificada a presença de *E. coli* nem de *Salmonella* sp., indicando que não ocorreram falhas na higiene durante o processamento nem de armazenamento dos produtos ou que essas bactérias não utilizam o produto como substrato.

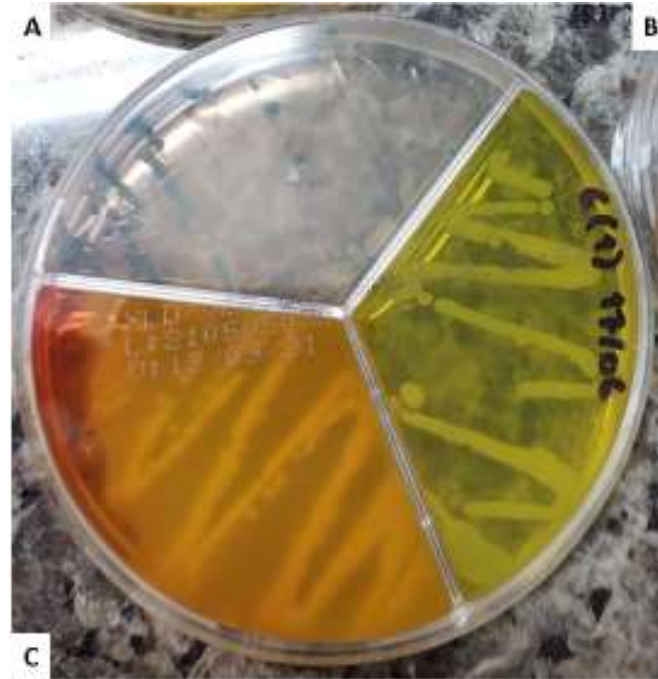
Figura 3 - Reverso de Ágar MacConkey com as culturas bacterianas.



LEGENDA: A – ágar com crescimento de colônias incolores e meio com coloração amarelada, indicando a não fermentação de lactose; B – ágar com crescimento de colônias incolores e meio com coloração avermelhada, indicando que houve fermentação de lactose; C e D – ágar sem crescimento bacteriano.

Fonte: Imagem do autor (2021).

Figura 4 - Triplaca ágar XLD, ágar Verde Brilhante e ágar *Salmonella* Cromogênico.



LEGENDA: A – ágar salmonela cromogênico com crescimento de colônias de coloração azul, indicação negativa de *Salmonella*; B – ágar verde brilhante com colônias amarelas e meio com coloração amarelada, indicação negativa de *Salmonella*; C – ágar XLD com colônias de coloração amarela e meio de coloração amarelada, indicação negativa de *Salmonella*.

Fonte: Imagem do autor (2021).

Na contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos, o valor mais alto foi obtido na amostra 4b (comércio 1) com $6,7 \times 10^5$ UFC/g, seguido por amostra 2 (*in natura*) com $6,4 \times 10^5$ UFC/g e amostra 4a (comércio 1) com $5,7 \times 10^5$ UFC/g, todos dentro dos parâmetros da farmacopeia brasileira de 10^7 UFC/g. Esses resultados, apesar de estarem dentro dos parâmetros aceitáveis, indicam que há condições favoráveis para que haja a proliferação de microrganismos, caso algum patógeno entre em contato com os produtos.

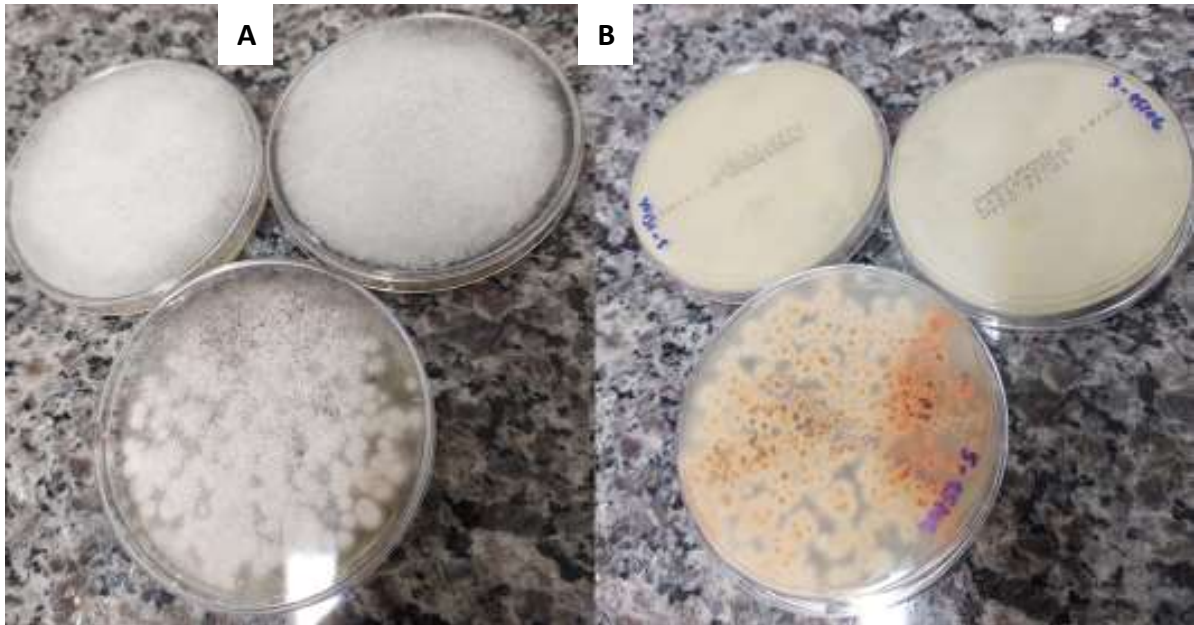
Figura 5 - Ágar TSA com crescimento de colônias não filamentosas.



