



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I – CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE LICENCIATURA PLENA E BACHARELADO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS**

**IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA
FÚNGICA DA CARNE MOÍDA
COMERCIALIZADA NO MERCADO
CENTRAL DE CAMPINA GRANDE – PB**

CAMPINA GRANDE – PB
2012

GEYSA KELLY DE SOUZA AMORIM

**IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA
FÚNGICA DA CARNE MOÍDA
COMERCIALIZADA NO MERCADO
CENTRAL DE CAMPINA GRANDE – PB**

Monografia apresentada ao Curso de Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba para a obtenção do título de Licenciada e Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Mabel Calina de França Paz

CAMPINA GRANDE

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL – UEPB

A524i Amorim, Geysa Kelly de Souza.
Identificação da microbiota fúngica da carne moída comercializada no mercado central de Campina Grande – PB. [manuscrito] / Geysa Kelly de Souza Amorim. – 2012.
50 f.: il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2012.

“Orientação: Profa. Dra. Mabel Calina de França Paz, Universidade Federal de Campina Grande.”

1. Manipulação de alimentos. 2. Contaminação de alimentos. 3. Segurança alimentar. I. Título.

CDD 21. ed. 613.2

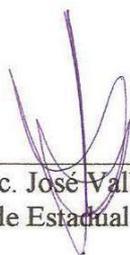
GEYSA KELLY DE SOUZA AMORIM

**IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA FÚNGICA DA
CARNE MOÍDA COMERCIALIZADA NO MERCADO
CENTRAL DE CAMPINA GRANDE – PB**

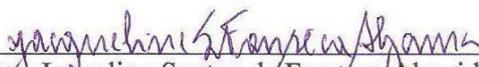
Aprovada em 27 / 11 / 2012.



Profª Drª Mabel Calina de França Paz (Orientadora)
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG



Prof. Msc. José Valberto de Oliveira
Universidade Estadual da Paraíba - UEPB



Profª Msc. Jaqueline Santos da Fonseca Almeida Gama
Universidade Estadual da Paraíba - UEPB

DEDICATÓRIA

A Deus, Pai amoroso, fiel e misericordioso, que tanto me inspirou em todos os momentos, estando sempre comigo me tranquilizando e me fazendo forte para realizar esta conquista.

Aos Meus pais, pela dedicação e incentivo em toda a minha educação, e me ensinando os reais valores da vida.

A minha família que tanto gosto e tenho orgulho de fazer parte da mesma.

Aos meus professores que contribuíram em toda a minha formação.

A todos os meus amigos que estiveram me acompanhado nesta conquista.

AGRADECIMENTOS

A vivência de alcançar os nossos objetivos, desejos e sonhos que por vários dias foram planejados é uma experiência ímpar, que sem dúvidas é preciso buscar muito, procurar fazer o melhor de si, e até mesmo se surpreender em ocasiões que tudo indicava que não iria dar certo, ou que nada estava contribuindo, porém o fato de enfrentar com a vontade de conseguir torna possível chegar ao topo da montanha. Momento como este tem um valor imenso, especial, uma sensação excelente de saber que a caminhada teve seus desafios, seus obstáculos, mas, sobretudo com o intuito de apenas me fazer mais forte. Entretanto, a motivação de tudo isso, é a partir do momento que acordamos, e que Deus nos apresenta propósitos, nos fazendo fortes a cada dia independentemente das dificuldades. Portanto, te agradeço Senhor por essa conquista, tenho certeza que sem a Tua presença ao meu lado durante todos os dias não seria possível. Agradeço-te por todos os dias que foram felizes, que foram tristes, os dias de sol, os dias de chuvas, os dias de muitas aulas que foram cheio de atividades para realizar, os dias de prova, de seminário, te agradeço Senhor todos os dias sem nenhuma exceção, pois cada dia teve sua beleza, teve seu propósito de mais um dia motivado pela tua graça. Muito obrigado Senhor Jesus por tudo ter dado certo, por tudo ter sido conduzido por Ti Senhor, e por fim como diz a música: “*Quem no pouco se encontrou, Aprendeu multiplicar*”, tudo através do Senhor Jesus Cristo!

Agradeço aos meus pais por tudo, por ter me apoiado em todos os momentos, me compreendendo e incentivando desde o início. Painho e Mainha vocês são essenciais na minha vida, muito obrigado pela educação e amor que sempre recebi. Não poderia esquecer de agradecer ao meu irmão João Paulo que por tantas vezes me deixou estudar para as provas e seminários, não fazendo barulho. Obrigado a toda a minha família, *In Memoriam* ao meu avô Boia, as minhas avós Zefinha e Regina que sinto saudades, meus tios, tias, primos e primas, em especial a minha Tia Daluz e ao meu Avô Joca Paulo que me apoiaram nesta caminhada.

Obrigado aos meus companheiros de curso Amanda, Natalice, Lidiane, Priscila, Paulo Sérgio, Marcel, Fernando, Gitá, Lamoniier, pelos quatro anos de curso que nós tivemos a oportunidade de aprender uns com os outros. Bem como agradeço a todos os colegas que escolheram outra caminhada, em especial Erika, Claudilene, Fabrício e Emmanuelle. Aos professores que tivemos a oportunidade de conviver ao longo do curso, meu muito obrigado. A minha orientadora Profa. Mabel Calina sou muito grata pela confiança, compreensão, dedicação, afeto e carinho. Aos meus amigos: Hanndson, Luana, Monalisa, Brigida, Valdenia do Laboratório Multidisciplinar, que me ajudaram a realizar esta pesquisa.

Agradeço a todos os meus amigos e amigas que diretamente ou indiretamente me apoiaram e estavam comigo durante esta jornada, e a todas as pessoas importantes não citadas aqui por falha de minha memória ou por ter de abreviar as palavras. Esses que não são de modo algum, menos especiais para mim. Enfim, a todas as pessoas que me conhecem ou não, e que farão a leitura desse estudo buscando conhecimento, e diante dessa experiência posso afirmar “*Tudo posso naquele que me fortalece*”, de todo coração meu MUITO OBRIGADO!

Tudo Posso – Pe. Fábio de Melo

*Posso, tudo posso naquele que me fortalece
Nada e ninguém no mundo vai me fazer desistir
Quero, tudo quero, sem medo entregar meus projetos
Deixar-me guiar nos caminhos que Deus desejou para
mim e ali estar*

*Vou perseguir tudo aquilo que Deus já escolheu pra mim
Vou persistir, e mesmo nas marcas daquela dor
do que ficou, vou me lembrar
E realizar o sonho mais lindo que Deus sonhou
Em meu lugar estar na espera de um novo que vai
chegar
Vou persistir, continuar a esperar e crer
E mesmo quando a visão se turva e o coração só chora
Mas na alma, há certeza da vitória*

*Eu vou sofrendo, mas seguindo enquanto tantos não
entendem
Vou cantando minha história, profetizando
Que eu posso, tudo posso... Em Jesus.*

RESUMO

Resumo – AMORIM, Geysa Kelly de Souza. **Identificação da Microbiota Fúngica da Carne Moída Comercializada no Mercado Central de Campina Grande – PB.** Campina Grande, PB: UEPB, 2012.

Resumo: A composição química da carne e os procedimentos ou manipulação inadequados são fatores que ocasionam uma possível contaminação deste alimento, tendo importantes implicações no tempo de prateleira do produto e na segurança alimentar do consumidor. Objetivando identificar os microrganismos fúngicos isolados de amostras da carne moída comercializada no Mercado Central de Campina Grande – PB, foram realizadas coletas quinzenais, num período de um ano, perfazendo um total de 12 coletas, e destas se constituiu amostras que foram testadas quanto a fonte de carbono e nitrogênio. Foram constatadas diversas deficiências higiênico-sanitárias no setor de comercialização do referido produto, bem como os fungos isolados resultaram em 65 amostras com um crescimento exclusivo de leveduras, e 35 amostras crescimento filamentosos. Algumas amostras foram identificadas resultando nos gêneros: *Geotrichum sp.*, *Cladosporium sp.*, *Aspergillus sp.*, permitindo afirmar a presença de fungos toxigênicos na carne moída. Conseqüentemente, diminuindo a valorização comercial desse produto, e possíveis danos à saúde do consumidor.

PALAVRAS-CHAVE: *contaminação alimentar; feiras livres; micotoxinas; segurança alimentar.*

ABSTRACT

Abstract– AMORIM, Geysa Kelly de Souza. **Identification Of Milled Beef's Fungal Microbiota Commercialized in the Central Market In Campina Grande – PB.** Campina Grande, PB: UEPB, 2012.

Abstract: The chemical composition of the meat and the procedures and manipulation inappropriates are factors bringing on one possible contamination this food, having important implications about the time that the food passed on the stand and food security of the consumer. Purpose identify the fungal microorganisms isolated samples of milled meat sold in Central Market in Campina Grande – PB, It were made biweekly samplings, in a period of one year, for a total of 12 samples, and in these samples was tested as a source of carbon and nitrogen. It was detected several deficiencies in hygiene and sanitary sector marketing of fresh meat from the Central Market and the fungi isolated were 65 samples with a unique growing of yeasts, filamentous growing and 35 samples. Some samples were identified resulting in the genera: *Geotrichum sp.*, *Cladosporium sp.*, *Aspergillus sp.*, allowing affirm the presence of toxigenic fungi in milled beef. Consequently, reducing the commercial valorization of the product, and possible damage to the consumer's health.

KEYWORDS: food contamination; fairs; mycotoxins; food security.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Gêneros de Fungos Frequentemente Encontrados em Carnes.....	27
---	-----------

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	Esquematização do método Pour-Plate.....	30
FIGURA 2 –	Microcultivo em Lâmina.....	32
FIGURA 3 –	Carnes frescas expostas nos estabelecimentos do Mercado Central.....	33
FIGURA 4 –	Comercialização de carnes frescas no Mercado Central.....	33
FIGURA 5 –	Características da assimilação dos carboidratos e nitrogênio.....	35
FIGURA 6 –	<i>Geotrichum</i> sp.	38
FIGURA 7 –	<i>Cladosporium</i> sp.	40
FIGURA 8 –	<i>Cladosporium</i> sp.	41
FIGURA 9 –	<i>Aspergillus</i> sp.	43
FIGURA 10 –	<i>Aspergillus</i> sp.	44

LISTA DE SIGLAS

UFC: Unidade Formadora de Colônias

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

BPF: Boas Práticas de Fabricação

BPP: Boas Práticas de Produção

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	14
2.	OBJETIVOS.....	15
2.1.	2.1. Geral.....	15
2.2.	Específicos.....	15
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1.	Carne.....	16
3.2.	Potencial contaminante.....	17
3.3.	Deterioração microbiana em alimentos de origem animal.....	18
3.4.	Comercialização de carne bovinas nas feiras livres.....	19
4.	População microbiana.....	20
4.1.	População fúngica.....	21
4.2.	Intoxicações alimentares de origem fúngica.....	23
4.3.	Gêneros comumente encontrados em alimentos.....	24
4.3.1.	<i>Geotrichum</i>	24
4.3.2.	<i>Cladosporium</i>	25
4.3.3.	<i>Aspergillus</i>	25
4.3.4.	<i>Penicillium</i>	26
4.3.5.	<i>Fusarium</i>	26
5.	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
5.1.	Tipo de Pesquisa.....	29
5.2.	Local de estudo.....	29
5.3.	Aquisição das amostras e observações das condições higiênico-sanitária.....	29
5.4.	Isolamento de Bolores e Leveduras.....	30
5.5.	Identificação.....	31
5.5.1.	Auxonograma.....	31
5.5.2.	Crescimento Radial.....	31
5.5.3.	Conservação das cepas.....	32
5.5.4.	Microcultivo em Lâmina.....	32
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
6.1.	Condições Higiênicas do ambiente de comercialização de carne moída.....	33
6.2.	Isolamento de Bolores e Leveduras.....	35

6.2.1. Auxonograma.....	35
6.2.2. Crescimento radial.....	37
6.3. IDENTIFICAÇÃO.....	37
6.3.1. <i>Geotrichum</i>.....	37
6.3.2. <i>Cladosporium</i>.....	39
6.3.3. <i>Aspergillus</i>.....	41
7. CONCLUSÃO.....	45
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

1 INTRODUÇÃO

O alimento é uma necessidade primária do ser humano, a sua disponibilidade e nutrição adequada são indispensáveis para a promoção da saúde. Contudo, é preciso considerar que o seu consumo não ocasione qualquer risco ou perigo a saúde pública. Uma das condições essenciais é que o alimento esteja seguro para o consumo, assim contribuindo na prevenção de enfermidades, do mesmo modo na promoção e manutenção da saúde.

