

LARISSA ROLIM BORGES

**ANÁLISE DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICA (BOLORES
E LEVEDURAS) EM ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St.
Hil.) 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
1999

AGRADECIMENTOS

À DEUS que sempre esteve ao meu lado guiando os meus passos.

Ida Chapaval Pimentel, M.Sc. - Engenheira Agrônoma e professora do Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná pela sua amizade e orientação durante todo o tempo em que trabalhamos juntas.

Gabriel Adolfo Guimarães - Engenheiro Químico, Diretor Executivo - CEPPA que cedeu o local e material para o desenvolvimento deste trabalho.

Márcia Regina Beux, M.Sc. - Bióloga e Coordenadora dos Laboratórios de Alimentos - CEPPA pela orientação na realização deste trabalho.

À Anelise – Bióloga, responsável pelo Laboratório de Microbiologia - CEPPA pela paciência que teve comigo durante todo o tempo do meu estágio no seu laboratório.

À todas as pessoas que trabalham no CEPPA e que me auxiliaram em todas as etapas do meu trabalho.

À minha mãe (Janete) e as minhas irmãs (Lívia e Cíntia) que estiveram comigo durante todos os momentos de minha vida, e a quem devo todas as minhas conquistas.

Ao meu pai (Rogério - *in memoriam*) que nunca me deixou desistir dos meus ideais e que sempre estará ao meu lado.

À Dr^a Neusa Rucker por todo o apoio em meus trabalhos e principalmente pela sua amizade.

À Teresa Urban por ter me emprestado gentilmente seu livro Engenhos & Barbaquás o qual me auxiliou muito em minhas pesquisas.

À Kátia Elisa Saatkamp pelo empréstimo de algumas das fotos utilizadas na sua monografia.

À Renata Cordeiro Cequinel pelos mais de dez anos de amizade, e por suas palavras certas nos momentos exatos.

Ao Miguel Lanzaolo de Paula pela amizade e incentivo em minhas pesquisas com a erva-mate.

À Maria Aparecida Cassilha Zawadneak pela grande ajuda e atenção na fase final deste trabalho.

Ao Acyr José Tedeschi pela imensa colaboração na parte de computação.

Ao Sideval Ruppel pelas fotos usadas neste trabalho (que ficaram lindas!!).

À todos os professores e amigos que em algum momento caminharam ao meu lado, e fizeram parte da minha vida.

SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	2
2.1. Objetivo Geral.....	2
2.2. Objetivo Específico.....	2
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
3.1. Caracterização da Erva-Mate.....	3
3.2. Leveduras.....	4
3.3. Bolores.....	4
3.4. Micotoxinas.....	5
3.4.1 Toxinas e Micotoxicoses por <i>Aspergillus</i> sp.....	6
3.4.1.1. Aflatoxinas.....	7
3.4.1.2. Ocratoxina.....	8
3.4.2. Toxinas e Micotoxicoses por <i>Penicillium</i> sp.....	8
3.4.2.1. Rubratoxina.....	9
3.4.2.2. Patulina.....	9
3.4.2.3. Citrinina e Citreoviridina.....	9
3.4.3. Toxinas e Micotoxicoses por <i>Fusarium</i> sp.....	10
3.4.3.1. Fumonisinias.....	10
3.4.3.2. Zearalenona.....	11
3.4.3.3. Desoxinivalenol.....	11
3.4.3.4. Toxina T-2.....	12
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1. MATERIAL.....	13
4.1.1. Material geral.....	13

4.1.2. Meios de cultura.....	13
4.1.2.1. Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol.....	13
4.1.2.2. Ágar Batata Dextrosado.....	14
4.1.3. Clarificante - Lactofenol de Amann.....	14
4.2. MÉTODOS.....	15
4.2.1. Preparo das amostras.....	15
4.2.2. Plaqueamento em superfície.....	16
4.2.3. Contagem das colônias e cálculo dos resultados.....	17
4.2.4. Isolamento de Bolores.....	18
4.2.5. Identificação dos fungos potencialmente micotoxigênicos.....	18
4.2.5.1. Método de cultura em lâmina ou técnica do microcultivo.....	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
6. CONCLUSÃO.....	23
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Procedimento para o preparo das diluições.....	15
Figura 2: Inoculação superficial em meio DRBC.....	16
Figura 3: Bolores e leveduras em placas com meio DRBC nas três diluições.....	17
Figura 4: Método de cultura em lâmina ou técnica do microcultivo.....	19
Figura 5: Identificação dos bolores.....	20
Figura 6: Conidióforos de <i>Penicillium</i> sp.....	21
Figura 7: Conidióforos de <i>Aspergillus</i> sp.....	21
Figura 8: Estruturas de <i>Rhizopus</i> sp.....	21
Figura 9: Estruturas de <i>Rhizopus</i> sp.....	21

RESUMO

Os fungos, também chamados de bolores ou leveduras são organismos eucariotos heterotróficos, que tem parede celular rígida e podem ser uni ou multicelulares e devido a estas características, constituem um reino a parte, o Reino Fungi. Em condições favoráveis os esporos germinam, produzindo hifas, as quais invadem sementes, grãos e outros substratos.

As micotoxinas são produtos metabólicos secundários produzidos pelos bolores e quando ingeridas, causam alterações biológicas prejudiciais aos seres humanos e outros animais, estes metabólitos fúngicos são quimicamente bastante diversos e podem estar contidos no interior dos esporos de bolores, em seus micélios, ou então serem liberados no alimento contaminado por estes microrganismos.

Neste trabalho realizou-se uma análise da qualidade microbiológica (contagem de bolores e leveduras) de cinco marcas comerciais de erva-mate adquiridas em estabelecimentos comerciais da cidade de Curitiba, PR, Brasil, pelo método de plaqueamento em superfície, utilizando-se o meio Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol, onde das cinco amostras, duas apresentaram crescimento de bolores e leveduras e uma revelou contagem superior ao estabelecido pela Portaria 451 de 19 de setembro de 1997 do Ministério da Saúde (que estabelece os padrões microbiológicos para alimentos). Os bolores isolados e identificados foram: *Aspergillus sp* (62,125%), *Penicillium sp* (32,355%) e *Rhizopus sp* (5,520%), sendo os dois primeiros considerados potencialmente micotoxigênicos.

1. INTRODUÇÃO

Neste trabalho selecionou-se a erva-mate como o alimento a ser testado, por ser um produto de exploração nativa da Região Cone Sul, amplamente utilizado como bebida estimulante neuromuscular e a presença de micotoxinas neste e em outros alimentos constituir-se num risco à saúde pública.

