

## CONTAGEM DE FUNGOS NO CONTROLE DE QUALIDADE DA ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hil) E ISOLAMENTO DE GÊNEROS POTENCIALMENTE MICOTOXIGÊNICOS

LARISSA ROLIM BORGES \*

IDA CHAPAVAL PIMENTEL \*\*

MARCIA REGINA BEUX \*\*\*

ANELISE TALAMINI \*\*\*\*

Realizou-se a contagem de fungos filamentosos e leveduras em cinco marcas de erva-mate, adquiridas em estabelecimentos comerciais da cidade de Curitiba, PR (Brasil), visando à quantificação, isolamento e identificação de gêneros potencialmente micotoxigênicos. Foi utilizado o método de plaqueamento em superfície, em meio Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol. Os fungos isolados e identificados foram *Aspergillus* sp. (62,13%), *Penicillium* sp. (32,35%) e *Rhizopus* sp. (5,52%), sendo os dois primeiros considerados potencialmente micotoxigênicos e o último considerado contaminante comumente encontrado em alimentos.

**PALAVRAS-CHAVE:** MICROBIOLOGIA; FUNGOS MICOTOXIGÊNICOS; ERVA-MATE.

### 1 INTRODUÇÃO

Os fungos são organismos eucarióticos que revelam notável capacidade de adaptação e crescimento sob condições de umidade e temperatura extremamente variáveis. São poucos exigentes quanto aos nutrientes disponíveis, razão pela qual o crescimento pode ocorrer praticamente em qualquer tipo de alimento (11, 12). Os fungos podem ser incluídos em dois grandes grupos, sendo os pluricelulares ou filamentosos (bolores) e

\* Mestre em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba - PR.

\*\* Profª Drª do Departamento de Patologia Básica, UFPR, Curitiba - PR.

\*\*\* Coordenadora do Laboratório de Alimentos, Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA), UFPR, Curitiba - PR.

\*\*\*\* Gerente-Técnica do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, CEPPA, UFPR.

os unicelulares (leveduras). Nos bolores, a unidade fundamental é a hifa e o conjunto desses elementos é denominado micélio, que exerce função de assimilação, nutrição e fixação, podendo diferenciar-se em estruturas de frutificação, que servem à sua propagação (6).

Os bolores podem formar colônias com aspectos diversos, que variam de seco e pulverulento a úmido e gelatinoso. O micélio é usualmente incolor e as diferentes tonalidades das colônias são decorrentes da maciça produção de esporos assexuais, resultando em colorações verde, verde-azulada, laranja, castanha, cinza ou preta. Particularmente nos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor* e *Rhizopus* essas colorações são bastantes características e auxiliam na identificação de gêneros e espécies (12, 18).

Os fungos são amplamente utilizados em processos fermentativos, como fabricação de cerveja e vinho e produção de antibióticos e vitaminas. Contudo, algumas espécies podem causar transformações indesejáveis nos alimentos, produzindo sabores e odores desagradáveis. Também podem ocasionar manifestações clínicas no homem e nos animais como infecções ou doenças decorrentes da invasão de tecidos, alergias ou reações de hipersensibilidade, além de toxicoses, intoxicações resultantes da ingestão de alimentos ou rações contendo micotoxinas (7).

Micotoxina designa um grupo de metabólitos secundários produzidos por determinadas espécies de fungos filamentosos. Estes metabólitos secundários são quimicamente diversos e podem estar contidos no interior dos esporos, em seus micélios, ou então serem liberados no alimento contaminado por estes microrganismos.

Segundo PINTO (13) os alimentos contaminados por microrganismos causadores de doenças, ao serem ingeridos, permitem que os patógenos ou seus metabólitos invadam os fluídos ou tecidos do hospedeiro causando doenças graves.

A intoxicação por micotoxinas é chamada de micotoxicose. A micotoxicose pode causar ao organismo do animal e/ou do ser humano danos no crescimento, afetando funções do organismo e desenvolvendo tumores, podendo, inclusive, ser letal. Os órgãos mais freqüentemente afetados são o fígado, os rins, o cérebro, os músculos e o sistema nervoso. Os sintomas vão desde náuseas e vômitos até a falta de coordenação dos movimentos (ataxia) e morte.

