

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
MESTRADO EM NUTRIÇÃO

ELENITA MARINHO ALBUQUERQUE BARROS

**MICROBIOTA FÚNGICA E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE QUEIJOS
TIPO RICOTA COMERCIALIZADOS EM MACEIÓ - AL**

Maceió - AL

2013

ELENITA MARINHO ALBUQUERQUE BARROS

**MICROBIOTA FÚNGICA E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE QUEIJOS
TIPO RICOTA COMERCIALIZADOS EM MACEIÓ - AL**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação em Nutrição da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Alagoas como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Orientador: Prof. Dr. Cyro Rêgo Cabral Júnior

Co-Orientadora: Profa. Dr^a. Edna Peixoto da
Rocha Amorim

Maceió - Alagoas

2013

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

B277m Barros, Elenita Marinho Albuquerque.
 Microbiota fúngica e caracterização físico-química de queijos tipo ricota
 comercializados em Maceió – AL / Elenita Marinho Albuquerque Barros. – 2013.
 53. f.

 Orientador: Cyro Rêgo Cabral Júnior
 Co-Orientadora: Edna Peixoto da Rocha Amorim.
 Dissertação (mestrado em Nutrição) – Universidade Federal de Alagoas.
 Faculdade de Nutrição. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Maceió, 2013.

 Inclui bibliografia.

 1. Queijos. 2. Bolores. 3. Leveduras. 4. Ricota. 5. Saúde pública. I. Título

 CDU: 612.39:637.3



MESTRADO EM NUTRIÇÃO
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Campus A. C. Simões
BR 104, Km 14, Tabuleiro dos Martins
Maceió-AL 57072-970
Fone/ fax: 81 3214-1160



PARECER DA BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

MICROBIOTA FÚNGICA E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE QUEIJOS
TIPO RICOTA COMERCIALIZADOS EM MACEIÓ - AL

por

ELENITA MARINHO ALBUQUERQUE BARROS

A Banca Examinadora, reunida no dia 04 do mês de abril do ano de 2013, considera o candidato APROVADO.

Prof. Drª. Suzana Lima de Oliveira
Faculdade de Nutrição - FANUT
Universidade Federal de Alagoas

Profa. Drª. Elizabeth Sampaio de Medeiros
Faculdade de Nutrição - FANUT
Universidade Federal de Alagoas

Prof. Drª. Edma Miranda
Instituto de Química e Biotecnologia - IQB
Universidade Federal de Alagoas

A Deus, princípio de tudo, razão de nossa existência. Ao leal amigo Genildo Cavalcante Ferreira Jr., pelo apoio, força, incentivo, amizade e por ter a paciência de colaborar neste caminho percorrido.

AGRADECIMENTOS

A minha família, por depositar em mim a confiança na realização deste mestrado, bem como, pela paciência e compreensão por minha ausência em alguns momentos.

Ao meu orientador, professor Cyro Rêgo Cabral Júnior, pela confiança, apoio, partilha do saber e valiosas intervenções.

À professora Edna Peixoto da Rocha Amorim, pela co-orientação, cessão do Laboratório de Fitopatologia do Centro de Ciências Agrárias-CECA/UFAL e seus ensinamentos.

À professora Maria Cristina Delgado da Silva, por sua boa vontade e compreensão, por ceder, em vários momentos, o Laboratório de Controle de Qualidade de Alimentos para o desenvolvimento de parte deste estudo.

Às professoras Terezinha da Rocha Ataíde e Suzana Lima de Oliveira, por tudo que fizeram por mim.

À professora Edma Carvalho de Miranda do Laboratório de Enzimologia e Análises Bromatológicas, Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas

Ao colega de mestrado, Genildo Cavalcante Ferreira Júnior, pelas contribuições, ideias e sugestões às quais tiveram importância para concretização deste trabalho.

À minha amiga Margarete Cabral, da Engenharia Química, pela colaboração em ceder o laboratório de Tecnologia de Bebidas e Alimentos do Centro de Tecnologia para realização de uma parte de minhas análises, bem como pela assistência necessária.

Ao meu colega Cantídio Francisco Lima Filho, do Laboratório de Controle de Qualidade de Alimentos, por sua boa vontade em me ajudar.

Ao professor Ticiano Gomes do Nascimento que muito colaborou durante esta pesquisa.

RESUMO GERAL

A presença de fungos nos alimentos representa um risco potencial para a saúde pública, pois indica condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, além de poder apresentar metabólitos tóxicos denominados micotoxinas. Entre os derivados do leite, a ricota se destaca com sua alta umidade, apresentando baixo custo, sendo indicada em dietas com baixo teor de gordura. No entanto, seu alto teor de umidade o torna também um excelente substrato para o crescimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos, reduzindo a segurança desse produto. Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo caracterizar a microflora epífita patogênica em ricotas comercializadas em Maceió - AL. Este estudo foi desenvolvido na Universidade Federal de Alagoas - UFAL, entre os meses de abril de 2010 a outubro de 2011. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado. Foram coletadas 20 amostras de ricotas fabricadas em Alagoas, de 5 marcas diferentes, em hipermercados localizados na cidade de Maceió. Paralelamente à caracterização da microbiota fúngica, foram realizadas análises em triplicada de umidade, pH, cinzas, cloretos e proteínas, sendo a contagem do número de unidades formadoras de colônias de fungos filamentosos realizada em duplicada. A identificação da microbiota fúngica se deu por observação através de microscopia óptica. Foram isolados os gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Geotrichum* e *Trichoderma*, com destaque para a presença de *Aspergillus flavus* em uma das marcas analisadas, cuja contagem variou entre $6,5 \times 10^2$ a $1,4 \times 10^6$ UFC/g, evidenciando problemas higiênicos-sanitários nas microusinas produtoras deste alimento e a necessidade da implantação e ou revisão de "Boas Práticas" para tal fabricação, quanto as características físico-química, pode-se observar que todos os queijos foram classificados como sendo semi-gordos, apesar de serem considerados queijos magros pela população;. Portanto, verifica-se a necessidade de maior fiscalização nos estabelecimentos produtores de ricota em Alagoas, visto a elevada contagem destes microrganismos, indicadores de qualidade em alimentos.

Palavras-chave: Queijos. Bolores. Leveduras. Ricota

GENERAL ABSTRACT

The presence of fungi in food presents a potential risk to public health because it indicates inadequate sanitary conditions, and can introduce toxic metabolites called mycotoxins. Among the dairy, the ricotta stands out with its high humidity, with low cost being indicated in diets with low fat. However, its high moisture content also makes it an excellent substrate for the growth of spoilage and pathogenic microorganisms, reducing the safety of this product. Given the above, this study aimed to characterize the pathogenic epiphytic microflora in ricotta sold in Maceió - AL. This study was conducted at the Federal University of Alagoas - UFAL, between the months of April 2010 to October 2011. The experimental design was completely randomized. We collected 20 samples of ricotta made in Alagoas, 5 different brands in supermarkets located in Maceió. In parallel to the characterization of fungal microbiota analyzes were performed in triplicate for moisture, pH, ash, chlorides and proteins, and counting the number of colony forming units of molds made in duplicate. The identification of fungal microbiota occurred by observation through optical microscopy. Were isolated genera *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Trichoderma* and *Geotrichum*, highlighting the presence of *Aspergillus flavus* in one of the brands analyzed, whose count ranged from $6,5 \times 10^2$ to $1,4 \times 10^6$ CFU / g, showing hygienic problems sanitary microusinas in producing this food and the need to implement and or review of "Good Practice" for such manufacturing, as the physico-chemical, can be noted that all cheeses were classified as semi-fat, despite being considered fat cheeses by population,. Therefore, there is a need for greater oversight in producing establishments in Alagoas ricotta, since the high counts of these microorganisms, indicators of quality in food.

Key words: Cheese. Mold. Yeast. Ricotta

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fluxograma de fabricação de queijo tipo ricota.....	18
Figura 2 - Estrutura do <i>Aspergillus flavus</i>	23
Figura 3 - Estrutura do furano, cumarina e da lactona.....	26
Figura 4 - Estrutura das aflatoxinas.....	26
Figura 5 - Biotransformação da aflatoxina B1.....	28

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Valores médios físico-químicos para as amostras de cinco marcas de queijos tipo Ricota produzidos no Estado de Alagoas e comercializados em hipermercados de Maceió–AL em 2011..... 43
- Tabela 2 - Valores médios para microbiota fúngica patogênica identificada nas cinco marcas de queijos tipo ricota produzidos no Estado de Alagoas e comercializados em hipermercados de Maceió–AL em 2011 45

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 - Ocorrência de aflatoxina M ₁ (AFM ₁), em leite e derivados, em regiões sul e sudeste do Brasil – Cenário 2000-2008.....	30
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AFB₁	Aflatoxina B ₁
AFB₂	Aflatoxina B ₂
AFG₁	Aflatoxina G ₁
AFG₂	Aflatoxina G ₂
AFM₁	Aflatoxina M ₁
AFQ₁	Aflatoxina Q ₁
AFP₁	Aflatoxina P ₁
AFLs	Aflatoxinas
AFL	Aflatoxicol
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
BDA	Batata-Dextrose-Ágar
CCD	Cromatografia em camada delgada
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DL	Dose letal
DRBC	Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
GMC	Grupo Mercado Comum
IARC	International Agency for Research on Cancer

SIE	Serviço de Inspeção Estadual
SIF	Serviço de Inspeção Federal
UFC	Unidade Formadora de Colônias ⁰
UV	Luz Ultra Violeta
PPB	Partes por bilhão
µg	Micrograma
ng	Nanograma
sp.	Espécie
spp.	Espécies

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	Queijos tipo ricota: ocorrência de fungos patogênicos, produção de de micotoxinas e, impactos toxicológicos em seres humanos.....	17
2.1.1	Os queijos tipo ricota.....	17
2.1.2	Fungos.....	21
2.1.2.1	<i>Aspergillus</i>	21
2.1.3	Micotoxinas.....	23
2.1.3.1	Aflatoxinas.....	24
2.1.3.2	Aflatoxina M ₁ – Biotransformação.....	27
2.1.3.3	Aflatoxina M ₁ – Toxicidade.....	29
2.1.4	Legislação e Ocorrência de Aflatoxina M1 em Leite e Queijos.....	30
	REFERÊNCIAS.....	32
3	ARTIGO DE RESULTADOS.....	38
3.1	Fungos toxigênicos em queijos tipo ricota comercializados em Maceió-Alagoas.....	38
4	INTRODUÇÃO.....	40
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	41
5.1	Delineamento experimental.....	41

5.2	Local e Coleta das amostras.....	41
5.3	Análises físico químicas.....	42
5.4	Análise da Microbiota Fúngica das Ricotas.....	42
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
6.1	Caracterização físico-química.....	43
6.2	Caracterização microbiológica.....	44
7	CONCLUSÕES.....	47
	REFERÊNCIAS.....	48

1 INTRODUÇÃO GERAL

As exigências do mercado em relação a alimentos mais nutritivos e saudáveis têm aumentado o consumo de produtos lácteos com baixo teor de gordura (CERESER et al., 2011), destacando-se a ricota, um queijo de soro de significativa importância econômica e alimentar, consumido mundialmente e, também, em larga escala no Brasil (RIBEIRO et al., 2005; SOUZA et al., 2003).

