

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
MESTRADO EM NUTRIÇÃO**

**MICROBIOTA FÚNGICA DE QUEIJO DE COALHO
COMERCIALIZADAS NO ESTADO DE ALAGOAS**

GENILDO CAVALCANTE FERREIRA JUNIOR

**MACEIÓ
2012**

GENILDO CAVALCANTE FERREIRA JUNIOR

**MICROBIOTA FÚNGICA DE QUEIJO DE COALHO
COMERCIALIZADOS NO ESTADO DE ALAGOAS**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Nutrição da Universidade Federal de
Alagoas como requisito final de obtenção do
título de Mestre em Nutrição Humana.

Prof. Dr. Cyro Rêgo Cabral Júnior – Orientador - FANUT
Profa. Dr^a. Edna Peixoto da Rocha Amorim – Co-Orientadora - CECA

MACEIÓ

2012

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

F383m Ferreira Júnior, Genildo Cavalcante.
Microbiótica fúngica de queijo de coalho comercializadas no estado de Alagoas
/ Genildo Cavalcante Ferreira Júnior. – 2012.
65 f.; il.

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, 2012.

Inclui bibliografia.

1. Queijo de coalho – Análise. 2. Aspergillus sp. 3. Penicillium sp. I. Título.

CDU: 612.39



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 DE QUEIJO DE COALHO
COMERCIALIZADOS NO ESTADO DE ALAGOAS**

por

Genildo Cavalcante Ferreira Junior

A Banca Examinadora, reunida no dia 27 do mês de abril do ano de 2012,
considerou o candidato **APROVADO**.

Prof. Dr. Cyro Rêgo Cabral Júnior

Universidade Federal de Alagoas

SIAPE: 2571220

Prof. Dr. Cyro Rêgo Cabral Júnior - Orientador
Faculdade de Nutrição - FANUT
Universidade Federal de Alagoas

Prof. Dr.ª Maria Cristina Delgado da Silva
Faculdade de Nutrição - FANUT
Universidade Federal de Alagoas

Prof. Dr. Johnnatan Duarte
Instituto Federal de Alagoas/Campus Maceió-AL

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus e *in memoriam* aos meus pais, Genildo e Lourdes, pelo amor e esforço incondicional em garantir um futuro seguro aos seus filhos, a minha irmã Genilsa pelo apoio e incentivo constante ao longo desses anos de estudos e aos demais irmãos (Gilceia, Gilcinea e Girlan).

AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente a Deus, pelo conforto e proteção que ele deu ao longo desses anos. Proteção e conforto este percebido em meus momentos de angústias, cansaço e estresse. Acredito que sem a ajuda irrefutável dele, jamais chegarei aonde cheguei. O Senhor vem demonstrando em minha vida, um amor incondicional e que mesmo diante de muitos obstáculos que a vida tem imposto, ele vem me mostrando que eu consigo chegar até o fim.

Agradeço em especial, aos meus pais (Genildo e Lourdes), que mesmo sabendo que eles não estão mais presente, acredito que esse momento seria recebido por eles, com muito orgulho e alegria.

As minhas irmãs Genilsa, Gilceia e Gilcinea, pela o incentivo, dado ao longo desses anos de estudos, no entanto, o meu agradecimento em especial à Genilsa, pela preocupação sempre visível em minhas conversas com ela, bem como pelo apoio e confiança.

Aos professores pelo voto de confiança em mim depositado.

Professor Dr. Cyro Rego Cabral pela imensa confiança em depositado, em me orientar nesse trabalho de dissertação.

Professora Dr^a Maria Cristina Delgado da Silva, que sempre me incentivou, apoio, e ajudou em todos os momentos de minha vida acadêmica. Sem a ajuda dela, acredito que meus caminhos para chegar até aqui, seriam bem mais difíceis e longos e certamente não estarei apresentando este trabalho nesse momento.

Professor Dr. Ticiano Gomes pela valiosa ajuda e sugestões.

Professor Dr. Antônio Euzébio Goulart e Professora Dr^a Ednar Peixoto Amorim, pela ajuda no desenvolvimento desse trabalho.

Aos meus amigos de mestrado que foram essenciais no desenvolvimento dessa dissertação, Vitor Luiz Melo e Elenita Marinho de Albuquerque, em especial, por sua constante preocupação e atenção.

Aos demais amigos (Angela de Guadalupe, Eliane Souza) e colegas de mestrado, pelo companheirismo e incentivo.

Ao Cantidio Filho, Juliana de Oliveira, Amália Luiza Ivo e Wanessa dos Santos, pela força e ajuda nas análises no laboratório de controle de qualidade da FANUT.

As alunas de iniciação científica, Bruna Rocha e Rafaela Costa, pela valiosa ajuda, e esforço feito por elas, em abdicar seus sábados para nos ajudar nas análises no laboratório. A secretária da PPGNUT, na pessoa da Amanda Menezes pela paciência com qual sempre me atendeu.

Aos meus amigos que sempre me apoiaram e que jamais irei esquecer, Valdenor Filho, Katia Cilene, Flavia Quintino, Simone da Silva, Julio Cesar, Plinio Jose da Silva, Jamili de Oliveira e Nelson Vieira.

A FAPEAL, pelo apoio financeiro, dado ao longo dos dois anos de mestrado.

Aos professores da banca de qualificação e de defesa, pela paciência em corrigir este trabalho.

E por fim, minha imensa gratidão a Universidade Federal de Alagoas, em particular, a Faculdade de Nutrição pela oportunidade de subir mais um degrau de minha vida acadêmica.

RESUMO GERAL

A presença de fungos nos alimentos pode um representar um risco potencial para a saúde do homem, pois indica condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, além de poder apresentar metabólitos tóxicos denominados micotoxinas. O leite constitui um alimento rico em proteínas, lipídeos, minerais e vitaminas, dentre outros nutrientes. Desta forma, torna-se um excelente substrato que favorece o crescimento de fungos patogênicos oportunistas. O grande potencial deste alimento é o de originar vários derivados, dentre os quais, o queijo de coalho, manteiga, ricota entre outros produtos. Com base no exposto, este trabalho teve como objetivo caracterizar a microflora epífita patogênica em queijo de coalho comercializado em Alagoas. Este estudo foi desenvolvido na Universidade Federal de Alagoas - UFAL, entre os meses de abril de 2011 a outubro de 2011. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado. Foram coletadas 20 amostras de queijo de coalho, de 5 marcas diferentes, em hipermercados localizados na cidade de Maceió - AL. As análises microbiológicas foram realizadas em duplicada e as físico-químicas em triplicata e as variáveis analisadas foram a contagem do número de unidades formadoras de colônias de fungos filamentosos, identificação da microbiota fúngica, e determinação de umidade e pH. As amostras foram semeadas em meio DRBC (ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol), utilizando-se diluições de 10^{-1} até 10^{-5} . As placas foram incubadas em temperatura de 25°C durante cinco dias. Após esse período, a identificação dos fungos filamentosos se deu em microscópio óptico. Para os gêneros e espécies de fungos filamentosos que não puderem ser identificadas após os sete dias, foi realizado microculturas. Dos fungos filamentosos identificados, foram isolados 7 gêneros, destacando-se as espécies *Aspergillus flavus* e *Penicillium sp*, potencialmente produtoras de micotoxinas, representando desse modo um perigo nas amostras de queijos analisadas. Observou-se também, a necessidade da adoção de Boas Práticas de Fabricação, evidenciada pelas altas contagens de contagem de fungos filamentosos, $5,0 \times 10^2$ a $1,7 \times 10^6$ UFC/g.

Palavras-chave: *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, queijo de coalho

GENERAL ABSTRACT

The presence of fungi in foods one can pose a potential risk to human health because it indicates inadequate sanitary conditions, and can introduce toxic metabolites called mycotoxins. Milk is a food rich in proteins, lipids, minerals and vitamins, among other nutrients. Accordingly, it is an excellent substrate which favors growth of opportunistic pathogenic fungi. The great potential of this food is the cause of various derivatives, among which, the cheese curd, butter, cottage cheese and other products. Based on the above, this study aimed to characterize the pathogenic microflora epiphyte in farmhouse cheese sold in Alagoas. This study was conducted at the Federal University of Alagoas - UFAL, between the months of April 2011 to October 2011. The experimental design was completely randomized. We collected 20 samples of cheese curd from 5 different brands, supermarkets located in the city of Maceio - AL. Microbiological analyzes were performed in duplicate and triplicate physicochemical and variables were analyzed by counting the number of colony forming units of fungi, identification of mycoflora, and determination of moisture and pH. The samples were plated in medium DRBC (Rose Bengal Agar Dichloran Chloramphenicol), using dilutions of 10^{-1} to 10^{-5} . The plates were incubated at 25 ° C for five days. After this period, the identification of filamentous fungi occurred in an optical microscope. For the genera and species of fungi that can not be identified after the seven days, was carried microcultures. Filamentous fungi identified were isolated seven genres, highlighting the species *Aspergillus flavus* and *Penicillium* sp, potentially producing mycotoxins, thereby representing a danger in the samples analyzed. There was also the need to adopt Good Manufacturing Practices, evidenced by high counts of filamentous fungi count $5,0 \times 10^2$ to $1,7 \times 10^6$. Cheese curds

