

CONTAGEM DE FUNGOS FILAMENTOSOS E LEVEDURAS EM CAMARÕES SALGADOS SECOS COMERCIALIZADOS EM TERESINA-PI

[Counts of filamentous fungi and yeasts in dry salted shrimps marketed in Teresina-PI]

Antônio William Barbosa de Sousa²; Francisco das Chagas Cardoso Filho³; Amilton Paulo Raposo Costa¹; Rosana Martins Carneiro⁴; Isabel de Oliveira Paixão²; Maria Christina Sanches Muratori^{3*}

¹ Médicos veterinários. Departamento de Morfofisiologia Veterinária, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil.

² Médicos Veterinários, autônomos, Teresina, PI, Brasil

³ Médico veterinário. Doutorandos do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil.

⁴ Nutricionista-Departamento de Nutrição, Universidade Federal do Piauí

RESUMO - O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade de água (Aw) e realizar a contagem de fungos e leveduras de camarão salgado-seco comercializado em um mercado público da Cidade de Teresina, PI, comparando as técnicas de inoculação da amostra (*spread plate* e *pour plate*). Foram coletadas 22 amostras de camarões (11 com exoesqueleto e 11 sem exoesqueleto) salgados-secos pela manhã de abril a junho de 2010, em seis semanas alternadas. As amostras de camarão apresentaram contaminação fúngica, em quantidades semelhantes. A técnica *spread plate* demonstrou ser melhor que a *pour plate* para contagens de fungos. Os camarões salgados-secos com exoesqueleto apresentaram maiores índices de atividade de água do que os sem exoesqueleto. Os camarões salgados-secos comercializados em Teresina-PI possuem condições higiênicas insatisfatórias. O método *spread plate* foi mais eficiente que o método *pour plate* para contagens de fungos filamentosos e de leveduras em camarões salgados-secos.

Palavras-chave: fungos, *spread plate*, *pour plate*

SUMMARY - This study aimed to assess the water activity (Wa) and perform a count of fungi and yeasts of dry-salted shrimp sold in a public market in the city of Teresina, PI, comparing the techniques of inoculation of the sample (*spread plate* and *pour plate*). We collected 22 samples of shrimp (11 with and 11 without exoskeleton) dry-salted in the morning from April to June 2010, during six alternate weeks. There were variations between the techniques *spread plate* and *pour plate* and between the water activity of the shrimp with and without exoskeleton for the count of filamentous fungi and yeasts. Samples of both with shrimp exoskeleton and without exoskeleton showed no fungal contamination in similar amounts. The salted-dried shrimp with exoskeleton had higher levels of water activity than those without exoskeleton. The salted-dried shrimp sold in Teresina have unsatisfactory hygienic conditions. The *spread plate* method is more efficient than the *pour plate* method for counting of filamentous fungi and yeasts in salted-dried shrimp.

Keywords: fungi, *spread plate*, *pour plate*

*

Autor para correspondência. E-mail: chrismuratori@uol.com.br

INTRODUÇÃO

Em várias regiões do mundo, o pescado faz parte da dieta alimentar e para alguns países, caracteriza-se como a principal fonte de proteínas de origem animal (Huss, 1997). Neste contexto, os camarões marinhos são cultivados comercialmente para atender a demanda de mercado. No Brasil, a carcinicultura se expandiu rapidamente, em menos de oito anos, o país já ocupa uma posição de destaque no *ranking* mundial dos produtores de camarão (Carvalho, 2005). Consequentemente, o consumo de camarão no país está aumentando, em 2007 foram consumidos 380 g *per capita*, aproximadamente 50% a mais do que em 2006. Estes resultados são explicados, em parte, pela melhoria econômica dos brasileiros e também pela redução da exportação do camarão cultivado. Atualmente, a maioria da produção da carcinicultura é destinada ao mercado interno, oferecida aos consumidores com preços competitivos em relação às demais fontes de proteínas animal (Carvalho, 2008).

Para garantir segurança ao consumidor, os alimentos devem satisfazer às exigências de qualidade relativas ao valor nutricional, aos aspectos sensoriais e a produção em condições de higiene e sanidade adequadas (Figueiredo et al., 2007).