De acordo com Maia et al. (2004), a ricota é um produto cuja conservação é limitada devido aos teores elevados de umidade (70% a 73%) e disponibilidade de nutrientes, como sais minerais e lactose. Essas condições, aliadas ao pH geralmente alto, favorecem a multiplicação de microrganismos contaminantes, sejam estes deteriorantes ou patogênicos, que apresentam ações deletérias sobre os queijos, alterando suas características sensoriais e representando risco à saúde pública (PINTADO et al., 2001).

Entre os microrganismos contaminantes observados nos queijos, em particular na ricota, destacam-se os fungos filamentosos. Segundo Evangelista (1999), os fungos, também chamados de mofos ou bolores, são microrganismos filamentosos, responsáveis por alterações desejáveis e indesejáveis nos alimentos. Franco e Landgraf (2004) afirmam que, além das alterações indesejáveis (deterioração), os fungos também podem produzir metabólitos tóxicos denominados micotoxinas (CABRAL JUNIOR, 2003).

As micotoxinas provêm do metabolismo secundário de fungos, cujas principais características são: amplo espectro de toxicidade, baixo peso molecular, termoestabilidade e atuação em baixas concentrações (DINIZ, 2002). De acordo com Fernandez et al. (1997), a maioria das micotoxinas afeta órgãos e tecidos, de homens e animais, induzindo várias patologias, tais como neoplasia, mutagênese, teratogênese e imunossupressão.

Os gêneros *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp. são os mais frequentemente associados à produção de micotoxinas, que ocorrem naturalmente em cereais, grãos e sementes, em níveis que tornam os alimentos impróprios para o consumo (MOLIN, 1999).

Entre as micotoxinas, destacam-se as aflatoxinas. São conhecidas atualmente cinco principais aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂ e M₁. A espécie *Aspergillus flavus* produz somente aflatoxina B, enquanto as outras espécies produzem as aflatoxinas B e G, sendo a aflatoxina B₁ de maior toxicidade. Estas toxinas são geralmente encontradas em muitos alimentos e rações (BAKIRCI, 2001).

A aflatoxina M₁ é um potente hepatocarcinógeno excretado no leite de vacas alimentadas com rações contaminadas com aflatoxina B₁. A concentração no leite pode variar amplamente de um animal para outro, e até de uma fase de lactação para outra, podendo ser detectada no leite 12 - 24 horas após a ingestão inicial de aflatoxina B₁, atingindo o equilíbrio com máxima concentração, após 3 – 6 dias de ingestão constante e diária (OLIVEIRA e GERMANO, 1997).

No Brasil, a Resolução nº 274, da Agência Nacional de Saúde – ANVISA, de 15 de outubro de 2002 (BRASIL, 2002), estabelece os limites máximos aceitáveis de aflatoxina M₁, como sendo de 0,5 µg/L (ppb), para leite fluído, e 5,0 µg/kg (ppb), para leite em pó, não sendo estabelecidos limites para outros derivados do leite. Em outros países, os limites estabelecidos para esses produtos são bem menores, como é o caso da Suíça, que estabeleceu 0,10 µg/L (ppb) para leite em pó (KANIOU-GRIGORIADOU et al., 2005)

O Estado de Alagoas possui aproximadamente 61 laticínios, de acordo com a Secretaria de Agricultura de Alagoas, observa-se a comercialização de poucas marcas de ricota produzidas no Estado, em número de aproximadamente oito, de acordo com a rede de varejistas do Estado. Porém, esse número pode ser maior, pois alguns laticínios não produzem esse produto em larga escala.

Por ser um produto pouco estudado e geralmente associado como sendo um produto de baixo teor de gordura, com baixo custo, objetivou-se com esse estudo, avaliar a microbiota fúngica e a caracterização físicoquímica de amostras de queijo tipo ricotas comercializadas no município de Maceió – AL.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Queijos tipo ricota: ocorrência de fungos patogênicos, produção de micotoxinas e impactos toxicológicos em seres humanos

2.1.1 Queijo tipo ricota

A ricota é um queijo de origem italiana fabricado em diversos países, sob várias denominações. É conhecida também por queijo de albumina, por se constituir basicamente desta proteína, e de lactoglobulina, que são os principais componentes protéicos do soro, não coaguláveis pelo coalho. São proteínas facilmente desnaturadas e precipitadas pelo calor, sob a influência de acidificação, o que constitui o princípio básico da fabricação da ricota (FURTADO, 1994). É considerada produto de baixo valor calórico e alto teor protéico, podendo ser comercializada fresca, defumada ou condimentada e geralmente sem sal (ALBUQUERQUE, 2002).

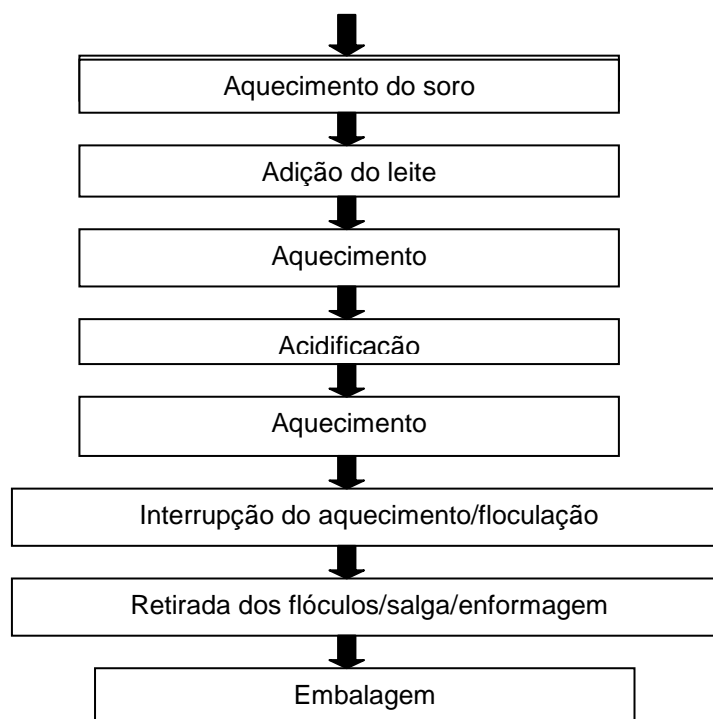
A produção anual brasileira de ricota aumentou significativamente nos últimos anos. Em 1991, era de cerca de 4,1 toneladas e, no ano de 2003, praticamente dobrou, passando para 8,2 toneladas (ABIQ, 2004). Um dos fatores para esse aumento expressivo seria a busca crescente de uma alimentação mais saudável e com baixo valor calórico. Verifica-se, portanto, a necessidade da garantia da qualidade e segurança para este tipo de produto.

A massa da ricota é obtida por meio da acidificação do soro de queijo, adicionado ou não de 10% de leite integral, após seu aquecimento, a aproximadamente 92 °C, cujo rendimento médio da fabricação é de cerca de 4 a 6%, sendo um produto de pouca durabilidade e, portanto, considerado queijo fresco.

Observa-se na figura 01, o fluxograma de fabricação de ricota, onde se inicia com a obtenção do soro de leite fresco, geralmente proveniente da fabricação de queijo coalho. Logo após a obtenção do soro de leite, inicia-se o aquecimento do mesmo com adição simultânea de leite pasteurizado, em uma proporção de 10 a 20% do volume de soro de leite. Uma vez que o leite e o soro estejam totalmente misturados, faz-se adição de ácido láctico e em seguida o aquecimento até 90°C. Uma vez aquecido, ocorrerá à floculação (precipitação das proteínas do soro de leite

– lactoalbumina e lactoglobulina), sendo nesse momento, interrompido o aquecimento e retirada desses flóculos, para o posterior processo de salga, enformagem e procedimento de embalagem das ricotas.

Figura 1 - Fluxograma de fabricação de queijo tipo ricota



Fonte: Silva et al., 2012.

Contudo, a ricota é um produto cuja conservação é limitada, devido aos teores elevados de umidade (70% a 73%) e à disponibilidade de nutrientes, como sais minerais e lactose (MAIA et al., 2004). Essas condições, aliadas ao pH geralmente baixo (pH <5,0), favorecem a multiplicação de microrganismos contaminantes, sejam estes deteriorantes ou patogênicos, que apresentam ações deletérias sobre os queijos, alterando suas características sensoriais e representando risco à saúde pública (PINTADO et al., 2001).

Entre os principais microrganismos deteriorantes, estão os fungos filamentosos, que podem se desenvolver sobre as ricotas. Cereser et al. (2011), por exemplo, encontraram valores elevados de fungos filamentosos e leveduras em amostras de ricotas do estado de São Paulo, oscilando de 10^4 a 10^6 UFC/g, demonstrando uma condição higiênico-sanitária insatisfatória das ricotas comercializadas.

O Regulamento de Inspeção Industrial Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) é o único diploma legal brasileiro vigente onde se descreve alguns parâmetros de identidade e qualidade para a ricota. O artigo 610 define ricota fresca como um produto obtido da albumina do soro de queijos, adicionado de leite em até 20% do seu volume. Algumas características sensoriais, tais como consistência, textura, cor, além de formato e peso também são estabelecidas (BRASIL, 1997).