Fonte: Imagem do autor (2021).

Na contagem de bolores e leveduras, o valor mais alto foi obtido na amostra 2 (*in natura*) com $7,3 \times 10^4$ UFC/g, seguido por amostra 4b (comércio 1) com $4,2 \times 10^4$ UFC/g e amostra 5b (comércio 2) com 4×10^4 UFC/g. De todas as amostras, as únicas que tiveram contagens abaixo do limite farmacopeico de 10^4 UFC/g foram a 3a e 3b, ambas da indústria. Esse resultado indica que o processo de dessecamento que acontece antes da amostra ir para a indústria gera uma diminuição da quantidade de fungos, prevenindo o produto de ser degradado rapidamente e melhorando seu tempo de prateleira. Porém, a alta quantidade de fungos encontrada nas amostras pós-indústria revela que não há um cuidado com o manuseio e/ou armazenamento do produto, uma vez que não foi observada, em nenhum dos três pontos de comércio, a higienização dos utensílios utilizados ou recipientes bem fechados. Essa alta quantidade de fungos provavelmente afeta a estabilidade do produto, uma vez que estes organismos agem como degradadores de matéria orgânica, causando alterações que, se prolongadas, afetarão a qualidade do produto (BAPTISTA; VENÂNCIO, 2003; ANVISA, 2021).

Figura 6 - Ágar Sabouraud com crescimento fúngico após incubação por 3 dias à temperatura de $22,5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.



LEGENDA: A – verso das placas contendo crescimento de fungos filamentosos; B – reverso das placas contendo crescimento de fungos filamentosos.

Fonte: Imagem do autor (2021).

5.4 Identificação dos microrganismos presentes nas amostras

5.4.1 Bactérias

Após a conclusão das análises foi feita a identificação dos microrganismos encontrados. Com o Bactray 1 foram encontradas as seguintes espécies bacterianas (com a porcentagem de aceitação): *Klebsiella oxytoca* (99,94%) na amostra 1, *Klebsiella ozaenae* (35,11%) na amostra 4, *Yokenella regensburgei* (84,55%) na amostra 2, *Hafnia alvei* (64,51%) na amostra 4, *Enterobacter asburiae* (95,02%) na amostra 4, *Moellerella Wisconsinensis* (34,21%) na amostra 5, *Pantoea dispersa* (14,16%) na amostra 5, *Cedecea neteri* (48,05%) na amostra 6, *Pseudomonas luteola* (23,3%) na amostra 6 e *Providencia stuartii* (88,37%) na amostra 6. Desses organismos, pode-se salientar que somente *K. oxytoca*, *Y. regensburgei*, *E. asburiae* e *P. stuartii* tiveram a porcentagem de aceitação alta, indicando que a identificação foi feita corretamente.

Klebsiella oxytoca é uma bactéria Gram-negativa não móvel que possui uma cápsula proeminente de polissacarídeos que confere resistência aos mecanismos de defesa do hospedeiro. Encontrada no intestino de humanos e animais, na água, no

solo e em plantas, é comumente associada a infecções oportunistas em pacientes imunossuprimidos, prolongando a estadia nos hospitais devido a broncopneumonia, infecções no trato urinário e septicemia (infecção generalizada), e vem ganhando mais significância por desenvolver uma resistência a múltiplas drogas (SINGH et al., 2016; TRIVEDI et al., 2015; BRISSE; VERHOEF, 2001).

Yokenella regensburgei é uma bactéria móvel, oxidase negativa e não fermenta lactose. Possui relevância clínica desconhecida e poucos estudos sobre a susceptibilidade a antibióticos foram executados, porém é semelhante fenotipicamente a *Hafnia alvei* e *Salmonella enterica*, conhecidas por causar infecções intestinais. É isolada principalmente em ambientes hospitalares, de urina, feridas e fezes (STOCK et al., 2004; JAIN et al., 2013; LO; CHUANG; LIN, 2011).

Enterobacter asburiae, bactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa não esporulada, é considerada um biorremediador de solo devido a sua capacidade de degradar xenobioticos, como pesticidas, além de possuir a capacidade de converter ácido fórmico em hidrogênio (MARDANEH; DALLAL, 2016; AHEMAD; KHAN, 2010; SHIN et al., 2007). Lau et al. (2013) afirma ainda que a presença de *E. asburiae* pode inibir em mais de 100 vezes o crescimento de *Salmonella enterica* e *E. coli*.

Providencia stuartii pode ser identificada por ser Gram-negativa e fermentar manitol, além de utilizar citrato como fonte de carbono. É multirresistente a antibióticos, sendo um patógeno oportunista nosocomial e tem grande correlação de infecção com a idade avançada, hospitalização prévia e prévio tratamento com antibióticos dos pacientes, sendo isolada principalmente de urina de pacientes que utilizaram cateter urinário por longos períodos (TUMBARELLO et al., 2004; SIPAHI et al., 2010).