A ineficiência nos padrões de qualidade dos alimentos é um dos fatores que explica os acontecimentos de casos ou surtos de doenças transmitidas por alimentos. Portanto, os alimentos contaminados com patógenos, e ingeridos em certas quantidades causam toxinfecções, de tal modo que a inocuidade dos alimentos necessita estar inclusa na atenção primária à saúde.

Dentre os alimentos de origem animal, os consumidores ainda preferem carnes bovinas, a mesma é considerada uma importante fonte de proteína para o homem. Todavia, os produtos cárneos são protéicos e possuem uma boa atividade de água, facilitando o crescimento e a multiplicação de bactérias, leveduras e bolores, agentes deteriorantes e patogênicos ao homem. A diversidade de microrganismos encontrados na carne esta relacionada com as fases póstumas da produção industrial, sobretudo, no processo de abate, distribuição e comercialização.

Diante dos aspectos que estabelecem a qualidade de um alimento, as características microbiológicas são necessárias, já que proporcionam dados que possibilitam avaliar as condições higiênico-sanitárias desde o processamento até a comercialização conferindo o alimento apto para o consumo, bem como seu estado perecível e o risco à saúde da população.

A comercialização de carnes bovinas apresenta uma peculiaridade, com uma tradição bastante pertinente em feiras livres, sendo um comércio móvel e circulante nas áreas urbanas. Assim, as feiras livres possuem um destaque, visto que o consumidor pode negociar os valores dos produtos ofertados e adquiri-los em quantidades desejadas, portanto, parte da população mantém esse costume preferindo a compra de alimentos neste local. Entretanto, é preocupante diante das carências higiênico-sanitárias do mesmo.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Identificar os microrganismos fúngicos isolados de amostras da carne moída comercializada no Mercado Central de Campina Grande – PB.

2.2 Específicos

Verificar a qualidade higiênico-sanitária, através da mensuração da população de fungos filamentosos (bolors) isolados em cortes de carne bovina;

Analisar os perigos microbiológicos presentes em cortes de carne bovina comercializados nas feiras livres do município através das recomendações do manual de boas práticas de manipulação;

Isolar e identificar os gêneros de fungos filamentosos mais comuns encontrados na carne bovina comercializada em feiras livres;

Correlacionar os agravos/doenças que atingem a população e que são veiculadas pela baixa condição de higiene na carne e de seus manipuladores com os gêneros microbianos encontrados nas amostras.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Carne

A carne bovina é um alimento de excelentes qualidades nutricionais. Na sua composição encontram-se proteínas de alto valor biológico, associadas a teores significativos de vitaminas, especialmente as do complexo B, juntamente com importantes minerais, particularmente o Fe^{++} , que tem uma forma altamente biodisponível. Contém todos os aminoácidos essenciais em proporções adequadas para atender as necessidades do organismo humano, quando consumida em uma dieta equilibrada (PENSEL, 1998; SAUCIER, 1999).

Diante da sua composição rica em nutrientes e sua elevada atividade de água é bastante susceptível à deterioração microbiana. É um excelente meio de cultura para o desenvolvimento de microrganismos e frequentemente está envolvida na disseminação de microrganismos patogênicos causadores de enfermidades ao homem e a outros animais (BRASIL, 1997). Portanto, a carne fresca é um dos alimentos mais perecíveis, que necessita da aplicação de procedimentos de conservação e armazenamento imediatamente após o abate. O método mais utilizado para prolongar a vida útil da carne é o emprego da refrigeração. A carne fresca deve ser mantida às baixas temperaturas de refrigeração, que começa com o esfriamento de carcaças logo após o abate, e continua no transporte, manipulação e exposição de cortes para a venda e no armazenamento destes cortes na geladeira do consumidor (ROÇA, 2008a).

A refrigeração é o método mais utilizado para a conservação da carne e torna-se necessária, por um lado, para minimizar as alterações, principalmente a putrefação, e, por outro, para eliminar os riscos produzidos pelo desenvolvimento de microrganismos patogênicos, responsáveis por toxinfecções, além de controlar a velocidade com que aparecem as características organolépticas *post mortem* da carne (ROSSET, 1994).

Nos métodos modernos de preparo e embalagem de carne utiliza-se o resfriamento rápido em temperaturas próximas a zero, seguido de armazenamento em salas refrigeradas com temperatura ligeiramente acima da temperatura de congelamento. Quanto mais rápido for o resfriamento da carne, menor será a possibilidade de multiplicação de bactérias mesófilas. As temperaturas de armazenamento variam de $-1,4^{\circ}\text{C}$ a $2,2^{\circ}\text{C}$. Os microrganismos que causam problemas no armazenamento de carnes refrigeradas são bactérias psicrófilas, principalmente do gênero *Pseudomonas*, além dos gêneros *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*,

Pediococcus, *Flavobacterium* e *Proteus*, e algumas espécies de leveduras e mofos que podem crescer em temperaturas baixas (FRAZIER, 1993).

A população microbiana inicial exerce um efeito marcante no tempo de armazenamento da carne fresca e produtos processados, portanto, é indispensável para manter as propriedades qualitativas ótimas da carne e para prolongar sua vida útil, reduzir ao mínimo a contaminação durante as fases de manipulação, processamento, embalagem e armazenamento. Para conservar a qualidade da carne é importante manter constante as temperaturas de refrigeração (3° C ou menos). A manutenção de temperaturas adequadas, de 3° C ou menos, às vezes não é cumprida durante o transporte, principalmente nas operações de carga e descarga (ROÇA, 2008a).

A carne moída tem sua vida de prateleira reduzida, devido à difusão por toda massa, da população microbiana da superfície. Nas carnes picadas, as alterações de cor constituem o primeiro indício de variações físico-químicas e biológicas, seguidas pelas modificações de odor e sabor. As medidas indicadas para se obter um aumento da vida útil das carnes picadas é a aplicação de temperaturas mais baixas de refrigeração (ROÇA, 2008a).

3.2 Potencial contaminante

A incidência de diferentes microrganismos encontrados na carne fresca é muito variada, principalmente porque a microbiota autóctone do produto é profundamente afetada pelas condições pré-abate, bem como pelas fontes de contaminação, incluindo facas, mesas de corte, couro e material fecal. Após a limpeza, a superfície da carcaça bovina pode ter entre 10^2 e 10^4 UFC/cm² e, após a desossa, os cortes de carne para embalagem, devem ter provavelmente, um número de microrganismos contaminante consideravelmente maior. Durante a estocagem aeróbia da carne, a limosidade pode tornar-se visível quando o número de bactérias atingir 10^8 UFC/cm², e odores estranhos podem ser sentidos quando o número atingir 10^7 UFC/cm² (JAMES, 1996; PINTO NETO, 2003).

A microbiota bacteriana potencialmente patogênica pode estar presente na carne, mesmo que sejam aplicadas as boas práticas de produção (BPP) seguida das condições higiênico-sanitárias satisfatórias durante o abate e a evisceração dos animais. O crescimento dessas bactérias potencialmente patogênicas pode ser inibido pelas condições de conservação e, sobretudo, pela redução da temperatura (SARANTÓPOULOS, 1983).

Para obtermos uma carne bovina de qualidade é necessário que se mantenham cuidados desde o nascimento do animal até o produto final. A produção da carne tem como objetivo preservar os seus benefícios, mantendo a sua qualidade nutricional, para o consumidor que dela faz uso e estar satisfeito com o produto adquirido (SARCINELLI et al, 2007).

3.3 Deterioração microbiana em alimentos de origem animal

O desenvolvimento de microrganismos em alimentos está relacionado a vários fatores, como: as características próprias do alimento (fatores intrínsecos) e as características relacionadas com o ambiente que o alimento está inserido (fatores extrínsecos). Sendo fatores intrínsecos a atividade de água, a acidez, o potencial de oxidação, a composição química, a presença de antimicrobianos naturais e as interações entre os microrganismos presentes nos alimentos. Entre os fatores extrínsecos os mais importantes são a umidade e a temperatura do ambiente, bem como a composição química da atmosfera que envolve o alimento.

O processo de deterioração é causado por reações químicas que ocorrem em sua porção gordurosa, ou lipídica, desencadeadas pela ação da luz, do corte ou moagem, do cozimento e do armazenamento que eventualmente levam à perda de qualidade e consequente rejeição do consumidor. Estas reações formam vários compostos que alteram as características sensoriais dos produtos, produzem odores e sabores desagradáveis, diminuem o valor nutricional do alimento e podem até mesmo ser nocivos à saúde (GALLO NETTO, 2009).

Os microrganismos habitam os mais diversos substratos alimentares, sendo bem exigentes quanto aos fatores de crescimento, visto que necessitam de nutrientes disponíveis como: água, fonte de nitrogênio, fonte de carbono, vitaminas e sais minerais. Deste modo, os alimentos de origem animal são excelentes meios de cultura devido a suas propriedades intrínsecas, principalmente a elevada quantidade de água e a composição rica em nutrientes, assim sendo susceptível à deterioração microbiana. Além disso, os fatores extrínsecos como o armazenamento e a manipulação podem influenciar contaminando esses alimentos na cadeia de produção. Estes microrganismos deterioradores estão presentes inicialmente em pequenas quantidades, mas se desenvolvem mais rapidamente que os outros microrganismos contaminantes, produzindo metabólitos responsáveis pela deterioração e rejeição sensorial da carne. Os perigos de natureza microbiana decorrem não apenas de enfermidades transmissíveis ao

homem pela ingestão de alimentos infectados (ou por simples contato com as fontes de contaminação), mas também de possíveis toxinfecções, bem como os vírus que podem ser transmitidos pela carne (MACDONALD, et al., 1999).

3.4 Comercialização de carne bovina nas feiras livres

A feira livre é considerada um dos locais mais tradicionais de comercialização de alimentos a varejo, sendo uma forma de comércio móvel, com circulação dentro das áreas urbanas. Entretanto, é motivo de preocupação e cautelas frequentes, em virtude de suas deficiências higiênico-sanitárias (MOY, et al., 1997; GARCIA-CRUZ, 2000).

Deve-se considerar ainda que nas feiras livres, os alimentos de origem animal e seus produtos derivados, ficam expostos sob condições insalubres, sujeitos a ações diretas dos microrganismos patogênicos ou não, provenientes da contaminação do ambiente e poluição ambiental, como também de insetos, quando não estão adequadamente acondicionados ou embalados (GERMANO, 2001).

Um aspecto importante a ser observado na comercialização de produtos cárneos de origem animal é a manutenção da temperatura adequada para cada alimento. Carnes quando expostas em temperaturas inadequadas, alteram-se rapidamente, sobretudo em regiões tropicais onde, durante o verão as temperaturas são elevadas, exigindo um controle rigoroso para garantir a qualidade desses produtos. Nas feiras livres continua sendo inadequadamente permitida à venda de produtos perecíveis, como a carne, sem refrigeração. As condições de armazenamento nesses locais são inadequadas, justamente porque o foco comum nesse tipo de comércio é a carne *in natura*, o que vai de encontro à Resolução RDC n. 275/2002 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2002), que dispõe sobre o regulamento técnico com relação às condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação (BPF) para estabelecimentos elaboradores/industrializadores de alimentos, bem como em relação à Portaria nº 304/96, que estabelece critérios para introdução de modificações nas atividades de distribuição e comercialização de carne bovina, bubalina, suína e avícola, visando à saúde do consumidor.

Dainty e Mackey (1992) definem a deterioração da carne como sinal ou conjunto de sinais evidentes do crescimento microbiano, quando manifestado por acentuados odores, descoloração e limosidade superficial.

A Resolução RDC n. 12/2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, (BRASIL, 2001) que dispõe sobre os padrões microbiológicos para

alimentos, exige para carne *in natura* apenas a ausência de *Salmonella* em 25g de amostra, contudo, a presença de *Escherichia coli* nesse alimento em quantidades elevadas é utilizada para indicar a possibilidade de contaminação fecal.

A contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva em alimentos tem como finalidade: relacionar este microrganismo à saúde pública, para confirmar o seu envolvimento em surtos de intoxicação alimentar, e para controlar a qualidade higiênico-sanitária nos processos de produção e manipulação de alimentos. Neste último caso, serve como indicador de contaminação pós-processo ou das condições de sanitização das superfícies que entram em contato com alimentos (SILVA et. al., 2002).

A presença de fungos filamentosos e leveduras viáveis em índices elevados nos alimentos podem fornecer informações sobre condições higiênicas deficientes nos equipamentos e utensílios, matéria-prima contaminada, falha no processamento ou na estocagem (VELD, 1996). Estatísticas da Organização Mundial de Saúde (OMS) comprovam que as doenças de origem alimentar são consideradas o maior problema de saúde pública em todo o mundo, sendo os manipuladores referenciados como um dos principais veículos de contaminação, tendo em vista que sua participação chega a atingir até 26% das fontes contaminantes (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2001).

4 População microbiana

Os microrganismos são apresentados através de várias espécies de bactérias, leveduras, bolores, parasitos e vírus. Sendo importante identificar os microrganismos presentes nos variados ambientes, com a finalidade de compreender o seu metabolismo, e posteriormente seus benefícios como a participação da microbiota residente de animais e plantas, a produção de alimentos e medicamentos; e ainda os malefícios, sendo deterioradores de alimentos e causadores de doenças.

A microbiota da carne fresca é composta tanto por bactérias Gram-negativas como por Gram-positivas. Dentre os mais comuns destacam-se: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Sarcina*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Proteus*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Escherichia* e *Listeria*. Entre os bolores e leveduras, encontram-se *Cladosporium*, *Sporotrichum*, *Oospora*, *Thamnidium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Candida*, *Rhodotorula* e *Torulopsis* (FRAIZER, 1993; LEITÃO, 1995).

As bactérias mais importantes na alteração da carne fresca são *Pseudomonas spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Aeromonas putrefaciens*, *Enterobacter liquefaciens* e *Yersinia enterocolitica* (NBUEGA e KARURI, 1994).

4.1 População fúngica

Os fungos são microrganismos bastante diversificados, podem estar presentes em diversos lugares: no solo, na água, nas plantas, em animais, no ser humano e em detritos orgânicos. Utilizam variados substratos orgânicos para se alimentar, como folhas caídas, restos de animais mortos e outros resíduos orgânicos, atuando como decompositores, reciclando a matéria orgânica que constitui os seres vivos, atividade de grande importância para a manutenção dos ecossistemas.

A identificação da maioria das espécies fúngicas é realizada considerando-se suas variadas características morfológicas. Os fungos incluem, basicamente, as leveduras, os bolores ou mofos, que são fungos microscópicos, e os cogumelos, que são considerados fungos superiores, macroscópicos (ZAITZ, 2010).

As leveduras são fungos formados por uma única célula eucarionte, em sua maioria são classificados como ascomicetos, tem forma esférica, oval ou cilíndrica. A reprodução das leveduras pode ser assexuada por brotamento ou podem realizar também a reprodução sexuada quando ocorre a fusão de duas células (MADIGAN et. al., 2004; GONÇALVES, 2007). Fungos leveduriformes possuem colônias pastosas ou cremosas, com superfície lisa, geralmente plana e opaca, podendo apresentar uma coloração branca, creme, rosa, laranja ou preta.

As leveduras são ubíquas, têm metabolismo peculiar que permite a utilização de nutrientes variados e nas mais diversas condições ambientais. Crescem principalmente onde há presença de açúcares, como frutas, flores e cascas de árvores, de nutrição quimioheterotrófico, predominantemente aeróbios, com temperatura ótima de crescimento entre 25° a 30° C e pH de 4 a 7, sendo que algumas espécies são patogênicas ao homem (MADIGAN et. al., 2004).

Devido à sua habilidade de utilizar vários substratos para sua nutrição absorptiva, as leveduras colonizam diversos nichos ecológicos. Têm extrema importância econômica, pois produzem bebidas fermentadas como cervejas e vinhos, e outros alimentos, como na produção de pão e queijo. (ALEXOPOULOS et. al., 1996; SANTOS et. al., 1996; GALVAGNO e FORCHIASSIN, 2004; MADIGAN et. al., 2004).

Os bolores são filamentosos, multicelulares, com células tubulares denominadas hifas, cujo conjunto é denominado micélio. Em cultivo, esses fungos apresentam colônias filamentosas, que podem ser algodinosas, pulverulentas ou com outras características e com os mais variados tipos de pigmentação, aspectos esses que são importantes na identificação presuntiva dos bolores (ZAITZ, 2010).

O micélio dos bolores é responsável pelo aspecto característico das colônias que formam. Estas colônias podem ter um aspecto cotonoso, ser secas, úmidas, compactas, aveludadas, gelatinosas, com variadas colorações. Normalmente, uma análise macroscópica da colônia formada é suficiente para a identificação de, pelo menos, o gênero ao qual o bolor pertence (FRANCO, 2008).

De acordo com sua morfologia, pode ser dividido em dois tipos: filamentoso (septado) e não-septado (cenocítico). As hifas podem-se dividir em compartimentos celulares, através de septos, os quais são parciais, completos ou, então, perfurados. Os septos parciais (pseudo-septos) resultam de um espessamento da parede celular das hifas. Os septos perfurados são uni ou multiperfurados. Os poros, estando presentes, os núcleos movem-se livremente de uma célula para outra (LACAZ, 1998).

O micélio pode ter duas funções distintas: promover a fixação do bolor ao substrato (micélio vegetativo) e promover a reprodução, através da produção de esporos (micélio reprodutivo). Os bolores podem reproduzir-se sexualmente (fungos perfeitos) ou assexualmente (fungos imperfeitos), ou ainda pelos dois processos, simultaneamente (FRANCO, 2008).

A fisiologia microbiana considera aspectos de crescimento, diferenciação celular, metabolismo geral e formação de produto, decorrentes da interação do microrganismo com o ambiente externo celular frente ao suprimento de nutrientes, temperatura, pH e disponibilidade de oxigênio. Portanto, o crescimento microbiano e a resultante formação de produto ocorrem em resposta ao ambiente, ou seja, de modo interativo. O microrganismo se adapta ao ambiente respondendo com mecanismos tanto de natureza física como química (COLEN, 2006).

Os fungos são microrganismos aeróbios, assim esclarecendo o bom crescimento na superfície dos meios de culturas em uma grande parte dos fungos, contudo, uma parte das leveduras são anaeróbias facultativas. Bastante peculiar é a participação dos fungos para a obtenção de energia através dos processos de respiração e fermentação, deste modo são usadas variadas fontes de carbono, como: glicose, lactose, sacarose,

frutose, dextrose, maltose. Os fungos não são capazes de fixar o nitrogênio, este pode ser adquirido como nitrato, nitrito e amônia (ANVISA, 2007).

Para cultivar um microrganismo é necessário empregar uma fonte de energia, disponibilizar nutrientes que forneçam materiais essenciais para a síntese de biomassa, evitar a presença de inibidores de crescimento, usar um inóculo viável e, submetê-lo às condições ambientais favoráveis. Assim, é necessário determinar as condições ambientais mais adequadas, sejam físicas, como a atividade de água e temperatura, sejam químicas, como o pH, a fonte de C e a fonte de N (COLEN, 2006).

Os fungos constituem um grupo diversificado de organismos que apresentam grande importância ecológica e econômica. Cerca de 70.000 espécies de fungos já foram descritas, entretanto, estima-se que o número total seja de aproximadamente 1,5 milhão. Esses organismos são considerados de grande importância por várias razões: são os decompositores primários em todos os ecossistemas terrestres, constituem importantes associações simbióticas com plantas vasculares (micorrizas), constituem a avassaladora maioria dos patógenos de plantas, oferecem sistemas genéticos para os biólogos moleculares, e são cruciais para a biotecnologia industrial (LI et. al., 2000).

A biodiversidade de fungos filamentosos no Brasil é extremamente relevante, tendo em vista que estes fungos participam ativamente nos processos de produção, biodegradação e biodeterioração dos alimentos. Os estudos de fungos no Brasil é um universo ainda pouco explorado quanto a biodiversidade em alimentos e produtos agrícolas. Estes microrganismos podem revelar um potencial biotecnológico até o momento praticamente desconhecido, a caracterização enzimática de espécies de fungos apresenta grande importância socioeconômica, devido a utilização em processos biotecnológicos (AMIM et. al., 1998).

4.2 Intoxicação alimentar de origem fúngica

A intoxicação alimentar é uma doença bastante desagradável, que ocorre geralmente entre 1 a 36 horas após a ingestão de alimentos contaminados por bactérias e suas toxinas, fungos filamentosos ou bolores, vírus, produtos químicos, metais, e/ou plantas tóxicas. Os sintomas costumam durar entre 1 a 7 dias. A intoxicação bacteriana é o tipo mais comum de ocorrer e em alguns casos, pode causar a morte. Normalmente a intoxicação alimentar é provocada por manipuladores de alimento despreparados e/ou que não obedecem aos princípios da higiene alimentar. As Boas Práticas de Fabricação e as Boas Práticas de Higiene devem ser uma prática constante de todos os

manipuladores de produtos alimentícios e produtos de origem animal, sendo assim praticadas e aperfeiçoadas em toda a indústria alimentícia e de produtos de origem animal (FERNANDES, 1995; FRANCO, 2003).

Algumas espécies de bolores produzem determinados metabólitos tóxicos, designados por micotoxinas. As micotoxinas são metabólitos simples, de baixo peso molecular, sendo a maioria suficientemente termoestável, resistindo a determinados tratamentos térmicos ou processos de desidratação, que são suficientes para destruir o micélio vegetativo dos fungos que as produzem. Outra característica das micotoxinas é a sua capacidade de circular na cadeia alimentar sem serem destruídas. Isto significa que alimentos de origem animal (carne e leite) podem estar contaminados por micotoxinas se o animal tiver sido alimentado por rações previamente contaminadas. Três gêneros de bolores assumem particular importância na produção de micotoxinas: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (SILVA et al, 1997; FRANCO, 2003).

Os fungos filamentosos, na sua maioria, são pouco resistentes ao calor, uma vez que este destrói facilmente conídios e hifas, porém, seus esporos são bem mais resistentes. As poucas espécies termo-resistentes produzem esclerócios ou ascósporos, sendo que a maior parte das deteriorações em alimentos provocadas por elas são devidas à sobrevivência de ascósporos (esporos) ao tratamento de pasteurização (SPLITTSTOESSER, 1991).

4.3 Gêneros fúngicos comumente encontrados em alimentos

4.3.1 *Geotrichum*

É um gênero de fungos encontrados em todo o mundo no solo, água, ar e esgoto, bem como em plantas, cereais e produtos lácteos, também é comumente encontrado na flora normal humana. Algumas espécies quando colonizam serviços em um intervalo intestinal, podem causar infecções oportunistas, chamadas Geotricose. Como outras infecções, a Geotricose pode ser adquirida através da ingestão ou inalação do fungo. (GENTE et. al., 2002).

Micélio hialino septado que se fragmenta com artroconídios, variando de subglobosos a cilíndricos. Os artroconídios são liberados por meio de duplos septos. As espécies desse gênero são diferenciadas por provas bioquímicas. (LACAZ, 1998). É desprovido de conidióforos e são unicelulares. Tem extremidades curtas e cilíndricas. É formado por segmentação de hifas na maioria saprófitas (BARNETT e BARRY, 1998).

Há espécies que são utilizadas como cultura adjunta na maturação de queijo. (GENTE et. al., 2002).

4.3.2 *Cladosporium*

É considerado um dos gêneros mais cosmopolitas e de maior concentração na atmosfera, particularmente em regiões temperadas. Compõe um gênero com mais de 50 espécies, que coloniza os mais diversos ambientes e substratos (GAMBALE, et. al., 1993; MENEZES, et. al., 2006).