Em geral, observa-se no mercado a oferta de ricotas com diferentes características, fato este motivado pela produção artesanal e também pela ausência de regulamento técnico mais definido (ESPER et al., 2007). A inexistência de padrões legais pode ser prejudicial ao próprio controle oficial de qualidade destes produtos; por exemplo, a falta de definição de um parâmetro físico-químico, como o teor de umidade, dificulta a interpretação dos resultados do controle microbiológico, conforme estabelecido na RDC nº 12, de 02/01/2001 (BRASIL, 2001).

A fabricação de ricota é uma alternativa satisfatória do ponto de vista ecológico para reaproveitar soros de queijos como o Minas frescal, Minas padrão ou mussarela, além de representar vantagens do ponto de vista econômico, pela redução de gastos com o tratamento de resíduos e utilização otimizada da matéria-prima (MORAIS et al., 2003 *apud* SANTOS, 2009).

Segundo dados da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), a produção de leite no Brasil é de aproximadamente 29 bilhões de litros por ano, caracterizando o país como 5º produtor mundial de leite. Cerca de 34% do volume de leite sob Inspeção Federal (SIF – Serviço de Inspeção Federal), no Brasil, é destinado à produção de queijos (BRASIL, 2009). Dez litros de leite dão origem a aproximadamente um quilo de queijo e nove litros de soro. A produção brasileira de queijo sob SIF está em 500 mil toneladas/2010 (BRASIL, 2009), o que gera aproximadamente 4,5 bilhões de litros de soro. No entanto, no Brasil não há dados oficiais sobre a real produção de queijo, visto que 40% da produção concentram-se em microlaticínios, muitas vezes não registrados no SIF (PENNA; ALMEIDA; OLIVEIRA, 2009 *apud* MENEZES, 2011).

2.1.2 Fungos

Os fungos são seres dispersos no meio ambiente: em vegetais, no ar atmosférico, no solo, na água, nos animais e nos alimentos, entre outros. Embora sejam estimados em 250 mil espécies, menos de 150 foram descritos como patógenos aos seres humanos. São organismos eucariotas, aclorofilados, heterotróficos, com reprodução assexuada e sexuada, capazes de utilizar uma grande parte de substratos como fonte de carbono, nitrogênio e energia (RAVEN et al., 2001; TANIWAKI et al., 1991).

Os fungos são divididos em: fungos de campo e de armazenamento. A distinção entre os dois tipos não é baseada na classificação taxonômica, mas de acordo com as condições ambientais e/ou ecológicas que favorecem o crescimento desses. Os fungos do campo requerem um teor de umidade em equilíbrio com uma umidade relativa de 90% – 100% para crescerem. Os principais gêneros são *Cephalosporium*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Nigrospora*, *Helminthosporium*, *Alternaria* e *Cladosporium*, que invadem grãos e sementes durante o amadurecimento e o dano é causado antes da colheita. Esses fungos não se desenvolvem normalmente durante o armazenamento, exceto em milho armazenado com alto teor de umidade (ATUI e LAZZARI, 1998).

Os fungos de armazenamento são representados pelos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, pois necessitam de teores de umidade mais baixos, entre 13 e 18%, e são considerados os principais agentes de deterioração das sementes (CHRISTENSEN e KAUFMANN, 1969). No entanto, essa classificação não é apropriada aos trópicos úmidos, uma vez que determinadas espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, anteriormente consideradas como fungos de armazenamento, podem ocorrer antes da colheita (HILL et al., 1985).

2.1.2.1 *Aspergillus*

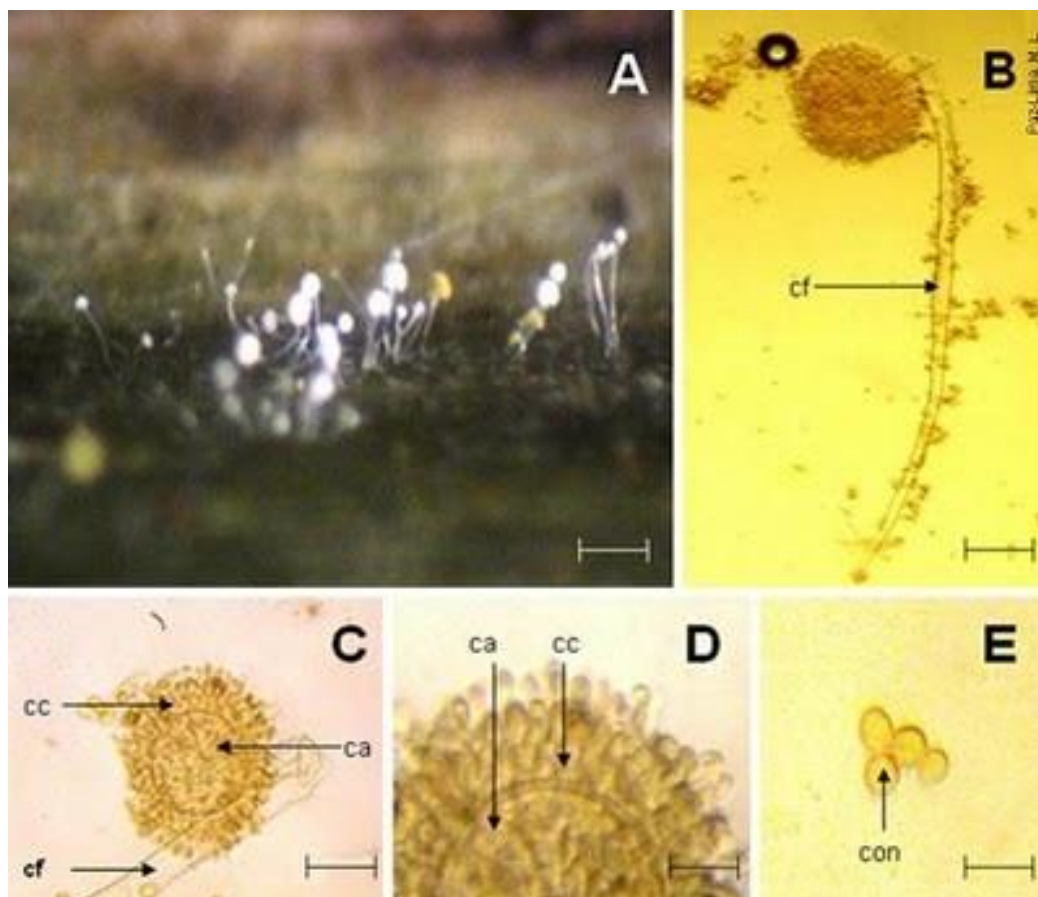
Aspergillus são caracterizados pelo desenvolvimento de colônias coloridas e brilhantes, como verdes e amarelo-oliva, constituem provavelmente o gênero mais comumente implicado na contaminação de alimentos por micotoxinas (RITTER, 2007). O gênero *Aspergillus* foi descrito, pela primeira vez, pelo botânico italiano Pier

Antonio Micheli, em 1729 (MACKENZIE, 1988). As espécies de *Aspergillus* são microrganismos cosmopolitas, capazes de colonizar uma grande variedade de substratos (LAFORET, 2008). Em geral, são frequentes em climas tropicais e subtropicais, comumente implicados na deterioração de alimentos (TANIWAKI e SILVA, 2001). Muitos possuem importância ecológica, genética, capacidade de exportação biotecnológica, embora apresentem aspectos patogênicos e micotoxicológicos relacionados com o homem e com os animais (POWELL et al., 1994).

Em relação à taxonomia, o *Aspergillus* spp. é agrupado à divisão *Deuteromycotina*, à classe dos *Hyphomycetes*, à ordem *Moniliales* e à família *Moniliaceae* (ATAYDE, 2009). Mais de vinte espécies de *Aspergillus* produzem micotoxinas, porém as mais comuns são as da divisão *flavi*, que incluem três espécies: *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* (SALEEMULLAH, 2006; VAAMONDE, 2003).

Aspergillus flavus (Figura 02) e *Aspergillus parasiticus* compreendem duas das espécies mais importantes do gênero, apresentam colônias caracteristicamente verdes a amarelas-oliva, embora eventualmente possam se apresentar amarelas puras, tornando-se acizentadas com a idade (PITT e HOCKING, 1997). Os conidióforos de *Aspergillus flavus* e de *A. parasiticus* surgem a partir de hifas vegetativas septadas. As fiálides podem surgir diretamente de uma vesícula globosa (condição unisseriada) ou a partir da métula, que envolve a superfície da vesícula (condição bisseriada). A vesícula, a métula, quando presente, as fiálides e as cadeias de conídios compreendem a cabeça conidial, que, no *A. parasiticus* é predominantemente unisseriada, enquanto no *A. flavus*, a seriação é mais variável (KOKALIS-BURELLE et al., 1997).

Figura 2 - Estrutura do *Aspergillus flavus*



A - Aspectos morfológicos de *Aspergillus flavus*. A. O crescimento do fungo em uma superfície, observando suas estruturas em desenvolvimento.

B - Conidióforo (cf) jovem e maduro de cor hialina

C - Conidióforo (cf) com célula ampuliforme (ca) e células conidiogênicas (cc)

D - Três camadas de células conidiogênicas (cc) ligadas à célula ampuliforme (ca) .

E - Conídios (con) esféricos, amerosseptados e hialinos.

Fonte: Caixeta, 2010.

2.1.3 Micotoxinas

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos, ocorrendo em diferentes regiões do mundo e representam um risco potencial para a saúde do homem e dos animais, quando presentes nos alimentos e rações (NORDIN; LUCHESE, 1998). A maioria das micotoxinas afeta órgãos e tecidos, induzindo várias doenças, tais como neoplasia, mutagênese, teratogênese e imunossupressão (FERNANDEZ et al., 1997; FERNANDES, 2004; KIESSLING, 1986).

O termo micotoxina é derivado da palavra grega *mykes*, que significa fungo, e “toxicum”, que significa veneno ou toxina. Quando produzidos em associação com alimentos, ração animal e forragens, os metabólitos tóxicos podem ser ingeridos pelo homem e animais, provocando as micotoxicoses (GONÇALEZ et al., 2001).