Das bactérias identificadas, *K. oxytoca* foi encontrada por Gundogan e Avci (2013) como patógeno transmitido por alimentos de origem animal e Nyenje et al. (2012) em tortas, batatas e vegetais vendidos em cafeterias de beira de estrada. Mardaneh e Dallal (2016) isolaram *E. asburiae* em fórmula de leite infantil num hospital no Irã, onde vários bebês foram contaminados; em contrapartida, Gong et al. (2019) alegam que sua presença em alimentos estocados pode servir como agente limitador do crescimento de patógenos fúngicos produtores de toxinas. Ababouch et al. (1991) comentam sobre a presença de *P. stuartii* em sardinhas armazenadas tanto em temperatura ambiente quanto em gelo e relacionam sua produção de histamina com intoxicação alimentar e Al-Gburi (2020) menciona sua

presença em leite de vaca cru vendidos no Iraque com intoxicações alimentares. Somente *Y. regensburgei* não apresenta dados literários relacionando sua presença em alimentos com infecção em humanos.

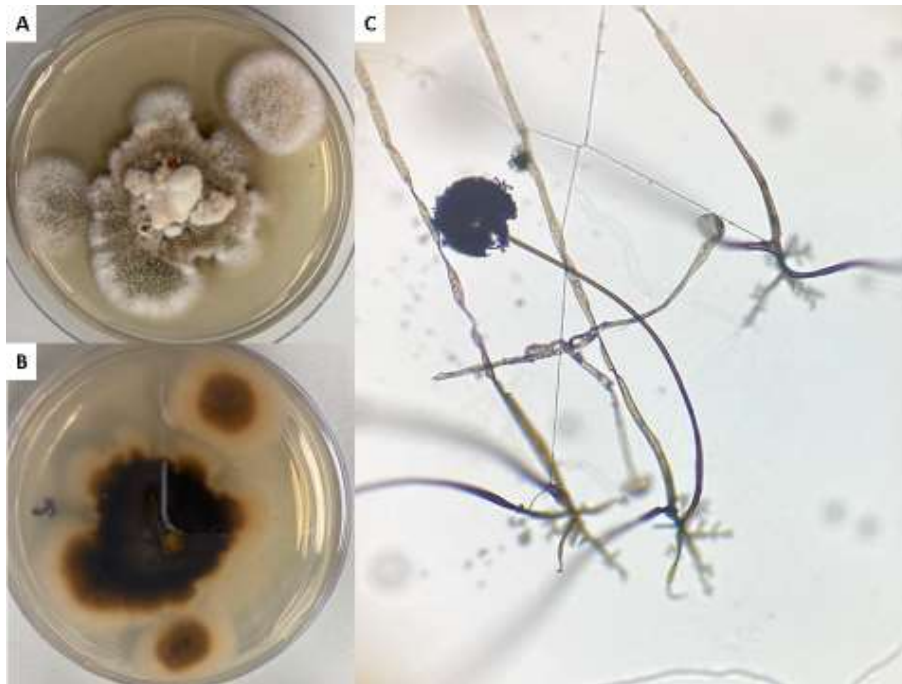
5.4.2 Fungos

Na identificação dos fungos foram encontrados exemplares dos gêneros *Rhizopus*, *Mucor*, *Fonsecaea* e exemplares *Mycelia sterilia* — fungos que não apresentam crescimento de estruturas reprodutivas, dificultando sua identificação.

A variedade fúngica, apesar de não ser muito grande, tem a presença de três fungos patogênicos:

Rhizopus (Figura 7 - *Rhizopus* sp. após crescimento por 7 dias a 28°C em ágar BDA) apresenta crescimento rápido e tem como aspecto macroscópico a textura algodonosa, coloração esbranquiçada a amarronzada e reverso de coloração marrom amarelado e como aspecto microscópico a observação de hifas largas não septadas, o formato arredondado, a coloração escura do esporângio e a presença de rizóides. Tem sua presença indesejada por ser um agente degradador de alimentos, conforme citado anteriormente, prejudicando a estabilidade e o tempo de prateleira do produto. (ZHENG et al., 2007; PAULO, 2014; INUI; TAKEDA; IIZUKA, 1965; LONDOÑO-HERNÁNDEZ et al., 2017).

Figura 7 - *Rhizopus* sp. após crescimento por 7 dias a 28°C em ágar BDA.



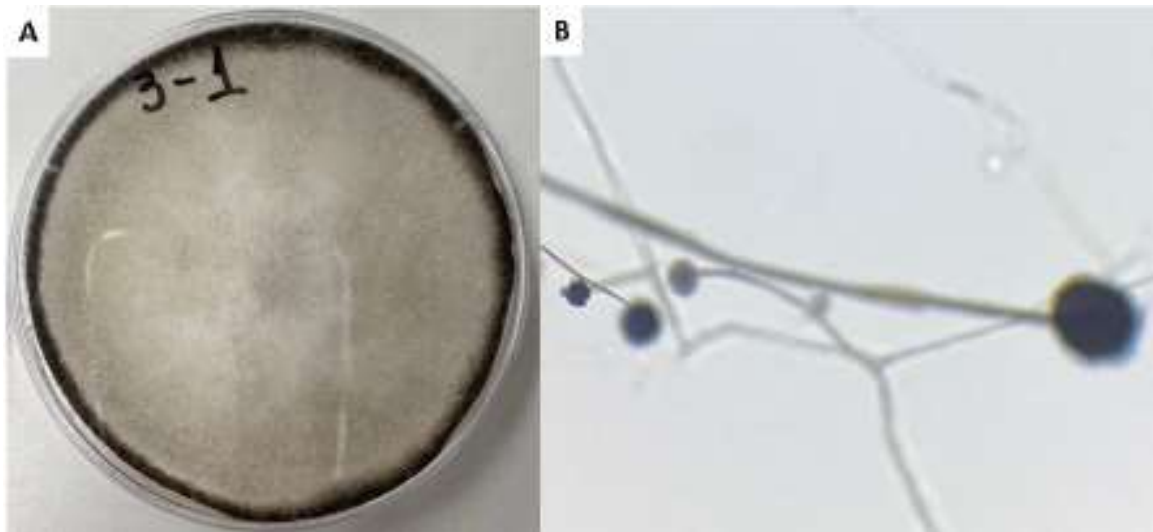
LEGENDA: A – Característica macroscópica do fungo no verso da placa; B – Característica macroscópica do fungo no reverso da placa; C – característica microscópica do fungo em 400x.