Podem ser encontrado em geladeiras sujas, em reservatórios de condensação, em caixilhos de janelas úmidas, e praticamente em qualquer superfície úmida porosa. Muitas vezes descolore papel pintura interior, ou dos têxteis armazenados em ambientes úmidos. A capacidade para esporular rapidamente e fortemente, torna este um alérgeno comum das vias aéreas associada à asma, e ainda pode causar doenças mais graves em indivíduos com supressão das funções imunológicas (ENVIROTEST LAB, 2012).

Apresentam colônias planas, de coloração branca ou escura. Conidióforos escuros, septados, ramificados no ápice. Conídios escuros (blastosporos), unicelulares ou bicelulares, variáveis quanto à forma e ao tamanho, ovoides, cilíndricos, em forma de limão ou irregulares, às vezes formando curtas cadeias. Fiálides cilíndricas, com células intercalares em cadeias, com aberturas laterais e colarete. Fialoconídios com forma de gotas, unicelulares, são produzidos de aberturas laterais das células intercalares (LACAZ, 1998).

4.3.3 *Aspergillus*

O gênero inclui aproximadamente 200 espécies das quais cerca de 20 são potencialmente patogênicas. Apenas espécies capazes de crescer a temperaturas de 35 a 37°C causam doença invasiva em humanos (SOUZA, 2006).

São espécies amplamente distribuídas em todo o mundo e têm uma capacidade de desenvolvimento de uma grande variedade de substratos. Muitas espécies são capazes de causar a deterioração de alimentos, embora alguns deles são utilizados nas indústrias de fermentação para produzir ácidos orgânicos, tais como ácidos cítrico e glucônico, assim como enzimas hidrolíticas tais como lipases e amilases (ABARCA, et. al. 2004; VALERO, et. al. 2007).

As espécies desse gênero caracterizam-se por apresentar conidióforos simples, com parede celular lisa, verrucosa ou espinescente, hialinos ou pigmentados, originados na célula-pé da porção basal. O conidióforo, em seu ápice, dilata-se em uma vesícula de forma variada (globosa, subglobosa, e clavada), hialina ou pigmentada das quais nascem as fiáides (LACAZ, 1998).

4.3.4 *Penicillium*

A maioria das espécies de *Penicillium* possui como *habitat* natural o solo, e estão presentes em alimentos de forma causal ou acidentalmente. Outras são naturalmente encontradas na vegetação morta, em algumas plantas e nos seus frutos, nas sementes ou na madeira. Desempenham um papel importante no processo natural de reciclagem da matéria orgânica e devido à sua grande adaptabilidade aos mais variados nichos ecológicos, acabam por desempenhar um papel relevante na deterioração de diversos tipos de produtos alimentares (MACHADO, 2006).

A maioria das espécies de *Penicillium* são saprófitos oportunistas, não são muito exigentes nutricionalmente e toleram uma grande gama de condições físico-químicas (atividade da água, temperatura, pH e potencial redox) o que lhes confere a capacidade de crescer em qualquer meio ambiente, onde exista um mínimo de sais minerais ou as mais diversas e complexas formas de carbono orgânico (MACHADO, 2006).

Segundo Machado (2006) uma série de características macroscópicas e microscópicas é necessária para a identificação dos diversos gêneros e espécies de *Penicillium*, considerando a mensuração das colônias, os aspectos macroscópicos e microscópicos, a micromorfologia obtida no exame microscópico, a data de crescimento e a obtenção de cleistotécios e esclerócios.

Em latim, *Penicillus* é a estrutura reprodutiva de *Penicillium* spp., base pela qual as espécies deste gênero são delimitadas e separadas de outros hifomicetos, permitindo também sua classificação. Toda a estrutura, incluindo desde os conídios até o estirpe, é denominada *Penicillus* (LACAZ, 1998).

4.3.5 *Fusarium*

A maioria das espécies de *Fusarium* é composta por fungos de solo com distribuição cosmopolita e ativo na decomposição de substratos celulósicos das plantas, sendo que alguns isolados são parasitas das plantas. A patogenicidade ao homem é rara, mas muitas espécies causam o apodrecimento de estoques e são importantes produtoras

de toxinas (DESJARDINS et. al., 2000; LESLIE et. al., 2001; ZEMANKOVA, 2001; GODOY e COLOMBO, 2004).

As colônias de coloração variam de branca a vermelha, de amarela a lilás. Produção de micro e macroconídios a partir de fiálides em forma de fusos, com fusos hialinos, extremidades afiladas, piriformes a falciformes, uni ou bicelulares, curvos ou retos. Clamidósporos presentes ou ausentes (LACAZ, 1998). A tabela 1 apresenta os principais gêneros de leveduras e bolores frequentemente encontrados em carnes frescas:

Tabela 1 – Gêneros de Fungos Frequentemente Encontrados em Carnes

GÊNERO	CARNES FRESCAS E REFRIGERADAS
Bolores	
<i>Alternaria</i>	X
<i>Aspergillus</i>	X
<i>Aureobasidium</i>	X
<i>Clodosporium</i>	XX
<i>Eurotium</i>	X
<i>Fusarium</i>	X
<i>Monascus</i>	X
<i>Monilia</i>	X
<i>Mucor</i>	XX
<i>Neurospora</i>	X
<i>Penicillium</i>	X
<i>Rhizopus</i>	XX
<i>Sporotrichum</i>	XX
<i>Thamnidium</i>	XX
Leveduras	

<i>Candida</i>	xx
<i>Geotrichum</i>	xx
<i>Debaryomyces</i>	x
<i>Tourulopsis</i>	
<i>Trichosporon</i>	xx
<i>Yarrowia</i>	x

Nota: x= casos ocorridos; xx= relatos mais frequentes.

Fonte: Adaptada de JAY, 2005.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Tipo de Pesquisa

Trata-se de uma pesquisa do tipo descritiva e exploratória com abordagem quantitativa. Segundo Gil (2010) a pesquisa descritiva tem a finalidade de descrever características de uma determinada população, servindo também para identificar possíveis relações entre variáveis, enquanto a pesquisa exploratória tem o objetivo de proporcionar maior familiaridade com o problema, tornando-o mais explícito. E a pesquisa de ordem quantitativa permite o agrupamento dos dados levantados por meio de tabelas, analisando e quantificando as variáveis em estudo.

5.2 Local de estudo

O Mercado Central é uma feira livre bastante tradicional, localizado no centro da cidade de Campina Grande, possui um comércio bastante diversificado, contudo este estudo direcionou as observações e coletas para o setor de carnes frescas “verdes”, comercializadas em 14 estabelecimentos.

5.3 Aquisição das amostras e observações das condições higiênico-sanitárias

No período de Outubro a Dezembro de 2011 foram realizadas visitas quinzenais durante o período matutino no setor de carnes frescas da feira central da cidade de Campina Grande – PB, cumprindo no total 12 coletas de carne moída, provenientes dos variados estabelecimentos deste local foram selecionadas quatro para o presente estudo. No momento da aquisição observamos as condições higiênico-sanitárias do ambiente de comercialização de carnes frescas, principalmente a carne moída. Ressaltando aspectos referentes às condições de higiene dos estabelecimentos, o local de exposição da carne, sua forma de apresentação, a temperatura de armazenamento dos produtos expostos, os equipamentos, os utensílios, a higiene dos manipuladores e a estrutura do local.

Foram adquiridas amostras de carne (cerca de 500 gramas) nos estabelecimentos do Mercado Central de Campina Grande, acondicionadas em um recipiente isotérmico contendo gelo, para que fossem transportadas até o Laboratório Multidisciplinar da Universidade Federal de Campina Grande (CCBS/UFCG).

No laboratório, elegemos amostras de 50 gramas de carne que foram adicionadas a 100 ml de água destilada sendo homogeneizadas e diluídas durante 5 minutos em temperatura ambiente, posteriormente realizaram-se diluições decimais seriadas até 10^{-4} .

As mesmas foram empregadas em todas as análises microbiológicas, para inoculação nos meios de cultura específicos.

5.4 Isolamento de Bolores e Leveduras

O método para o isolamento de bolores e leveduras utilizou apenas três diluições (10^{+1} ; 10^{-1} ; 10^{-2}), inoculando 1 ml em duplicatas de placa de Petri, e empregando a técnica de *Pour Plate* com meio Ágar Sabouraud Dextrose a 2%, posteriormente as placas de Petri foram inoculadas e incubadas em temperaturas diferentes, parte em 37°C , e as outras foram mantidas em temperatura ambiente, executou-se uma observação diária das colônias de fungos que estavam se formando, e permaneceram até completar sete dias.

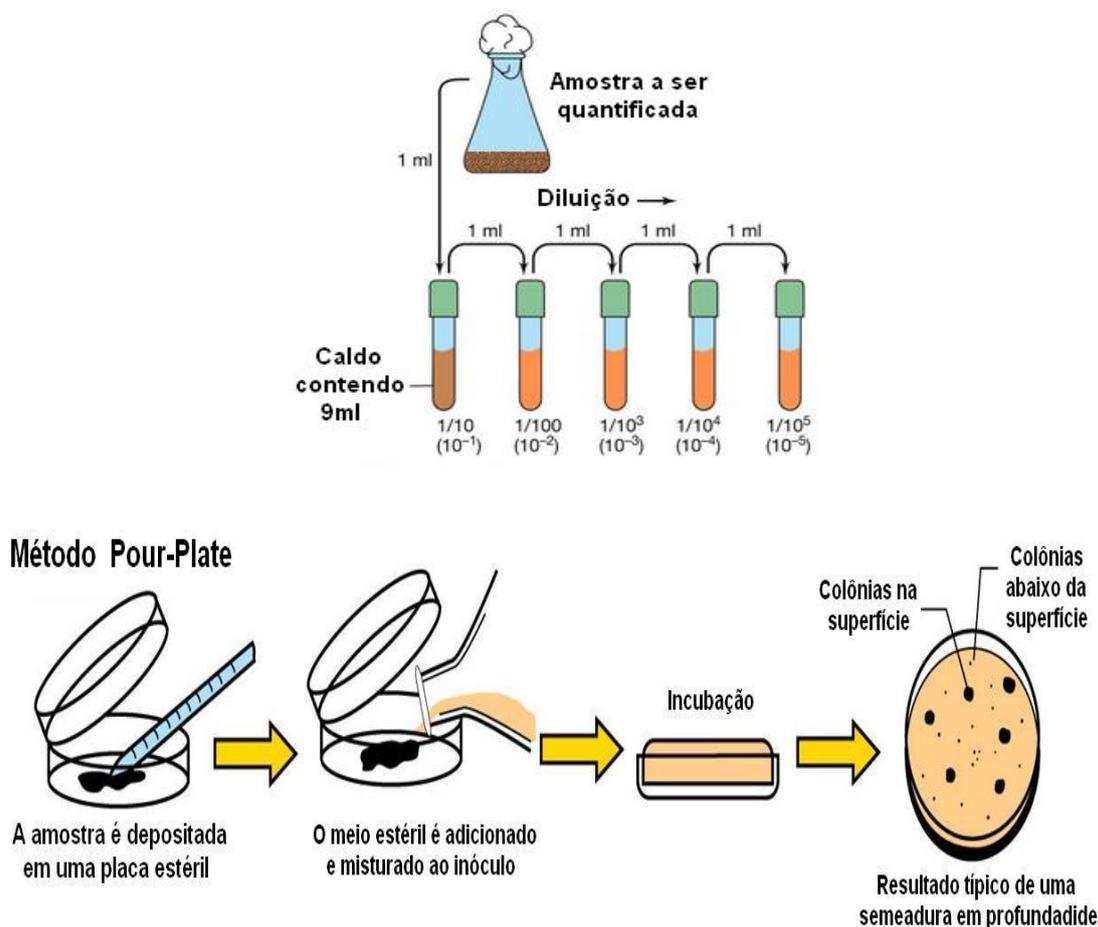


FIGURA 01 – Esquematização do método Pour-Plate.

Fonte: TORTORA et. al., 2000.