Mais de quatrocentas micotoxinas conhecidas na atualidade são produzidas por aproximadamente uma centena de fungos. As principais micotoxinas podem ser divididas em três grupos: as aflatoxinas, produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*, como *A. flavus* e *A. parasiticus*, as ocratoxinas, produzidas pelo *Aspergillus ochraceus* e diversas espécies do gênero *Penicillium*, e as fusariotoxinas, que possuem como principais representantes os tricotecenos, zearalenona e as fumonisinas, produzidas por diversas espécies do gênero *Fusarium* (DILKIN, 2002).

A presença de uma micotoxina e o perigo associado somente podem ser determinados depois da extração e identificação da mesma, por quatro razões: a presença do fungo não garante que existe uma micotoxina; a micotoxina continua no alimento, mesmo que o fungo tenha desaparecido; um fungo pode produzir mais de uma micotoxina; uma determinada micotoxina pode ser produzida por mais de uma espécie de fungo (CARRILLO, 2005).

Diante disso, as micotoxinas produzidas durante a esporulação dos fungos contaminam os animais que consomem alimentos contaminados e, dessa forma, são transferidas para os seus produtos, tal como o leite ou a carne, conseqüentemente, prejudicando a saúde humana (JOBIM et al., 2001).

2.1.3.1 Aflatoxinas

Aflatoxinas (AFLs) são metabólitos secundários que podem ser produzidos por fungos como, *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* (BOK et al., 2004; YU et al., 2005). Os seres humanos e várias espécies domésticas são sensíveis aos seus efeitos tóxicos, que podem ser agrupados em: agudos, mutagênicos, neoplásicos e teratogênicos (GROOPMAN et al., 1988; HARRISON et al., 1993). Existem vários tipos de aflatoxinas, entre elas destacam-se quatro – B₁ (AFB₁), B₂

(AFB₂), G₁ (AFG₁) e G₂ (AFG₂) –, sendo que sua biotransformação, em diversas espécies animais, resulta na produção de M₁ e M₂ (FERREIRA et al., 2006).

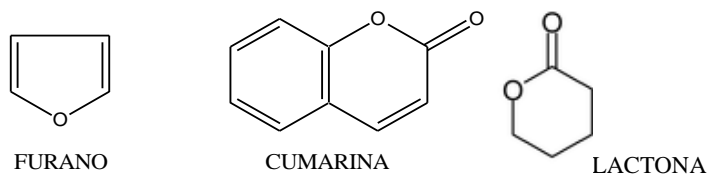
As aflatoxinas receberam essas denominações, B e G, devido às suas características fluorescentes, *Blue* (azul) e *Green* (verde), quando expostas à luz ultravioleta. A designação “M” origina-se de *milk toxin*, por ser uma toxina excretada no leite (BAGGIO, 2006).

A descoberta da aflatoxina ocorreu em 1960, na Inglaterra, devido ao surto que provocou alta mortalidade em perus, conhecido como “*turkey - X disease*”. Durante a epidemia, milhares de aves morreram após o consumo de torta de amendoim acrescentada à ração, proveniente do Brasil. O principal fungo encontrado no alimento foi o *Aspergillus flavus* (WOGAN, 1992).

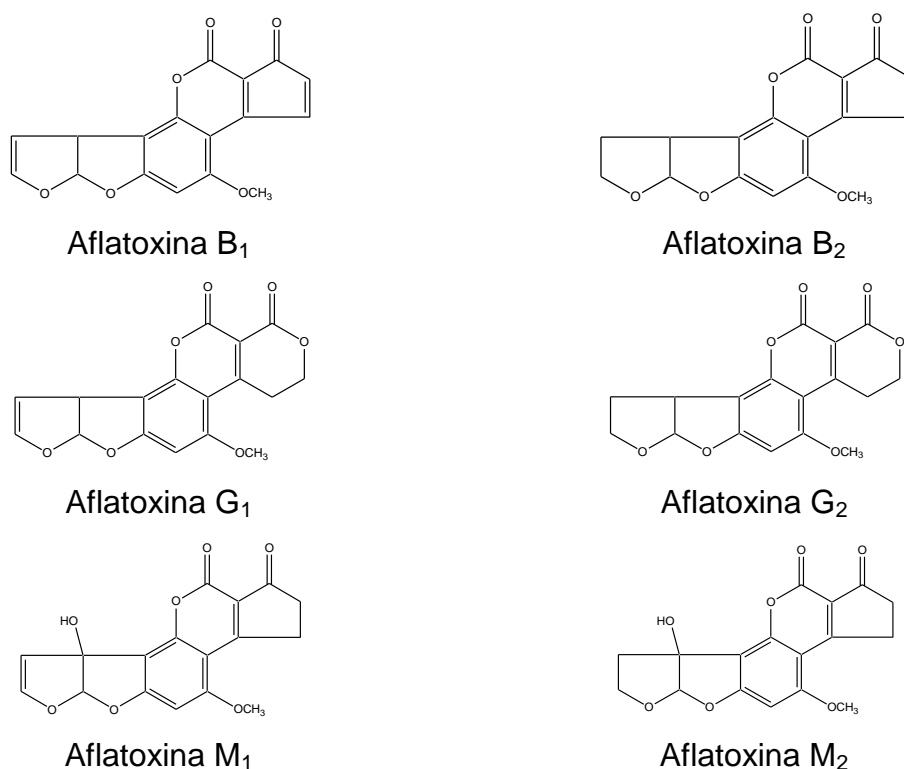
A ocorrência de aflatoxinas em alimentos é inevitável e influenciada por diversos fatores ambientais. Portanto, a extensão de sua contaminação não é previsível e pode variar com a localização geográfica, as práticas agronômicas e a suscetibilidade do produto à invasão do fungo durante as fases de pré-colheita, armazenamento e processamento (ARAÚJO, 2004).

Os fatores que favorecem o desenvolvimento de fungos e a produção de toxinas são classificados em três categorias: físicos, químicos e biológicos, como: umidade relativa, conteúdo de umidade, temperatura, luz, danos mecânicos, microclima (atmosfera), fungicidas, composição do substrato, competição microbiológica (interação microbiana) e linhagem do fungo contaminante (SCUSSEL, 1998).

As aflatoxinas pertencem à classe de compostos denominados furanocumarinas, apresentando um núcleo cumarina associado ao furano e à lactona (Figura 03). As aflatoxinas do grupo B possuem um anel ciclopentenona, as do grupo G, uma lactona insaturada de seis membros, e as do grupo M são derivadas hidroxiladas no carbono 4 de B₁ e B₂ (ARAÚJO, 2004) (Figura 04).

Figura 3 - Estrutura do furano, cumarina e lactona

Fonte: Araújo, 2004.

Figura 4 - Estrutura das Aflatoxinas

Fonte: Araújo, 2004.

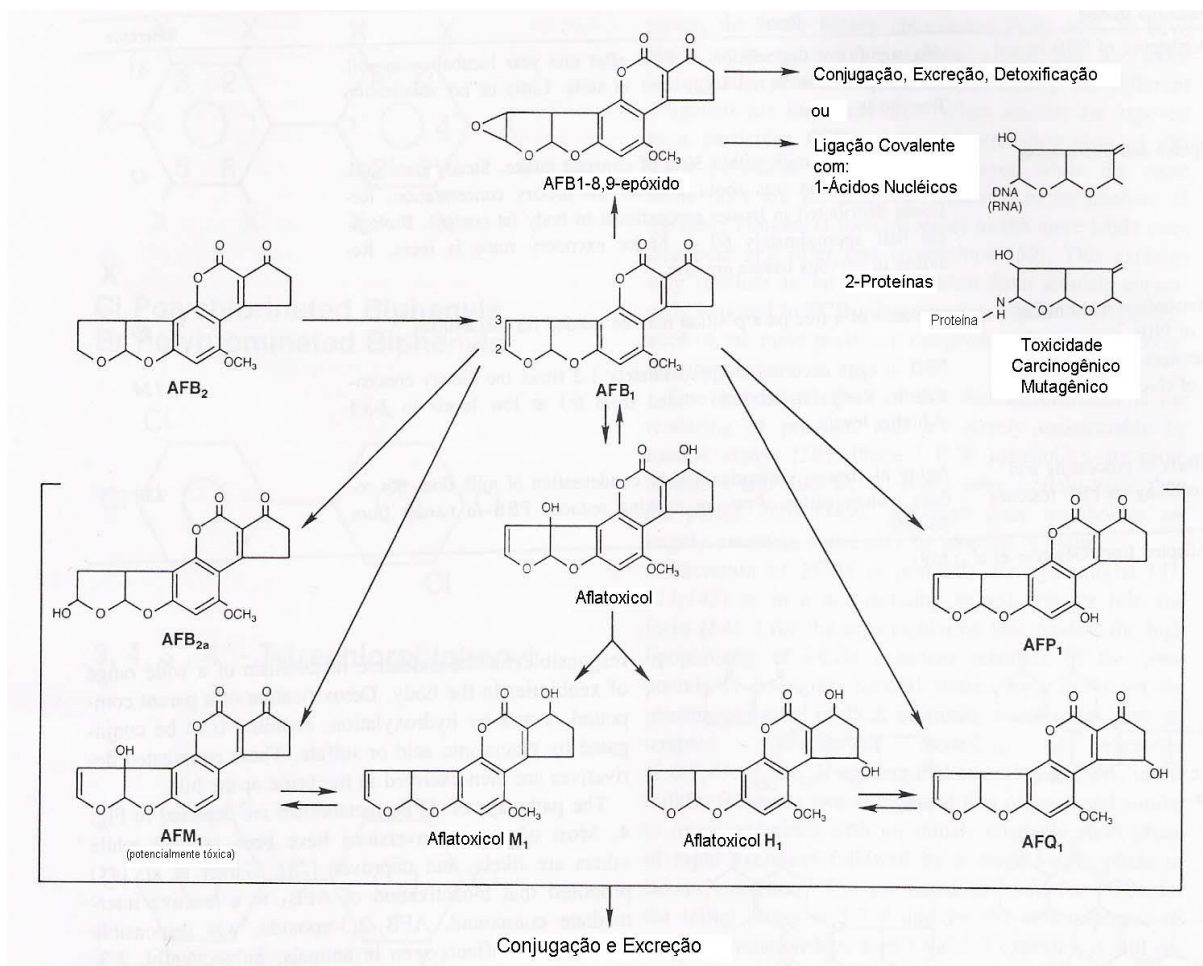
Em estado puro, são extremamente estáveis a altas temperaturas, enquanto que, quando se encontram em solventes polares, são relativamente sensíveis à luz, particularmente à radiação ultravioleta. São degradadas por esterilização em presença de amônia e por tratamento com hipoclorito e álcalis fortes (WHO, 1979). São incolores, inodoras e não alteram o sabor dos alimentos (MARTINS et al., 1999).