Key words: *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., cheese curds

LISTA DE TABELAS

	Páginas
TABELA 01 – Ocorrência de aflatoxina M ₁ (AFM ₁), em leite e derivados	35
TABELA 02 – Contagem de fungos filamentosos e identificação da microbiota fúngica de amostras de queijo de coalho	56
TABELA 03 – Médias dos resultados de pH e umidade de amostras de queijo coalho	59

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 01 - Estrutura do furano e da cumarina	32
Figura 02 - Estrutura das aflatoxinas	32
Figura 03 – Microculturas	54
Figura 04 – Estufa com circulação de ar e dessecador	55
Figura 05 – Análise de pH	55

LISTA DE ABREVIATURAS

AFB ₁	Aflatoxina B ₁
AFB ₂	Aflatoxina B ₂
AFG ₁	Aflatoxina G ₁
AFG ₂	Aflatoxina G ₂
AFM ₁	Aflatoxina M ₁
AFQ ₁	Aflatoxina Q ₁
AFP ₁	Aflatoxina P ₁
AFB _{2a}	Aflatoxina B _{2a}
AFLs	Aflatoxinas
AFL	Aflatoxicol
ANVISA	Agencia Nacional de Saude
BDA	Batata-dextrose-agar
CCD	Cromotografia em camada delgada
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DL	Dose letal
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DRBC	Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FAPI	FAPI ((N ⁵ -formil-2, 5,6-triamino-4-oxo-N ⁵ -imidil)-9-hidroxiil-aflatoxina-B ₁)
GMC	Grupo Mercado Comum
IARC	International Agency for Research on Cancer
pH	Potencial de Hidrogênio
PCR	Reação em cadeia polimerase
RNA	Ácido Ribonucléico
SIE	Serviço de Inspeção Estadual
SIF	Serviço de Inspeção Federal
UFC	Unidade Formado de Colonia

UV	Luz Ultra Violeta
ppb	Partículas por bilhão
µg	Micrograma
Kg	Quilograma
Ng	Nanograma
g	Gramma
mg	Miligrama
L	Litro
mL	Mililitro
sp	Espécie
spp	Especies

SUMÁRIO

RESUMO GERAL

GENERAL ABSTRACT

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

1. INTRODUÇÃO GERAL	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	
Produção de queijos, fungos toxigênicos, micotoxinas, métodos de análises e ocorrência de micotoxinas em queijos	19
2.1. LEITE E DERIVADOS	20
2.1.1. Leite	20
2.1.2. Queijos	22
2.1.3. Queijos de Coalho	22
2.2. FUNGOS FILAMENTOSOS	24
2.2.1. <i>Aspergillus</i>	27
2.3. MICOTOXINAS	28
2.3.1. Aflatoxinas	30
2.4. MÉTODOS DE ANÁLISE DE FUNGOS FILAMENTOSOS EM QUEIJOS	33
2.5. LEGISLAÇÃO E OCORRÊNCIA DE AFLATOXINA M1 EM LEITE E QUEIJOS	34
3. REFERÊNCIA	37
4. ARTIGO DE RESULTADOS	
Microbiota fúngica em queijo de coalho comercializados em Alagoas	46
RESUMO	47

ABSTRACT	48
4.1. Introdução	49
4.2. MATERIAIS E MÉTODOS	
4.2.1. Amostragem	52
4.2.2. Análise Microbiológica	
4.2.2.1. Contagem de fungos filamentosos	52
4.2.2.2. Identificação dos fungos	53
4.2.2.3. Caracterização morfológica das estruturas após microcultura	53
4.2.3. Análises físico-químicas	
2.4.1. Teor de Umidade	54
2.4.2. Potencial Hidrogeniônico	55
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
5.1. Contagem de fungos filamentosos e identificação do fungos	56
5.2. Teor de umidade e pH	57
6. CONCLUSÃO	61
7. REFERÊNCIAS	62

1. INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

Os fungos, também chamados de mofos ou bolores, são microrganismos, filamentosos, alguns provocadores de alterações de alimentos e outros de importante e benéfico desempenho, principalmente no setor industrial (EVANGELISTA, 1999). Entretanto, alguns fungos podem provocar deterioração ou produzir metabólitos tóxicos denominados micotoxinas (CABRAL, 2003; FRANCO & LANDGRAF, 2004).

O Brasil apresenta condições ideais para o desenvolvimento de fungos devido à prevalência do clima tropical, além da utilização de práticas agrícolas inadequadas de colheita, plantio, secagem, transporte e armazenamento dos grãos (SABINO, 1996).

A contaminação de rações e alimentos por fungos filamentosos deve-se principalmente à utilização de grãos já contaminados por toxinas ou rações estocadas em condições inadequadas, bem como, pela ingestão de forragens contendo fungos endofíticos (CAVALCANTE, 1998).

Um dos gêneros de fungos de grande importância agrícola é o *Aspergillus*, por contaminar várias culturas e produzir aflatoxinas após a fase de crescimento exponencial. *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, e *Aspergillus nomius*, se desenvolvem naturalmente em produtos alimentícios como amendoim, milho, feijão, arroz, cacau, cevada, leite, carnes, sementes de algodão, castanha, trigo e outros (ARAÚJO, 2004). No entanto, em rações, os principais produtos alimentícios susceptíveis ao desenvolvimento destes fungos incluem: amendoim, milho e trigo (ROSAMARINHO et al., 2006).

Os fungos mais comuns encontrados em alimentos e produtos estocados

pertecem ao gênero *Aspergillus*. Esses fungos, nem sempre desejáveis nos alimentos, são capazes de produzir uma grande quantidade de enzimas que provocam sua deterioração. Além disso, algumas espécies podem produzir toxinas (micotoxinas) por significativas perdas econômicas e sérios problemas de saúde humana e animal (RITTER, 2007).

Entre as micotoxinas, são conhecidos atualmente, cinco principais aflatoxina (B_1 , B_2 , G_1 , G_2 , M_1). A espécie *Aspergillus flavus* produz somente aflatoxina B enquanto as outras espécies produzem as aflatoxina B e G, sendo a aflatoxina B_1 de maior toxicidade. Estas toxinas são geralmente encontradas em muitos alimentos e rações (BAKIRCI, 2001).

A aflatoxina M_1 é um potente hepatocarcinógeno excretado no leite de vacas alimentadas com rações contaminadas com aflatoxina B_1 . 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 B_1 , atingindo o equilíbrio com máxima concentração após 3 – 6 dias de ingestão constante e diária (OLIVEIRA e GERMANO, 2003)

O crescimento de mofos em queijos é comum e é um problema para o fabricante durante a maturação, bem como para o varejista e consumidor durante a estocagem, seja ela refrigerada ou não (TANIWAKI e DENDER, 1991). De acordo com FURTADO (1979), é bastante trabalhoso impedir o crescimento de mofos e, que a ele estão sujeitos praticamente todos os tipos de queijos maturados.

A Instrução Normativa nº30 de 26 julho de 2001 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2001), define queijo de coalho, aquele que se obtém por coagulação do leite por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácticas selecionadas e

comercializado normalmente com até 10 (dez) dias de fabricação. O queijo de coalho, de acordo com a exigência estabelecida pela legislação brasileira, deve ser produzido com emprego do processo de pasteurização do leite.

Atualmente, o estado de Alagoas dispõe de duas bacias leiteiras significativas. A primeira e maior delas, também conhecida como “Bacia Leiteira Tradicional”, situa-se na região do Agreste (compreende 5 municípios) e no Sertão Alagoano (compreende outros 13 municípios), tendo os municípios de Batalha e Major Izidoro como os maiores expoentes (SILVA, et al. 2010). A principal atividade do Arranjo Produtivo Local referente ao seguimento laticínios (APL – laticínio) é a produção de queijo de coalho, atingindo, no ano de 2007, um total de 1985 toneladas (SEBRAE, 2008).

O queijo de coalho produzido no sertão alagoano apresenta forte tradição e reconhecida procedência e, por isso, os produtores locais e as entidades governamentais e empresariais têm buscado o resgate da qualidade e identidade dos queijos do sertão alagoano (SEBRAE, 2008).

De acordo com o Serviço de Inspeção Federal (SIF) e Estadual (SIE), em Alagoas funcionam aproximadamente 61 laticínios, sendo que, desse total somente 4 possui o SIF, disponibilizando seus produtos, em diversos estabelecimentos comerciais, de pequeno e de grande porte do estado, sendo o queijo de coalho, o principal produto comercializado.

A utilização de leite pasteurizado no processamento do queijo de coalho, não garante que perigos químicos, como a aflatoxina M1, possam estar ausentes no queijo, pois a pasteurização não destrói a AFM1, bem como não impede o desenvolvimento de uma microbiota epífita patogênica, caso forem dadas condições para o desenvolvimento desses microrganismos.

Portanto, objetivou-se nesse estudo, a caracterização da microbiota fúngica em amostras de queijo de coalhos, comercializadas e produzidas no estado de Alagoas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Produção de queijos, fungos toxigênicos, micotoxinas, métodos de análises e ocorrência de micotoxinas em queijos

PRODUÇÃO DE QUEIJOS, FUNGOS TOXIGÊNICOS, MICOTOXINAS, MÉTODOS DE ANÁLISES E OCORRÊNCIA DE MICOTOXINAS EM QUEIJOS

2.1. LEITE E DERIVADOS

2.1.1. Leite

Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outras espécies deve denominar-se segundo a espécie da qual proceda (BRASIL, 2002). O grande potencial deste alimento é o de originar uma grande variedade de derivados, dentre os quais, o queijo de coalho, manteiga, ricota, entre outros produtos.