As micotoxinas são metabólitos secundários, produzidos por certos fungos em crescimento, podendo contaminar grãos e sementes durante o amadurecimento da planta, na colheita, no armazenamento, no processamento e até mesmo no transporte.

A incidência de micotoxinas e as micotoxicoses não estão restritas a um determinado clima, região geográfica ou país. É difícil de estimar a extensão dos problemas causados pelas micotoxinas, pois as toxinas podem ocorrer em baixas concentrações dificultando a sua detecção e os sinais de micotoxicoses podem ser confundidos com outras doenças, dificultando a sua caracterização. Um dos efeitos mais comuns do consumo de níveis baixos de micotoxinas é a predisposição às infecções causadas por doenças normalmente presentes no meio ambiente (LAZZARI, 1997).

O presente trabalho teve por objetivos analisar a qualidade microbiológica de cinco marcas de erva-mate, adquiridas em estabelecimentos comerciais da cidade de Curitiba, PR, Brasil e realizar a identificação de fungos potencialmente produtores de micotoxinas.

2. OBJETIVO

2.1. OBJETIVO GERAL

Isolamento de fungos potencialmente produtores de micotoxinas em erva-mate, utilizando como substrato na contagem de fungos (bolores e leveduras) o Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Contagem e identificação dos gêneros mais ocorrentes potencialmente produtores de micotoxinas em erva-mate.

Controle de qualidade microbiológico de 5 marcas comerciais de erva-mate (contagem de bolores e leveduras).

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. CARACTERIZAÇÃO DA ERVA-MATE

A erva-mate *Ilex paraguariensis* St. Hill, 1922 faz parte da família Aquifoliaceae que conta com cerca de 600 espécies, 10% delas ocorrentes no Brasil. Cresce na Floresta Ombrifolia Mista, um ecossistema associado do domínio da Mata Atlântica, que originalmente abrangia áreas do território dos estados de Mato Grosso, São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, da região leste do Paraguai e uma pequena parte do nordeste da Argentina (MIRANDA & URBAN, 1998).

A erva-mate é uma árvore de 10 a 15 metros de altura, o caule é um tronco de cor acinzentada, com aproximadamente 20 a 25 cm de diâmetro, as folhas são alternas, subcoriáceas até coriáceas e mostram-se estreitas na base e ligeiramente obtusas no vértice com bordas providas de pequenos dentes, o fruto é uma baga-dupla globular muito pequena, de cor verde quando novo, passando a vermelho-arroxeadado em sua maturidade, que ocorre de dezembro até março (MAZUCHOWSKI, 1989).

As flores são pequenas, pedunculadas e dispostas na axila das folhas superiores. Em relação ao comportamento das flores, a erva-mate é dióica e floresce de setembro até dezembro com período predominante em outubro (MAZUCHOWSKI, 1989).

A erva-mate possui uma área de dispersão geográfica que compreende a região centro-oeste do Rio Grande do Sul, passando através de quase todo o Estado de Santa Catarina, penetrando no Estado do Paraná, avança a região centro-sul estendendo-se a nordeste para o Estado de São Paulo (limitando-se a pequena zona situada na região sudeste). Por outro lado, a oeste do Paraná segue em direção à região sul do Mato Grosso do Sul, abrangendo ainda parte da província de Misiones na Argentina, e a parte oriental do Paraguai (MAZUCHOWSKI, 1989).

3.2. LEVEDURAS

As leveduras, como os bolores, são fungos, mas deles se diferenciam por se apresentarem, usual e predominantemente, sob forma unicelular, com forma variada, de esférica a ovóide e de elipsóide a filamentosa (PELCZAR *et al.*, 1996). Como células simples, as leveduras crescem e se reproduzem mais rapidamente do que os bolores (PELCZAR *et al.*, 1981).

Como os bolores, as leveduras são tanto benéficas quanto prejudiciais. Elas são amplamente utilizadas em indústrias de pães, e são essenciais para a produção de bebidas alcoólicas fermentadas. A ocorrência de espécies patogênicas em alimentos é praticamente desconhecida, sua importância reside muito mais no fato de serem eventuais agentes de deterioração em alimentos nos quais apresentam condições de desenvolvimento (PELCZAR *et al.*, 1996).

Condições seletivas para a intensa proliferação de levedura no alimentos são dadas pelos pH ácido, com ótimo na faixa de 4,0 a 4,5, temperatura ao redor de 25°C a 28°C, embora muitas espécies se desenvolvam sob refrigeração a 4°C e 5°C, e substrato rico em carboidratos, principalmente açúcares simples (LEITÃO *et al.*, 1988).

3.3. BOLORES

Os bolores são células cilíndricas e tem valor considerável; eles são usados para produzir o antibiótico penicilina, queijos, e muitos outros produtos. Contudo, eles também são responsáveis pela deterioração de materiais, tais como matéria têxtil e madeira e causam algumas doenças em humanos, animais e plantas. (PELCZAR *et al.*, 1996).

Os bolores são formados por filamentos denominados hifas. As hifas crescem rapidamente à temperatura ambiente e se ramificam. O conjunto de hifas ramificadas é denominado micélio (LAZZARI, 1997). O micélio que se desenvolve no interior do substrato e funciona também como elemento de sustentação e de absorção de nutrientes, é chamado de micélio vegetativo. O

micélio que se projeta na superfície e cresce acima do meio de cultivo é o micélio aéreo. Quando o micélio aéreo se diferencia para sustentar os corpos de frutificação ou propágulos, constitui o micélio reprodutivo (TRABULSI, 1991). Os esporos realizam a função reprodutiva. Algumas espécies se propagam unicamente por meio do micélio enquanto outras por meio dos esporos. Em condições favoráveis os esporos germinam, produzindo hifas, as quais invadem sementes, grãos e outros substratos. Quando o substrato proporciona a umidade necessária, os esporos germinam e o desenvolvimento do fungo ocorre.

Os bolores revelam notável capacidade de adaptação e crescimento sob condições extremamente variáveis como a umidade e a temperatura (o intervalo ótimo se situa entre 25°C a 30°C, mas muitas espécies se desenvolvem 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 um 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 infecção por insetos entre outros (LAZZARI, 1997). São também pouco exigentes quanto aos nutrientes disponíveis, razão pela qual o crescimento pode ocorrer praticamente em qualquer tipo de substratos (LEITÃO *et al.*, 1988).