A avaliação microbiológica de um alimento pode ser conduzida para investigar a presença ou ausência de um micro-organismo, quantificação, identificação e caracterização das diferentes espécies microbianas. Também é um parâmetro importante para se conhecerem as condições de higiene nas quais o alimento foi processado, visando determinar os perigos e riscos que podem oferecer à saúde do consumidor (Franco & Landgraf, 2008).

O ambiente pode conter muitas espécies de fungos, bactérias, vírus entre outros micro-organismos, sendo os dois primeiros os mais importantes na deterioração de alimentos quando ocorrem contaminações (Melo, 2000). Dentre possíveis contaminações microbiológicas, devem-se considerar os problemas causados pelo desenvolvimento de fungos nos alimentos e suas matérias-primas, não apenas pelo fato de reduzir consideravelmente os valores nutritivos do produto, mas também pelas micotoxinas que se encontram presentes uma vez que haja a contaminação fúngica (Robb, 1993). Hoje os fungos vêm sendo investigados numa diversidade muito grande de alimentos, não só nos destinados à alimentação humana, como também na alimentação animal (Pereira et al., 2002; Nunes, 2009; Cardoso Filho et al., 2011; Cardoso Filho, 2011)

Os conídios dos fungos filamentosos são abundantes e amplamente encontrados na natureza, crescem rapidamente no solo, em plantas, em alimentos, em papel e vidros. De um modo geral, a umidade presente no ambiente e as condições de estocagem favorecem a proliferação dos fungos em alimentos (Fonseca, 2000).

Na maioria dos países, a legislação sobre alimentos proíbe a venda de produtos contaminados por substâncias venenosas ou nocivas. Entretanto, poucos dispõem de regulamentos estabelecendo os limites admissíveis de fungos causadores de micotoxicidade nos alimentos (Martins & Martins, 2001).

Atualmente, pouca atenção vem sendo dada quanto à presença de fungos filamentosos e leveduras em alimentos. Não existe padronização qualitativa e nem quantitativa para estes micro-organismos, tanto a nível nacional quanto internacional (Sartoli & Montanari, 2005), o que, de certa forma, prejudica a qualidade dos alimentos conforme ressalta Siqueira (1995).

Em Teresina, os camarões podem ser vendidos sob a apresentação de salgados-secos, que são aqueles processados artesanalmente por comunidades dos Estados do Piauí e do Maranhão. Embora esses sejam comercializados salgados-secos os tornando menos propícios para o desenvolvimento de micro-organismos, as condições em que eles são colocados a venda favorecem esse desenvolvimento, pois ficam expostos ao ambiente. Muitos dos micro-organismos encontrados em alimentos são capazes de provocar enfermidades transmitidas por alimentos para o homem (Motta et al., 2000).

A contagem elevada e a verificação de fungos filamentosos e leveduras viáveis nos alimentos podem fornecer várias informações, tais como manipulação inadequada, matéria-prima, equipamentos; processamento e/ou estocagem em condições higiênicas indesejáveis que possam causar contaminação excessiva (Siqueira, 1995). Para quantificação de micro-organismos em alimentos existem técnicas de plaqueamento profundo (*pour plate*) e plaqueamento superficial (*spread plate*) (Menezes, 2008), sendo necessário avaliar sua eficiência para isolamento de fungos em camarões.

Pelo contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade de água (Aw) e verificar as contagens de fungos e leveduras de camarões salgados-secos comercializados em mercado público da Cidade de Teresina, PI.

MATERIAL E MÉTODOS

Em Teresina, PI existem 16 mercados públicos que comercializam camarão salgado-seco. Destes, o Mercado Central foi escolhido para amostragem de camarões salgados-secos pela disponibilidade e constância da oferta deste produto. Em todas as coletas foram verificadas as condições de venda dos produtos, sendo realizada uma avaliação subjetiva da higiene do ambiente. Foram coletadas 22 amostras de camarões (11 com exoesqueleto e 11 sem exoesqueleto) salgados-secos pela manhã, de abril a junho de 2010, em seis semanas alternadas. Em cada coleta foram adquiridas duas amostras de camarões com exoesqueleto e duas sem exoesqueleto, com aproximadamente 100g cada. Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos individuais de primeiro uso para serem transportadas, em caixas isotérmicas com gelo reciclável até o Laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos do Núcleo de Estudos Pesquisa e Processamento de Alimentos, pertencente ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí.