Cada componente individual do leite tem um valor peculiar em relação às propriedades dos queijos e ao processo de fabricação (FURTADO, 1979).

Conforme FURTADO (1979), o teor de proteínas no leite é importante no processo de coagulação, na retenção de água, no rendimento e na maturação. A gordura contribui para o aroma e o rendimento do queijo, melhora a consistência e durante a maturação, confere ao queijo características peculiares. A lactose, devido às transformações que sofre pela ação de enzimas bacterianas durante a fabricação, confere ao queijo parte do sabor e odor característicos. Os sais são responsáveis pela formação do complexo da micela das caseínas e exercem influência sobre a qualidade do queijo produzido.

Por sua composição, o leite é considerado um dos alimentos mais completos em termos nutricionais e fundamentais para dieta humana, mas pela mesma razão, constitui num excelente substrato para o desenvolvimento de uma grande diversidade de microrganismos, inclusive os patogênicos. Daí a qualidade do leite ser uma constante preocupação para técnicos e autoridades ligadas à área de saúde, principalmente pelo risco de veiculação de microrganismos relacionados com surtos de doenças de origem alimentar (LEITE JR; TORRANO; GELLI, 2000; TIMM et al., 2003).

Em 2002, foi instituído a Instrução Normativa nº 51 (BRASIL, 2002), que regulamenta a produção, transporte e armazenamento de leite no Brasil.

2.1.2. Queijos

A produção de queijos no mundo é um dos exemplos clássicos de conservação de alimentos, provavelmente antecedendo a era cristã. A conservação dos mais importantes constituintes do leite, como a gordura e as proteínas, na forma de queijos, explora dois princípios clássicos de conservação de alimentos, isto é, a fermentação láctica, a redução da atividade de água e a adição de sal (FOX, 1993).

A origem do queijo ocorreu acidentalmente há mais de quatro mil anos, na Ásia, quando os povos nômades da África transportavam em suas viagens o leite das jumentas e camelas em bolsas feitas com couro do estômago dos animais, o que fazia com que o leite coagulasse. Essa massa foi provada, apreciada e também reconhecida como uma excelente forma de conservar o leite (CAMARGO, 1995).

No Brasil, o queijo foi introduzido em meados do século XIX, produzido inicialmente em escala doméstica e de forma bastante rudimentar. Algumas

fazendas de Minas Gerais produziam um queijo obtido de maneira simples, com pouca maturação, o queijo-de-Minas, hoje conhecido como Minas-curado (CAMARGO, 1995).

Segundo a Portaria 146 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1996), entende-se por queijo o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído, coagulado pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactérias específicas, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes.

2.1.3. Queijo de Coalho

Entende-se por queijo de coalho, aquele que se obtém por coagulação do leite por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácticas selecionadas e comercializado normalmente com até 10 (dez) dias de fabricação (Brasil, 2001). O queijo de coalho, típico da região nordeste, faz parte da cultura, modo de vida e hábitos de consumo do nordestino, além de ser um alimento de elevado valor nutricional.

Atualmente, o queijo de coalho, vem sendo produzido em várias regiões do Brasil em escala industrial, com emprego do processo de pasteurização do leite devido à exigência estabelecida pela legislação brasileira (Brasil, 2001), com o intuito de garantir a segurança para os consumidores.

Dentre os queijos de fabricação artesanal no Brasil, o queijo de coalho se destaca como um dos principais e, seu consumo já faz parte do hábito alimentar da população, tanto no nordeste como, mais recentemente, nos grandes centros da região sudeste, destacando-se Rio de Janeiro e São Paulo, onde o produto tem excelente mercado (MANDACARU, 2009).

Na região nordeste a produção de queijo de coalho artesanal representa uma atividade de importância social, econômica e cultural. Apesar de não apresentar sofisticação tecnológica, esta produção inclui-se entre os poucos empreendimentos adequados para modificar perfil social e econômico de pequenos municípios da região. Além disso, desempenha importante papel no desenvolvimento da agricultura familiar em pequenos municípios localizados nas bacias leiteiras (CERRI, 2002; BORGES, 2006).

Apesar da grande importância socioeconômica do queijo de coalho para a região Nordeste, muitas vezes o produto é elaborado sem que sejam observados os padrões higiênico-sanitários. Portanto, seu consumo pode oferecer consideráveis riscos à saúde pública (BRANCO et al, 2003). A qualidade e a segurança alimentar do queijo de coalho limitam sua comercialização. Quase sempre são elaborados de forma artesanal e normalmente a partir de leite cru, sem os devidos cuidados de higiene ou em pequenas indústrias que não adotam Boas Práticas de Fabricação (BORGES et al, 2003).

Bolores e leveduras são os principais microrganismos associados com a deterioração de queijos, contagens elevadas desses microrganismos e de bactérias do grupo coliformes têm sido constatadas em queijos de coalho, indicando produção sob condições de higiene insatisfatórias (FEITOSA et al, 2003; FLORENTINO e MARTINS, 1999). Alguns bolores são capazes de produzir micotoxinas, que são

metabólitos tóxicos formados durante o crescimento dos fungos. Os gêneros de bolores toxigênicos mais importantes são *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*.

O isolamento de fungos toxigênicos, a partir de alimentos, não significa obrigatoriamente risco imediato para consumo. Assim como, a ausência de fungos em alimentos suspeitos, não significa ausência de micotoxinas, ou seja, o fungo pode estar ausente, mas a toxina pode estar presente e ativa (OSBORNE, 1982).

2.2. FUNGOS FILAMENTOSOS

Os fungos são seres dispersos no meio ambiente, em vegetais, ar atmosférico, solo, água, animais, etc. e, 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 (TANIWAKI et al., 1991; RAVEN et al., 2001).

Os alimentos em geral são muito sensíveis à contaminação e proliferação por fungos, especialmente os de origem vegetal que apresentam uma contaminação natural vinculada ao ar atmosférico, água ou ao solo onde são cultivados. Sendo assim, tanto os ingredientes quanto as rações prontas estão sujeitas a apresentar contaminação por fungos (FRISVAD & SAMSON, 1991).

Os fungos crescem e se proliferam bem em cereais, principalmente, no amendoim, milho, trigo, cevada, sorgo e arroz, onde geralmente encontram um substrato altamente nutritivo para o seu desenvolvimento. O crescimento fúngico e produção de micotoxinas em cereais podem ocorrer em diversas fases do desenvolvimento, maturação, colheita, transporte, processamento ou

armazenamento dos grãos. Por isso, a redução da umidade dos cereais através da secagem é de fundamental importância para reduzir os níveis de contaminação (DILKIN, 2002).

Os fungos que invadem sementes e grãos em geral são freqüentemente divididos em dois grupos: fungos do campo, que infectam o produto ainda no campo e fungos de armazenamento, como aqueles que invadem o milho pouco antes e durante o armazenamento. A distinção entre fungos de campo e de armazenamento não é baseada na classificação taxonômica, mas de acordo com as condições ambientais e/ou ecológicas que favorecem o crescimento dos mesmos. Também não é absoluta, pois é baseada nos seus hábitos de crescimento e onde os danos ocorrem. 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. Estes fungos não se desenvolvem normalmente durante o armazenamento, exceto em milho armazenado com alto teor de umidade (ATUI; LAZZARI, 1998).

Já os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, são considerados fungos de armazenamento, pois necessitam de teores de umidade mais baixos, entre 13 e 18%, e são considerados os principais agentes de deterioração das sementes (CHRISTENSEN & KAUFMAN, 1969). No entanto, esta 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).

Wetzel (1987) afirma que as condições que favorecem o desenvolvimento dos fungos no armazenamento são temperatura, umidade, pH, taxa de oxigenação, período de armazenamento, grau de contaminação, condições físicas dos grãos, vagens ou sementes, artrópodes e interações microbianas. Sendo a temperatura e a umidade como fatores principais para o desenvolvimento fúngico.

Sabino (1996) destaca que os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* são capazes de crescerem em diversos substratos com condições ambientais variáveis e produzirem micotoxinas, ou seja, além de alterar a composição química dos alimentos, o desenvolvimento de fungos pode ser prejudicial à saúde dos animais e dos seres humanos. 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, imunossupressão entre outras (FERNANDEZ et al, 1997; FERNANDES, 2004).

Os fungos filamentosos são capazes de crescer nos mais diversos tipos de alimentos, como cereais, carnes, leite, frutas e vegetais. O crescimento de mofos pode resultar em diversos tipos de deterioração nos alimentos, como perda de sabores, descoloração, apodrecimento, produção de micotoxinas e formação de esporos patogênicos ou alergênicos (FILTENBORG, 1996). A presença de fungos no leite pode estar associada à ocorrência de casos de mastite infecciosa de origem fúngica no rebanho, ou pode estar relacionada ao nível de higiene da ordenha e do ambiente (COUSINS & BRAMLEY, 1981).