3.3.1. MICOTOXINAS

A expressão greco-latina "mykes toxicum" significa toxina fúngica, ou como dizemos, micotoxina. É usado para designar um grupo de compostos, altamente tóxicos, produzidos por certos fungos. (LAZZARI, 1997).

As micotoxinas podem ser definidas também como produtos metabólicos secundários produzidos pelos bolores. Quando ingeridas, dependendo da concentração e do tempo de exposição à micotoxina, provocam manifestações toxicológicas agudas e crônicas prejudiciais aos seres humanos e outros animais. Estes metabólitos fúngicos são quimicamente bastante diversos e

podem estar contidos no interior dos esporos de bolores, em seus micélios, ou então ser liberados no alimento contaminado por estes microrganismos (LEITÃO *et al.*, 1988). Além disso, um alimento pode estar contaminado com mais de uma micotoxina ao mesmo tempo, podendo levar a um efeito sinérgico ou aditivo das micotoxinas (GIL & LIMA, 1996).

A presença de micotoxina no alimento não está diretamente associada à presença de fungos, pois pode haver presença de fungos sem que haja produção de toxinas e estas podem permanecer no alimento mesmo após o desaparecimento do fungo (GIL & LIMA, 1996).

Os fungos de maior importância econômica são *Aspergillus sp*, *Penicillium sp* e *Fusarium sp* e suas respectivas micotoxinas serão descritas a seguir:

3.3.1.1. TOXINAS E MICOTOXICOSES POR *Aspergillus sp*

Os aspergilos, membros da morfo-classe Deuteromycetes, são largamente espalhados na natureza, sendo encontrados em qualquer tipo de substrato capaz de fornecer o alimento necessário ao seu crescimento. Algumas espécies se envolvem na deterioração de alimentos (PELCZAR *et al.*, 1996).

Morfologicamente, os aspergilos produzem micélios septados e ramificados, com porções vegetativas submersas no nutriente. Os conidióforos, ou hifas férteis, surgem de células podais, também submersas, podendo ser septados ou não. No ápice, o conidióforo apresenta uma dilatação que forma uma vesícula, e esta, dá origem ao esterigma. As conídias surgem do esterigma, em cadeias, sendo exteriorizadas para formar cadeias de esporos. Essas conídias apresentam 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).

3.3.1.1.1. AFLATOXINAS

As aflatoxinas são um grupo de metabólitos tóxicos produzidos durante o estágio de esporulação dos fungos saprófitos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. O grupo de Aflatoxinas compreende as toxinas B1, B2, G1, G2, M1, M2 (LAZZARI, 1997).

As aflatoxinas são as micotoxinas mais estudadas, sendo a mais importante a aflatoxina B1 por ser mais toxigênica e abundante. As aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 são encontradas em grãos, principalmente oleaginosas (milho, amendoim, sementes de algodão e castanhas diversas), por terem alto valor energético. As aflatoxinas M1 e M2 ocorrem no leite e são derivadas da B1 e B2 (GIL & LIMA, 1996).

A produção de aflatoxinas é favorecida pela temperatura de 23°C a 26°C, sendo produzida em maior quantidade quando o substrato é rico em carboidratos, gorduras e proteínas (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

As aflatoxinas são solúveis em água e em solvente como metanol e etanol, mas não são solúveis em gorduras e óleos. São termoestáveis, não sendo afetadas por métodos de processamento, cozimento ou peletização, e nem pelo frio ou pela luz (LAZZARI, 1997).

As aflatoxinas são carcinogênicas, teratogênicas e mutagênicas causando grandes danos à saúde humana e elevados prejuízos financeiros no rendimento de animais domésticos (bovinos, ovinos, suínos, aves, coelhos) (LAZZARI, 1997).

A legislação brasileira apresenta um limite máximo de 30 ppb de aflatoxina B1 ou G1 ou a soma das duas em produtos e sub-produtos agrícolas (LAZZARI, 1997).

A maneira mais eficiente de evitar-se problemas com aflatoxinas é o controle da qualidade da matéria prima no momento da compra, pois até o momento não existe um método que seja economicamente viável para a descontaminação de grandes volumes de grãos (LAZZARI, 1997).

3.3.1.1.2. OCRATOXINA

A ocratoxina é uma micotoxina nefrotóxica produzida principalmente pelos fungos *Aspergillus alutaceus* (anteriormente denominado *A. ochraceus*) e são ésteres derivados da L-β-fenilalanina (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Em suínos o consumo de 1 mg/Kg de peso vivo de ocratoxina leva à morte o animal em 5 a 6 dias, e concentrações de 1ppb na dieta durante 3 dias causam poliúria, polidipsia, anorexia, diarreia, desidratação e perda de peso (GIL & LIMA, 1996).

3.3.1.2. TOXINAS E MICOTOXICOSES POR *Penicillium* sp

Os membros deste grupo, também Deuteromycetes, ocorrem amplamente na natureza. Algumas espécies causam o 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 conídias. 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).

3.3.1.2.1. RUBRATOXINA

A rubratoxina, provoca doenças hemorrágicas em animais. Sua produção está associada à produção de pigmentos vermelhos e o cereal mais comumente envolvido é o milho (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

3.3.1.2.2. PATULINA

A patulina, produzida por algumas espécies de *Penicillium* entre os quais se incluem as espécies de *P. claviforme*, *P. expansum* e *P. patulum* e por algumas espécies de *Aspergillus* como *A. clavatus*, *A. terreus* e outros (JAY, 1994).

A patulina tem ação antibiótica e sua produção ocorre principalmente em frutas ácidas em estado de deterioração, por ser esta micotoxina estável em condições ácidas (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

3.3.1.2.3. CITRININA E CITREOVIRIDINA

A citrinina, foi isolada inicialmente do *Penicillium citrinum*, mas posteriormente se descobriu que o gênero *Aspergillus* também a produz (GIL & LIMA, 1996).

A citrinina produzida pelo *Penicillium citrinum* e a citreoviridina, produzida pelo *P. citreoviridae* são encontrados em, alguns alimentos fermentados, principalmente arroz amarelo, cuja coloração é consequência da produção de pigmentos amarelos pelos bolores mencionados. A citrinina é uma micotoxina nefrotóxica como a ocratoxina e causa lesões em muitas espécies de animais. Animais que consomem alimentos contaminados com citrinina apresentam diarreia, aumento no consumo de água, poliúria, aumento no tamanho dos rins e nefrose (GIL & LIMA, 1996). A ingestão de citreoviridina

em animais, causa convulsões, paralisia dos membros traseiros, vômitos, problemas respiratórios e cardiovasculares (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

3.3.1.3. TOXINAS E MICOTOXICOSES POR *Fusarium* sp

As espécies do gênero *Fusarium* estão distribuídas nos substratos orgânicos e tem sido analisadas em diferentes lugares do mundo. Produzem várias enfermidades na plantas e algumas delas produzem micotoxicoses (HERRERA *et al.*, 1990). Estes bolores deuteromicéticos apresentam um abundante micélio algodinoso com contornos cor rosa, roxo e pardo. As conídias podem ser multicelulares, fusiformes ou em forma de foice, em conidióforos dispostos como os raios de uma roda (arranjo verticilado) (PELCZAR *et al.*, 1996).