Cerca de 300 micotoxinas produzidas por pelo menos 350 espécies de

fungos já foram identificadas. Suspeita-se que quase todos os fungos, se testados, mostrariam alguma espécie de toxicidade e que todos os alimentos e rações susceptíveis à produção de fungos podem ser potencialmente contaminados sob condições ambientais apropriadas (14). Além disso, as micotoxinas podem permanecer no alimento mesmo após o desaparecimento do fungo.

As micotoxinas mais importantes podem ser divididas em três grandes grupos: aflatoxinas, produzidas pelo gênero *Aspergillus* (espécies *A. flavus* e *A. parasiticus*); fusariotoxinas, produzidas por fungos do gênero *Fusarium*, representadas pela zearalenona, tricotecenos e fumonisinas; e ocratoxinas, produzidas pelo *Aspergillus alutaceus* (*A. ochraceus*) e algumas espécies do gênero *Penicillium* (7).

Em função do perigo que constitui a presença de micotoxinas em alimentos para o consumo humano, os limites máximos de tolerância em países europeus e nos Estados Unidos da América (EUA) são muito rígidos. Já no Brasil a legislação estabelece padrão apenas para amendoim e derivados (Tabela 1).

O presente trabalho teve como objetivo a quantificação, isolamento e identificação de gêneros de fungos potencialmente micotoxigênicos em amostras de erva-mate comercializada em Curitiba, PR (Brasil). Selecionou-se a erva-mate por tratar-se de produto de exploração nativa na Região Cone Sul, que apesar da baixa atividade água é consumida em grande escala na forma de infusão.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos, sendo utilizadas cinco amostras de erva-mate adquiridas no comércio de Curitiba. As amostras foram semeadas (em triplicata) em ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol, a partir de diluições seriadas e as placas incubadas a 25 °C, por cinco dias. Após a incubação, quantificou-se o número de colônias, sendo selecionadas as de fungos filamentosos. Estes foram isolados pela técnica do microcultivo (10) para posterior identificação.

A identificação dos bolores, a partir dos microcultivos foi realizada por meio de observação macroscópica de suas colônias e microscópica de suas estruturas de reprodução sexual e assexual, de acordo com BARNETT (3) e SILVEIRA (16).

**TABELA 1 – NÍVEIS MÁXIMOS PERMITIDOS PARA AFLATOXINAS EM ALIMENTOS PARA CONSUMO HUMANO**

PAÍS	NÍVEL MÁXIMO (µg/kg)	ALIMENTO
Austrália	15 (B1)	Amendoim e derivados
Brasil	30 (B1 + G1)	Amendoim e derivados
Dinamarca	15 (total aflatoxinas) 10 (total aflatoxinas)	Nozes comestíveis e derivados Amendoim
Índia	30 (B1)	Todos os alimentos
Itália	50	Amendoim e derivados
Japão	10	Todos os alimentos
Holanda	5	Amendoim e derivados
Polônia	0	Todos os alimentos
Singapura	0	Todos os alimentos
África do Sul	10 (total aflatoxinas) 5 (B1)	Todos os alimentos
Suécia	5 (total aflatoxinas) 0,5 (M1)	Todos os alimentos Leite e derivados
EUA	20 (total aflatoxinas)	Todos os alimentos
Alemanha	10 (total aflatoxinas) 5 (B1)	Todos os alimentos

FONTE: SCUSSEL, 1998 (15).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A observação das placas para contagem de bolores e leveduras evidenciou que somente as amostras identificadas pelos números 3 e 5 apresentaram crescimento fúngico (Tabela 2).

**TABELA 2 – MÉDIA DA CONTAGEM DE BOLORES E LEVEDURAS (UFC/g) NAS AMOSTRAS 3 E 5**

	Bolores	Leveduras	Bolores e leveduras
Amostra 3	$7,6 \times 10^3$	$8 \times 10^2$	$8,4 \times 10^3$
Amostra 5	$1,8 \times 10^3$	$3 \times 10^2$	$2,1 \times 10^3$

UFC = Unidade formadora de colônia.