O crescimento de bolores em queijos durante a maturação e estocagem consiste em uma das grandes preocupações dos profissionais responsáveis pelo setor nas indústrias de laticínios. Tal problema acarreta muitos gastos com mão-de-obra empregada na limpeza dos queijos, além de considerável prejuízo do ponto de vista econômico, traduzido pelas perdas de produto e de prestígio da marca junto aos consumidores (TANIWAKI, 1991).

2.2.1. *Aspergillus*

Aspergillus são caracterizados pelo desenvolvimento de colônias coloridas e brilhantes, como verdes e amarelo-oliva, é 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, sem falar de seus 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*, *A. nomius* (Vaamonde et al., 2003; Saleemullah et al., 2006).

Aspergillus flavus e *Aspergillus parasiticus* compreendem duas das espécies mais importantes do gênero, apresentam colônias caracteristicamente verdes a amarelas-oliva, embora eventualmente possam apresentar-se 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).

2.3. MICOTOXINAS

Os fungos filamentosos produzem uma imensa diversidade de metabólitos secundários, como pigmentos, antibióticos, além de compostos tóxicos, denominados de micotoxinas. A formação do metabólito secundário está sujeito ao controle fisiológico geral que responde a fatores ambientais. Há muitas evidências que o metabolismo secundário tem menor prioridade que o crescimento na hierarquia da regulação. Quando um meio de cultura é rico, com nutrientes balanceados, microrganismos tipo selvagem não realizam o metabolismo secundário ou seu potencial é reduzido. A produção de micotoxinas está ligada ao crescimento

do fungo; sem o crescimento geralmente a produção não ocorre. Entretanto, a presença do fungo produtor não indica a presença de micotoxina, especialmente se o crescimento não ocorre (GONÇALEZ; PINTO; FELICIO, 2001).

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; PINTO; FELICIO, 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).

As micotoxinas são produtos tóxicos formados por diversas espécies de fungos que colonizam as plantas no campo ou depois da colheita. Nas fazendas os animais contaminados por micotoxinas provocam grandes perdas econômicas por recusar alimento, baixa conversão alimentícia, diminuição do ganho de peso corporal, imunossupressão, interferência com a fertilidade e resíduos em produtos animais. Apesar de terem alguns efeitos, suas estruturas divergem bastante, tendo em comum apenas o fato de serem produzidas por fungos (BAGGIO, 2006).

A presença de uma micotoxina e o perigo associado somente pode ser determinada 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 disto, as micotoxinas produzidas durante a esporulação dos fungos contaminam os animais que consomem alimentos contaminados, e desta forma são transferidas para os seus produtos, tal como o leite ou a carne e, conseqüentemente, prejudicando a saúde humana (JOBIM; GONÇALVES; SANTOS, 2001).

2.3.1. Aflatoxinas

Aflatoxinas (AFLs) são metabólitos secundários que podem ser produzidos por fungos como: *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A.nominus* (YU et al., 2005; BOK et al., 2004). Os seres humanos e várias espécies domésticas são sensíveis aos seus efeitos tóxicos que podem ser agrupados como: agudos, mutagênicos, neoplásicos e teratogênicos (GROOPMAN et al., 1988; HARRISON et al., 1993). Existem vários tipos de aflatoxinas, dentre elas, destacam-se quatro, B1 (AFB1), B2 (AFB2), G1 (AFG1), G2 (AFG2); sendo que sua biotransformação, em diversas espécies animais, resulta na produção de M1 e M2 (FERREIRA, et al, 2006). A AFB₁ é a mais tóxica do grupo, seguida pela AFG₁, AFB₂ e AFG₂ com toxicidade de 50%, 20% e 10% em relação à primeira, respectivamente (DILKIN et al., 2000; CREPPY, 2002).

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 na 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 produção de toxinas são classificados em três categorias: fatores 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).

Em cereais estocados, os fatores mais importantes para o crescimento de fungos toxigênicos do gênero *Aspergillus* e a produção de aflatoxinas são a umidade relativa do ar e do substrato e temperatura de armazenamento. Umidade relativa de 80% a 85% com 17% de umidade dos cereais e temperatura de 24 a 35°C são consideradas condições ótimas. Já em rações a umidade deve estar entre 10% a 13% do substrato, 79% a 89% de umidade relativa do ar e temperaturas de 19 a 27°C (DILKIN et al., 2000).

As aflatoxinas pertencem à classe de compostos denominados furanocumarinas, apresentando um núcleo cumarina associado ao furano e a lactona (Figura 01). As aflatoxinas do grupo B possuem um anel ciclopentenona as do grupo G uma lactona insaturada de 6 membros, e as do grupo M são derivadas hidroxiladas no carbono quatro de B₁ e B₂ (ARAÚJO, 2004) (Figura 02).

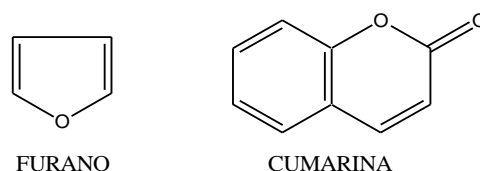


Figura 01. Estrutura do furano e da cumarina

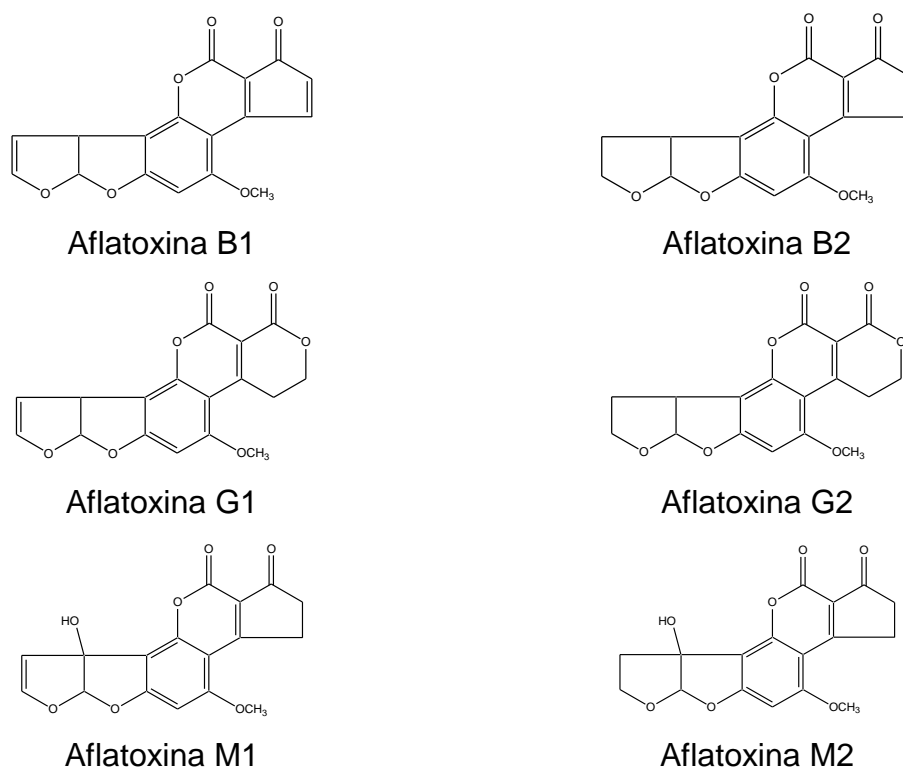


Figura 02. Estrutura das aflatoxinas

Estas toxinas apresentam baixo peso molecular (**AFB1**: 312,2782; **AFB2**: 314,294; **AFG1**:328,2776; **AFG2**: 330,2934 e **AFM1**: 328,2776 g/mol), sendo bastante solúveis em solventes de polaridade intermediária como clorofórmio,

metanol e dimetilsulfóxido. Seus pontos de fusão são de 168-269 °C, 286-289 °C, 244-246 °C, 237- 240 °C e 299°C, respectivamente para as aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂ e M₁ (MERCK, 1996).

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, 2002).

Segundo Araújo (2004), as aflatoxinas são inativadas desde que alcancem o ponto de fusão 237-289°C. Tal aquecimento é inaceitável para processamento de alimentos. Sendo assim, leites e produtos lácteos, mesmo após o processamento, pasteurização ou ultra high temperature (UHT), podem encontrar-se contaminados por aflatoxina M₁.

2.4. MÉTODOS DE ANÁLISE DE FUNGOS FILAMENTOSOS EM ALIMENTOS

As propriedades bioquímicas dos alimentos restringem o desenvolvimento dos microorganismos a poucas espécies específicas, fazendo com que as técnicas de identificação e isolamento tendam a ser também cada vez mais restritivas às espécies fúngicas com que se deseja trabalhar (DE BOER & BEUMER, 1999).

Meios de cultura diferenciados são introduzidos para análise de fungos em alimentos, como, o PCA com antibióticos, o DRBC e o PDA com antibióticos. Atualmente estes são os meios mais indicados para a contagem de bolores e leveduras em placa (MISLIVEC et al., 1992; SILVA et al., 2001). O trabalho de

TANIWAKI et al. (2001b) mostrou que os meios DRBC, PDA e DG18 são equivalentes para a contagem de fungos em alimentos.

Para os gêneros *Penicilium*, *Aspergillus* e *Fusarium*, a identificação morfológica vem sendo substituída por métodos que identificam os metabólitos secundários, a produção de iso-enzimas, características fisiológicas, características ecológicas, suscetibilidade a drogas e técnicas moleculares, com Reação em Cadeia Polimerase - PCR (FILTENBORG et al., 1996).