5.5 Identificação

Foi realizada através da leitura das placas inoculadas analisando as características macroscópicas, visto que a macrocolônia permite avaliar a velocidade do crescimento do fungo, assim observando a morfologia da colônia, as bordas, a textura, a coloração do verso e do reverso, formação ou não de pigmentos difusos no meio do cultivo, o aspecto brilhoso ou opaco, presença ou ausência de odores bem como as semelhanças entre as diluições. Complementando essa visualização, produzimos lâminas para uma observação microscópica, transferindo uma pequena quantidade do material de cada colônia presente nas placas de Petri, para uma pequena quantidade de água destilada presente no centro da lâmina, inoculando com uma alça de platina, e colocando com cuidado uma lamínula sobre o preparado e pressionando levemente. As lâminas foram etiquetadas e observadas em microscópio para verificação das estruturas presentes. Em seguida, procedemos o isolamento dessas colônias com o meio Ágar Sabouraud Dextrose inclinado em tubos para posterior identificação.

5.5.1 Auxonograma

A assimilação de carboidratos é a capacidade que os fungos têm de crescer em meios que oferecem certos carboidratos como a única fonte de energia. O procedimento consiste em fontes de Carbono e Nitrogênio, distribuídas em duplicatas de tubos de ensaio contendo 5 ml, esterilizados a 121°C por 15 minutos, sendo empregadas as seguintes fontes de carbono: glicose, lactose, sacarose, frutose e dextrose; bem como a fonte de nitrogênio: peptona (LACAZ et al,1998) . As amostras fúngicas anteriormente isoladas foram inoculadas nos tubos de ensaios contendo as fontes de carbono e nitrogênio, e permaneceram na estufa a 25°C por um período de cinco dias, e desempenhado uma análise a cada 24 horas, observando os seguintes aspectos: turbidez, biofilme, aerobiose, precipitação e produção de gás.

5.5.2 Crescimento Radial

Após a assimilação das fontes de energia, dentre os tubos de ensaio duplicados, foram selecionados os que apresentaram um melhor desenvolvimento, sendo estes inoculados em para placas de Petri, para observar o crescimento radial dos fungos, deste modo foram selecionados os fungos filamentosos, visto que este crescimento favorece uma melhor visualização das estruturas características, que auxiliam na diferenciação entre bolores e leveduras.

5.5.3 Conservação das cepas

Os fungos filamentosos foram conservados através de repiques, em tubos de ensaio contendo Ágar Sabouraud Dextrose inclinado. Após a incubação por até 72h em estufa a 25°C, as culturas foram mantidas sob refrigeração em geladeira a uma temperatura de 4°C a 8°C, para diminuir o metabolismo celular, até a próxima utilização.

5.5.4 Microcultivo em Lâmina

Para um estudo micromorfológico, os fungos filamentosos foram semeados em meio Ágar Fubá Tween 80. Observando características, como a formação de hifas septadas ou não septadas, a disposição de esporos, tendo a intenção de visualizar estruturas morfológicas do microrganismo, assim sendo importante para uma possível identificação do gênero. Portanto, cada amostra foi semeada com o auxílio de uma alça de platina coletando uma pequena parte da colônia isolada anteriormente, e transferindo para uma pequena quantidade, aproximadamente 1 ml de Ágar Fubá disposta na lâmina e cobertas com lamínulas, matérias organizados em placas, e posteriormente incubadas a 25°C, durante 72 a 96 horas. Advertindo, que os esporos dos fungos filamentosos são de fácil disseminação, são necessários cuidados nos procedimentos realizados, isto é, condições de assepsia e áreas de trabalho foram limpas com etanol a 70% antes de efetuar qualquer procedimento, utensílios de vidro foram mergulhados no álcool a 70%. Bem como, as placas foram seladas com parafilme, em seguida, foram realizadas leituras no microscópio óptico, realizadas quando completou 96 horas com objetivas de aumento de 40x.

1. Placa de Petri;
2. Lâmina;
3. Lamínula;
4. Tubo em U;
5. Papel filtro;
6. Bloco de Ágar;

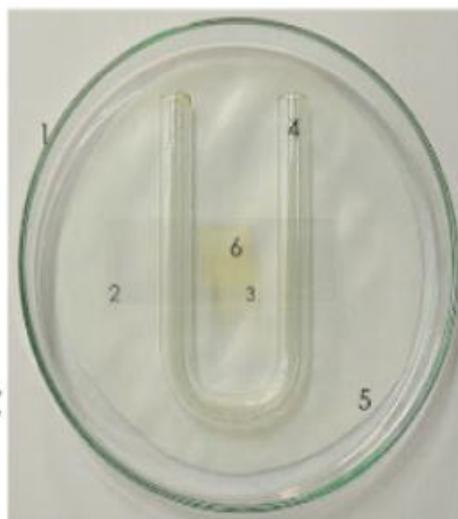


FIGURA 02 – Esquematização do microcultivo em lâmina.
Fonte: Jonh Alves. Disponível em: www.micologiaemfoco.com

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Condições Higiênicas do ambiente de comercialização de carne moída

Durante as coletas das amostras de carne moída no Mercado Central, observamos que os produtos eram expostos em ganchos de aço (ferro), e sobre os balcões, estruturas que não recebem nenhum tipo de esterilização e higienização adequada, bem como essas carnes permaneciam em temperatura ambiente. As Figuras 03 e 04 mostram a forma de exposição das carnes frescas. Segundo Ordoñez (2005), as carnes frescas devem ser mantidas em temperaturas baixas de refrigeração, bem como em todos os processos destinados a esse produto, ou seja, desde o processamento de abate até a exposição para a venda ao consumidor, uma vez que, a carne fresca é um alimento altamente perecível, sua refrigeração oferece vantagens em proporcionar máximo prolongamento de conservação, mínima modificação das características sensoriais e do valor nutritivo e ausência de ações nocivas para a saúde.



Figura 03: Carnes frescas expostas nos estabelecimentos do Mercado Central.



Figura 04: Comercialização de carnes frescas no Mercado Central.

A carne moída tem sua vida de prateleira reduzida, devido à difusão por toda massa, da população microbiana da superfície. Nas carnes picadas, as alterações de cor constituem o primeiro indício de alteração, seguidas pelas modificações de odor e sabor. As medidas indicadas para se ter um aumento da vida útil das carnes picadas é a aplicação de temperaturas mais baixas de refrigeração (ROÇA, 2008a).

Os alimentos comercializados em feiras livres podem ser contaminados através de vários fatores, dentre esses, as más condições de infraestrutura do local, as quais foram observadas no Mercado Central de Campina Grande, uma vez que os estabelecimentos não têm ponto de abastecimento de água potável considerada segura sanitariamente para higienização dos manipuladores e equipamentos, assim os comerciantes costumam limpar suas mãos em panos umedecidos e relativamente sujos. Em alguns boxes, observamos que alguns moedores apresentavam ferrugem, as facas para corte de carnes estavam frequentemente sujas, esporadicamente eram limpas, e esta limpeza era praticada sempre com um pano umedecido, que atendia as necessidades dos manipuladores em enxugar as mãos e limpar a balança utilizada para pesar as carnes vendidas.

O ambiente apresentava características para uma forte contaminação dos alimentos comercializados naquele setor, visto que observamos o acúmulo de lixo e poeira que provoca infestações de pragas como moscas, mosquitos, baratas e ratos, como também foram encontrados animais como, gatos e cachorros. É de conhecimento popular que os alimentos são carreadores de contaminação, podendo receber influências de forma direta ou indireta através de vias de eliminação do homem e de animais; ou através de vetores, levando contaminação do lixo ou do ambiente contaminado ou ainda, estes alimentos podem receber uma contaminação procedente do solo (terra), água e ar. Vetores mecânicos como insetos podem contaminar diretamente os alimentos quando pousam sobre os mesmos, com suas patas contaminadas com microrganismos patogênicos ou parasitas ou por meio das suas fezes, urina, pêlos e saliva (SILVA Jr, 2007).

Consequentemente, este ambiente de comercialização necessita de melhores e maiores cuidados higiênicos para assim evitar as fontes de contaminação dos alimentos e minimizar os riscos a saúde do consumidor. Considerando que o comércio em feiras livres tem uma característica bastante peculiar que é a negociação, dispondo ao consumidor um local mais acessível, e como os produtos são bem expostos, os consumidores possuem um costume bem tradicional de ter o hábito de colocar a mão nas mercadorias, como também os vendedores de forma espontânea enfatizam esse estilo de comercializar, manipulando os alimentos e o dinheiro ao mesmo tempo, sem o uso de luvas, de aventais, de máscaras, deste modo facilitando os veículos de contaminação e diminuindo os cuidados com a higiene dos produtos e do ambiente. A higiene alimentar é fundamental para garantir a qualidade dos produtos alimentícios,

desta forma é indispensável inserir condições higiênicas em todas as operações relacionadas à manipulação de qualquer gênero alimentício, requerendo procedimentos apropriados no campo, na transformação, na distribuição e no consumo (HOBBS e ROBERTS, 1999).

6.2 Isolamento de Bolores e Leveduras

O procedimento aplicado para o isolamento dos bolores e leveduras através das coletas de carne moída resultou em 24 amostras, destas 15 sendo representadas através de leveduras, e 6 com a presença das duas morfologias, ou seja, colônias filamentosas e leveduriformes, e 4 não apresentaram um crescimento muito favorável. Os fungos semelhantes às leveduras ou, aos filamentosos foram classificados através de suas características macro e micromorfológicas.

6.2.1 Auxonograma

Características auxiliares para a identificação dos fungos foram às observações do crescimento, ou seja, o aumento do número de células fúngicas em meio completo que contenha um determinado composto como única fonte de carbono ou nitrogênio, apresentadas na Figura 05.

Figura 05 – Características da assimilação dos carboidratos e nitrogênio.

Identificação da Cepa	Zimograma	Auxanograma dos Carboidratos				Auxanograma dos Compostos N	Outras Propriedades
	Glicose	Lactose	Sacarose	Frutose	Dextrose	Peptona	Temperatura ótima
Amostra 01	+	+	+	+	+	+	23°C-25°C
Amostra 02	-	+	+	+	+*	+	23°C-25°C
Amostra 03	+	+	+	+	+	+	23°C-25°C
Amostra 04	-	+	+	+	+	+	23°C-25°C
Amostra 05	-	+	-	+	-	+	23°C-25°C
Amostra 06	-	-	+ *	+ *	-	+	23°C-25°C
Amostra 07	+	+	+	+	+ *	+	23°C-25°C

Amostra 08	+	+	+	+ *	+ *	+	23°C-25°C
Amostra 09	+	+	-	-	-	+	23°C-25°C
Amostra 10	+	+	+	+ *	+	+	23°C-25°C
Amostra 11	+	+	-	+	-	+	23°C-25°C
Amostra 12	-	+	+	+ *	+ *	+	23°C-25°C
Amostra 13	+	+	+	+ *	+ *	+	23°C-25°C
Amostra 14	-	+	-	+	+ *	+	23°C-25°C
Amostra 15	+ *	+ *	+ *	+ *	+ *	+	23°C-25°C
Amostra 16	+ *	+ *	+ *	+ *	+ *	+	23°C-25°C
Amostra 17	-	-	+	+ *	+	+	23°C-25°C
Amostra 18	+ *	+ *	+ *	+ *	-	+	23°C-25°C
Amostra 19	+ *	+ *	-	+ *	-	+	23°C-25°C
Amostra 20	+ *	+ *	+ *	+ *	+ *	+	23°C-25°C

*Amostras que o crescimento não foi uniforme em todo o tubo de ensaio.

A maioria dos fungos filamentosos isolados apresentaram-se estritamente aeróbio. Eles desenvolvem-se numa ampla faixa de temperatura, com um ótimo de 25° C, porém foi testado seu crescimento numa faixa entre 22° a 30° C, para a maioria das espécies, que também foi comprovada por Lacaz-Ruiz (2000) em seus estudos com mesmas cepas.

A glicose é uma fonte de carbono adequada para praticamente todos os bolores. O nitrogênio, sob a forma de sais de amônio ou de nitratos, pode servir de fonte de nitrogênio para algumas espécies; porém, todas as espécies podem utilizar substratos nitrogenados orgânicos. Com muita frequência, o nitrogênio orgânico é fornecido pelas peptonas do meio de cultura (LACAZ-RUIZ, 2000).

Os carboidratos como: glicose, lactose e dextrose foram melhores assimilados na maioria das amostras através de um crescimento leveduriforme, poucas amostras filamentosas apresentaram um crescimento considerado menos expressivo. Entretanto, sacarose e frutose proporcionaram um crescimento maior para os fungos filamentosos, denotando uma preferência metabólica por estes compostos, embora também houve crescimento leveduriforme (COLEN, 2006; PRADO, 2007; ANVISA, 2007).