2.1.3.2 Aflatoxina M₁ - Biotransformação

As aflatoxinas B₁ estão classificadas na Classe 1 dos carcinógenos humanos pela *International Agency for Research on Cancer* – IARC (1993). Já as aflatoxinas M₁ estão classificadas, como no grupo 2B, sendo possível carcinogênos para humanos.

As aflatoxinas são absorvidas no trato gastrointestinal e biotransformadas primariamente no fígado, por enzimas microsossomais do sistema de funções oxidases mistas. Essas enzimas, pertencentes à superfamília de enzimas do sistema citocromo P-450, constituem parte do processo de detoxificação de uma ampla variedade de xenobióticos no organismo (FORRESTER et al., 1990). Essa biotransformação (Figura 05) dá origem a um produto reativo, o 8-9-epóxido (anteriormente denominado AFB₁-2,3 epóxido), originado por meio da epoxidação da dupla ligação do éter vinílico, presente na estrutura bifuranoíde da molécula de aflatoxina B₁ (KWIATKOWSKI e ALVES, 2007).

Figura 5 - Biotransformação da aflatoxina B₁



Fonte: Biehl; Buck, 1987.

A aflatoxina-epóxido é altamente reativa e instável, ligando-se através de ligações covalentes a vários locais nucleofílicos da célula, como ácido desoxirribonucléico (DNA), ácido ribonucléico (RNA) e proteínas (particularmente os aminoácidos metionina, cisteína e histidina). A interferência na síntese de ácidos nucleicos pode ocorrer mediante processos de transcrição, pela interação direta da aflatoxina-epóxido com o DNA, ou na interação com o RNA polimerase (enzima que catalisa a síntese do mRNA a partir do DNA) (ARAÚJO, 2004).

A biotransformação da AFB₁ inclui, além da epoxidação, as reações de hidroxilação e de O-demetilação. Na reação de hidroxilação, são formadas as aflatoxinas M₁ (AFM₁), aflatoxina Q₁ (AFQ₁) e a aflatoxina B_{2a} (AFB_{2a}), enquanto que a aflatoxina P₁ (AFP₁) é formada na reação de O-demetilação. Esses quatro novos compostos possuem o grupo hidroxila em sua molécula, permitindo a sua

conjugação com o ácido glucurônico ou sulfatos, tornando-as substâncias bastante solúveis em água. Essas substâncias podem então ser excretadas pela urina, bile e pelas fezes (BIEHL e BUCK, 1987).

Após ser biotransformada, a aflatoxina M_1 pode permanecer em diversos tecidos, especialmente no hepático e no renal, ou ser excretado pela urina ou pelo leite. Portanto, a aflatoxina M_1 é considerada o principal metabólito hidroxilado presente em leite de animais, que ingeriram alimentos contaminados por AFB_1 (APPLEBAUM et al., 1982).

2.1.3.3 Aflatoxina M_1 - Toxicidade

A toxicidade aguda da AFM_1 é muito semelhante à da AFB_1 , manifestando seus efeitos tóxicos também em doses baixas (BAGGIO, 2006). A teratogênese provocada por determinadas concentrações de aflatoxina B1 já foi observada em animais, através de alguns efeitos durante o curso da gravidez, principalmente durante a primeira fase embrionária (ELLIS, 1991 citado por BAGGIO, 2006). Os efeitos teratogênicos das aflatoxinas causam má formação do feto e reabsorção de embriões (SCUSSEL, 1998).

A imunossupressão, outra repercussão do consumo de AFM_1 , manifesta-se de diferentes formas, como diminuição dos linfócitos T ou B, supressão dos anticorpos ou retardamento na atividade dos macrófagos e neutrófilos, aumentando a susceptibilidade a determinadas infecções, podendo implicar na transmissão de patógenos ao homem. A dose diária mínima de aflatoxina B₁ que induz a imunossupressão através da hipoplasia do timo e da depleção dos timócitos é de 0,25 mg/kg de peso vivo (ELLIS, 1991 citado por BAGGIO, 2006).

As crianças expostas à AFM_1 são consideradas mais susceptíveis aos seus efeitos adversos, pois sua capacidade de biotransformação de carcinógenos é geralmente mais lenta que em adultos e o efeito cumulativo de exposições repetidas, por longos períodos, a pequenas doses, é um fator preocupante (LÓPEZ et al., 2001).

2.1.4 Legislação e Ocorrência de Aflatoxina M₁ em Leite e Queijos

Observam-se, no Brasil, alguns trabalhos que investigaram a presença de aflatoxina M₁ em produtos lácteos, em particular, em queijos e leite (QUADRO 01). No entanto, esses trabalhos se concentram na região sul e sudeste do país e não incluíram a ricota em suas investigações.

Quadro 1 - Ocorrência de aflatoxina M₁ (AFM₁), em leite e derivados, em regiões sul e sudeste do Brasil – Cenário 2000-2008

Leite e derivados	Local da pesquisa	Total de amostras utilizada	Incidência de amostras contaminadas (%)	Níveis de aflatoxina M ₁ verificados (µg/L/kg)	Autores
Queijo Parmesão	Minas Gerais	88	46,6	0,01-0,66	PRADO et al. (2008)
Queijo Minas	Minas Gerais	75	74,6	0,2-6,9	PRADO et al. (2000)
Pasteurizado, UHT	Ribeirão Preto	139	80,0	0,015-0,5	GARRIDO et al. (2003)
Leite <i>in natura</i> pasteurizado, UHT	São Paulo	107	74,0	0,02-0,26	SHUNDO e SABINO (2006)
Pasteurizado	Paraná	40	57,5	0,01-0,17	BAGGIO (2006)
Leite <i>in natura</i> e UHT	Porto Alegre	128	0,00	0,0	WEIGE (2007)
Queijo Prato	Minas Gerais	9	100	0,2-0,54	PRADO et al. (2001)

Fonte: Autora, 2013

Observando-se os limites estabelecidos pela legislação brasileira, limite máximo de 0,5 µg/L (BRASIL, 2002), verifica-se no quadro 01, que em todos os estudos não se observou amostras de leite que apresentassem níveis detectáveis de aflatoxina M₁ acima dos valores estabelecidos pela legislação brasileira.

Quanto à presença de aflatoxina M₁ em queijos, Prado et al. (2001) verificaram que todas as amostras analisadas de queijo prato continham algum nível de aflatoxina. PRADO (2008) detectou a presença de aflatoxina M₁ em 40 amostras de queijos parmesão, das 88 analisadas, sendo que apenas duas amostras (2,3%) estavam com níveis de AFM₁ (270 ng/kg⁻¹ e 660 ng/kg⁻¹) acima do nível admissível de 250 ng/kg⁻¹ pela maioria dos países europeus. O mesmo autor, em 2000, observou níveis elevadíssimos (6900 ng/kg⁻¹) de aflatoxina M₁ em amostras de queijo minas, no Estado de Minas Gerais.

Cada país tem tentado definir regulamentações a fim de estabelecer limites de tolerância máximos. No Brasil, a Resolução nº 274 da Agência Nacional de Saúde – ANVISA, de 15 de outubro de 2002 (BRASIL, 2002), estabelece os limites máximos aceitáveis de aflatoxina M₁ 0,5 µg/L (ppb) em leite fluído e 5,0 µg/kg (ppb) para leite em pó, não sendo estabelecidos limites para outros derivados do leite.

Outras micotoxinas, como aflatoxinas B₁, G₁, M₂, M₄, esterigmatocistina, ocratoxina, toxina T-2 e fumonisinas, podem ocorrer no leite e derivados, bem como no leite humano, embora em quantidades menores. Porém, a principal forma é a aflatoxina M₁ (APPLEBAUM et al., 1982; GALVANO et al., 1996).

Portando, observa-se que a presença AFM₁, representa um risco para os consumidores de produtos lácteos, sendo necessário que pesquisas no âmbito de identificação e quantificação de AFM₁, incentivada pelas instituições de pesquisa e ensino, visto o aumento do consumo de produtos lácteos, em particular do queijo tipo ricota, no Brasil.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, L. C. **Os queijos no mundo**. Juiz de Fora: Arte-final. 2002. v. 1, p. 107.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INDÚSTRIA DE QUEIJOS. **Produção de queijos no Brasil**. Disponível em: <<http://www.abiq.com.br>>. Acesso em: 19 nov. 2004.
- APPLEBAUM, R. S. et. al. Aflatoxin: toxicity to dairy cattle and occurrence in milk and milk products: a review. **Journal of Food Protection**, v. 45, n. 8, p. 752-777, 1982.
- ARAÚJO, J. M. A. Aflatoxinas. In: _____. **Química de alimentos**. Viçosa, MG: UFV; 2004.
- ATAYDE, D. D. **Microbiota fúngica e determinação de aflatoxinas em cultivar de amendoim plantado em diferentes regiões produtoras no estado de São Paulo**. 2009. 121 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade de São Paulo. São Paulo, 2009.
- ATUI, M. B.; LAZZARI, F. A. Monitoramento de fungos em milho em grão, grits e fubá. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 4, p. 363-367, 1998. ISSN 0101-2061.
- BAGGIO, E. C. R. **Determinação de aflatoxina M₁ em leite pasteurizado pelos métodos de CCD e CLAE utilizando coluna de imunoafinidade**. 2006. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- BAKIRCI, I. A study on the occurrence of a aflatoxin M₁ in milk and milk products produced in Van province of Turkey. **Food Control**, Vurrey, v. 12, p. 47-51, 2001. ISSN 0956-7135.
- BIEHL, M. L.; BUCK, W. B. Chemical contaminants: their metabolism and their residues. **Journal of Food Protection**, v. 50, n. 12, p. 1058-1073, 1987.
- BOK, J. W. et. al. A regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. **Eukaryot. Cell**, Washington, v. 3, p. 527-535, 2004. ISSN 0535-9778.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. **Regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal**. Brasília, DF, 1997.
- _____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 jan. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 274, de 15 de outubro de 2002 da ANVISA. Aprova o Regulamento Técnico Sobre Limites Máximos de Aflatoxinas Admissíveis no Leite, no Amendoim, no Milho. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 16 out. 2002.