A amostra 3 não se enquadrava nos padrões da Portaria nº 451, de 19 de setembro de 1997, que estabelecia contagem inferior a  $5 \times 10^3$  UFC/g para bolores e leveduras nesse tipo de produto (4). Esta Portaria foi substituída pela Resolução nº 12, de 10 de janeiro de 2001 (5), que exclui esta análise em erva-mate, restringindo a possibilidade de quantificar estes indicadores de contaminação potencialmente toxigênicos.

Os gêneros de fungos filamentosos encontrados foram *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp e *Rhizopus* sp. (Tabela 3).

**TABELA 3- PERCENTUAL DOS GÊNEROS DE FUNGOS FILAMENTOSOS IDENTIFICADOS NAS AMOSTRAS 3 E 5 DE ERVA-MATE**

Gênero dos fungos	Amostra 3	Amostra 5	Média das amostras
<i>Aspergillus</i> sp	59,71%	64,54%	62,13%
<i>Penicillium</i> sp	34,05%	30,66%	32,35%
<i>Rhizopus</i> sp	6,24%	4,80%	5,52%

Os resultados encontrados indicam maior porcentagem de fungos do gênero *Aspergillus* sp (62,13%) e de *Penicillium* sp (32,35%). Segundo ATUI (1) os fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são organismos conhecidos na deterioração de alimentos e produção de micotoxinas, podendo representar graves riscos à saúde.

Sendo produzidas como metabólitos secundários no final da fase de crescimento exponencial de algumas espécies de fungos filamentosos (9), a quantificação prévia destes detecta a presença de perigo potencial do alimento, pois nem sempre é realizada a pesquisa de micotoxinas devido ao seu alto custo. Além disso, a legislação brasileira só estabelece padrão para amendoim e derivados.

Segundo MARTINS e MARTINS (17) foi observado que rações com contagens de fungos acima de  $10^7$  UFC/g cheiram a mofo, tornam-se organolepticamente anormais e representam perigo potencial para a saúde dos animais se apresentarem substâncias tóxicas.

BARNI e FREITAS (2) em trabalho para verificação de aflatoxinas em alimentos que compõem a cesta básica de Curitiba observaram amostras

de amendoim e feijão com dosagens muito acima dos limites de tolerância. As amostras de erva-mate analisadas não apresentaram resultado positivo para esta micotoxina, porém não foi descartada a produção de outras micotoxinas para este e os demais produtos analisados.

GELLI *et al.* (8) analisaram 215 cepas de *Aspergillus*, isoladas de diversos produtos alimentícios, para detecção de aflatoxinas. Os resultados foram positivos para seis cepas, sendo estas isoladas de mel, condimentos, produtos amiláceos e pó para preparo de bebida láctea.

ATUI (1) analisou amostras de milho em grão, grits e fubá para detecção e quantificação de cinco tipos de micotoxinas (aflatoxina, zearalenona, vomitoxina, fumonisina e ocratoxina). Níveis de contaminação acima do limite tolerado para fumonisinas e aflatoxina foram detectados em 60% e 10% das amostras de milho, respectivamente. Em grits, 45% das amostras também ultrapassam o limite permitido para fumonisina. Embora as outras toxinas também estivessem presentes em diversas amostras desses alimentos, estas não excederam os limites de tolerância. Em fubá foi constatada a presença de fumonisina acima do limite tolerado em 100% das amostras, as quais também estavam contaminadas por aflatoxina e ocratoxina.

O controle dos níveis de fungos nos alimentos torna-se necessário não só devido à deterioração dos mesmos, mas principalmente pela produção de micotoxinas. Assim, considera-se de extrema importância a readequação de padrões legais com relação à avaliação da incidência de bolores e leveduras nos produtos alimentícios.

## 4 CONCLUSÃO

Para as cinco marcas analisadas, duas apresentaram crescimento de bolores e leveduras. Os bolores identificados e seus percentuais foram *Aspergillus sp* 62,13%; *Penicillium sp* 32,35% e *Rhizopus sp* 5,52%, sendo os dois primeiros considerados potencialmente micotoxigênicos e o último como contaminante comumente encontrado em alimentos.