A atividade de água (A_w) foi definida por um determinador de A_w modelo Decagon Pawkit digital previamente calibrado, seguindo as recomendações do fabricante. Após isso, foram realizadas contagens de fungos filamentosos e leveduras conforme método recomendado por Silva et al. (2010). De cada amostra foram retiradas porções de 25g assepticamente que foram transferidas para um frasco, contendo 225 mL de água peptonada a 0,1%, formando a diluição 10^{-1} , e a partir desta foi retirada uma alíquota de 1,0 mL para adicionar em 9,0 mL de solução salina formando a diluição de 10^{-2} e assim sucessivamente até a diluição de 10^{-3} .

Para contagem, foram utilizadas as técnicas de plaqueamento em profundidade (*pour plate*) e em superfície (*spread plate*). Para a técnica de *pour plate* inoculou-se 1,0 mL de cada diluição selecionada (10^{-1} a 10^{-3}) em placas de Petri em duplicata, após adicionou-se 12 a 15 mL do agar DRBC. Para a técnica de *spread plate* foram inoculados 0,1 mL de cada diluição na superfície de placas de Petri previamente preparadas com Agar Dicloran Rosa de

Bengala, em seguida espalhou-se o inóculo pela superfície, com uma alça de Drigalski, até que o excesso do líquido fosse absorvido. Aguardou-se a completa solidificação do meio de cultura, inverteu-se as placas que foram incubadas a 25°C em estufa do tipo BOD por sete dias.

Para a contagem dos fungos filamentosos e leveduras foi utilizado um contador de colônias do tipo Quebec. Para análise, os resultados foram transformados em números logarítmicos da base 10, em seguida realizou-se a análise de variância pelo método do Holm-Sidak, com significância $P < 0,05$, utilizando o pacote estatístico Sigma Stat, 3,5 versão 2006.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os camarões pesquisados eram vendidos a granel em sacos de rafia exposto às precárias condições higiênicas do ambiente (umidade, temperatura, poeira, insetos, aves e animais domésticos) e os consumidores podiam manipular aos alimentos sem limitações.

Após análise dos camarões pode-se observar que houve variação ($P < 0,05$) entre as técnicas *spread plate* e *pour plate* para contagem dos fungos filamentosos e leveduras (Tabela 1). Este resultado indica que a utilização do método *spread plate* favoreceu o isolamento de maiores quantidades de colônias fúngicas em camarões salgados e secos do que o *pour plate*. Frank e Yousef (2004) também preferiram o método *spread plate* para a contagem total de fungos filamentosos e leveduras em alimentos. Vieira (2002) argumenta que a escolha da técnica para estudar a população microbiana deve permitir o desenvolvimento de todas as unidades viáveis, possibilitando a determinação quantitativa com maior exatidão dos micro-organismos, sendo assim, Menezes (2008) recomendam que é importante considerar o método de contagem adotado para cada micro-organismo. Embora não tenha sido a proposta deste trabalho, o método *spread plate* favoreceu a evidenciação e a recuperação das colônias dos fungos e das leveduras em testes posteriores, portanto, mostrou-se como o método mais adequado para a contagem de fungos filamentosos em camarões salgados-secos.

Tabela 1- Média das Contagens de fungos filamentosos e de leveduras e a atividade de água em camarões salgados-secos com e sem exoesqueleto, comparando com as metodologias *spread plate* e *pour plate*

| | Com exoesqueleto UFC/g em log ₁₀ | Sem exoesqueleto UFC/g em log ₁₀ |
|---------------------|--|--|
| <i>Spread plate</i> | 4,09a ± 0,46 | 3,88a ± 0,37 |
| <i>Pour plate</i> | 3,62b ± 0,34 | 3,39b ± 0,30 |
| Aa | 0,76a ± 0,03 | 0,72b ± 0,03 |

UFC/g em log₁₀= unidades formadoras de colônias por grama em números logaritmos a, b= letras semelhantes resultados iguais na mesma coluna ou linha (P<0,05).