6.2.2 Crescimento radial

Através do enriquecimento de carboidratos observamos que em 100 amostras, 65 apresentaram um crescimento exclusivo de leveduras, com colônias esbranquiçadas, beges, brancas, bem como mostrando aspectos consistente, cremoso, enrugado, com bordas lisas ou enrugadas- “*curly*”, e sendo opacas ou brilhosas; e 35 amostras apresentaram um crescimento filamentoso, e ainda algumas desenvolveram as duas morfologias fúngicas. Em seguida, foram isoladas e conservadas em tubos de ensaio com Ágar Sabouraud para posteriores estudos.

6.3 IDENTIFICAÇÃO

Conforme visualização das estruturas em microcultivo e macroscopicamente, identificamos os seguintes gêneros fúngicos:

- a) *Geotrichum* sp. – identificado de forma automatizada com vitek 2 Biomerieux[®], e apresentando colônias brancas em ágar-Sabouraud a 25°C, em um período de 72 horas. A macromorfologia mostrou um crescimento no centro da colônia bem evidente e consistente, apresentando um formato que permanece até as extremidades. O verso mostra uma textura aveludada e seca, no reverso nenhuma pigmentação. As bordas são difusas e hialinas. Características micromorfológicas foram pseudo-hifas e artroconídios cilíndricos.

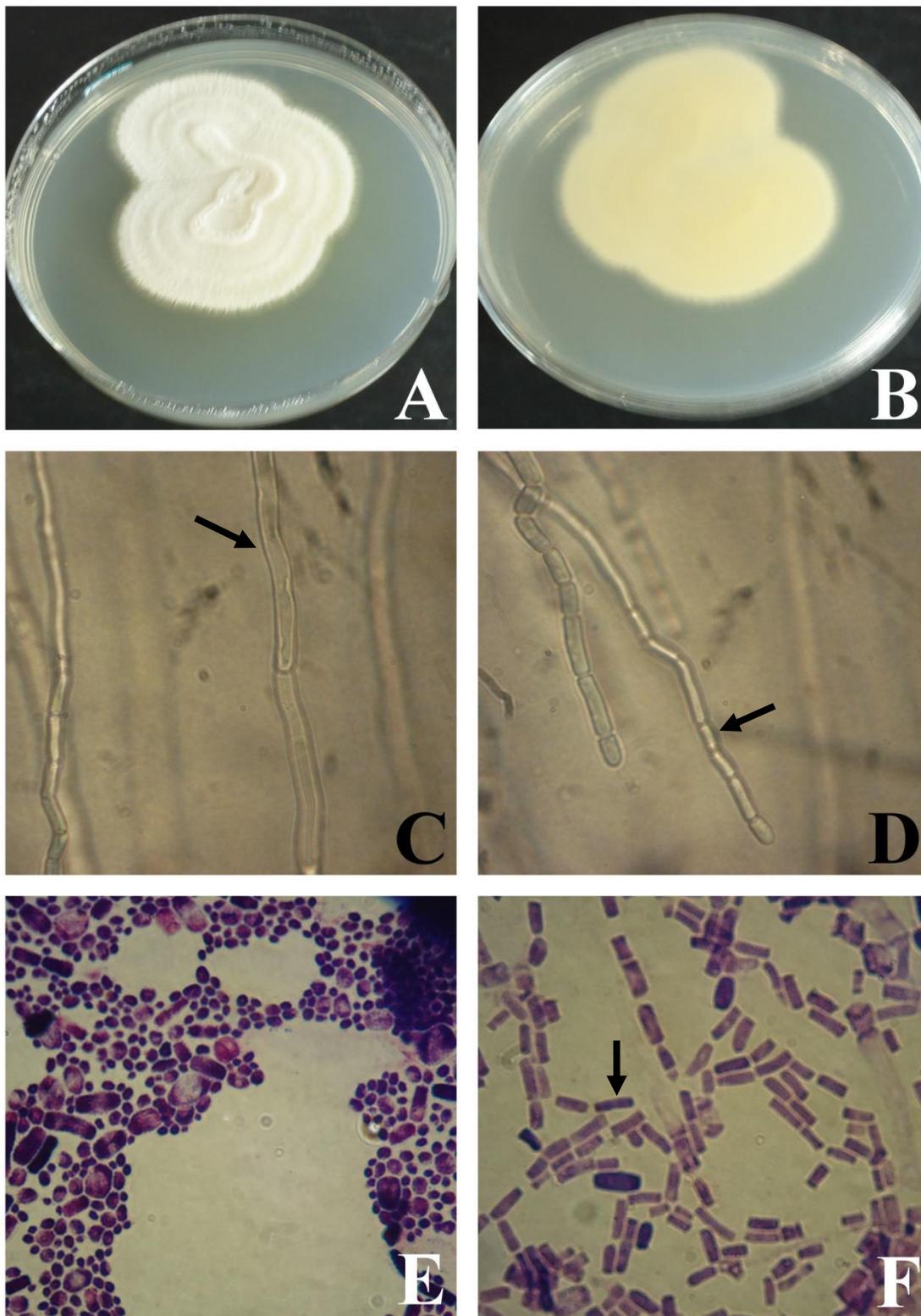


Figura 06 - *Geotrichum* sp. Colônia em meio ágar-Sabouraud a 25°C, em um período de 72 horas. **A)** Colônia branca, com bordas difusas e hialinas. **B)** Reverso sem nenhuma pigmentação. Cultivo em lâmina com ágar-fubá. **C)** Pseudo-hifas. **D)** Artroconídios. Coloração de Gram. **E e F)** Artroconídios.

b) *Cladosporium* sp. – apresentando colônia em meio ágar-Sabouraud a 25° C com um crescimento durante 72 horas. A macromorfologia tem uma coloração no verso oliváceo-preto e no reverso oliváceo-preto escuro, a superfície possui uma textura aveludada, com sulcos centrais. A micromorfologia mostrou hifas hialinas, septadas e ramificadas (Figura 07). Conidióforos micronematosos, retos ou encurvados, com ramificações restritas nas hifas terminais, podendo ter superfícies lisas ou verrugosas. As células conidiogênicas são agregadas, terminais, intercalares, bem discretas, e de formato cilíndrico. Cadeias de conídios produzidos diretamente no lado ou na extremidade da hifa, tendo formato oblongo a subglobosos ou elipsoidais (Figura 08). São encontrados 5 a 10 conídios por cadeia em geral, mas algumas podem chegar a possuir mais de 20 conídios. As diferentes espécies de *Cladosporium* são frequentemente contaminantes das culturas e mais raramente agentes de infecções de pele e unhas e, ainda mais raramente, queratites e infecções profundas.

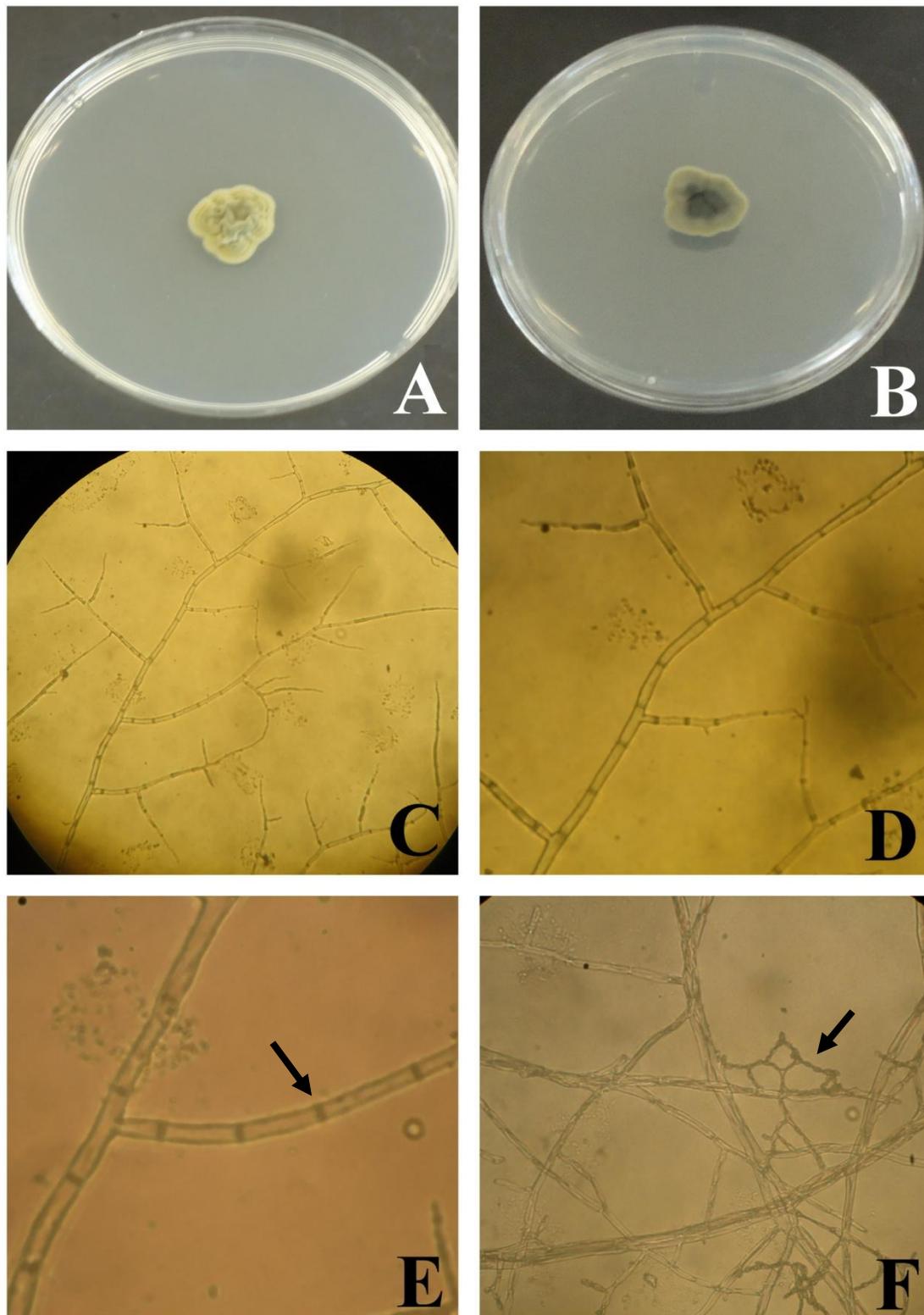


Figura 07 - *Cladosporium* sp. Colônia em meio ágar-Sabouraud a 25° C com um crescimento durante 72 horas. **A)** Colônia com verso oliváceo-preto, superfície com sulcos centrais com textura aveludada. **B)** Reverso oliváceo-preto escuro. Cultivo em lâmina com ágar-fubá. **C, D e E)** Hifas septadas. **F)** Hifas septadas, conidióforos micronematosos, cadeias de conídios elipsoides (400x).