Gibberela (estágio perfeito ou sexuado) ou *Fusarium* (estágio imperfeito ou assexuado) crescem em grãos no campo e armazenados quando as condições de umidade e temperatura forem favoráveis, com um teor de umidade a partir de 22-23 % e temperatura acima de 2°C. Oscilações de temperaturas altas 20-25°C com temperaturas moderadamente baixas 8 - 10°C são necessárias para a produção de quantidades significativas de toxinas (LAZZARI, 1997).

Os bolores do gênero *Fusarium* podem produzir pelo menos três tipos de micotoxinas: fumonisinas, zearalenona, desoxinivalenol, toxina T-2.

3.3.1.3.1. FUMONISINAS

As fumonisinas são um grupo de micotoxinas produzidas pelos fungos *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. nygamai* e *Alternaria alternata*. São seis as toxinas pertencentes a este grupo: fumonisinas B1, B2, B3, B4, A1 e A2. Destas, a fumonisina B1 é a mais abundante e conhecida (GIL & LIMA, 1996).

As fumonisinas são encontradas comumente em grãos de milho e seus sub-produtos, ocorrendo principalmente nos estados do Paraná e Rio Grande do Sul. Estas toxinas podem causar danos severos e morte em animais domésticos. São suspeitas também de provocar câncer de esôfago em pessoas cuja dieta alimentar seja basicamente sub-produtos de milho. Por serem carcinogênicos e termoestáveis, apresentam grandes riscos para as pessoas e animais domésticos (LAZZARI, 1997).

Ainda não foi estabelecida tolerância para fumonisinas B1, sabe-se, entretanto, que a toxina pode provocar doenças em concentrações de 10ppm (LAZZARI, 1997).

3.3.1.3.2. ZEARALENONA

De todas as micotoxinas produzidas pelos fungos sobre alimentos, a zearalenona é a que mais afeta o sistema reprodutivo, por apresentar atividade estrogênica. A zearalenona é produzida por várias espécies de *Fusarium* como o *F. roseum*, *F. tricinctum* e *F. moniliforme* que invadem os grãos ainda no campo antes da colheita (GIL & LIMA, 1996).

A produção de zearalenona é favorecida por temperaturas alternadas (dias quentes, noites frias) e pelo excesso de umidade durante o armazenamento de grãos. (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

3.3.1.3.3. DESOXINIVALENOL

A Desoxinivalenol (vomitoxina ou DON) é uma toxina produzida por diversas espécies de *Fusarium*. Quimicamente, a vomitoxina é conhecida como desoxinivalenol e pertence ao grupo das toxinas conhecidas como tricotecenos. A vomitoxina é freqüentemente acompanhada por outros tricotecenos e seus efeitos tóxicos são mais intensos do que a ação isolada de cada toxina (LAZZARI, 1997).

Um dos sintomas mais freqüentes da vomitoxina é o vômito, e ele normalmente não ocorre com baixas concentrações de toxina, sendo necessários aproximadamente 10ppm ou mais para que isto ocorra (GIL & LIMA, 1996).

Quando a secagem for mal feita, porções de milho, cevada e trigo podem manter níveis de umidade altos o suficiente para o desenvolvimento do fungo e produção da toxina em decorrência do ciclo quente-frio (dias quentes e noites frescas) (LAZZARI, 1997).

3.3.1.3.4. TOXINA T-2

Fusarium sporotrichioides e *F. poae* (*F. tricinctum*) são os produtores de toxina T-2. Estes fungos infectam a planta hospedeira (cevada, milho, trigo) no campo, desenvolvem-se saprofiticamente após a morte da planta e produzem as micotoxinas durante o período de colheita e/ou durante o armazenamento (LAZZARI, 1997).

Os efeitos tóxicos da toxina T-2 e tricotecenos são bastantes variados, atingindo os sistemas nervoso, imunológico e digestivo. Os sinais mais característicos são náuseas, vômitos, inapetência, inflamações, diarreia, abortos e sinais neurológicos, que variam de acordo com a espécie animal e a toxina em questão (GIL & LIMA, 1996).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. MATERIAL GERAL

- 5 amostras de marcas comerciais de erva-mate
- sacos plásticos para pesagem das amostras
- Stomacher (homogeneizador de amostras)
- frascos de 225 ml de solução tampão
- pipetas esterilizadas
- placas de Petri esterilizadas
- alça de Drigalski
- meios de cultura DRBC e BDA
- estufa regulada a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- lâminas e lamínulas
- clarificante

4.1.2. MEIOS DE CULTURA (DIFCO MANUAL, 1984)

4.1.2.1. 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

Após a pesagem dos ingredientes, adicionou-se a água destilada e esterilizou-se a 121° C / 15 minutos. Foi distribuído o meio em placas de Petri esterilizadas na quantidade de 15 ml por placa.

4.1.2.2. Ágar Batata Dextrosado (BDA)

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

Pesou-se os ingredientes, a estes foi adicionado a água destilada e foi esterilizado a 121° C / 15 minutos. Após esterilização aguardou-se o meio retornar a temperatura próxima à 40° C e adicionou-se ácido tartárico 10% esterilizado de forma a reduzir o pH para o intervalo de 3,0 - 3,5. Foi distribuído o meio em placas de Petri esterilizadas, na quantidade aproximada de 15ml por placa.

4.1.3. CLARIFICANTE

Lactofenol de Amann (CRUZ,1981)

Ácido fênico.....	10g
Ácido láctico.....	10g
Glicerina.....	20g
Água destilada.....	10ml

4.2. MÉTODOS

4.2.1 PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras de erva-mate foram numeradas de 1 a 5, e de cada uma delas foi retirado assepticamente 3 unidades analíticas de 25g identificadas com as letras A, B e C, perfazendo assim 15 sub-amostras.