CABRAL JUNIOR, C. R. **Influência do tempo de desidratação e armazenamento sobre a ocorrência de fungos e destes na composição químico-bromatológica das vagens da algarobeira *Prosopis juliflora* (SW) D.C. em Alagoas**. 2003. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Alagoas: Universidade Federal de Alagoas. Rio Largo, 2003.

CAIXETA, A. A. **Aspectos gerais e morfológicos do fungo *Aspergillus flavus*: estudos de doenças de plantas**. Urutaí: Instituto Federal Goiano. Campus Urutaí. 2010. Disponível em: <http://fitopatologia1.blogspot.com.br/2010/07/aspectos-gerais-e-morfologicos-do-fungo_4512.html>. Acesso: 30 set. 2011.

CARRILLO, L. **Microbiologia agrícola**. Disponível em: <<http://www.unsa.edu.ar/matbib/hongos/01htextomohos.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2012.

CERESER, N. D. et al. Avaliação da qualidade microbiológica da ricota comercializada em supermercados do estado de São Paulo. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 12, n. 1. 2011.

CHRISTENSEN, C. M.; KAUFMANN, H. H. **Grain storage the role of fungi in quality loss**. Minneapolis: University of Minesota Press, 1969.

DILKIN, P. Micotoxicose suína: aspectos preventivos, clínicos e patológicos. **O Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 187-191, 2002.

DINIZ, S. P. S. S. **Micotoxinas**. Rio de Janeiro: Rural, 2002.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1999.

ESPER, L. M. R. et. al. Avaliação das características físico-químicas de ricotas comercializadas no município de Campinas-SP e da conformidade das informações nutricionais declaradas nos rótulos. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, n. 3, p. 299-304, 2007. ISSN 0073-9855.

FERNANDES, F. C. Micotoxinas: Risco biológico para trabalhadores em aviários. **Rev. Bras. Med. Trab.**, Belo Horizonte. v.2, n. 3, p. 200-208, jul./set. 2004.

FERNANDEZ, E. et. al. Fungus incidence on peanut grains affected by drying method and C_a nutrition. **Field Crops Research**, Amesterdan, v. 52, n.1, p. 9-15. 1997.

FERREIRA, H. et. al. Aflatoxinas: um risco a saúde humana e animal. **Ambiência**. Guarapuava, v. 2, n. 1, p. 113-127, jan./jun. 2006. ISSN 2175-9405.

FORRESTER, L. M. et. al. Evidence for involvement of multiple forms of cytochrome P-450 in aflatoxin B1 metabolism in human liver. **Proc. Natl. Acad. Sci.** Washington, v. 87, p. 8306-8310, 1990. ISSN 0027-8424.

FRANCO, D. B. G. M.; LANNGRAF, M. Microrganismos patogênicos de importância em alimentos. In: _____; _____. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2004.

FURTADO, M. M. **Tecnologia de queijos**: manual técnico para produção industrial de queijos. São Paulo: Pipemar, 1994.

GARRIDO, N. S. Occurrence of aflatoxins M₁ and M₂ in milk commercialized in Ribeirão Preto - SP, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, London. v. 1, n. 20, p. 70-73. 2003. ISSN 0265-203X.

GALVANO, F. et. al. Occurrence and stability of aflatoxin M1 in milk and milk products: a worldwide review. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 10, p. 1079-1090, 1996.

GONÇALEZ, E. et. al. Análise de micotoxinas no Instituto Biológico de 1989 a 1999. **O Biológico**, São Paulo, v. 63, n. 1/2, p. 15-19, 2001. ISSN 0366-0567.

GROOPMAN, J. D. et. al. Exposure in human populations: measurements and relationship to cancer. **CRC Crit. Rev. Toxicol.**, Boca Raton, v. 19, p. 113-45, 1988.

HARRISON, J. C. et. al. Aflatoxin exposure in the United Kingdom constitute cancer risk? **Environ. Health Perspect.**, Research Triangle Park, v. 99, p. 99-105, 1993. ISSN 0091-6765.

HILL, R. A. et. al. Ecology of the *Aspergillus flavus* group and aflatoxin formation in corn and groundnut. In: LACEY, J. (Ed.). **Trichotecenes and other mycotoxins**. Chichester: J. Wiley, 1985.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER; WORLD HEALTH ORGANIZATION. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, Lyon, v. 56, p. 19-23, 1993. ISSN 1017-1606.

JOBIM, C. C.; GONÇALVES, G. D.; SANTOS, G. T. Qualidade sanitária de grãos e de forragens conservadas “versus” desempenho animal e qualidade de seus produtos. In: SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS, 1., 2001, Maringá. **Anais...** Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2001. p. 242-261.

KANIOU-GRIGORIADOU, I. et. al. Determination of aflatoxin M1 in ewe's milk samples and the produced curd and feta cheese. **Food Control**, Vurrey, v. 16, p. 257-261, 2005. ISSN 0956-7135.

KOKALIS-BURELLE, N. et. al. **Compendium of peanut diseases**. 2. ed. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1997. 94 p.

KWIATKOWSKI, A.; ALVES, A. P. F. Importância da detecção e controle de aflatoxinas em alimentos. **Rev. Saúde e Biol.**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 2, p. 44-53. 2007.

LAFORET, E. P. El género *Aspergillus*: Métodos, claves y referencias actuales para las especies comunes em clínica y em ambientes diversos. **Boletín Micológico**, Valparaiso, v. 23, 2008. ISSN 0719-3114.

LÓPEZ, C. et. al. Distribution of aflatoxin M1 in cheese obtained from milk artificially contaminated. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 64, n. 1-2, p. 211-215, 2001. ISSN 0168-1605.

MACKENZIE, D. W. R. Keynote lecture: *Aspergillus* in man. In: BOSSCHE, H. van den; _____; CAUWENBERGH, G. (Ed.). **Aspergillus and Aspergillosis**. New York: Plenum Press, 1988. p. 332.

MAIA, R. et al. Uso do açafrão (*Curcuma longa* L.) na redução da *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048) em 38 ricota. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 2, p. 358-365, mar./abr., 2004. Disponível em: <http://www.editora.ufla.br/site/_adm/upload/revista/28-2-2004_16.pdf>. Acesso: 12 jan. 2012.

MARTINS, R. S. et. al. Alterações da rede logística e expansão do mercado de leite longa vida no Brasil. **Organizações Rurais e Agroindustriais**. Lavras, v. 1, n. 2, p. 55-69. 1999.

MENEZES, A. C. S. **Desenvolvimento de bebida láctea fermentada à base de soro de leite e polpa de cajá (*Spondia mombim* L.) com potencial atividade probiótica**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia em Alimentos) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2011. Disponível em: <http://www.pgcta.ufrpe.br/files/dissertacoes/2011/Adriana_Carla_Santos_Menezes.pdf>. Acesso: 11 nov. 2011.

NORDIN, N.; LUCHESE, R. H. Detecção de aflatoxina e zearalenona em milho (*Zeamays*), destinado à alimentação animal. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 32, n. 1, p. 35-39, 1998. ISSN 0101-2061.

OLIVEIRA, C. A. F.; GERMANO, P. M. L. Aflatoxina M₁ em leite e derivados: ocorrência no Brasil e aspectos relativos à legislação. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 11, n. 48, p. 22-25, 1997. ISSN 0101-9171.

PINTADO, M. E. et. al. Technology, chemistry and microbiology of whey cheeses. **Food Science and Technology International**, v. 7, n. 2, p. 105-116, 2001. ISSN 1365-2621.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. London: Blackie Academic Professional, 1997. 593 p.

POWELL, K. A.; RENWICK, A.; PEBERDY, J. F. (Ed.). **The genus *Aspergillus*: from taxonomy and genetics to industrial application**. New York: Plenum Press, 1994.

PRADO, G. Ocorrência de aflatoxina M₁ em queijo parmesão consumido em Minas Gerais, Brasil. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1906-1911, nov./dez., 2008. ISSN 1413-7054.

_____. et. al. Aflatoxina M₁ em queijo prato e parmesão determinada por coluna de imunoafinidade e cromatografia líquida. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 60, n. 2, p. 147-151, 2001. ISSN 0073-9855.

_____. et. al. Aflatoxin M₁ in samples of "Minas" cheese commercialized in the city of Belo Horizonte- Minas Gerais, Brazil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 3, p. 398- 400, 2000. ISSN 0101-2061.

RAVEN, P. H. et. al. **Biologia vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RIBEIRO, A. C. Controle microbiológico da vida de prateleira de ricota cremosa. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 113-117, jan./fev. 2005. ISSN 1413-7054.

RITTER, A. C. **Potencial toxigênico de *Aspergillus flavus* testado em diferentes meios e condições**. 2007. 72 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007. p. 10.

SALEEMULLAH, A. I. Aflatoxin contents of stored and artificially inoculated cereals and nuts. **Food Chemistry**, Barking, v. 98, p. 699-703, 2006. ISSN 0308-8146.

SANTOS, V. A. Q. **Perfil microbiano, físico-químico e análise das boas práticas de fabricação (bpf) de queijos minas frescal e ricota**. 2009. 105 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 2009. Disponível em: <<http://www.dominiopublico.gov.br/download/texto/cp083380.pdf>>. Acesso em: 22 jun. 2011.

SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998.

TANIWAKI, M. H.; SILVA, N. **Fungos em alimentos: ocorrência e detecção**. Campinas: Núcleo de Microbiologia; ITAL, 2001. 82 p.