## Abstract

### **COUNTING OF FUNGI IN THE QUALITY CONTROL OF MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hil) AND ISOLATION OF GENERA HIGHLY MICOTOXIGENIC**

The counting of yeasts and molds was made in five commercial brands of mate in

Curitiba, PR, (Brazil) with the objective of quantify, isolate and identify the genera potentially mycotoxigenic. It was utilized the surface plating method in medium Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol agar (DRBC). The isolated and identified fungi were *Aspergillus* sp. (62,13%), *Penicillium* sp. (32,35%) and *Rhizopus* sp. (5,52%), the first and second are potentially micotoxigenic and the last one usually found as food contaminant.

**KEY WORDS:** MICROBIOLOGY; MICOTOXIGENIC FUNGI; MATE.

## REFERÊNCIAS

- 1 ATUÍ, M.B. **Monitoramento de matérias estranhas, fungos e micotoxinas em milho em grão, grits e fubá.** Curitiba, 1996. 105 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná.
- 2 BARNI, A.C.; FREITAS, R.J.S. **Incidência de aflatoxinas em alimentos que compõem a cesta básica comercializada na cidade de Curitiba/PR.** In: ENCONTRO REGIONAL SUL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 7., Curitiba, out. 2001. **Anais...** Curitiba: SBCTA (PR), PPGTA/UFPR, 2001. p. ACQ3-15.
- 3 BARNETT, H. L. **Illustrated genera of imperfect fungi.** 2<sup>nd</sup> ed. Burgess, 1962. p. 225.
- 4 BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. Portaria nº 451, de 19 set. 1997. Estabelece critérios e padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 22 set. 1997. Seção 1.
- 5 BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. Resolução RDC nº 12, de 2 jan. 2001. Estabelece padrões microbiológicos sanitários para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 10 jan. 2001. p. 45.
- 6 CORRÊA, B. Fungos toxigênicos em grãos e rações: biologia, ocorrência e controle. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE MICOTOXINAS E MICOTOXICOSES EM AVES, 1995, Curitiba. **Características gerais das micotoxinas e micotoxicoses.** Campinas: FACTA, 1995. p. 15-20.
- 7 CORRÊA, B. Fungos toxigênicos: panorama nacional. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS; SIMPÓSIO EM ARMAZENAMENTO QUALITATIVO DE GRÃOS DO MERCOSUL, 9., 1998, Florianópolis. **Atualidades em micotoxinas e armazenagem de grãos.** Florianópolis: V.M. Scussel, 2000. p. 162-168.

- 8 GELLI, D.S.; JAKABI, M.; PORTO, E. Isolamento de *Aspergillus* spp. aflatoxigênicos de produtos alimentícios – São Paulo, Capital. **R. Inst. Adolfo Lutz**, v. 50, p. 319-323, 1990.
- 9 JAY, James M. **Microbiologia moderna de los alimentos**. 3. ed. Zaragoza: Acribia, 1994. 804 p.
- 10 KERN, M.E.; BLEVINS, K.S. **Micologia médica**. 2. ed. São Paulo: Premier, 1999. p. 256.
- 11 LAZZARI, F.A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. 2. ed. Curitiba: Ed. do Autor, 1997. p.148.
- 12 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, 1988. v.1, p.181.
- 13 PINTO, F.A.C.; SANTOS, C.D.; VALE, V.L.; PORTO, M.L.G.; BEZERRA, F.S.B.C. Monitoramento da produção de aflatoxina nos alimentos na cidade de Fortaleza, realizado no LACEN – Ceará. In: ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE ALIMENTOS, 12., 2001, Maceió. **O analista e a gestão da qualidade**. Maceió: LACEN, 2001. p. 253.
- 14 SABINO, M. Ocorrência e métodos analíticos para determinação de micotoxinas em grãos e rações. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE MICOTOXINAS E MICOTOXICOSES EM AVES, 1995, Curitiba. **Características gerais das micotoxinas e micotoxicozes**. Campinas: FACTA, 1995. p. 35-47.
- 15 SCUSSEL, V.M. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998. 144 p.
- 16 SILVEIRA, V. D. **Micologia**. 4.ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1981. p. 325.
- 17 MARTINS, H.M.; MARTINS, M.L. Qualidade micológica de rações para bovinos (Portugal 1996–1999). **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 96, n. 538, p. 85-88, 2001.
- 18 TRABULSI, L.R. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 1991.