A cada sub-amostra adicionou-se 225 ml de água tamponada e homogeneizou-se, obtendo-se desta forma a primeira diluição (10^{-1}), para a segunda diluição (10^{-2}), transferiu-se 10 ml da primeira diluição para 90 ml de água tamponada, e para a terceira diluição (10^{-3}), foi utilizado o mesmo procedimento (Figura 1).

A homogeneização das sub-amostras requer alguns cuidados:

- abrir as embalagens em câmara asséptica, próximo a chama de um bico de Bunsen
- todos os instrumentos e utensílios utilizados na abertura da embalagem e retirada das unidades analíticas (tesouras, colheres) devem ser previamente esterilizados e flambados no momento do uso
- após a pesagem o saco para homogeneização e a embalagem devem ser fechados com auxílio de uma seladora.

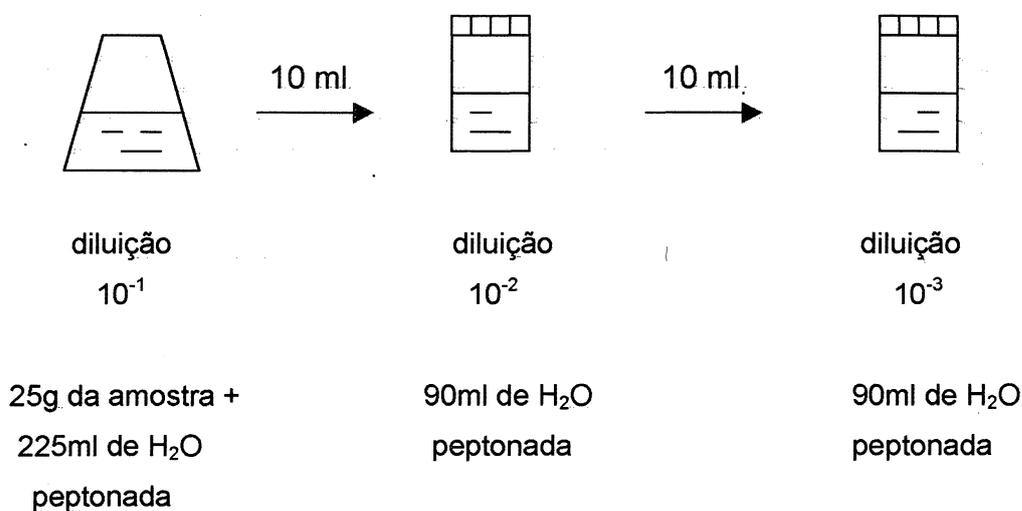


Figura 1: Procedimento para o preparo das diluições

4.2.2. PLAQUEAMENTO EM SUPERFÍCIE

Plaqueou-se 0,1 ml de cada diluição nas placas com o Meio Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol e espalhou-se o inóculo por toda a superfície com auxílio da alça de Drigalski (Figura 2). As placas foram incubadas à 25°C por aproximadamente 5 dias.

Após a incubação, foi verificada a presença de diversas colônias de bolores e leveduras nas marcas de erva-mate identificadas com os números 3 e 5 (Figura 3). Nas marcas 1, 2 e 4 não houve crescimento.

Para o plaqueamento em superfície (contagem de bolores e leveduras), utilizou-se o meio DRBC, pois em recente trabalho realizado por SAATKAMP (1998), foram comparados diferentes meios de cultura utilizados como substratos na contagem de bolores e leveduras no controle de qualidade da erva-mate e foi demonstrada a eficiência deste, devido a presença do Rosa de Bengala que restringe o crescimento excessivo das colônias de fungos com desenvolvimento rápido, do Dicloran que ajuda a reduzir o diâmetro da colônia e do Cloranfenicol que inibe o crescimento de outras bactérias presentes.



Figura 2: Inoculação superficial em meio DRBC

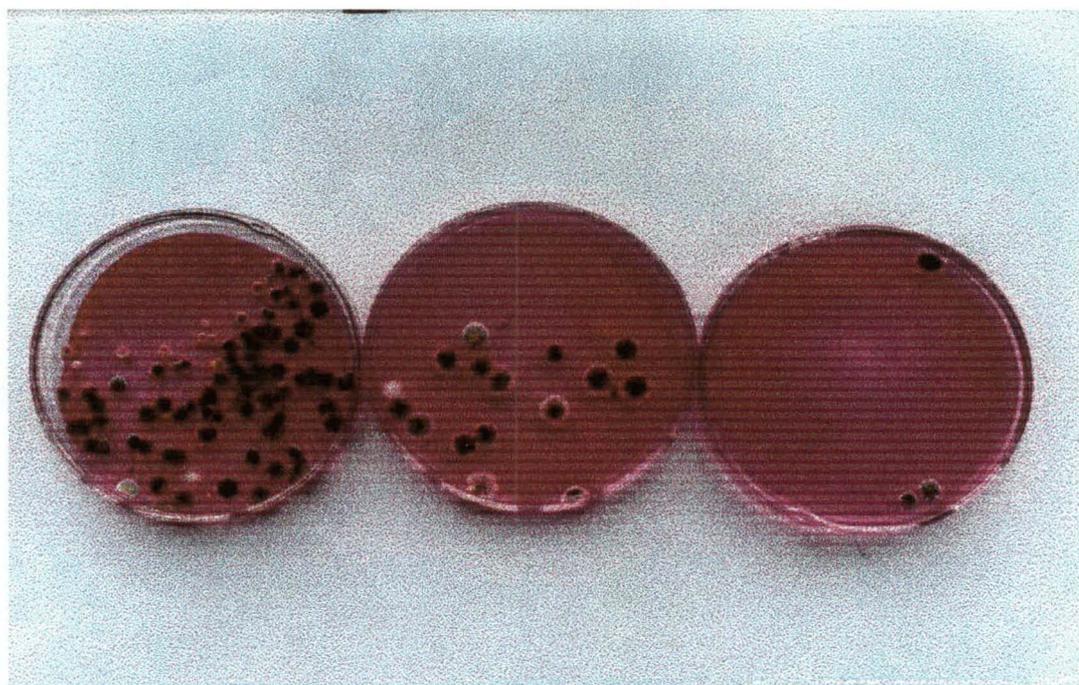


Figura 3: Bolores e leveduras da amostra três, em placas com meio de DRBC nas diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} .