Fonte: Imagem do autor (2021).

Mucor também apresenta crescimento rápido, além de preenchimento completo da placa e seu aspecto macroscópico apresenta colônia algodonosa com superfície esbranquiçada e pontos pretos e aspecto microscópico com hifas não septadas, esporângios arredondados e coloração escura, semelhantes aos de *Rhizopus*, porém sem a formação de rizóides. Também é considerado um contaminante comum, com presença indesejada por sua ação degradadora de alimentos e pode causar a mucormicose, conforme mencionado por Paterson e Lima (2017), onde relacionam sua presença em alimentos cozidos, vegetais, queijo, iogurte e soja com infecções em humanos imunossuprimidos (DOMKA et al., 2019; BOTHÁ; BOTES, 2014; SNYDER; CHUREY; WOROBO, 2016; ALMEIDA, 2019; FERNÁNDEZ et al., 2001).

Mucor e *Rhizopus* são fungos zigomicetos (Mucorales) causadores da mucormicose, doença que afeta a região rinocerebral (quando inalados), a pele (quando em contato com feridas) e região gastrointestinal (quando ingeridas) de pessoas imunodeprimidas, facilmente evoluindo para casos graves e gerando óbitos em cerca de 65% dos infectados (GALVÃO et al., 2005; WITTIG et al., 1973, XAVIER; KORN; GRANATO, 2004);

Figura 8 - *Mucor* sp. após crescimento por 7 dias a 28°C ágar BDA.



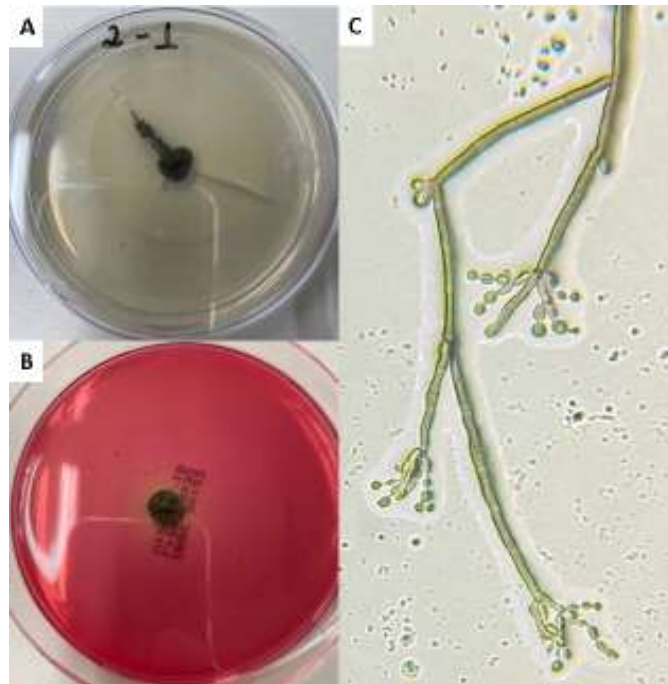
LEGENDA: A – Característica macroscópica do fungo; B – Característica microscópica do fungo em 400x.

Fonte: Imagem do autor (2021).

Fonsecaea apresenta colônias filamentosas de coloração cinza esverdeada e em microscopia se apresenta com hifas septadas, coloração esverdeada e conídios externos que, quando em tecido epidérmico, tem a capacidade de digerir suas proteínas causando lesões na pele, infecção chamada de cromoblastomicose. A infecção pode ocorrer pela implantação de conídios e fragmentos de hifas presentes em plantas, galhos, solo ou detritos, que aderem ao tecido epitelial em feridas abertas - geralmente nas extremidades inferiores - e se diferenciam em células escleróticas, gerando placas verrucosas ou nódulos, que podem evoluir para úlcera. Outra possível via de infecção é a inalação de esporos (ALVIANO et al., 1991; SANTOS, 2009; CORREIA et al., 2010; MATTE et al., 1997; SILVA et al., 1992; TORRES et al., 2010).

Não foram encontrados dados na literatura relacionando sua presença em alimentos com infecções em humanos, entretanto, por ser um patógeno humano importante, sua ocorrência é motivo de preocupação.

Figura 9 - *Fonsecaea* sp. após crescimento por 7 dias a 28°C ágar BDA.