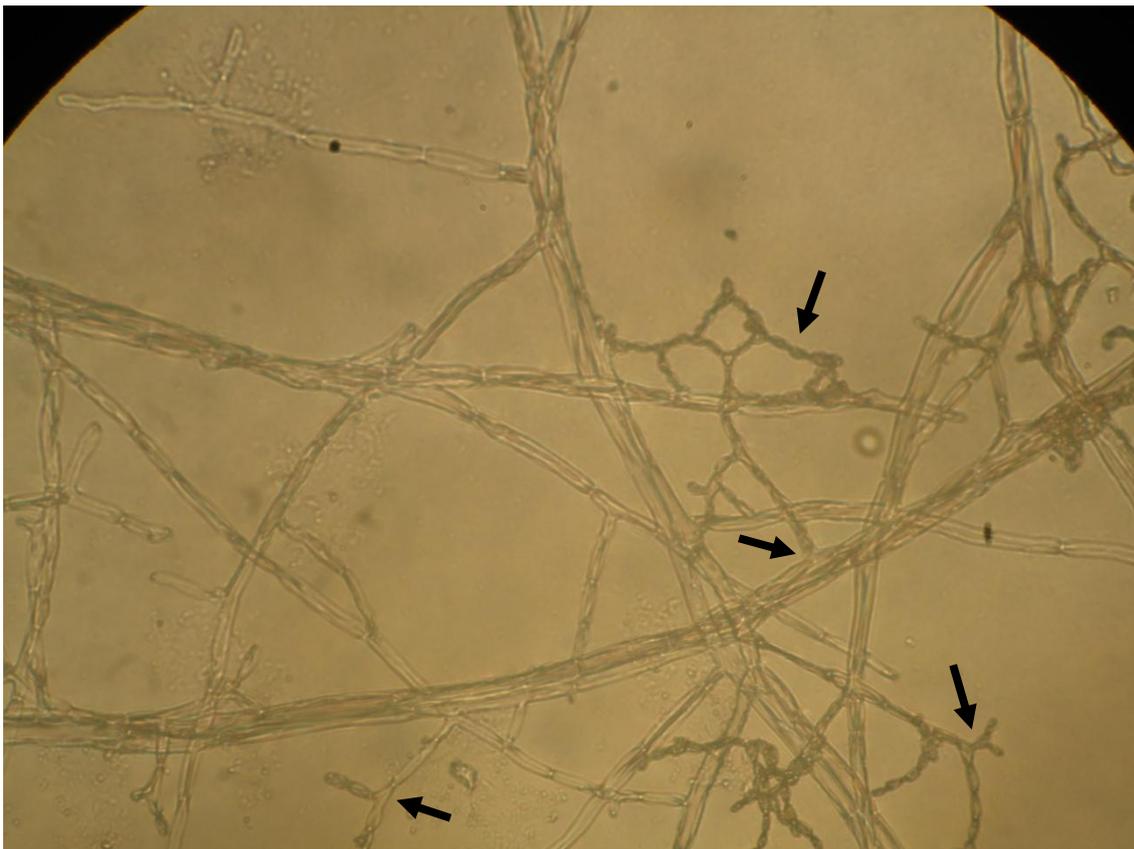


Figura 08 - *Cladosporium* sp. Cultivo em lâmina durante quatro dias. Conidióforos micronematosos, ramificações restritas nas hifas terminais. Células conidiogênicas são agregadas, terminais, intercalares. Cadeias de conídios elipsoidais produzidos diretamente no lado ou na extremidade da hifa.

c) *Aspergillus* sp. – apresentando colônia em meio ágar-Sabouraud a 25° C com um crescimento durante 72 horas. Na primeira amostra deste gênero a macromorfologia mostra uma coloração diferenciada, ou seja, a colônia tem uma pigmentação que varia desde o centro até as margens, com três cores: verde escuro (centro), verde com uma tonalidade mais clara (ao redor do centro da colônia), e em seguida uma coloração branca nas bordas. O crescimento no centro da colônia é volumoso e com pregas, e no reverso tem pregas com uma pigmentação amarelada bem evidente. As bordas brancas são limitadas. A textura é aveludada no verso, circundando a colônia tem metabólitos de coloração amarela. A micromorfologia mostrou hifas hialinas, septadas, ramificadas e multinucleadas (Figura 09). Na segunda amostra deste gênero, as características macroscópicas apresentam uma coloração amarelada (centro) e branca (extremidades). A superfície possui uma textura aveludada, e apenas no centro tem uma textura porosa, sendo a parte da colônia que tem a pigmentação amarela. O crescimento no centro da colônia é

volumoso e com pregas, e ainda no reverso tem uma pigmentação enegrecida e ao redor a presença de pregas. As extremidades têm pregas e bordas difusas. A micromorfologia mostrou hifas hialinas, septadas. Os conidióforos são dilatados na parte terminal, formando uma vesícula (cabeça grande), estando retos e macronematosos. Não foi possível visualizar as fiálides, entretanto, bem perceptível a disposição radial (Figura 10). Fungos do gênero *Aspergillus* são considerados importantes produtores de micotoxinas (NUNES, 2003), que são metabólitos tóxicos naturais e frequentemente encontrados em alimentos. Entre os tóxicos contaminantes de alimentos podemos destacar as aflatoxinas produzidas por espécies do gênero *Aspergillus*, as quais são altamente tóxicas e carcinogênicas para homens e animais (GRANADA, 2003; AMADO, 2012).

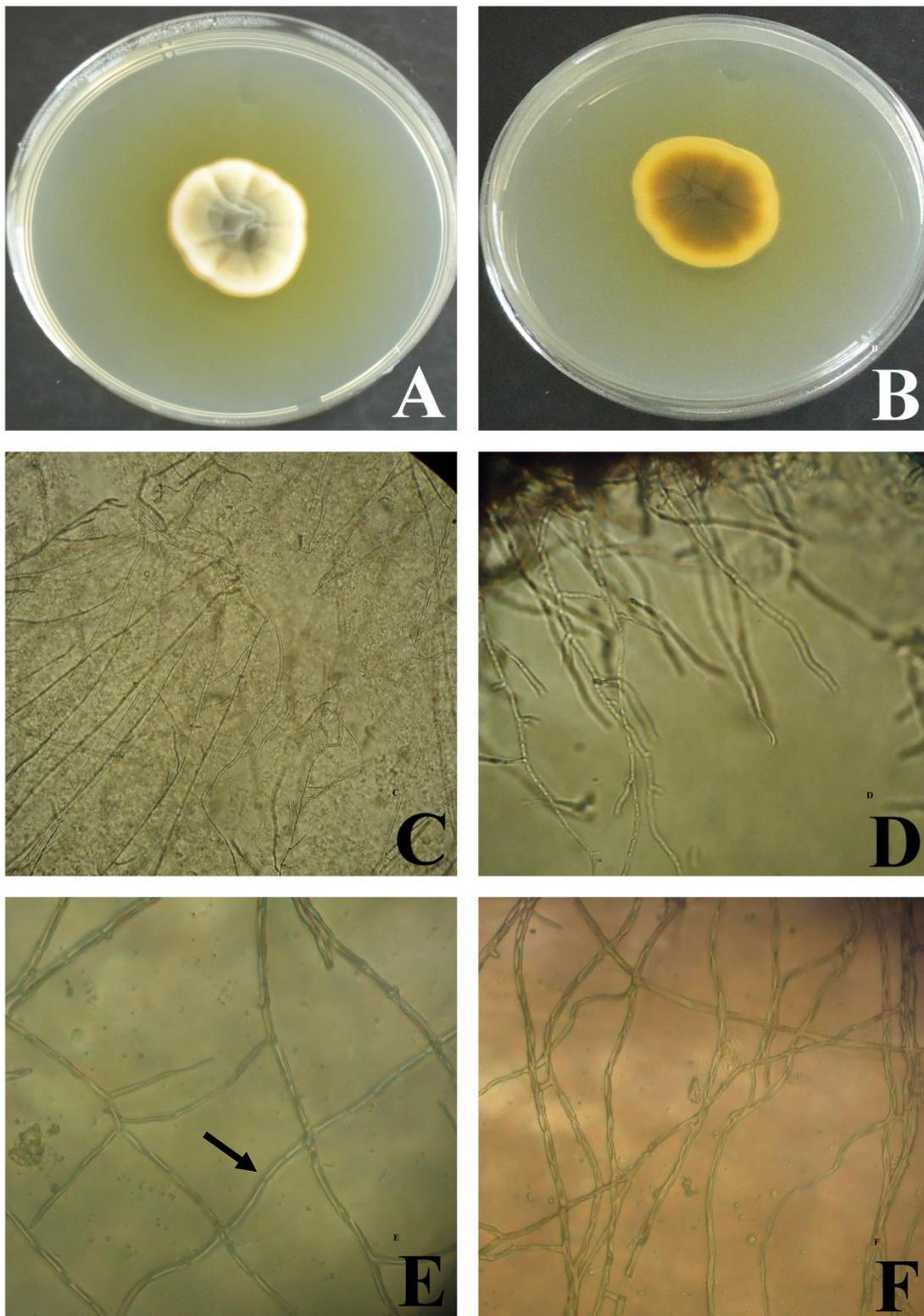


Figura 09 – *Aspergillus* sp. Colônia em meio ágar-Sabouraud a 25° C com um crescimento durante 72 horas. **A)** Colônia com o verso aveludado, verde escuro, verde claro e branco nas bordas, e com metabólitos de coloração amarela ao redor. **B)** O reverso com pregas e uma pigmentação amarelada. Cultivo em lâmina com ágar-fubá. **C e D)** Hifas hialinas. **E e F)** Hifas septadas.

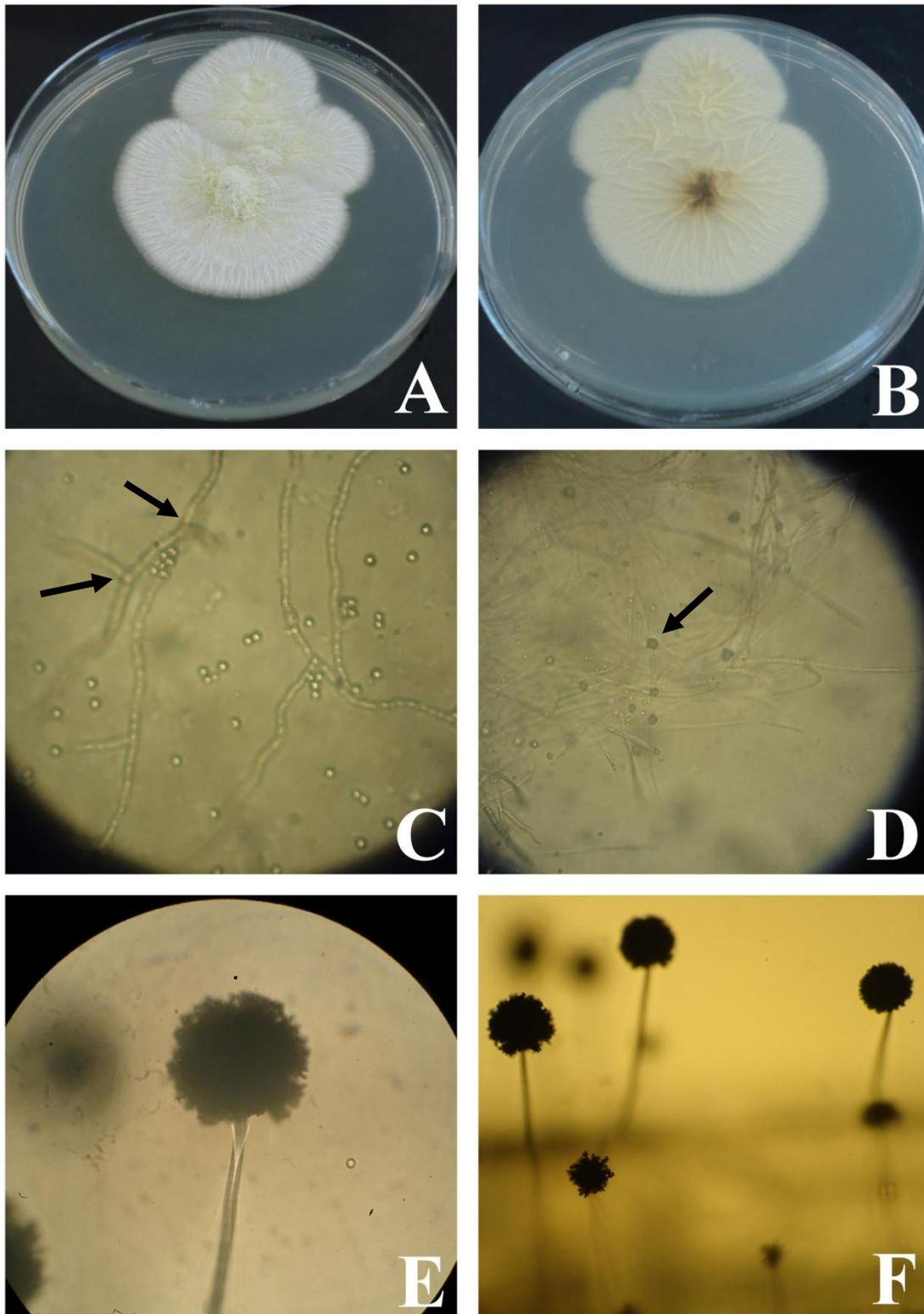


Figura 10 – *Aspergillus* sp. Colônia em meio ágar-Sabouraud a 25° C com um crescimento durante 72 horas. **A)** Colônia com coloração amarelada (centro) e branca (extremidades), superfície aveludada e com pregas, e apenas no centro uma textura porosa. **B)** O reverso tem uma pigmentação enegrecida e ao redor a presença de pregas. Cultivo em lâmina com ágar-fubá. **C)** Hifas hialinas, septadas. **D)** Hifas hialinas e conidióforos. **E** e **F)** Conidióforos dilatados na parte terminal, retos, e com uma disposição radial.