TANIWAKI, M. H.; VAN DENDER, A. G. F. Bolores produtores de toxinas em queijos: ocorrência e significado. **Coletânea ITAL**, Campinas, v. 21, n. 2, p. 187-200, jul./dez. 1991. ISSN 0100-350X.

VAAMONDE, G. Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* section *flavi* from different substrates in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 88, p. 79-84, 2003. ISSN 0168-1605.

WEIGEL, M. **Avaliação da contaminação por aflatoxina M₁ em leite cru e leite UHT**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) -. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

WOGAN, G. N. Aflatoxin carcinogenesis: interspecies potency differences and relevance for human risk assessment. **Progress in Clinical and Biological Research**, New York, v. 374, p. 123-137, 1992. ISSN 0361-7742.

YU, J. et. al. *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases. **Rev. Iberoam. Micol.**, Barcelona, v. 22, p. 194-202. 2005. ISSN 1130-1406.

3 ARTIGO DE RESULTADOS

3.1 Fungos toxigênicos em queijos tipo ricota comercializados em Maceió-Alagoas

RESUMO

A ricota se destaca, por sua alta umidade entre os queijos frescos. Apresenta-se como um produto de baixo custo, disponível para a maioria das classes sociais e representa um produto bastante popular por sua indicação em dietas com baixo teor de gordura. No entanto, seu alto teor de umidade a torna também um excelente substrato para o crescimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos, reduzindo a segurança desse produto. O objetivo deste trabalho foi avaliar a microbiota fúngica em cinco marcas de ricota comercializadas em Maceió, AL. Foram coletadas em hipermercados de Maceió-AL, 20 amostras queijo tipo ricota, de 5 marcas, sendo 4 amostras de lotes diferentes de cada marca, entre os meses de abril e julho de 2011. As análises físico-químicas foram realizadas de acordo com o Instituto Adolfo Lutz. A identificação dos fungos foi realizada de acordo com o método descrito no *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (1992). Em relação às características físico-químicas, observou-se que todas as amostras de queijo tipo ricota apresentaram umidade acima de 55,0%, sendo, portanto, classificadas como queijo de muito alta umidade. No que diz respeito ao teor de gordura, as amostras foram classificadas como queijos semigordos, por apresentarem teores de gordura no extrato seco entre os limites de 25,0% a 44,9%. Foram isolados gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Geotrichum* e *Trichoderma*, sendo verificada a presença de *Aspergillus flavus* em uma das marcas analisadas. A contagem de bolores variou entre $6,5 \times 10^2$ a $1,4 \times 10^6$ UFC/g. Pode-se observar nos queijos analisados, ausência de controle quanto aos teores de proteínas e cloretos, presença de fungos do gênero *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. na maioria das marcas analisadas, é fator determinante da falta de controle de higiene e das condições de alimentação dos rebanhos leiteiros. De acordo com os teores de gordura analisado todos os queijos foram classificados como sendo semi-gordos, apesar de serem considerados queijos magros e fazer parte da dieta de pessoas também convalescentes.

Palavras-chave: *Aspergillus flavus*. Bolores. Leveduras. Queijo. Ricota.

ABSTRACT

The ricotta stands out for its high moisture content between fresh cheeses. Presents itself as a low-cost, available for most social classes and is a product quite popular for its indication in diets with low fat. However, its high moisture content also makes it an excellent substrate for the growth of spoilage and pathogenic microorganisms, reducing the safety of this product. The aim of this study was to evaluate the fungal microbiota in five brands of ricotta sold in Maceio. AL. Were collected in supermarkets Maceió-AL, 20 samples ricotta cheese type, 5 marks, 4 samples from different batches of each brand, between April and July 2011. The physico-chemical analyzes were performed according to the Instituto Adolfo Lutz. The identification of the fungi was performed according to the method described in the Compendium of methods for the microbiological examination of foods (1992). In relation to the physico-chemical characteristics, it was observed that all the samples presented ricotta cheese type moisture above 55.0%, and is therefore classified as cheese very high humidity. With regard to the fat, the samples were classified as cheese semigordos for presenting fat content in the dry extract in the range of 25.0% to 44.9%. Were isolated genera *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Trichoderma* and *Geotrichum*, and verified the presence of *Aspergillus flavus* in one of the brands tested. The mold count ranged from 6.5×10^2 to 1.4×10^6 CFU / g. It can be observed in the cheeses analyzed, absence of control for the levels of proteins and chlorides, the presence of fungi of the genus *Penicillium* spp. and *Aspergillus* spp. in most brands analyzed, is a determining factor of lack of control and hygiene conditions of feeding dairy herds . According to the in fat cheeses were analyzed all classified as semi-acids, despite being considered fat cheeses and become part of the diet of people also convalescent.

Keywords: *Aspergillus flavus*. Cheese. Molds. Ricotta. Yeasts.

4 INTRODUÇÃO

O leite é um dos alimentos mais completos e largamente utilizados na alimentação humana, principalmente por crianças (POLEGATO e RUDGE, 2003). É reconhecidamente um alimento de grande valor nutritivo, fornecendo ao homem macro e micro nutrientes para seu crescimento, desenvolvimento e manutenção da saúde (TINÔCO et al., 2002).

Obtido em circunstâncias naturais, o leite é uma emulsão de cor branca, ligeiramente amarelada, de odor suave e gosto adocicado. É secretado pelas glândulas mamárias, sendo alimento indispensável nos primeiros meses de vida dos mamíferos (ALBUQUERQUE, 1997).

Os queijos representam um dos principais derivados do leite, sendo a ricota proveniente da precipitação das proteínas do soro do leite. O soro é um subproduto do processamento dos queijos, composto por lactose, proteínas e sais. Do volume de leite destinado à fabricação de queijos, entre 75 e 85% resultam em soro. A expressiva produção de queijo gera grande quantidade dessa matéria-prima ainda sub-aproveitada, pois uma pequena parte do soro é empregada na fabricação de ricota e na produção de bebidas lácteas, sendo mais comum a utilização do soro na alimentação de suínos, ou seu lançamento em rios ou lagoas de maturação (UES et al., 2006).

Conhecida também como “queijo albumina”, a ricota é constituída basicamente de lactoalbumina e lactoglobulina, que representam cerca de 80% das proteínas do soro. Essas proteínas são facilmente desnaturadas e precipitadas pelo calor, sob influência de acidificação, o que constitui o princípio básico da fabricação da ricota (MORAIS, 2010).

De acordo com o Serviço de Inspeção Federal (SIF) e Estadual (SIE) de Alagoas, funcionam no estado aproximadamente 61 laticínios, sendo quatro fiscalizados pelo SIF e 57 pelo SIE. Os queijos são considerados um veículo frequente de patógenos de origem alimentar; a sua contaminação assume destacada relevância tanto para a indústria, pelas perdas econômicas, como para a saúde pública, pelo risco de causar doenças transmitidas por alimentos (BORGES, 2003).

Muitas vezes, os queijos são elaborados sem que sejam observados os padrões higiênico-sanitários. Outro fator agravante é a qualidade da matéria – prima, que influencia diretamente as características organolépticas, bioquímicas e microbiológica dos queijos (SCHULZE e FERNANDES, 1997).

Entre os contaminantes mais frequentes dos queijos estão os fungos filamentosos. Algumas espécies são responsáveis pela produção de aflatoxinas, contaminando os alimentos, tornando-se prejudiciais à saúde dos animais e dos seres humanos (RAVEN et al., 2001; TANIWAKI et al., 1999).

Nesse contexto, objetivou-se com esse estudo avaliar a presença de fungos patogênicos e determinar o perfil físico-químico de ricotas comercializadas no Estado de Alagoas.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Delineamento experimental

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado. Foram coletadas 20 amostras de queijo tipo ricota, de 5 marcas diferentes, em hipermercados localizados na cidade de Maceió, entre os meses de abril e julho de 2011. Paralelamente à caracterização da microbiota fúngica, foram realizadas análises em triplicadas de umidade, pH, cinzas, cloretos e proteínas; a contagem do número de unidades formadoras de colônias de fungos filamentosos realizada em duplicada.

5.2 Local e Coleta das amostras

As amostras de ricota foram provenientes de cinco laticínios do Estado de Alagoas, localizados na região da zona da mata, litoral e sertão de Alagoas (Batalha, Pilar, Maceió, Viçosa, Capela), segundo dados de rotulagem. Peças de queijos de aproximadamente 500 gramas foram adquiridas em estabelecimentos comerciais de Maceió-AL e transportadas em caixas isotérmicas para o Laboratório de Controle e Qualidade de Alimentos da Universidade Federal de Alagoas para análises físicoquímica e de fungos filamentosos, e posteriormente encaminhados para o Laboratório de Fitopatologia do Centro de Ciências Agrárias-CECA/UFAL para

identificação das espécies fúngicas. As amostras foram designadas por códigos (A, B, C, D e E) e mantidas sob refrigeração ($4^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$) até o momento das análises.

5.3 Análises físico químicas

As análises físico-químicas de umidade, cinzas, cloretos, pH e proteína bruta foram realizadas de acordo com a metodologia preconizada pelo Instituto Adolfo Lutz (2008).

5.3 Análise da Microbiota Fúngica das Ricotas

A pesquisa de fungos filamentosos foi realizada segundo método descrito no *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* da American Public Health Association – APHA (1992). Fragmentos de aproximadamente 5cm X 5cm de ricota foram semeados em placas de Petri contendo meio de cultura Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC), em triplicata. As placas foram incubadas em temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), durante sete a dez dias.

Após crescimento e contagem, as colônias foram selecionadas para visualização das estruturas morfológicas em microscopia direta, utilizando-se água destilada e/ou azul de metileno, como corante. A identificação destes microrganismos ocorreu segundo Menezes e Silva (1997). As amostras não identificadas foram selecionadas para a realização de microculturas segundo Alfenas e Mafia (2007).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Caracterização físico-química

Os resultados obtidos referentes às variáveis físico-químicas nas amostras de queijo tipo ricota estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores médios físico-químicos para as amostras de cinco marcas de queijos tipo Ricota produzidos no Estado de Alagoas e comercializados em hipermercados de Maceió-AL, em 2011

MARCAS	pH	Umidade (%)	GES (%)	Cinzas (%)	Cloretos (%)	Proteínas (%)
A	5,98	59,45	40,09	1,33	8,09	17,99
B	5,71	61,12	40,64	3,02	5,55	16,00
C	5,25	69,40	34,08	1,27	2,97	12,89
D	5,12	67,10	42,56	1,33	4,73	16,22
E	5,66	58,10	38,65	1,33	2,28	17,16

pH – Potencial Hidrogeniônico
 GES – Gordura no Extrato Seco
 Fonte: Autora, 2013.