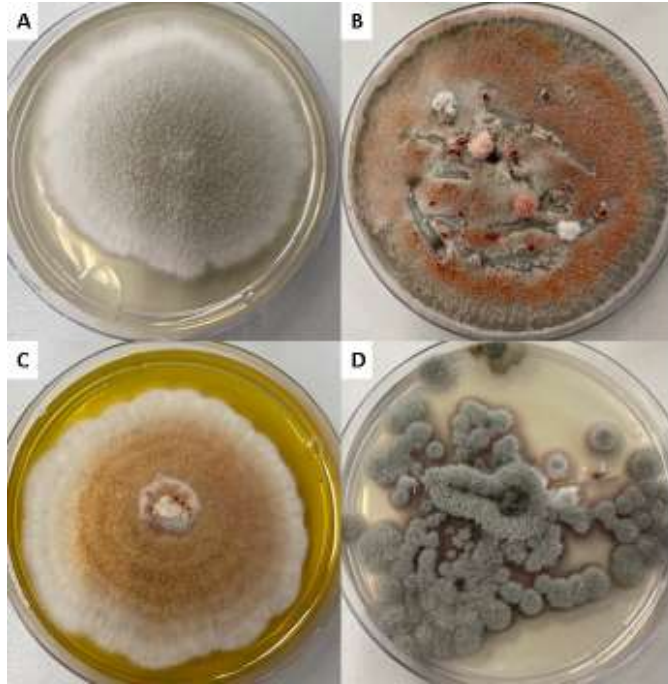


LEGENDA: A – Característica macroscópica do fungo em ágar BDA; B – Característica macroscópica do fungo em ágar DRBC; C – característica microscópica do fungo em 400x.

Fonte: Imagem do autor (2021).

Mycelia sterilia é um grupo artificial que engloba os fungos filamentosos que não produzem estrutura reprodutiva e, segundo COSTA (2003), a causa provável é por não estarem em associação com o hospedeiro. Neste trabalho foram identificados quatro tipos de fungos, ilustrados na Figura 10 - Fungos , que não produziram estruturas reprodutivas, sendo que para três deles (fungos B, C e D) há a possibilidade de que produzissem caso fossem crescidos por mais tempo ou em outros meios de cultura. O fungo A, por sua vez, apresenta um micélio tênue e esbranquiçado e não há indícios de formação de estruturas reprodutivas, sendo, portanto, considerado como *Mycelia sterilia*.

Figura 10 - Fungos sem estruturas de reprodução após crescimento por 7 dias a 28°C ágar BDA.



LEGENDA: A – *Mycelia sterilia*; B, C e D - Características macroscópica dos fungos que não apresentaram crescimento de estruturas reprodutivas.

Fonte: Imagem do autor (2021).

Em nenhuma das amostras foram encontrados os fungos conhecidos por contaminarem alimentos armazenados, *Aspergillus* spp, produtor de aflatoxinas e ocratoxinas, nem *Penicillium* spp, produtor de ocratoxina A, responsável por redução das funções renais em humanos (PAULUS, 2021).

Segundo Santos et al. (2013), o consumo de alimentos contaminados com fungos patogênicos, como os mencionados nesse trabalho, pode ser prejudicial ao consumidor, dependendo da eficiência do seu sistema imune também da quantidade de fungos presentes nesses alimentos.

6 CONCLUSÕES

- Não foram encontradas contaminações por *E. coli* e *Salmonella* (cumprindo o exigido pela RDC 331/19 e IN 60/19), mostrando que o alimento foi preparado utilizando-se as boas práticas de fabricação do produto
- Em relação aos cuidados de armazenamento do produto, somente a amostra da indústria cumpriu os padrões microbiológicos para bolores e leveduras estabelecidos pela Farmacopéia Brasileira 6ª edição.
- Foram encontradas nas amostras as bactérias *Klebsiella oxytoca* (amostra 1), *Yokenella regensburgei* (amostra 2), *Enterobacter asburiae* (amostra 4) e *Providentia stuartii* (amostra 6), relacionadas com intoxicações alimentares, principalmente em hospitais.
- Os valores da contagem total de organismos aeróbios mesófilos, apesar de todas as amostras estarem dentro dos limites exigidos pela farmacopeia brasileira 6ª edição, são indicativos de baixa qualidade do produto, em que se faz necessária a adoção das Boas Práticas de Fabricação tanto por produtores, quanto pela indústria e pontos de comércio.
- Foram encontrados os fungos *Fosecaea* sp., *Rhizopus* sp. e *Mucor* sp., todos capazes de causar algum tipo de infecção em humanos, principalmente os imunossuprimidos. No entanto, apesar de não haver na legislação um padrão para fungos em chás, é importante salientar que o manuseio incorreto durante a colheita e o tratamento inadequado do produto para venda, como o método de secagem, pode prejudicar a saúde do consumidor e a vida útil do alimento.

REFERÊNCIAS

ABABOUC, L. et al. Identification of histamine-producing bacteria isolated from sardine (*Sardina pilchardus*) stored in ice and at ambient temperature (25°C). **Food Microbiology**, v.8, n.2, p.127-136, 1991.

ABREU, E. S. et al. Alimentação mundial: uma reflexão sobre a história. **Saúde e sociedade**, v. 10, n. 2, p. 3-14, 2001.

AGNOLIN, C.A; OLIVO, C.J; PARRA, C.L.C. Efeito do óleo de capim limão (*Cymbopogon flexuosus* Stapf) no controle do carrapato dos bovinos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, p.77-82, 2014.

AHEMAD, M; KHAN, M.S. Plant growth promoting activities of phosphate solubilizing *Enterobacter asburiae* as influenced by fungicides. **EurAsian Journal of BioSciences**, v.4, n.1, p.88-95, 2010.

AL-GBURI, N.M.A. Isolation and Molecular Identification and Antimicrobial Susceptibility of *Providencia* spp. from Raw Cow's Milk in Baghdad, Iraq. **Veterinary Medicine International**, v.2020, 2020.

ALMEIDA, A.C. **Bioprospecção de fungos amilolíticos e caracterização bioquímica da amilase de *Mucor* sp. ad742 visando aplicação na hidrólise do amido**. Dissertação (Mestrado em Biocombustíveis) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha, Diamantina (MG), 93p. 2019.