4.2.3. CONTAGEM DAS COLÔNIAS E CÁLCULO DOS RESULTADOS

Como as células microbianas muitas vezes ocorrem em agrupamentos, não é possível estabelecer uma relação direta entre número de colônias e o número de células. A relação correta é feita 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 o cálculo do número de unidades formadoras de colônias (UFC), por grama ou ml da amostra, divide-se o número de colônias pelo volume inoculado (0,1 ml) e multiplica-se pela diluição (10^{-1}) (MISLIVEC, 1992).

$$\text{UFC /g ou ml} = \frac{\text{número de colônias}}{0,1 \times 10^{-1}}$$

4.2.4. ISOLAMENTO DE BOLORES

O isolamento dos bolores (fungos) encontrados nas placas foi feito a partir das características macroscópicas e microscópicas da colônia.

Os bolores podem formar colônias de dois tipos: leveduriformes e filamentosas. As colônias leveduriformes são pastosas ou cremosas, formadas por microrganismos unicelulares que cumprem as funções vegetativas e reprodutivas. As colônias filamentosas podem ser algodonosas, aveludadas ou pulverulentas; são constituídas fundamentalmente por elementos em forma de tubo multicelulares – as hifas (TRABULSI, 1991).

As hifas podem ser contínuas ou cenocíticas e tabicadas ou septadas. Possuem hifas septadas os bolores das divisões Ascomycota, Basidiomycota e Deuteromycota e hifas cenocíticas, os das divisões Mastigomycota e Zigomycota. (TRABULSI, 1991).

O micélio é usualmente incolor, embora em algumas espécies haja produção de pigmentos. Em muitos bolores, as diferentes colorações das colônias são decorrentes da maciça produção de esporos assexuais, como os conídios e esporangiosporios, resultando em colorações verde, verde-azulada, laranja, castanha, cinza ou preta; particularmente nos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor* e *Rhizopus* (LEITÃO *et al.*, 1998). Essas colorações são bastante características e auxiliaram na identificação dos gêneros encontrados.

Após os repiques, os bolores foram estocados em tubos de ensaio com meio Ágar Batata Dextrosado e incubados por aproximadamente 5 dias em estufa à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

4.2.5. IDENTIFICAÇÃO DOS BOLORES POTENCIALMENTE MICOTOXIGÊNICOS

Para cada uma das colônias isoladas foi preparado um microcultivo e incubadas por aproximadamente 5 dias à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ (Figura 4).

A identificação dos bolores isolados foi realizada por meio de observação de suas estruturas de reprodução (sexual e assexual).

4.2.5.1. MÉTODO DE CULTURA EM LÂMINA OU TÉCNICA DO MICROCULTIVO (KERN & BLEVINS, 1999)

- Colocar algodão e uma lâmina no fundo de uma placa de Petri e esterilizar.
- Colocar um cubo de um centímetro quadrado de Ágar Batata Dextrose (BDA) sobre a lâmina, pois este meio intensifica muito a esporulação.
- Inocular um pedacinho de colônia retirada do tubo em um dos lados do cubo de ágar e repetir esse procedimento para cada um dos lados.
- Colocar uma lamínula sobre o cubo inoculado de ágar
- Molhar o algodão com água destilada esterilizada.
- Periodicamente, examinar a lâmina em microscópio e quando a maturação for evidente, retirar a lamínula da lâmina.
- Colocar a lamínula sobre lâmina limpa com uma gota de lactofenol e observar ao microscópio. Para que os preparados seja permanentes, contornar as margens da lamínula com esmalte transparente de unha.

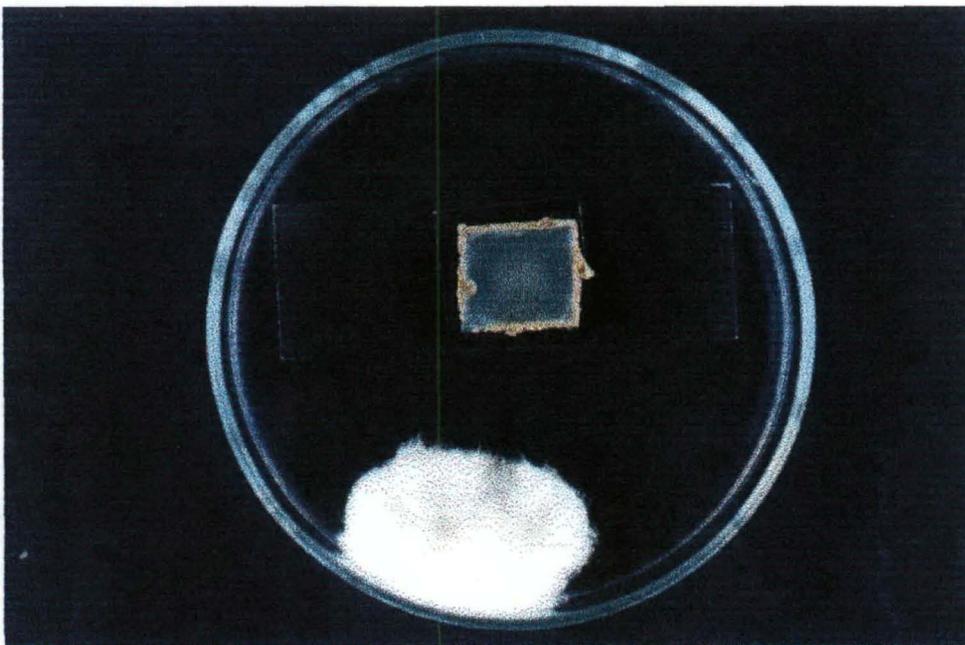


Figura 4: Método de Cultura em Lâmina ou Técnica do Microcultivo

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o controle microbiológico de qualidade (contagem de bolores e leveduras) fez-se uma média aritmética do número de colônias encontradas em cada uma das duas amostras de erva-mate, a partir das placas com meio DRBC na diluição 10^{-1} e os números encontrados foram:

	Média de bolores	Média de leveduras	Bolores e leveduras
Amostra 3	$7,6 \times 10^3$ UFC/g	8×10^2 UFC/g	$8,4 \times 10^3$ UFC/g
Amostra 5	$1,8 \times 10^3$ UFC/g	3×10^2 UFC/g	$2,1 \times 10^3$ UFC/g

A identificação dos bolores, a partir dos microcultivos, foi realizada por meio de observação macroscópica (Figura 5) e microscópica (Figuras 6, 7, 8 e 9) de suas estruturas de reprodução (sexual e assexual), de acordo com os autores Barnett (1962) e Silveira (1981). Os gêneros encontrados foram: *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp e *Rhizopus* sp:

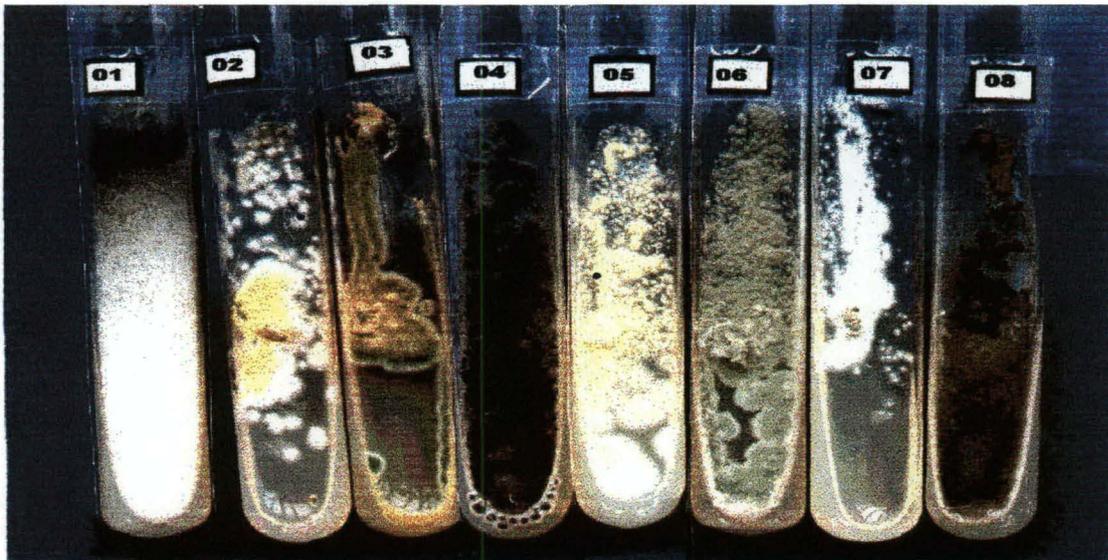


Figura 5 : Identificação dos bolores; tubo 1: *Rhizopus* sp; tubos 2, 3, 4 e 5: *Aspergillus* sp; tubos 6, 7 e 8: *Penicillium* sp.

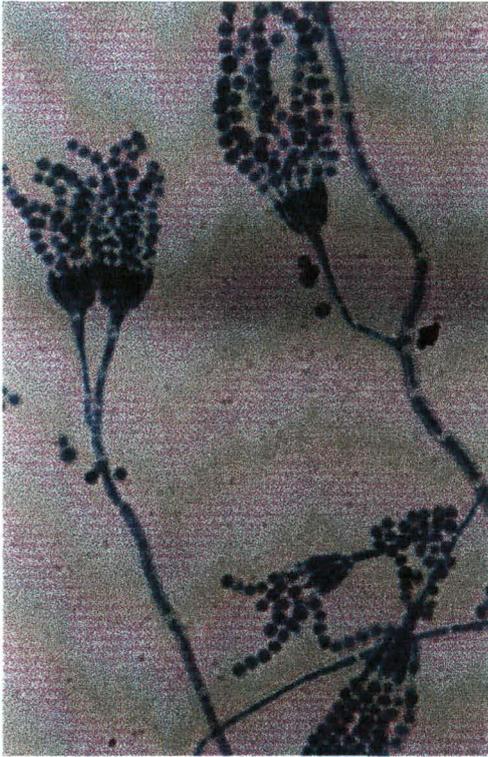


Figura 6: Conidióforos de *Penicillium* sp
(Foto de ATUI, M. B.; 1996)

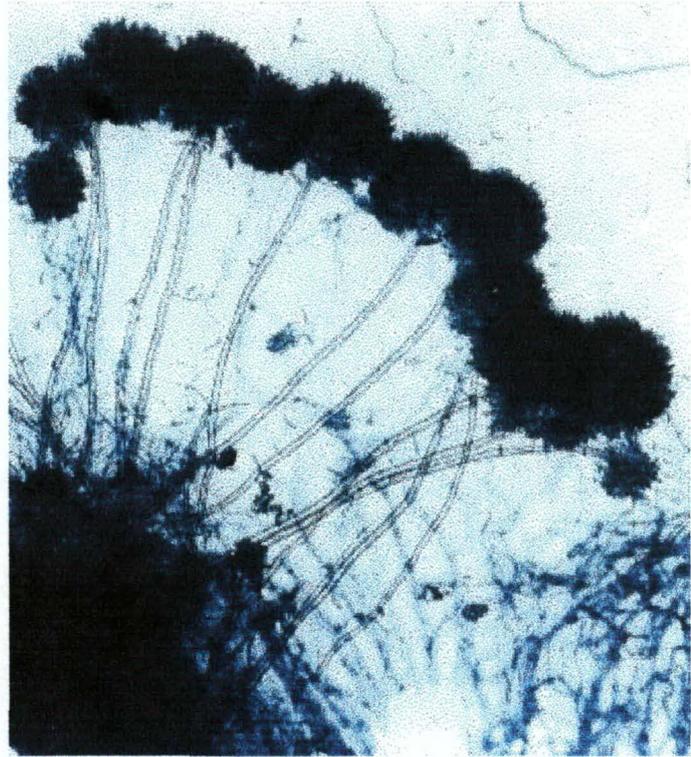


Figura 7 :Conidióforo de *Aspergillus* sp
(Foto de ATUI, M. B.; 1996)

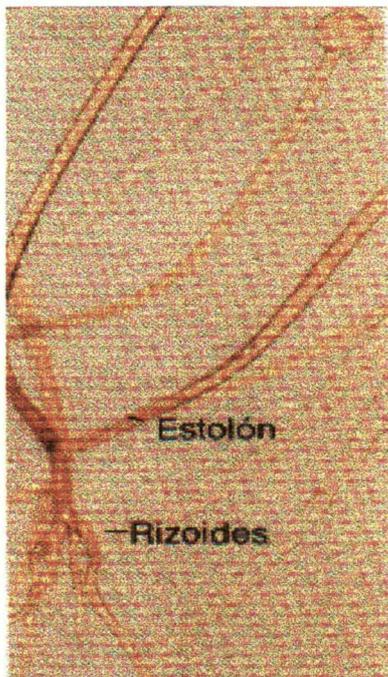


Figura 8: Estrutura de *Rhizopus* sp
aumento de 50x (Foto de HERRERA
e ULOA, 1990)