Apesar da retirada do exoesqueleto favorecer maior manipulação, as amostras de camarões apresentaram contagens fúngicas semelhantes (P>0,05) em ambos os métodos utilizados (Tabela 1). Isso ocorreu provavelmente porque os camarões eram processados em condições semelhantes e expostos à venda nas mesmas condições de comercialização.

Pode-se observar que os camarões com exoesqueleto apresentaram atividade de água (Tabela 1) superior, quando comparados aos camarões sem exoesqueleto. Esta estrutura impermeável, que é composta por quitina, confere proteção e sustentação da musculatura dos camarões e, portanto, a retirada do exoesqueleto favorece a maior exposição dos tecidos ao ambiente com consequente desidratação e redução da atividade de água. Franco & Landgraf (2008) informam que valores de atividade de água a 0,65 são limitantes para desenvolvimento de fungos e que 0,60 inibe completamente a multiplicação microbiana. Portanto, os valores obtidos nas amostras de camarões salgados e secos que oscilaram entre 0,72 a

0,76 podem favorecer a multiplicação de fungos filamentosos e leveduras.

A legislação vigente (Brasil, 2001) só estabelece padrões para fungos filamentosos e leveduras para alguns alimentos. Os camarões salgados-secos não estão incluídos nestes alimentos, embora possuam condições de umidade que favoreçam o desenvolvimento. Por similaridade de condições de osmolaridade, foram utilizados os padrões para doces em pasta ou massa (máximo 4,00 UFC/g em log₁₀) para comparação com os resultados obtidos. Deste modo, pode-se observar na Tabela 2 que 90,9% das amostras isoladas pelo método *spread plate* apresentaram valores acima de 4,00 UFC/g em log₁₀, indicando que as amostras apresentavam condições higiênicas insatisfatórias, porém no método *pour plate*, apenas 9,1% apresentavam tais condições. Estes resultados reforçam a superioridade de isolamento do método *spread plate*, que foi capaz de detectar contagens superiores em uma curva de log.

Tabela 2 Total de amostras de camarões salgado e seco que apresentaram valores acima de 4,00 em UFC/g em log₁₀, conforme o método *spread plate* ou *pour plate*

| | Com exoesqueleto UFC/g em log ₁₀ n (%) | Sem exoesqueleto UFC/g em log ₁₀ n (%) | Total |
|---------------------|---|---|------------|
| <i>Spread plate</i> | 6 (54,5) | 4 (36,4) | 10 (90,9) |
| <i>Pour plate</i> | 1 (9,1) | 0 (0,0) | 1 (9,1) |
| Total | 7 (63,6) | 4 (36,4) | 11 (100,0) |

UFC/g em log₁₀= unidades formadoras de colônias por grama em números logaritmos; n= número de amostras isoladas.

Os resultados refletem as condições de comercialização do camarão salgado-seco produzido em Teresina, Piauí, que, de um modo geral, é exposto à venda em temperatura não controlada e estocado sem cuidados prévios satisfatórios, sendo necessárias a adoção de medidas preventivas junto aos produtores

e comerciantes para o oferecimento destes alimentos, com o intuito de oferecer à população camarões salgados-secos com condições higiênicas satisfatórias.

CONCLUSÃO

Os camarões salgados-secos comercializados em Teresina eram comercializados em ambiente com precárias condições higiênicas. O método *spread*