Além da escolha e execução correta dos procedimentos de isolamento, quantificação e identificação, o bom êxito de qualquer trabalho científico em microbiologia, dependerá muito dos cuidados com a amostragem. As amostras devem ser coletadas em recipientes assépticos e o volume coletado nunca deverá ultrapassar três quartos da capacidade total do recipiente (SILVA et al., 2001). O transporte até o laboratório deve ser feito a uma temperatura entre 0 e 4,4 °C. e as amostras processadas num prazo máximo de 36 horas após sua coleta (MESSER et al., 1992).

2.5. LEGILAÇÃO E OCORRÊNCIA DE AFLATOXINA M1 EM LEITE E QUEIJOS

Observa-se que no Brasil, poucos trabalhos investigaram a presença de aflatoxina M1 em produtos lácteos, em particular, em queijos e leite (TABELA 01). No entanto, essas pesquisas se concentram na região sul do Brasil.

Tabela 01 – Ocorrência de aflatoxina M₁ (AFM₁), em leite e derivados

Leite & derivados	Local da pesquisa	Total de amostras utilizada	Incidência de amostras contaminada (%)	Níveis de aflatoxina M ₁ Verificado (µg/L)	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
“in natura” pasteurizado, UHT	São Paulo	107	74,0	0,02-0,26	SHUNDO; SABINO, 2006
Pasteurizado	Paraná	40	57,5	0,01-0,17	BAGGIO, 2006
Leite “in natura” e UHT	Porto Alegre	128	0,00	0,0	WEIGEL, 2007
Queijo Prato	Minas Gerais	9	100	0,2-0,54	PRADO et al., 2001

Quanto a presença de aflatoxina M₁ em queijos, observa-se que Prado et al, (2001), verificaram que todas as amostras analisadas de queijo prato, continham algum nível de aflatoxina. Os mesmos autores em 2008 (PRADO, et al, 2008) detectaram 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 dos nível admissível de 250 ng/kg⁻¹ pela maioria dos países europeus.

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, 2002b), 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 estabelecido 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; GALOFARO, 1996).

3. REFERÊNCIA

APPLEBAUM, R. S.; BRACKETT, R. E.; WISEMAN, D. W.; MARTH, E. H. 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: 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. **Dissertação de mestrado**. São Paulo – SP. 2009.

BAGGIO, E. C. R. Determinação de aflatoxina M₁ em leite pasteurizado pelos métodos de CCD e CLAE utilizando coluna de imunoafinidade. [Dissertação de Mestrado]. Curitiba, Paraná: **Universidade Federal do Paraná**, 2006.

BOK, J. W.; KELLER, N. P.; LAE, A. A regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. **Euk Cell**, 3: 527-535. 2004.

BORGES, M. F. Diagnóstico da contaminação por bactérias patogênicas em uma indústria processadora de queijo de coalho e detecção de genes associados a fatores de virulência. **Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas**, São Paulo. 2006.

BORGES, M. F., Microrganismos Patogênicos e indicadores em Queijos de Coalho Produzidos no estado do Ceará, Brasil. **CEPPA**, Curitiba, v 21, n 1, Janeiro/Junho 2003;

BRANCO, et al. Incidência de *Listeria monocystogenes* em queijo de coalho refrigerado produzidos industrialmente. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 21, n. 2, p 393-408. Jun/dez. 2003;

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova e oficializa o Regulamento Técnico de identidade e qualidade de leite pasteurizado tipo C refrigerado. **Diário Oficial da União**, Brasília, 20 de setembro de 2002..

BRASIL. 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. 2002b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de produtos de origem animal. Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de 2001. Aprova e oficializa o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho. **Diário Oficial (da) República Federativa do Brasil**, Brasília, 2001.

BRASIL, **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Portaria 146, de 07 de Março de 1996. Disponível em: <www.agricultura.gov.br>. Acesso em 06 de jan. 2011.

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. [**Dissertação de Mestrado**]. Rio Largo, Alagoas: Universidade Federal de Alagoas, 2003.

CAMARGO, M. B. A origem dos queijos. **Revista Alimentos e Tecnologia**. v.10, n..61, p.32-33, 1995.

CAVALCANTE, M. P. C. Ocorrência de fungos e identificação de espécies toxigênicas em vagens de algarroba (*Prosopis juliflora* (SW) D.C.).[**Dissertação de Mestrado**].Recife, Pernambuco: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1998.

CERRI, C. Artesãos do futuro. **Globo Rural**, Ed. Globo, n. 200, p. 36-49, junho 2002.

CHRISTENSEN, C. M.; KAUFMANN, H. H. Grain storage the role of fungi in quality loss. Minneapolis. **University of Minesota Press**; 470. 1969.

COUSINS, C. M.; BRAMLEY, A. J. The microbiology of raw milk. "In" Robinson, RK. **Dairy microbiology**, (1):119-163. 1981.

CREPPY, E. E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicology Letters**, Amsterdam, n. 1/2, p. 1-10, Jan. 2002.

DE BOER, E.; BEUMER, R.R. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. **Int. J. Food Microbiol.** v.50, p.119-130, 1999.

DILKIN, P.; MALLMANN, C. A.; SANTURIO, J. M.; HICKMANN, J. L. Classificação macroscópica, identificação da microbiota fúngica e produção de alfa toxinas em híbridos de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30. n. 1, p. 137-141, 2000.

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

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de Alimentos**. Ed. Atheneu. 2º Ed; São Paulo. 1999.

FEITOSA, et al., Pesquisa de *salmonella* sp., *Listeria* sp., e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no Estado do Rio Grande Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, . 23, n3, set./dez. 2003.

FERNANDES, F. C. Micotoxinas: Risco Biológico para trabalhadores em Aviários. **Rer. Bras. Med. Trab.**, Belo Horizonte. jul-set; 02(3): 200-8. 2004.

FERNANDEZ, E.; ROSOLEM, C. A.; MARINGONI, A. C.; OLIVEIRA, D. M. T.; Fungus incidence on peanut grains affected by drying method and Ca nutrition. **Field Crops Research**, Amesterdan; 52(1): 9-15. 1997.

FERREIRA, H.; P. E., S. H. F., M. m. C. AFLATOXINAS: UM RISCO A SAÚDE HUMANA E ANIMAL. *Ambiência - Revista do Centro de Ciências Agrárias e Ambientais* V. 2 No 1 Jan/Jun. 2006

FILTENBORG, O.; FRISVAD. J. C.; THRANE, U. Moulds in food spoilage. *International Journal of Food Microbiology*. n. 33, p. 85-102, 1996.

FLORENTINO, E.S.; MARTINS, R.S. Características microbiológicas do queijo de coalho produzidos no Estado da Paraíba. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 13, n. 59, p. 43-48, jan/fev. 1999.

FOX, P. F. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. **Chapman & Hall**, v.1 (General Aspects), 600p. 2º ed., London. 1993.

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

FURTADO, M. M.; POMBO, A. F. W. Fabricação do queijo prato e minas: Estudo do rendimento . *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, v. 34, n. 205, p. 3-19, Set./Out. 1979.

GALVANO, F.; GALOFARO, V.; GALVANO, G. 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.

GARRIDO, N. S. et al. Occurrence of aflatoxins M₁ and M₂ in milk commercialized in Ribeirão Preto - SP, Brazil. *Food Additives and Contaminants*. 1 (20):70-73. 2003.

GONÇALEZ, E.; PINTO, M. M.; FELICIO, J. D. Análise de micotoxinas no Instituto Biológico de 1989 a 1999. *O Biológico*, v. 63, n. 1/2, p. 15-19, 2001.

GROOPMAN, J. D.; CAIN, L. G.; KENSLER, T. W. exposure in human populations: measurements and relationship to cancer. **CRC Crit. Rev. Toxicol.** 19: 113-45. 1988.

HARRISON, J. C.; CARVAJAL, M.; GARNER, R. Aflatoxin exposure in the United Kingdom constitute cancer risk? **Environ. Health Perspect.** 99: 99-105. 1993.

HILL, R. A.; WILSON, D. M.; MCMILLIAN, W. W.; WIDSTRON, N. W.; COLE, R. J.; SANDERS, T. H.; BLANKENSHIP, P. D. Ecology of the *Aspergillus flavus* group and aflatoxin formation in corn and groundnut. "In" Lacey J ed. Trichotecenes and other mycotoxins. Chichester: **Wiley J, Publisher**; 1985.

LAFORET, E. P. El género *Aspergillus*: Métodos, claves y referencias actuales para las espécies comunes em clínica y em ambientes diversos. **Boletín Micológico**, v. 23, 2008.

LEITE, JR, A. F. S.; TORRANO, A. D. M.; GELLI, D. S. Qualidade microbiológica do leite tipo C pasteurizado, comercializado em João Pessoa, Paraíba. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 74, p. 45-49, 2000.

KOKALIS-BURELLE, N.; PORTER, D. M.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; SMITH, D. H.; SUBRAHMANYAM, P. **Compendium of peanut diseases**. 2. ed. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1997. 94 p.

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

MANDACARU. **Queijo de coalho Mandacaru**. Disponível em <<http://www.queijodecoalho.com.br>>, acesso em: 28/03/2011.

MERCK. The Merck Index – 12nd ed. Editora: **Susan Budavari**. New Jersey: Merck & Co; 1996.