ALVES, A. R. F. **Doenças alimentares de origem bacteriana**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto (Portugal), 87p. 2012. Disponível em: https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/3756/3/PPG_AnaAlves.pdf. Acesso em: 08 abr. 2021.

ALVIANO, C.S. et al. Characterization of *Fonsecaea pedrosoi* melanin. **Journal of General Microbiology**, v.134, n.4, p.837-844, 1991.

ANS - Agência Nacional de Saúde Suplementar. **Ministério da Saúde faz alerta sobre surto de infecção por bactéria**, 2011. Retirado de: <<https://www.ans.gov.br/a-ans/sala-de-noticias-ans/qualidade-da-saude/625-ministerio-da-saude-faz-alerta-sobre-surto-de-infeccao-por-bacteria#:~:text=para%20evitar%20transmiss%C3%A3o-,A%20E.,tamb%C3%A9m%20pode%20transmitir%20a%20bact%C3%A9ria>>. Acesso em 08 abr. 2021.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia Brasileira**, v.1. 6ª Ed. Brasília, 2019.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia Brasileira**, v.2. 6ª Ed., p.145-150 Brasília, 2019.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Perguntas e Respostas sobre padrões microbiológicos**, 3ª ed., Brasília, fevereiro de 2021. Retirado de: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/alimentos/perguntas-e-respostas/padroes-microbiologicos.pdf/view>> Acesso em 17 abr. 2021.

ATILA, F; OWAID, M.N; SHARIATI, M.A. The nutritional and medical benefits of agaricus bisporus : a review. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v.7, n.3, p.281-286, 2017.

BAPTISTA, P; VENÂNCIO, A. **Os perigos para a segurança alimentar no processamento de alimentos**. Guimarães: Forvisão - Consultoria em Formação Integrada, Lda., 2003.

BARRETTO, R. J.; SILVA, L. R. **Intoxicações alimentares. Divisão de doenças micóticas e bacterianas**. Disponível em: http://www.medicina.ufba.br/educacao_medica/graduacao/dep_pediatria/disc_pediatria/disc_prev_social/roteiros/diarreia/intoxicacoes.pdf. Acesso em 08 abr. 2021.

BETT, M. S. **O uso popular de plantas medicinais utilizadas no tratamento da ansiedade no município de Galvão - SC**. Monografia (Licenciatura em Ciências Biológicas) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis (SC). 2013. Disponível em: <https://uab.ufsc.br/biologia/files/2014/05/Marisa-Szczepanski-Bett.pdf>. Acesso em: 08 abr. 2021.

BHALLA, T.C. et al. International laws and food-borne illness. In: **Food Safety and Human Health**. Academic Press, 2019. p. 319-371.

BOTHA, A; BOTES, A. *Mucor*. **Encyclopedia of food microbiology**, v.2, p.834-840, 2014.

BRAGA, C. M. **Historico da utilização de plantas medicinais**. Monografia (Licenciatura em Biologia) - Universidade de Brasília, Brasília (DF), 2011. Disponível em: https://bdm.unb.br/bitstream/10483/1856/1/2011_CarladeMoraisBraga.pdf. Acesso em: 08 abr. 2021.

BRASIL. **Portaria Nº 971, de 03 de Maio de 2006**. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. Diário Oficial da União, Brasília DF, 04 mai. 2006.

BRASIL. **Portaria Nº 1.600, de 17 de Julho de 2006**. Aprova a constituição do Observatório das Experiências de Medicina Antroposófica no Sistema Único de Saúde (SUS). Diário Oficial da União, Brasília DF, 18 jul. 2006.

BRASIL. **Portaria Nº 1.600, de 17 de Julho de 2006**. Aprova a constituição do Observatório das Experiências de Medicina Antroposófica no Sistema Único de Saúde (SUS). Diário Oficial da União, Brasília DF, 18 jul. 2006.

BRISSE, S; VERHOEF, J. Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, gyrA and parC genes sequencing and automated ribotyping. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, n.3, p.915-924, 2001.

CALUMBY, R.J.N. et al. Isolamento e identificação da microbiota fúngica anemófila em Unidade de Terapia Intensiva. **Braz. J. of Develop.** v.5, n.10, p. 19708-19722, 2019.

CANESQUI, A. M. A qualidade dos alimentos: análise de algumas categorias da dietética popular. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.20, n.2, p. 203-216, 2007.

CORREIA, R.T.M. et al. Cromoblastomicose: relato de 27 casos e revisão da literatura. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.85, p.448-454, 2010.

COSTA, I.P.M.W. **Fungos endofíticos isolados de vegetais do manguezal do Rio Paripe, Ilha de Itamaracá, Pernambuco, Brasil.** Dissertação (Mestrado em Micologia Básica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, 82p. 2003.

COSTA, K. P. et al. Qualidade de amostras de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf). **Brazilian Journal of Health and Pharmacy**, v.1, n. 1, p.5-11, 2019.

CUNHA, L.F; AMICHI, K.R. Relação entre a ocorrência de enteroparasitoses e práticas de higiene de manipuladores de alimentos: revisão da literatura. **Revista Saúde e Pesquisa**, v.7, n.1, p.147-157, jan./abr. 2014.

DALMOLIN, S.F; PERSEL, C; CRUZ-SILVA, C.T.A. Alelopatia de capim-limão e sálvia sobre a germinação de picão preto. **Revista Cultivando o saber**, v. 5, n. 3, p. 176-189, 2012.