7 CONCLUSÕES

Os resultados sugerem a necessidade de aprimorar as condições higiênico-sanitárias do setor de carnes frescas do Mercado Central de Campina Grande - PB. Sendo indispensável um controle mais rigoroso na produção, no armazenamento e na distribuição do alimento, visto que esse estudo permitiu confirmar a presença de fungos toxigênicos na carne moída, tendo uma grande importância por ser um alimento protéico bastante consumido pela população. Bem como é um produto susceptível a deterioração devido a presença microbiana, postulando controle e fiscalização, para assim diminuir e/ou eliminar as possíveis contaminações através de fungos produtores de micotoxinas, que comprometem a qualidade dos alimentos, causando sérios problemas à saúde do consumidor.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARCA, M. L.; ACCENSI, F.; CANO, J.; CABAÑES, F. J. **Taxonomy and significance of black *Aspergillus***. Antonie van Leeuwenhoek. 2004.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C.; BLACKWE, L. L. M. **Introductory Mycology**. 4^a ed. New York: John Wiley e Sons, 869 p. 1996.

AMADO, M. A. **Métodos Imunológicos na Detecção e Determinação de Aflatoxinas em Alimentos**. Disponível em: <http://www.ipv.pt/millennium/Millennium26/26_21.htm>. Acesso em: set. 2012.

AMIN, I.; JINAP, S.; JAMILAH, B. Proteolytic Activity (Aspartic Endoproteinase and Carboxypeptidase) of Cocoa Bean during Fermentation. **Journal Scienc Food Agricultural**. v.76, p.123-128, 1998.

ANVISA. **Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Mod. VII. 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria n°368, de 04/09/1997. **Regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de elaboração para estabelecimentos elaboradores/industrializadores de alimentos**. Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil, Brasília, p.60. 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC n. 275, de 21 de outubro de 2002. **Dispõe sobre o regulamento técnico de procedimentos operacionais padronizados aplicados aos estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos e a lista de verificação das boas práticas de fabricação em estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos**. Diário Oficial [da] da República Federativa do Brasil, Brasília, 06 de novembro de 2002.

BARNETT, H. L. e BARRY, B. H. **Illustrated Genera of Imperfect Fungi**. 4^a edição. 1998.

COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentos produtores de lípases**. Belo Horizonte - MG. 2006.

DAINTY, R. H.; MACKEY, B. M. The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. **J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.**, v.73, n.2, p.103-114, 1992.

DESJARDINS, A.E.; MANANDHAR, G.; PLATTNER, R.D.. MARAGOS, C.M.; SHRESTHA, K.; MCCORMICK, S.P. Occurrence of Fusarium species and mycotoxins in Nepalese maize and wheat and the effect of traditional processing methods on mycotoxin levels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p. 1377-1383, 2000.

ENVIROTEST LAB. Disponível em: <http://www.envirotestlab.com/mold_test_inspection.html>. Acesso em: out. 2012.

FERNANDES, M. S. **Contaminação fúngica e a legislação vigente no Brasil e outros países.** Seminário Internacional da Atualização da Tecnologia do Processamento e Envase Asséptico de Produtos Derivados de Tomate. Anais. São Paulo, 1995.

FRAIZER, W. C.; WESTHOFF, D. C.; **Microbiologia de los alimentos.** 3. ed. Zaragoza: Acribia, 681p.1993.

FRANCO, B. D. G. de M. **Microbiologia dos Alimentos/** Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco, Mariza Landgraf/colaboradora Maria Teresa Destro/ - São Paulo: Editora Athene, 2008.

FRANCO, B. D. G.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos.** São Paulo: Atheneu, 2003.

GAMBALE W.; CROCE J.; COSTA-MANSO E.; CROCE M.; SALES M. Library fungi at the University of São Paulo and their relationship with respiratory allergy. **J Invest Allergol Clin Immunol.** 1993.

GALLO NETTO, C. Pesquisa mostra ação do alho e da sálvia na carne de frango. **Jornal da Unicamp,** Campinas, 11 a 17 de maio de 2009.

GALVAGNO, M. A.; FORCHIASSIN, F. **Fisiologia dos fungos: nutrição e metabolismo.** In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. (Orgs.). Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul, RS: EDUCS, p.125-169. 2004.

GARCIA-CRUZ, C. H.; HOFFMANN, F. L.; BUENO, S. M. Monitoramento microbiológico de lanches vendidos por ambulantes na parte central de São José do Rio Preto, SP. **Hig. Alim.,** v.11, n.75, p.48-51, 2000.

GENTE, S; DESMASURES, N; JACOPIN, C et. al. Microbiologia Alimentar. Junho, 2002.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos.** São Paulo: Varela, 2001. 629p.

GIL, A. C. **Como elaborar projetos de pesquisa.** 5ª ed. São Paulo: Atlas, 2010.

GODOY, P.; COLOMBO, A.L. **Biologia e relevância clínica do gênero *Fusarium* spp.** Prática Hospitalar, v.34, p. 136-140, 2004.

GONÇALVES, F. A. G. **Produção de lipase extracelular por leveduras em cultivo submerso.** Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2007.

GRANADA, G. et al. Caracterização de granolas comerciais. **Ciênc. Tecnol. Aliment.,** Campinas, v. 23, n. 1, p. 87-91, 2003.

HOBBS B. C.; ROBERTS, D. **Toxinfecções e controle higiênico sanitário de alimentos.** São Paulo: Livraria Varela; 1999.

JAMES, S. **The chill Chain “from carcass to consumer”.** Meat Sci., Chicago, v.43, n.1, p.203-216, 1996.

- JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**/ James M. Jay; trad. Eduardo Cesar Tondo, et. al. – 6.ed. – Porto Alegre: Artmed, 2005.
- LACAZ, C. da S., et al. **Guia para identificação: fungos, actinomicetos, algas de interesse médico**. São Paulo: Sarvier, 1998.
- LACAZ-RUIZ, R. **Manual Prático de Microbiologia Básica** – São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2000.
- LEITÃO, M. F. F. **Controle do desenvolvimento microbiano no processamento industrial da carne e produtos**. B. ITAL, Campinas, v. 21, p. 89-108, 1995.
- LESLIE, J.F.; ZELLER, K.A.; SUMMERELL, B.A. Icebergs and species in populations of *Fusarium*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.59, p. 107-117, 2001.
- LI, S, MARQUARDT RR, ABRAMSON D. Immunochemical detection of molds: a review. **J Food Prot.** 2000.
- MACDONALD, K.; SUN, D. Predictive food microbiology for the meat industry: a review. **Int. J. Food Microbiol.**, Copenhagen, v. 52, p. 1-27, 1999.
- MACHADO, A. P. da S. M. **Uso de técnicas de detecção rápidas de fungos filamentosos na água**. Departamento em Engenharia Biológica, Universidade do Minho – 2006.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. São Paulo: Pearson Education., v.1, p.466-467. 2004.
- MENEZES, E. A.; ALCANFOR, A. C.; CUNHA, F. C. Fungos anemófilos na sala de periódicos da biblioteca de ciências da saúde da Universidade Federal do Ceará. RBAC. 2006.
- MOY, G.; HAZZARD, A.; KÄFERSTEIN, F. Improving the safety of street-vended food. **World Health Stat. Q.**, v.1-2, n.50, p.124-131, 1997.
- NBUEGA, S. K.; KARURI, E. G. Preservation of beef using bacteriostatic chemicals and solar drying. **Food Nutr. Bull**, Boston, v.15, p.262-268,1994.
- NUNES, I. L. et al. Arroz comercializado na região sul do Brasil: aspectos micotoxicológicos e microscópicos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 190-194, 2003.
- OLIVEIRA, A. V. B. **Avaliação microbiológica de carnes de frangos de corte comercializadas em granjas produtoras no município de Patos – PB**. Pombal, 2010.
- OLIVEIRA, M. M. M. et al. **Condições Higiênico-Sanitárias de Máquinas de Moer Carne, Mãos de Manipuladores e Qualidade Microbiológica da Carne Moída**. Universidade Federal de Lavras – UFLA. Lavras – MG, 2008.
- ORDÓÑEZ, J. A. et al. **Tecnologia de alimentos**. v. 2, 294p.. Porto Alegre: Artmed, 2005.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD/ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis. Informe sobre el sistema de información regional para la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos. (SIRVEETA 1999 - 2000). Buenos Aires, 2001.

PENSEL, L. The future of red meat in human diets. **Nutr. Abstr. Rev.** (Serie A), Oxford, v. 68, p.1-4, 1998.

PINTO NETO, M. Embalagem da carne vermelha. **Rev. Nac. Carne**, n. 318. Ago. 2003.

PRADO, M. R. do. Isolamento de *Microsporium canis*, *Malassezia* spp. e *Candida tropicalis* em Cães: um Destaque para Teste de Sensibilidade de *Malassezia pachydermatis* in vitro / Marilena Ribeiro do Prado. – Fortaleza, 2007.

ROÇA, R. de O. **Refrigeração**. UNESP. Botucatu – SP, 2008a.

ROÇA, R. de O. **Microbiologia da Carne**. UNESP. Botucatu – SP, 2008b.

ROSSET, R. Otras carnes y productos cárnicos. In: BOURGEOIS, C.M.; MESCLE, J.F.; ZUCCA, J., org. Microbiología Alimentaria: aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria. Zaragoza: Acribia, p.247-261. 1994.

SANTOS, E. A.; OLIVEIRA, R. B.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; HAGLER, A. N. Yeasts associated with flowers and fruits from a Semi-arid Region of Northeastern Brazil. **Revist Microbiological**. v.27, n.1, p.33-40, 1996.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; SOLER, M. R. **Embalagens com atmosfera modificada/controlada**. In: ITAL. Novas tecnologias de acondicionamento de alimentos. São Paulo, 1983. **cap. 5, p. 104-140**.

SARCINELLI, M. F.; VENTURINI, K. S.; SILVA, L. C. da. Características da Carne Bovina. Universidade Federal do Espírito Santo – UFES. Espírito Santo, Ago, 2007.

SAUCIER, L. Meat safety: challenges for the future. **Nutr. Abstr. Rev.** (Série A), Oxford, v. 69, p.705-708, 1999.

SILVA Jr, E. A. da. Manual de controle higiênico-sanitário em serviços de alimentação. 6ª ed, São Paulo: Varela, 2007.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. 295p. São Paulo: Varela, 1997.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. S. A. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. 295p. São Paulo: Varela, 2002. 295p.

SOUZA, C. A. Aspergilose e Candidíase Pulmonar em pacientes imunocomprometidos: estudo comparativo dos achados de Tomografia Computadorizada de Alta Resolução - Rio de Janeiro: UFRJ / Faculdade de Medicina, 2006.

SPLITTSTOESSER, D. F. **Fungi of importance in processed fruits.** In: ARORA, D. K.; MUKERJI, K. G.; MARTH, E. H. (Eds.) **Handbook of Applied Mycology - Foods and Feeds.** New York: Marcel Dekker Inc. v. 3, Cap. 7, p. 201-219, 1991.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R. CASE, C. L. *Microbiologia: 6^a Ed.,* Porto Alegre: Artmed, 827p, 2000.

VALERO, A.; OLIVÁN, A.; MARÍN, S.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J. Effect of intra and interspecific interaction on OTA production by A. section Nigri in grapes during dehydration. **Food Microbiol.** 2007.

VELD, J. H. J. H. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. **Int. J. Food Microbiol.,** v.33, p.1-18, 1996.

ZAITZ, C. et al., **Compêndio de Micologia Médica.** 2. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

ZEMANKOVA, M. L. A. Fusarium species, their taxonomy, variability and significance in plant pathology. **Review. Plant Protection Science UZPI,** v.37, p.25-42, 2001.