MESSER, J.W.; MIDURA, T.F.; PEELER, J. T. Sampling plans, sample collection, shipment and preparation for analysis. In: VANDERZART, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3rd.ed. Washington, DC: APHA, 1992. p.25-48.

MISLIVEC, P.B.; BEUCHAT, L.R.; CUSIN, M.A Yeast and molds. In: VANDERZART, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3rd. ed. Washington, DC: APHA, 1992. p.239-49.

OLIVEIRA, C. A. F.; GERMANO, P. M. L. Aflatoxina M₁ em leite e derivados. "In" Germano, PML. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 2.ed. São Paulo: Varela;103-109 , 2003

OSBORNE, B. G. Mycotoxins and the Cereal Industry – A Review. **Jornal of Food Technology**. 17: 1-9. 1982.

PRADO, G. et al.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

PRADO, G.; OLIVEIRA, M. S.; CARVALHO, E. P.; VELOSO, T.; SOUZA, L. A. F.; CARDOSO, A. C. F. 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.

PRADO, G.; OLIVEIRA, M. S.; PEREIRA, M. L.; ABRANTES, F. M.; SANTOS, L. G.; VELOSO, T. 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.

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

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. *Biologia Vegetal*. 6 ed. Rio de Janeiro. **Guanabara Koogan S.A**; 2001.

RITTER, A. C. Potencial toxigênico de *aspergillus flavus* testado em diferentes meios e condições. **Dissertação de Mestrado**, Porto Alegre, RS, Brasil, pg. 10. Março, 2007.

ROSMANINHO, J. F.; OLIVEIRA, C. A. F.; REIS, T. A.; CORRÊA, B. Aflatoxina M1 e ácido ciclopiazônico em leites de consumo comercializados no Município de São Paulo, SP, Brasil. **Brazilian Journal of Food Technology**, III JIPCA, p. 55-59, 2006.

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

SALEEMULLAH, A.I. et al. Aflatoxin contents of stored and artificially inoculated cereals and nuts. **Food Chemistry**, London, v. 98, p. 699-703, 2006.

SEBRAE/AL. APL-laticínios sertão (T3-ano 2007). Maceió: Instituto Compasso; 2008.

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

SHUNDO. L., SABINO, M. Aflatoxin M₁ in milk by immunoaffinity column cleanup with TLC/HPLC determination. **Braz J Microbiol**. 2(37):164-167. 2006.

SILVA, M. C. D.; RAMOS, A. C. S.; MORENO, R.; MORAES, J. O. Influência dos procedimentos de fabricação nas características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas de queijo de coalho. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, 2010; 69(2): 214-21.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A ; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 2001. 332p.

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.

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

TANIWAKI, M.H.; SILVA, N. da; BANHE, A.A.; IAMANAKA, B.T. Comparison of culture media, Simplate, and Petrifilm for enumeration of yeast and molds in food. **J. Food Protect.**, v.64, p.1592-1596, 2001(b).

TIMM, C. D. et al. Avaliação da qualidade microbiológica do leite pasteurizado integral, produzido em micro-usinas da região sul do Rio Grande do Sul. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 106, p. 100-104, 2003.

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

VAAMONDE, G. et al. 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.

WEIGEL, M. Avaliação da contaminação por aflatoxina M₁ em leite cru e Leite UHT. Porto Alegre; 2007. Mestrado [Dissertação de Ciência e Tecnologia de Alimentos]. Porto Alegre: **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos; 2007.

WHO (World Health Organization). Environmental Health Criteria 11, Geneva: **WHO**;1979

YU, J.; CLEVELAND, T. E.; NIERMAN, W. C.; BENNETT, J. W. *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases. **Rev Iberoam Micol** ; 22: 194-202. 2005.

4. ARTIGO DE RESULTADOS

Microbiota fúngica em queijo de coalho comercializados em

Alagoas



MICROBIOTA FÚNGICA EM QUEIJO DE COALHO COMERCIALIZADOS EM ALAGOAS

FERREIRA – JUNIOR, G. C.; CABRAL JUNIOR, C. R.; AMORIM, E. P. R.

RESUMO

O setor lácteo apresenta expressivo papel na economia do nordeste, sendo o queijo de coalho o mais difundido e apreciado pela população local, dos derivados lácteos produzido na região. No entanto, mesmo com o uso de leite pasteurizado no processamento do queijo de coalho, algumas espécies de fungos patogênicos podem se desenvolver sobre os queijos, como é o caso dos fungos do gênero *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., esses fungos têm a capacidade de produzir diversas micotoxinas, assumindo destacada relevância em saúde pública devido aos seus efeitos carcinogênicos e mutagênicos. Portanto, o objetivo desse trabalho foi caracterizar a microbiota fúngica de amostras de queijo de coalho comercializados em Maceió. AL. A contagem de fungos filamentosos foi realizada de acordo com o método descrito no *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (1992). Foram isolados 12 gêneros de fungos, destacando-se as espécies *Aspergillus flavus* e *Penicillium* sp, e a contagem de fungos filamentosos variou entre $5,0 \times 10^2$ a $1,7 \times 10^6$ UFC/g, evidenciando a necessidade de boas práticas de fabricação. A presença desses fungos nos queijos revela os riscos que os consumidores estão expostos, visto que, as toxinas produzidas por essas espécies fúngicas, apresentam efeitos carcinogênicos e mutagênicos.

Palavras-chave: fungos, *Aspergillus flavus*, queijo de coalho

MYCOFLORA IN FARMHOUSE CHEESE SOLD IN ALAGOAS

FERREIRA-JUNIOR, G. C.; CABRAL JUNIOR, C, R.; AMORIM, E. P. R.

Abstract

The dairy sector has a significant role in the economy of the northeast, and the cheese curds the most widespread and appreciated by the local population of dairy products produced in the region. However, even with the use of pasteurized milk in cheese processing rennet, some species of pathogenic fungi can develop on cheese, such as fungi of the genus *Aspergillus* sp. *Penicillium* sp. These fungi have the ability to produce several mycotoxins, assuming outstanding relevance for public health due to their carcinogenic and mutagenic. Therefore, the objective of this study was to characterize the mycoflora of cheese curd samples marketed in Maceió. AL. The counts of filamentous fungi were performed according to the method described in the Compendium of methods for the microbiological examination of foods (1992). Were isolated 12 genera of fungi, especially species *Aspergillus flavus* and *Penicillium* sp, and filamentous fungi count ranged between $5,0 \times 10^2$ to $1,7 \times 10^6$ UFC / g, suggesting the need for good manufacturing practices. The presence of these fungi in cheeses reveals the risks that consumers are exposed, since the toxins produced by these fungal species, have carcinogenic and mutagenic.

Keywords: fungi, *Aspergillus flavus*, cheese curds

4.1 INTRODUÇÃO

Dentre os produtos de laticínios fabricados na região nordeste, o queijo coalho é um dos mais difundidos e apreciados pela população local. Observa-se que esse produto tem sido comercializado sem que haja padronização no seu processamento e se caso houvesse, provavelmente poderia tornar-se mais competitivo.

O queijo de coalho é fabricado com massa semi-cozida e tradicionalmente consumido fresco ou maturado. É produzido há mais de 150 anos, em vários Estados da Região Nordeste do Brasil a partir de leite de vaca cru e/ou leite pasteurizado. Antigamente utilizava-se para coagulação do leite o coalho do estômago seco e salgado de animais silvestres ou bezerros. Atualmente esta prática foi substituída pelo uso de coalho industrial (GONDIM, 1995; LIMA, 1996).

A instrução normativa nº 30, de 26 de junho de 2001, do Ministério da Agricultura, Pesca e Abastecimento, define o queijo de coalho como sendo o queijo que se obtém por coagulação do leite por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas e comercializado normalmente com até 10 (dez) dias de fabricação. Sendo classificada de média a alta umidade, de massa semi-cozida ou cozida e apresentando um teor de gordura nos sólidos totais variável entre 35,0% e 60,0%. (BRASIL, 2001).

Segundo o Serviço de Inspeção Federal (SIF) e Estadual (SIE), em Alagoas funcionam aproximadamente 61 laticínios, sendo 4 desses fiscalizados pelo SIF, e 57 pelo SIE. Segundo Escobar et al., (2001) no nordeste a maioria dos

queijos de coalho são fabricados em pequenas fazendas rurais e/ou em pequenas queijarias urbanas ou rurais de forma clandestina.

Dentre os produtos derivados do leite, o queijo é considerado um veículo freqüente de patógenos de origem alimentar e, em especial, os queijos frescos artesanais por serem, na maioria das vezes, elaborados a partir de leite cru e sem processo de maturação. A contaminação microbiana desses produtos assume destacada relevância tanto para a indústria, pelas perdas econômicas, como para a saúde pública, pelo risco de causar doenças transmitidas por alimentos (BORGES, et al. 2003)

Apesar dos queijos de coalho comercializados no estado de Alagoas, sob fiscalização do SIF e SIE, serem processados com leite pasteurizado, este procedimento não garante a ausência de contaminantes químicos no produtos, como a aflatoxina M₁. De acordo com FRANCO & LANDGRAF (2004) o tratamento térmico na forma que costuma ser utilizado (pasteurização e esterilização) para processamento de alimentos, não causa a inativação completa das aflatoxinas. PADUA et al. (2002) afirmam que em estado puro, as aflatoxinas são extremamente estáveis em elevadas temperatura superando até 200 °C .