DOMKA, A et al. *Mucor* sp.- An endophyte of Brassicaceae capable of surviving in toxic metal-rich sites. **Journal of Basic Microbiology**, n.59, p. 24-37, 2019

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Empenho internacional para melhorar a segurança alimentar, 2019. Disponível em: <<https://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/en/c/1180378/>>. Acesso em 19 de dezembro de 2021.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO e PNUMA convocam movimento no Brasil para reduzir perdas e desperdícios de alimentos, 2021. Disponível em: < <https://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/pt/c/1442163/>>. Acesso em 19 de dezembro de 2021.

FDA - Food and Drugs Administration. **Salmonella (Salmonellosis)**, 2019. Retirado de: <<https://www.fda.gov/food/foodborne-pathogens/salmonella-salmonellosis>>. Acesso em 08 abr. 2021.

FERNÁNDEZ, C.A.P. et al. Colonización benigna sinusal por *Mucor* asociada a desviación septal. **Acta Otorrinolaringol Esp**, v.52, n.2, p. 157-161, 2001.

GOMES, E. C.; NEGRELLE, R. R. B. Análise da cadeia produtiva do capim limão: estudo de caso. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.17, n.2, p.201-209, 2015.

GONG, A.D. et al. Antifungal activity of volatile emitted from *Enterobacter asburiae* Vt-7 against *Aspergillus flavus* and aflatoxins in peanuts during storage. **Food Control**, v.106, p.106718-106726, 2019.

GUIMARÃES, L.G.L et al. Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim limão e do citral. **Revista Ciência Agronômica**, v.42, n.2, p.464-472, abr-jun, 2011.

GUNDOGAN, N.; AVCI, E. Prevalence and antibiotic resistance of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species isolated from foods of animal origin in Turkey. **African journal of microbiology research**, v.7, n.31, p.4059-4064, 2013.

HUSS, H. H. Assurance of seafood quality. **FAO Fisheries Technical Paper**, n. 334, 1993, 169p.

INUI, T; TAKEDA, Y; IIZUKA, H. Taxonomical studies on genus *Rhizopus*. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 1, n. Suplemento, p.1-121, 1965.

JAIN, S. et al. *Yokenella regensburgei* infection in India mimicking enteric fever. **Journal of Medical Microbiology**, v.62, n.6, p.935-939, 2013.

JAYACHANDRAN, M; XIAO, J; XU, B. A critical review on health promoting benefits of edible mushrooms through gut microbiota. **International Journal of Molecular Sciences**, v.18, n.9, p.1934, 2017.

KANIA C.E. **Isolamento e identificação de fungos associados ao café (Coffea arabica L.) produzido por sistema orgânico e convencional da variedade IAPAR 59**. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba (PR), 56p. 2004.

KERN, M.E; BLEVINS, K.S. **Micologia Médica**. 2 ed. São Paulo: Premier, 1999.

KRIJGSHELD, P. et al. Development in *Aspergillus*. **Studies in mycology**, v.74, p.1-29, 2013.

LAU, Y.Y. et al. Quorum Sensing Activity of *Enterobacter asburiae* Isolated from Lettuce Leaves. **Sensors**, v.13, n.10, p.14189-14199, 2013.

LO, Y.C; CHUANG, Y.W; LIN, Y.H. *Yokenella regensburgei* in an immunocompromised host: a case report and review of the literature. **Infection**, v.39, n.5, p.485-488, 2011.

LONDOÑO-HERNÁNDEZ, L. et al. *Rhizopus oryzae* – ancient microbial resource with importance in modern food industry. **International journal of food microbiology**, v.257, p.110-127, 2017.

LORENZI, H. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**, 2 ed. Nova Odessa - São Paulo: Instituto Plantarum, 2008.

MA, L.J. et al. Fusarium Pathogenomics. **Annual Review of Microbiology**, n.67, v.1, p. 399–416, 2013.

MACHADO, D.F.M. et al. Trichoderma no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, v.35, n.1, p. 274-288, 2012.

MARDANEH, J; DALLAL, M.M.S. Isolation and Identification *Enterobacter asburiae* from Consumed Powdered Infant Formula Milk (PIF) in the Neonatal Intensive Care Unit (NICU). **Acta Medica Iranica**, v.54, n.1, p. 39-43, 2016.

MATTE, S.M.W. et al. Cromoblastomicose no Rio Grande do Sul: relato de 12 casos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, p. 309-311, 1997.

MAZIERO, M. T., BERSOT, L. S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.12, n.1, p.89-99, 2010

MORATOYA, E. E. et al. Mudanças no padrão de consumo alimentar no Brasil e no mundo. **Revista de política agrícola**, n.1, ano XXII, Jan./Fev./Mar, 2013, p. 72-84.

MOURA, G.S. et al. Conservação pós-colheita de frutos de maracujá-amarelo por derivados de capim-limão (*Cymbopogon citratus*). **Ambiência - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais**, v.12, n.2, Maio/Ago, 2016.

NEGRELLE, R.R.B; GOMES, E.C. *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf : chemical composition and biological activities. **Rev. Bras. Pl. Med.** Botucatu, v.9, n.1, p.80-92, 2007.

NOGUEIRA, M. O.; DAMASCENO, M. L. V. Importância do sistema de gestão de qualidade para a indústria de alimentos. **Cad. Ciênc. Agrá.** v.8, n.3, p.84-93, 2016.

NYENJE, M.E. et al. Foodborne pathogens recovered from ready-to-eat foods from roadside cafeterias and retail outlets in Alice, Eastern Cape Province, South Africa: public health implications. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.9, n.8, p.2608-2619, 2012.

PARAPOULI, M. et al. *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. **AIMS Microbiol**, v.6, n.1, 2020.