Observa-se que todas as amostras analisadas apresentaram umidade acima de 55,0%, sendo, portanto, classificadas como queijo de muita alta umidade, conforme a Portaria 146 - Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos (BRASIL, 1996).

Mattanna et al. (2010), ao analisarem um creme de ricota, na cidade de Santa Maria - RS, encontraram teor de umidade nas amostras de 69,97%, similar aos valores observados neste trabalho.

Sabe-se que a umidade é um importante parâmetro usado para caracterizar os diferentes tipos de queijos. Dela dependem as características que estão relacionadas com a fase aquosa do queijo, como cinzas, bolores e leveduras,

cloretos e proteínas. O crescimento indesejável de mofos é bastante relacionado com a umidade do queijo e com a umidade relativa do ar (ROCHA, 2004).

Para gorduras no extrato seco (GES), a referida Portaria classifica os queijos como sendo extra-gordos ou duplo-creme, quando contém o mínimo de 60% de GES, gordos (entre 45,0 e 59,9%), semigordo (entre 25,0 e 44,9%), magros (entre 10,0 e 24,9%) e desnatados (10,0%).

Pode-se observar neste estudo que todas as amostras apresentaram teores de gordura no extrato seco, dentro do intervalo de 25,0% a 44,9%, o que os classifica como queijos semigordos.

Segundo Ribeiro et al. (2005) as exigências de mercado em relação a produtos mais nutritivos e saudáveis, particularmente no que se refere ao teor de gordura, estimulam a produção e criação de novos produtos como a ricota cremosa, com consistência de patê, porém sem adição de creme de leite. Com isso, o produto final contém apenas proteínas de fácil digestão e alto valor biológico.

6.2 Caracterização microbiológica

A Tabela 2 apresenta os resultados para o número de unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g) nas cinco marcas de queijo tipo ricota analisadas.

Tabela 2 - Valores médios para a microbiota fúngica patogênica identificada nas cinco marcas de queijos tipo ricota produzido no Estado de Alagoas e comercializados em hipermercados de Maceio – AL em 2011

Marca	Nível de Inspeção Realizada	Status do leite	Microbiota identificada	UFC/g
A	SIE	Pasteurizado	<i>Geotrichum</i> sp.	$3,0 \times 10^2$
			<i>Penicillium digitatum</i>	$3,0 \times 10^4$
			<i>Aspergillus flavus</i>	$2,0 \times 10^4$
B	SIE	Pasteurizado	<i>Cladosporium</i> sp.	$2,6 \times 10^3$
			<i>Penicillium</i> sp.	$4,0 \times 10^3$
			<i>Penicillium viridicatum</i>	$3,0 \times 10^4$
C	SIF	Pasteurizado	<i>Geotrichum</i> sp.	$2,0 \times 10^6$
			<i>Aspergillus</i> sp.	$2,2 \times 10^3$
D	SIE	Pasteurizado	<i>Penicillium digitatum</i>	$1,0 \times 10^2$
			<i>Aspergillus ochraceus</i>	$1,0 \times 10^3$
			<i>Penicillium viridicatum</i>	$2,6 \times 10^4$
E	SIE	Pasteurizado	<i>Trichoderma</i> sp.	$4,0 \times 10^3$
			<i>Cladosporium</i> sp.	$2,2 \times 10^4$

UFC/g – Unidade formadora de colônia/grama.

Fonte: Autora, 2013.

Observa-se gêneros e espécies de fungos uni e pluricelulares toxigênicos nas amostras/marcas analisadas. A presença destes patógenos variou de $1,0 \times 10^2$ (Marca D – *Penicillium digitatum*) a $2,0 \times 10^6$ UFC/g (amostra C – *Geotrichum* sp.).

Embora a legislação brasileira não regulamente limites aceitáveis de bolores e leveduras em ricotas, a identificação e contagem elevada desses microrganismos nestes queijos, indicam condições higiênico-sanitárias inadequadas de processamento, podendo proporcionar, também, a multiplicação de microrganismos patogênicos.

Cereser et al. (2011) também verificaram valores elevados de fungos filamentosos em amostras de ricota, no Estado de São Paulo, que oscilaram entre $1,0 \times 10^4$ e $1,0 \times 10^5$ UFC/g.

Segundo FEITOSA et al. citado por BORGES (2003), contagens elevadas de bolores e leveduras constatadas em queijos indicam produção sob condições de higiene insatisfatórias. Esses microrganismos são considerados os principais responsáveis pela deterioração de queijos e alguns deles apresentam risco à saúde dos consumidores.

Os fungos *Penicillium* sp. são contaminantes naturais da alimentação humana e animal, encontrados em milho, cereais, trigo, nozes, frutas secas, vinho e leite, que, quando armazenados em condições favoráveis de umidade e temperatura, podem provocar uma doença ocasional denominada peniciliose. Algumas espécies podem produzir ocratoxina-A, nefrotóxica e também carcinogênica (CHIAVARO et al., 2002).

Sabino (1996) destaca que os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são capazes de crescerem em diversos substratos com condições ambientais variáveis e produzirem micotoxinas. A presença do gênero *Aspergillus flavus* na marca A ($2,0 \times 10^4$ UFC/g), representa um perigo em potencial à saúde dos consumidores, visto que 50% dos fungos dessa espécie são produtores potenciais de aflatoxinas (DILKIN, et al., 2000).

Estratégias e instrumentos legais são necessários na agricultura e na indústria de alimentos para assegurar a qualidade de produtos de origem animal (GONÇALEZ et al. 2004), pois a presença destes microrganismos pode sugerir a contaminação também por micotoxinas neste tipo de queijo, o que coloca em risco a segurança alimentar da população consumidora.

As boas práticas agrícolas, de transporte, de manufatura e de armazenagem continuam sendo a melhor forma de prevenir a contaminação de alimentos por fungos potenciais produtores de aflatoxinas e, conseqüentemente, a contaminação do leite.

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que existe ausência de controle de qualidade, quanto aos teores de proteínas e cloretos, nas ricotas analisadas.

Também se pode verificar que os queijos analisados foram classificados como sendo semi-gordos, apesar de serem considerados queijos magros e fazer parte da dieta de pessoas também convalescentes. Outro fator agravante foi a presença de fungos dos gêneros *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. na maioria das marcas analisadas, evidenciando a falta de controle de higiene nas indústrias, bem como na alimentação dos rebanhos leiteiros.

Outro aspecto importante a ser ressaltado, é a ausência de uma legislação específica para este tipo de queijo, quanto à presença de espécies patogênicas e metabólitos secundários.

REFERÊNCIAS

- AMERICANPHA PUBLIC HEATH ASSOCIATION. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3. ed. Washington, 1992. p. 1219.
- ALBUQUERQUE, L. C. **O leite em suas mãos**. Juiz de Fora: Concorde, 1997. v. 3.
- ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em fitopatologia**. Viçosa, MG: UFV, 2007. 382 p.
- BORGES, M. F., Microrganismos patogênicos e indicadores em queijos de coalho produzidos no estado do Ceará, Brasil. **Revista Brasileira CEPPA**, Curitiba, v. 21, n. 1, p. 31-40, jan./jun. 2003.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 11 mar. 1996.
- CERESER, N. D. et. al. Avaliação da qualidade microbiológica da ricota comercializada em supermercados do estado de São Paulo. **Ci. Anim. Bras.**, Goiânia, v. 12, n. 1, p. 149-155, jan./mar. 2011. DOI: 10.5216/cab.v12i1.6372
- DILKIN, P. et. al. Classificação macroscópica, identificação da microbiota fúngica e produção de aflatoxinas em híbridos de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 137-141, 2000.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo, 2008.
- MATTANNA, P. et. al. Caracterização físico-química de creme de ricota. In: JORNADA ACADÊMICA INTEGRADA, 25., 2010. Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: UFSM, 2010. Disponível em: < http://portal.ufsm.br/jai2010/anais/trabalhos/trabalho_1041271762.htm > . Acesso em: 14 nov. 2011.
- MORAIS, M. V. T. et. al. **Produção industrial de ricota**. Disponível em: <<http://www.dipemar.com.br>>. Acesso em: 5 nov. 2010.
- POLEGATO, E. P. S.; RUDGE, A. C. Estudo das características físico-químicas e microbiológicas dos leites produzidos por mini-usinas da Região de Marília-SP/ Brasil. **Higiene Alimentar**, v. 17, n. 110, p. 56-63, 2003.
- RAVEN, P. H. et. al. **Biologia Vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2001.
- RIBEIRO, A. C., et. al. Controle microbiológico da vida de prateleira de ricota cremosa. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 113-117, jan./fev. 2005.

ROCHA, A. M. P. **Controle de fungos durante a maturação de queijo minas padrão**. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, 2004.

SABINO, M. Micotoxinas. In: OGA, S. **Fundamentos da toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 1996.

SCHULZE, J. C. M.; FERNANDES, M. N. A importância da higiene em indústrias de alimentos. **Revista Nacional da Carne**, n. 247, p. 62-67, set. 1997.

SILVA, N. et. al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. contagem de bolores e leveduras**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2007. Cap. 2. p. 99-108.

TANIWAKI, M. H. et. al. Comparison of culture media to recover fungi from flour and tropical fruit pulp. **Journal of Food Mycology**, v. 2, p. 291-302, 1999.

TINÔCO, A. L. A. et. al. Estudo microbiológico comparativo de leites pasteurizados em estabelecimentos com inspeção federal e em fazendas. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 96, p. 88-93, 2002.

UES, I. et. al. Otimização do processo de fabricação da ricota. **Synergismus scyentifica**, Pato Branco, v. 1, n. 1-4, p. 1-778, 2006.