OLIVEIRA & GERMANO (2003) afirmaram que podem ser encontradas várias aflatoxinas nos produtos alimentares, sendo as mais importantes as B₁, B₂, G₁, G₂. A aflatoxina M₁ (AFM₁) é um potente hepatocarcinógeno excretado no leite de vacas alimentadas com rações contaminadas com aflatoxina B₁ (AFB₁), classificadas na Classe 1 dos carcinógenos humanos pela International Agency for Research on Cancer – IARC (2003). A contaminação do leite de consumo humano com AFM₁, classificadas no grupo 2B, possíveis carcinógenos para

humanos, assumem destacada relevância em saúde pública, ao se considerar que seus efeitos tóxicos agudos e carcinogênicos têm sido extensivamente demonstrados em diversas espécies.

Os fungos responsáveis pela produção de aflatoxinas, podem contaminar os alimentos, causando sua deterioração, reduzindo seu valor nutricional e alterando suas qualidades organolépticas (TANIWAKI et al., 1999; RAVEN et al., 2001), podendo ser prejudiciais á saúde dos animais e dos seres humanos. Neste sentido, Sabino (1996) destaca os gêneros *Aspergillus*, *Penicillum* e *Fusarium* como sendo espécies capazes de crescerem em diversos substratos e de produzirem toxinas patogênicas.

Neste contexto, os objetivos deste trabalho foram investigar a ocorrência de fungos patogênicos em queijos de coalho produzidos e comercializado no estado de Alagoas.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Amostragem

As amostras de queijo de coalho foram adquiridas aleatoriamente durante o período de abril a agosto de 2011. As amostras foram provenientes de cinco laticínios do estado de Alagoas, designadas por A, B, C, D e E, duas sob inspeção do SIF e as outras três do SIE. As amostras foram coletadas em estabelecimentos comerciais de Maceió-AL, e acondicionadas em caixas isotérmicas, contendo gelo reciclável, e transportadas para o Laboratório de Controle e Qualidade de Alimentos da Universidade Federal de Alagoas, onde foram mantidas a temperatura de refrigeração ($4^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$) até a realização das análises, que ocorreram até 12 horas após as coletas.

Foram coletadas 20 amostras de queijo de coalho de 05 empresas, cada uma com aproximadamente 500g. Após a contagem de fungos filamentosos, as placas foram transportadas para o Laboratório de Fitopatologia do Centro de Ciências Agrárias-CECA/UFAL, para a identificação de fungos.

4.2.2 Análise Microbiológica

4.2.2.1 Contagem de Fungos Filamentosos

A contagem de bolores e leveduras foi realizada de acordo com o método descrito no *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (APHA, 1992). As amostras foram semeadas em meio ágar Dicloran Rosa de

Bengala Cloranfenicol (DRBC), utilizando-se diluições de 10^{-1} até 10^{-5} . As placas foram incubadas em temperatura de 25°C, durante cinco dias.

O DRBC contém cloranfenicol, que inibe o crescimento de bactérias, além de dicloran e rosa bengala, que restringe o espalhamento das colônias dos bolores (SILVA et al, 2007). Por esse motivo, as colônias observadas nas placas, se apresentaram não muito espalhadas nas placas.

4.2.2.2 Identificação dos fungos

Após crescimento e contagem, as colônias foram selecionadas para preparo de lâminas para visualização em microscopia direta, utilizando-se água destilada e/ou azul de metileno, como corante. Desta forma, pode-se observar as estruturas morfológicas dos fungos. Os fragmentos também foram observados sob microscopia direta e as estruturas comparadas com as descritas em publicação especializada. Os fungos foram identificados em nível de gênero e espécie, com base nas chaves de Barnett & Hunter (1987), Pitt (1999), Rappe & Femel (1977). As amostras que não foram identificadas foram selecionadas para a realização de microculturas.

4.2.2.3 - Caracterização morfológicas das estruturas após microculturas

A caracterização morfológica dos isolados foi realizada após microculturas dos fungos não identificados no primeiro momento, consistindo de placas de Petri, forradas com papel de filtro e um suporte de vidro, sobre o qual foram colocadas lâminas e lamínulas, sendo o conjunto esterilizado em autoclave a 120°C durante 20 minutos. Com a ajuda de uma alça de platina, pequenos fragmentos de

crescimento fúngico foram inoculados em quatro pontos laterais de um bloco de meio DRBC ($\pm 1\text{cm}^2$), previamente colocado sobre a lâmina, cobrindo-se em seguida com a lamínula.

O papel de filtro foi umedecido com água destilada esterilizada, incubando-se as microculturas em temperatura de 25°C , por 48–72 horas. Após este período procedeu-se a retirada da lamínula com o auxílio de uma pinça, colocando-a sobre uma lâmina, contendo o corante azul de metileno e/ou água destilada e as estruturas formadas, observada ao microscópio óptico (FIGURA 03).

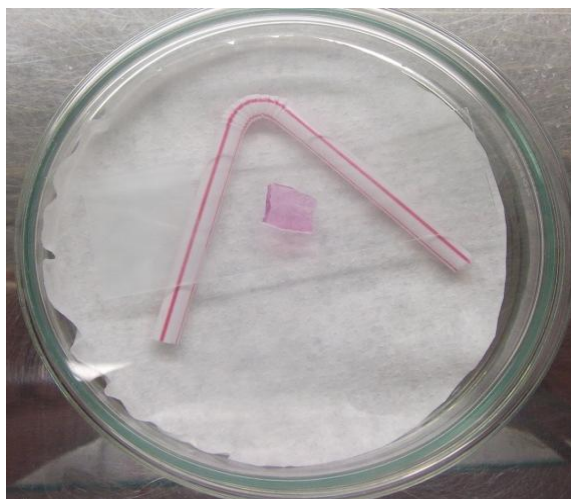


Figura 03 – Microcultura

4.2.3 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas foram realizadas de acordo com a metodologia preconizada pelo INSTITUTO ADOLFO LUTZ (2008).

4.2.3.1 Teor de Umidade

A umidade consistiu em secagem de uma alíquota da amostra, a uma temperatura determinada (105°C), até massa constante e pesagem para determinação da perda de massa de umidade e voláteis (FIGURA 04).



Figura 04 – Estufa com circulação de ar e dessecador (análise de umidade)

4.2.3.2 – Potencial Hidrogeniônico (pH)

As análises de pH, foram realizadas diretamente sobre a amostra, com um uso de um pHmetro calibrado com as soluções tampão pH 7,0 e pH 4,0 e de um eletrodo específico para queijos (FIGURA 05).



Figura 05 – Análise de pH (pHmetro digital e eletrodo específico para queijos)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Contagem de fungos filamentosos e identificação de fungos

A legislação vigente (BRASIL, 1996) não determina valores máximos para contagem de fungos filamentosos e leveduras em queijo de coalho. Na tabela 03, observa-se que os valores de contagem de bolores variaram entre $5,0 \times 10^2$ a $1,7 \times 10^6$. FEITOSA et al. (1985) relataram contagens de bolores e leveduras em amostras de queijo de coalho em valores que variaram de $8,6 \times 10^3$ a $3,2 \times 10^6$ UFC/g, similares aos encontrados nesta pesquisa

Segundo FEITOSA et al, citado por BORGES em 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.

TABELA 2 – Contagem de fungos filamentosos e identificação da microbiota fúngica de amostras de queijo de coalho

Amostras	Contagem de fungos filamentosos (UFC/g)		Espécies fúngicas
	Mínimo	Máximo	
A	$6,1 \times 10^3$	$5,3 \times 10^5$	<i>Penicillium sp.</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Albugo sp.</i> , <i>Geotrichum sp.</i> , <i>Monilia sp.</i>
B	$1,2 \times 10^5$	$1,7 \times 10^6$	<i>Penicillium sp.</i> , <i>Geotrichum sp.</i> ,
C	$4,5 \times 10^3$	$1,3 \times 10^6$	<i>Cladosporium fulvum</i> ,
D	$1,0 \times 10^3$	$5,1 \times 10^5$	<i>Penicillium sp.</i>
E	$5,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$	<i>Cladosporium sp.</i> , <i>Geotrichum sp.</i> , <i>Penicillium sp.</i>

UFC/g= Unidade Formadoras de Colônias por grama

Quanto à identificação da microbiota fúngica, os dados obtidos no presente estudo permitem observar uma grande variedade de gêneros e espécies de fungos nas amostras analisadas, totalizando 12 espécies, onde se destacam *Penicillium* sp., *Aspergillus flavus*, *Cladosporium* sp., *Geotrichum* sp., *Albugo* sp., *Monilia* sp. (Tabela 2). Observou-se a presença de fungos em todas as marcas analisadas.

Os fungos do gênero *Penicillium* sp. são contaminantes naturais da alimentação humana e animal encontrado 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, representa um perigo em potencial a saúde dos consumidores, visto que, 50% dos fungos dessa espécie são produtores potenciais de aflatoxinas (DILKIN, et al., 2000).