plate é mais eficiente que o método *pour plate* para contagens de fungos filamentosos e de leveduras em camarões salgados-secos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brasil. 2001. Ministério da Saúde. Resolução RDC n.12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial da União*. Brasília-DF, n.7 - E, seção 1, p.45 - 53, 10 de janeiro de 2001.
- Cardoso Filho, F. C., Calvet, R. M., Pereyra, C. M., Pereira, M. M. G., Rosa, C. A. R., Torres, A. M., Muratori, M. C. S. 2011 a. Ocorrência de *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e aflatoxinas em amostras de farinha de milho utilizadas no consumo humano, Piauí. Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.78, n.3, p.443-447, jul./set.
- Cardoso Filho, F.C. 2011. Monitoramento de fungos toxigênicos e aflatoxinas em rações utilizadas na piscicultura em Teresina, Piauí, Brasil. 43 f. *Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)* – Curso de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina.
- Carvalho, R. 2005. ABCC - *Camarões marinhos, gestão de qualidade e rastreabilidade na fazenda*. Janeiro de 2005. ABCC. São Paulo. Disponível em: <http://www.abccam.com.br/download/Get%E3odeQualidade-Grande.pdf>. Acesso em 08 de Junho de 2010.
- Carvalho, R. 2008. O aumento do consumo e as mudanças no perfil do mercado de camarão cultivado no Brasil. *Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo* – USP. 2008. 32 f.
- Figueiredo, E. E. S. Imbelloni, M. F., Elesbão, H. S., Santos, A. F. Avaliação das condições higiênico-sanitárias de manipulação e comercialização de produtos de origem animal nas feiras-livres do município de Cuiabá, MT. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 21, n.148, p38-42, 2007.
- Fonseca, H. 2000. *Os fungos e a deterioração de alimentos*. Disponível em <http://www.micotoxinas.com.br/boletim4.htm>. Acesso em 09 de Junho de 2010.
- Franco, B, D. G. M & Landgraf, M. 2008. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Atheneu, 2008. 182p.
- Frank, J. F. & Yousef, A. E. 2004. Tests for groups of microorganisms, p. 227-247. In H. M. Wehr and J. F. Frank (eds.), Standard methods of the examination of dairy products, 17th ed. *Am. Publ. Health Assoc.*, Washington, DC. Chapter 8, p. 227-248.
- Huss, H. H. **A garantia de qualidade dos produtos de pesca**. FAO- Roma, documento técnico sobre pescas. 334p, 1997.
- Martins, H. M. & Martins, M. L. 2001. Qualidade micológica de rações para bovinos (Portugal: 1996-1999). *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. Lisboa. v. 37, n. 538, p. 85-20 88.
- Melo, J. T. 2000. Avaliação dos níveis de contaminação microbiológica ambiental das diversas áreas de produção do laboratório de fitoterápicos do programa de plantas medicinais da Universidade Federal de Juiz de Fora. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*. v.12, n. 2, p. 45-50.
- Menezes, A. 2008. *Técnicas de contagem pour plate e spread plate*. Rio de Janeiro. CEFET-RJ. Disponível em : <http://www.ebah.com.br/relatorio-tecnicas-de-contagem-pour-plate-e-spread-plate-doc-doc-a7854.html>. Acesso em 11 de junho de 2010.
- Motta, M. R. A., & Belmonte, M. A. 2000. Avaliação microbiológica de amostras de carne moída comercializada em supermercados de região oeste de São Paulo. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo. v. 14, n. 78/79, p. 59-62, 2000.
- Nunes, E.M.C.G. 2009. Microbiota fúngica nos ingredientes e em ração para piscicultura. 58 f. *Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)* – Curso de Pós- Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina.
- Pereira, M.M.G., Carvalho, E. P. & Prado, G. 2002. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. *Boletim CEPPA*, Curitiba. v. 20 (1).
- Robb, J. 1993. *Mycotoxins: Contamination and decontamination*. Feed mix vol. 1 n° 2, p. 18 – 23.
- Sartori, F. G. & Montanari, L. B. 2005. Monitoramento da água utilizada em um Centro de Hemodiálise: parâmetros bacteriológicos e micológicos. 50 f. *Relatório de Pesquisa (Graduação em Biomedicina)* – Universidade de Franca, Franca.
- Silva, N., Junqueira, V.C.A., Silveira, N.F.A., Taniwaki. M.H., Santos, R., F. S. & Gomes, R. A. R. 2010. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 2ed. Sao Paulo: Varela. 317p.
- Siqueira, R. S. 1995. *Manual de microbiologia de alimentos*. Brasilia, Merck, 65 f.
- Vieira, F.C. 2002. Erro na contagem de fungos pelo método “pour plate”. *Revista Ceres*. Viçosa. v.1, p. 335-340.