PATERSON, R.R.M; LIMA, N. Filamentous fungal human pathogens from food emphasising *Aspergillus*, *Fusarium* and *Mucor*. **Microorganisms**, v.5, n.3, p.44, 2017.

PAULO, C.F.M. **Rhizopus e mucormicose: Fatores de risco, patogenicidade e novas opções de tratamento.** Monografia (Bacharel em Farmácia) - Universidade Federal de Campina Grande, Cuité (PB), 49p. 2014.

PAULUS, R.L. **Contaminação microbiológica em amostras de chás comerciais.** Monografia (Bacharelado em Agronomia), Universidade Federal da Fronteira Sul, Cerro Largo (RS), 40 p. 2021.

PINTO, U. M.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D. G. M. **Deterioração microbiana dos alimentos.** In: Microbiologia e higiene de alimentos: teoria e prática. Rio de Janeiro: Rubio, 2019.

PORTE, A.; MAIA, L. H. Alterações fisiológicas, bioquímicas e microbiológicas de alimentos minimamente processados. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 19, n. 1, 2001.

RAJPUT, H. et al. **Methods for food analysis and quality control**. In: Meghwal, Murlidhar; GOYAL, Megh R. State-of-the-Art Technologies in Food Science Human Health, Emerging Issues and Specialty Topics. Apple Academic Press, 2018, p. 299-320.

ROCHA, L.O; SOARES, M.M.S.R; CORRÊA, C.L. Análise da contaminação fúngica em amostras de *Cassia acutifolia* Delile (sene) e *Peumus boldus* (Molina) Lyons (boldo-do-Chile) comercializadas na cidade de Campinas, **Brasil. Braz. J. Pharm. Sci.** v.40, n.4, p. 521-527, out. / dez., 2004.

RUSSOMANO, O.M.R. et al. Flora micótica presente em chás e condimentos. **Biológico**, São Paulo, v.77, n.1, p.35-39, jan./jun., 2015.

SANTOS, C.J. **Atividade antifúngica in vitro de própolis em *Fonsecaea pedrosoi* utilizando ferramentas quimiométricas associadas à espectroscopia no infravermelho**. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

SANTOS, R.L. et al. Contaminação fúngica de plantas medicinais utilizadas em chás. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, n.34, v.2, p.289-293, 2013;

SHIN, J.H. et al. Fermentative hydrogen production by the newly isolated *Enterobacter asburiae* SNU-1. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.32, n.2, p.192-199, 2007.

SHINOHARA, N.K.S. et al. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.13, n.5, p.1675-1683, 2008.

SILVA, A.C.C.M. et al. Cromoblastomicose produzida por *Fonsecaea pedrosoi* no Estado do Maranhão. I-Aspectos clínicos, epidemiológicos e evolutivos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.25, p.37-44, 1992.

SILVA, J.C. et al. Atividade antimicrobiana de espécies de *Penicillium* mantidas sob duas condições de preservação. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**, n.30, p.48-54, 2010.

SINGH, L; CARIAPPA, M.P; KAUR, M. *Klebsiella oxytoca*: An emerging pathogen?. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 72, p. S59-S61, 2016.

SIPAHI, O.R. et al. Meningitis Due to *Providencia stuartii*. **Journal of Clinical Microbiology**. v.48, n.12, p.4667-4668, dezembro, 2010.

SOARES, C. M. G.; ABRUNHOSA, L.; VENÂNCIO, A. Fungos produtores de micotoxinas. **Portuguese Society for Microbiology Magazine**, 2013.

SNYDER, A.B; CHUREY, J.J; WOROBO, R.W. Characterization and control of *Mucor circinelloides* spoilage in yogurt. **International journal of food microbiology**, v.228, p.14-21, 2016.

STOCK, I. et al. Antimicrobial susceptibility patterns, β -lactamases, and biochemical identification of *Yokenella regensburgei* strains. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v.48, n.1, p.5-15, 2004.

TERRASAN, C.R.F. **Produção e caracterização do complexo xilanolítico de *Penicillium janczewskii***. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 81p. 2007.

TORRES, E. et al. Carcinoma epidermoide como complicação letal de lesões crônicas de cromoblastomicose. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.85, n.2, p.267-270, 2010.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**, 10. ed. São Paulo: Editora Artmed, 2012.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**, 6. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2015.

TRIVEDI, M.K. et al. Phenotypic and biotypic characterization of *Klebsiella oxytoca*: An impact of biofield treatment. **Microbial & Biochemical Technology**, v.7, n.4, p.202-205, 2015.

TUMBARELLO, M. et al. ESBL-producing multidrug-resistant *Providencia stuartii* infections in a university hospital. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.53, n.2, p.277-282, 2004.

VERONEZI, C.; CAVEIÃO, C. A importância da implantação das boas práticas de fabricação na indústria de alimentos. **Rev. Saúde e Desenvol.** v.8, n.4, jul-dez, 2015.

WANDERLEY, L. S. M. et al. Uso de plantas medicinais por indivíduos da comunidade do Valentina – PB. **Rev. Ciênc. Saúde Nova Esperança**, n.13, v.2, p. 99-105, dez. 2015.

ZENI, Ana Lúcia Bertarello et al. Utilização de plantas medicinais como remédio caseiro na Atenção Primária em Blumenau, Santa Catarina, Brasil. **Ciênc. saúde colet.**, n.8, v.22, Ago 2017.

ZHENG, R. et al. A Monograph of Rhizopus. **SYDOWIA-HORN**, v. 59, n. 2, p. 273, 2007.