5.2 Teor de umidade e pH

Os valores médios de umidade dos queijos de coalho pesquisados neste trabalho variaram entre 41,43% (marca B) a 45,03% (marca E). Esses valores de umidade, observado na tabela 03, classificam os queijos como sendo de média

umidade (BRASIL, 1996). Segundo a Portaria nº 146, de 07 de março de 1996, do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, os queijos são classificados em relação ao teor de umidade, em queijos de baixa umidade (queijos com teores de umidade <35,9%), média umidade (36 a 45,9%), alta umidade (46 a 54,9%), e queijos de muita alta umidade (>55,0%).

Sabe-se que a umidade é um importante parâmetro usado para caracterizar os diferentes tipos de queijos. De acordo com Rocha (2004), o crescimento indesejável desses fungos está relacionado principalmente com a umidade do queijo e com a umidade relativa do ar.

Segundo Oliveira (1981) o teor de umidade varia muito e está correlacionado com o tempo de conservação do queijo. Os mais desidratados são mais duros e apresentam maior conservação, mesmo em condições adversas.

Nassu et al (2003), encontraram variações de 43,1%, a 43,77% nos valores de umidade de amostras de queijo de coalho do estado do Ceará . Esses valores são similares aos encontrados neste trabalho.

Entre os fatores que podem influenciar o teor de umidade dos queijos, destaca-se o manuseio da coalhada observada durante o processo de fabricação dos queijos, bem como o tempo de prensagem, que segundo NASSU, et al. (2003) diferem muito entre produtores de queijos, fato este que explica a diferença de valores de umidade entre a marcas comercializadas.

TABELA 3 – Médias dos resultados de pH e umidade de amostras de queijo de coalho

Queijo de coalho (marcas)	pH	Teor de Umidade (%)
A	5,54	43,43
B	6,10	41,43
C	6,22	42,90
D	5,38	42,31
E	5,64	45,03

Quanto ao pH, os valores verificados variaram entre 5,38 (marca D) a 6,22 (marca C). A legislação que regulamenta a produção de queijo no Brasil, não estabelece valores mínimos ou máximos de pH. Segundo COUSINS (1997) valores de pH baixo associado com elevado teor de sal nos queijos podem provocar a destruição, durante a maturação, da maioria dos patógenos inicialmente presentes no produto.

No entanto, Robinson (1987) salienta que a acidez não evita o crescimento de leveduras e mofos, mas sim das bactérias no interior do queijo, particularmente com uma baixa umidade, ausência de oxigênio e alta concentração de sal. Ele também afirma que o pH mínimo, da maioria dos queijos é 5,3 e em muitas variedades alcança o valor de 4,5. Os valores de pH da maioria dos queijos utilizados neste trabalho, ficaram acima do valor mínimo citado por Robinson (1987).

De acordo com Jay (1973), a maior parte dos microrganismos se multiplicam melhor com valores de pH em torno de 7,0 (6,6 – 7,5), enquanto que

somente alguns crescem com pH abaixo de 4,0. Os mofos crescem em um pH mínimo de 1,5 – 2,0 e máximo de 11, já as leveduras pH mínimo 2,5 e máximo 8,0 – 8,5.

Benevides (2000), ao analisar amostras de queijo de coalho produzido com leite cru e pasteurizado no estado do Ceará, encontrou valores médio de pH (5,02 a 5,62.), similar aos encontrado neste trabalho.

A presença de micotoxinas em produtos destinados ao consumo humano coloca em risco a segurança da saúde da população. As boas práticas agrícolas, de transporte, de manufatura e de armazenagem continuam sendo a melhor forma de prevenir a contaminação de alimentos por aflatoxinas e, conseqüentemente, a contaminação do leite.

Assim, estratégias e instrumentos legais são necessários na agricultura e na indústria de alimentos para assegurar a qualidade de produtos de origem animal.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir:

- A elevada contagem de fungos filamentosos observado, evidenciam a necessidade de boas práticas de fabricação.
- Os principais fungos encontrados foram os *Penicillium* sp., *Aspergillus flavus*, *Cladosporium* sp., *Geotrichum* sp.,
- Foi encontrada a presença do *Aspergillus flavus*, potencial produtor de aflatoxina, em uma das marcas analisadas.

7. REFERENCIAS

APHA. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3^a ed. Washington: **American Public Health Association**. 1219.1992.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. Illustrated genera of imperfect fungi. **MacMillan Publishing Company**. 1987

BENEVIDES et al. Aspectos físicoquímicos e microbiológicos do queijo de coalho produzido com leite cru e pasteurizado no estado do ceará . B.CEPPA, Curitiba, v. 18, n. 1, jan./jun.2000

BORGES, M. F., Microrganismos Patogênicos e indicadores em Queijos de Coalho Produzidos no estado do Ceará, Brasil. **B. CEPPA**, Curitiba, v 21, n 1, Janeiro/Junho 2003;

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de produtos de origem animal. Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de 2001. Aprova e oficializa o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho. **Diário Oficial (da) República Federativa do Brasil**, Brasília, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº 146, de 07/03/96. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. Brasília: **Ministério da Agricultura e do Abastecimento**, 1996.

COUSINS, C. M., SHARPE, M. E., LAW, B.A. The bacteriological quality of milk for Cheddar cheesemaking. **Dairy Industrie International**, v.42, n. 7, p. 1217, 1997.

CHIAVARO, E.; LEPIANI, A.; COLLA, F.; BETTON, P.; PARI, E.; SPOTTI, E. Ochratoxin A determination in ham by immunoaffinity clean-up and a quick fluorometric method. **Food Additives and Contaminants**. 6(19): 575-581. 2002.

DILKIN, P.; MALLMANN, C. A.; SANTURIO, J. M.; HICKMANN, J. L. Classificação macroscópica, identificação da microbiota fúngica e produção de alfa toxinas em híbridos de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30. n. 1, p. 137-141, 2000.

ESCOBAR, C. A. M. et al. Avaliação dos pontos críticos na produção de queijo de coalho em Pernambuco. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora**, v. 56, n. 321, p. 248-256, 2001.

FEITOSA, T.; BORGES, M. F.; NASSU, R. T.; AZEVEDO, E. H. F.; MUNIZ, C. R. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Ciênc. Technol. Aliment.**, Campinas, 23(Supl): 162-165, dez. 2003.

FEITOSA, TEREZINHA et al., Composição Centesimal do Queijo Tipo “Coalho” do Estado do Ceará. **Ciências Agronômicas**, 16 (2), pág. 57-63, dezembro, 1985;

FRANCO, D. B. G. M.; LANNGRAF, M. Microrganismos patogênicos de importância em alimentos “In” Franco DBG M, Lanngraf M. Microbiologia de alimentos. São Paulo: **Atheneu**. 2004.

GONDIM, F. A. L. Renforcement des propriétés organoleptiques d'un fromage à pâte pressée brésilien COALHO DO CEARA à l'aide de la lipase-estérase de *Rhizomucor miehei*. 1995. 118 f.. **Thèse (Doctorat)**, L'Institut National Polytechnique de Lorraine, Lorraine, 1995.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo). Métodos físico-químicos para análise de alimentos coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglia. São Paulo: **Instituto Adolfo Lutz**; 2008

JAY, J. M. Microbiologia moderna de los alimentos. Zaragoza: **Acribia**, 1973.

LIMA, M. H. P. Elaboração de queijo de coalho a partir de leite pasteurizado e inoculado com *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*. 1996. 82 f.. **Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos)**, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1996.

NASSU, R. T.; ARAÚJO, R. S.; GUEDES, C.G M; ROCHA, R. G. A. Diagnóstico das condições de processamento e Caracterização Físico química de queijos regionais e manteiga no Rio Grande do Norte. Fortaleza, CE **Boletim de pesquisa e desenvolvimento** Embrapa Agroindústria Tropical, n..11, p.24, 2003. Disponível em: http://www.cnpat.embrapa.br/publica/pub/BolPesq/bd_11.pdf Acesso em:10 out. 2011.

OLIVEIRA, J. S. Queijo: fundamentos tecnológicos. São Paulo: **Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia / Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia**, p. 233 1981.

PÁDUA , I. P. M.; SILVEIRA, I. A.; MARTINS, C. E. C. B. Aflatoxinas e risco de contaminação do leite humano. **Pro Homine**. 2002.

PITT, J.; HOCKING, A. Fungi and food spoilage. **An Aspen publication**. 2^o ed. 387-383. 1999

RAPPE, K. B.; FEMEL, D. I. The genus *Aspergillus*. New York: **Robert E.K.** 68p. 1977.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. *Biologia Vegetal*. 6 ed. Rio de Janeiro. **Guanabara Koogan S.A**; 2001.

ROBINSON, R. K. *Microbiologia lactológica – microbiologia de los productos lácteos*. Zaragoza: **Acribia**, 1987.

ROCHA. A. M. P. Controle de fungos durante a maturação de queijo minas padrão. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Santa Maria UFSM, RS. 2004.

SABINO M. Micotoxinas. “In” OGA, S. *Fundamentos da Toxicologia*, São Paulo: **Atheneu**; 1996.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. *Manual de Métodos de Análise. Microbiológica de Alimentos. Contagem de Bolores e Leveduras*. Cap. 2. p. 99-108. 3ª Ed. São Paulo: **Varela**, 2007.

TANIWAKI, M. H.; LAMANAKA, B. T.; BANHE, A. A. Comparision of culture media to recover fungi from flour and tropical fruit pulp. **J Food Mycol**. 2: 291-302 .1999.