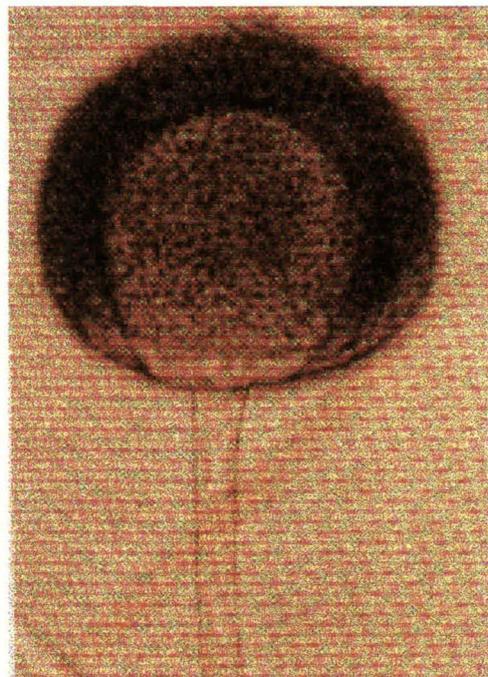


Figura 9: Estrutura de *Rhizopus* sp
aumento de 200x (Foto de HERRERA
e ULOA, 1990)

As médias dos bolores encontrados nas amostras três e cinco foram calculadas (Tabela 1):

Tabela 1: Média de bolores das amostras (%):

Gênero dos bolores	Amostra 3	Amostra 5	Média das amostras
<i>Aspergillus sp</i>	59,71%	64,54%	62,125%
<i>Penicillium sp</i>	34,05%	30,66%	32,355%
<i>Rhizopus sp</i>	6,24%	4,80%	5,520%

De acordo com os resultados encontrados (Tabela 1) observamos uma maior porcentagem de bolores do gênero *Aspergillus sp* (62,125%), seguida de *Penicillium sp* (32,355%) e *Rhizopus sp* (5,520%). Sendo que *Aspergillus* e *Penicillium* são os principais gêneros isolados de alimentos de baixa umidade relativa (U.R.) (KRAEMER & STUSSI, 1998).

Segundo pesquisas realizadas, os alimentos que devem ser armazenados por muito tempo, devem ter uma U.R. abaixo de 70% , visto que os valores limítrofes para a produção de aflatoxinas em relação a atividade de água (Aw), está entre 0,71 - 0,94 (KRAEMER & STUSSI, 1998). Entretanto, mesmo levando-se em consideração a porcentagem de bolores encontrados, a falta de dados relativos às variações de temperatura, período de armazenamento e umidade relativa das amostras, não podemos afirmar que estes produzam micotoxinas.

Estes dados, nos dão uma indicativa da presença em porcentagem (%) destes fungos, portanto sugere-se que a análise da qualidade microbiológica da erva-mate deva ser acompanhada de uma análise qualitativa e quantitativa de micotoxinas que podem ser realizadas utilizando "Kits" de imunodiagnóstico, cromatografia de camada delgada e cromatografia líquida de alta precisão (HPLC) (LAZZARI, 1997).

6. CONCLUSÃO

A partir dos dados encontrados para o controle de qualidade microbiológica observamos que, das cinco marcas analisadas, duas apresentaram crescimento de bolores e leveduras e uma revelou contagem superior ao estabelecido pela Portaria 451 de 19 de setembro de 1997, que exige uma contagem inferior a 5×10^3 UFC/g para bolores e leveduras.

A identificação dos bolores isolados e suas médias foram: *Aspergillus* sp 62,125%; *Penicillium* sp 32,355% e *Rhizopus* sp 5,520% e destes, apenas *Aspergillus* sp e *Penicillium* sp são considerados potencialmente micotoxigênicos e *Rhizopus* sp um contaminante comumente encontrado em alimentos em decomposição.

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.

BARNETT, H. L. **Illustrated Genera of Imperfect Fungi**. 2nd ed. Burgess Publishing Company, p. 225, 1962.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 451 de 19 de setembro de 1997. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 22 de julho de 1998. Seção 1, p.4.

CRUZ, L.C.H. **Micologia Veterinária**. Itaguaí: UFRRJ, Imprensa Universitária, p. 202, 1981.

DIFCO MANUAL. **Dehydrated culture media and reagents for microbiology**. 10. ed. Detroit, Michigan, 1984.

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

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

HERRERA, T.; ULLOA, M. **El Reino de Los Hongos: micología básica y aplicada**. México, DF: Fondo de Cultura e Económica e Universidad Nacional Autónoma de México, 1990.

- JAY, J. M. **Microbiologia moderna de los alimentos**. 3 ed. Zaragoza: Acribia, p.804, 1994.
- KERN, M.E.; BLEVINS, K.S. **Micologia Médica**. 2ª ed. São Paulo: Editora Premier, p. 256, 1999.
- KRAEMER, F.B.; STUSSI, J.S.P. **Higiene Alimentar**, v. 12, p. 38-40, 1998.
- 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 de sementes, grãos e rações**. 2ª ed. Curitiba: Ed. Do Autor, p.148, 1997.
- LEITÃO, M.F.F.; HAGLER, L.C.S.M.; HAGLER, A.N.; MENEZES, T.J.B. **Tratado de Microbiologia: microbiologia de alimentos, sanitária e industrial**. São Paulo: Manole, v.1, p.181, 1988.
- MAZUCHOWSKI, J. Z. **Manual da erva-mate**. Curitiba, EMATER- Paraná, p.104, 1989.
- MIRANDA, N.; URBAN, T. **Engenhos & Barbaquás**. Curitiba: Posigraf, p.120, 1998.
- MISLIVEC, P.B.; BEUCHAT, L.R.; CAUSIN, M.A. **Yeasts and Molds**. In APHA. Compendium of Methods for de microbiological examination of foods, 3 ed. Washington, 1992.
- PELCZAR, M.J.; REID, R.; CHAN, E.C.S. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. São Paulo: Mc Graw-Hill, v.1, p. 524, 1996.

PELCZAR, M.J.; REID, R.; CHAN, E.C.S. **Microbiologia : conceitos e aplicações**. São Paulo: Mc Graw-Hill, v.2, p. 1072, 1981.

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

SAATKAMP, K.E. **Comparação de deferentes meios de cultura utilizados como substratos na contagem de bolores e leveduras no controle de qualidade de erva-mate**. Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da UFPR, Curitiba, 1998, p. 28

SILVA, N. **Manual de Métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, p. 295, 1997.

SILVA, N. JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Métodos de análise microbiológica de alimentos**. Campinas: ITAL, p. 229, 1995 .

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

TRABULSI, L.R. **Microbiologia**. São Paulo: Ed. Atheneu, 1991

VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. **Compendium of Methods for the Microbiological examination of foods**. 3 ed. Washington: American Public Health Association, p. 1219, 1992.