

27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020



ON LINE

7º Simpósio de
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

AVALIAÇÃO MICOLÓGICA DE PERNIS OVINOS CURADOS

T.S. Almeida¹, A. Stefanello¹, E.S. Nalério², L. N. Magrini¹, M. da Silva¹, M.V. Copetti¹

1-Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos - Centro de Ciências Rurais - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria - CEP: 97105900 - Brasil. e-mail: (tiagosda11@gmail.com; andri_stefanello@hotmail.com; lisianicoloso@outlook.com, marina1012@gmail.com, mvc@smail.ufsm.br).

2- Embrapa Pecuária Sul, Rodovia BR-153, Km 633, Vila Industrial, Zona Rural - CEP: 96.401-970 - Bagé - RS - Brasil, Telefone: 55 (53) 3240-4771 - Fax: 55 (53) 3240-4651 - e-mail: (elen.nalerio@embrapa.br).

RESUMO – Durante a maturação de produtos cárneos pode ocorrer o crescimento de fungos na superfície dos mesmos, o que pode influenciar suas características sensoriais. O objetivo do estudo foi identificar os fungos presentes na superfície de produto cárneo curado elaborado a partir de pernil ovino, bem como no ar ambiente nas áreas de seu processamento e maturação. Os pernis ovinos foram desenvolvidos experimentalmente na Embrapa Pecuária Sul, e submetidos a dois tratamentos diferentes (com ou sem adição de condimentos). As coletas para análises micológicas foram feitas por *swab* de superfície e as amostragens do ar de cada área foram realizadas em triplicata através de método de impressão em ágar, ambos usando ágar dicloran glicerol 18%. Nas superfícies dos pernis as médias de contaminação foram $6,47 \pm 0,49$ (tratamento 1) e $6,45 \pm 0,68$ (tratamento 2) log UFC/g, com predominância para espécies xerofílicas de *Aspergillus* e, no ar ambiente os gêneros de maior frequência foram *Cladosporium* sp. e *Penicillium* sp.

ABSTRACT – During the maturation of meat products, fungi can grow on the products' surface, which can influence their sensory characteristics. The objective of this study was to identify the fungi present on the surface of cured meat product made from sheep shank, as well as in air of their processing and maturation areas. Sheep shanks were developed experimentally at Embrapa Pecuária Sul, and subjected to two different treatments (with or without the addition of condiments). The collections for mycological analyses were made by surface swab and the air sampling of each area was carried out in triplicate by printing on agar, both using 18% dichloran glycerol agar. On the surfaces of the shanks the contamination averages were 6.47 ± 0.49 (treatment 1) and 6.45 ± 0.68 (treatment 2) log UFC/g, with predominance of xerophilic *Aspergillus* species and, in environment air, the genera most frequent were *Cladosporium* sp. and *Penicillium* sp.

PALAVRAS-CHAVE: fungos; análises micológicas; produto cárneo ovino; presunto.

KEYWORDS: moulds; mycological analyzes; sheep meat product; ham.

1. INTRODUÇÃO

Os presuntos crus ovinos do tipo espanhol são produtos obtidos de pernis íntegros de ovinos nas condições de borregos (animais de 7 meses de idade até que se tornem aptos para reprodução, ou seja, de 12 a 18 meses) e animais mais velhos ou fora do padrão de qualidade comercial (animais de descarte), nos quais passam por um processo de cura, salga, maturação e podem ser defumados ou não (EMBRAPA, 2017). Segundo a legislação nacional vigente (BRASIL, 2000), os padrões de identidade e qualidade estabelecidos para presunto cru suíno preconizam os seguintes parâmetros físico-químicos: atividade de água (máx.) 0,92; proteína (min.) 27% e gordura (máx.) 20%. Não existem parâmetros estabelecidos para produtos desenvolvidos com pernis de outras espécies.

Durante o processo de maturação, as condições às quais alguns produtos cárneos são expostos podem favorecer o crescimento de fungos em sua superfície, como ocorre em presuntos curados, e estes na sua maioria pertencem aos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* e a contaminação pode se originar no ambiente de produção e

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br



maturação (NÚNEZ et al., 1996; BATTILANI et al., 2007; CEBRIÁN et al., 2019). Devido a suas características ecofisiológicas, o gênero *Penicillium* tende a predominar em locais com clima temperado, enquanto que o gênero *Aspergillus* é o mais frequente em países de clima tropical.

A presença dos fungos durante a maturação pode contribuir para o desenvolvimento de características sensoriais dos produtos cárneos, devido às alterações lipolíticas e proteolíticas que ocorrem durante o processamento (MARTIN et al., 2004; MARTIN et al., 2006). Embora muito destas colônias sejam consideradas benéficas para o desenvolvimento de sabores e aromas aos presuntos, alguns fungos deteriorantes podem produzir micotoxinas durante o processamento (NÚNEZ et al., 1996; MARTIN et al., 2004; PERRONE et al., 2015).

Com isso, o objetivo deste estudo foi quantificar, isolar e identificar os fungos presentes na superfície dos presuntos, bem como do ar ambiente de elaboração e maturação dos presuntos, verificando a presença tanto de espécies com potencial biotecnológico, quanto aquelas com potencial toxigênico, que podem representar um perigo à saúde dos consumidores.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Matérias-primas

Os produtos cárneos ovinos foram desenvolvidos no Laboratório de Ciência e Tecnologia de Carnes (LCTC) na Embrapa Pecuária Sul no município de Bagé – RS, e foram obtidos de cortes íntegros dos pernis de borregos e animais velhos ou de descarte. Os demais ingredientes para elaboração dos presuntos foram adquiridos no comércio local e/ou fornecidos pelo próprio LCTC.

2.2 Amostragem: análise dos presuntos

As amostras foram coletadas dos presuntos no estágio de maturação de 70 dias, os quais estavam armazenados em câmara climática na temperatura de 20°C e com umidade de 60% no momento da coleta. As formulações dos tratamentos são diferentes, visto que o tratamento T1 não tinha a adição de condimentos e T2 era adicionado condimentos na sua formulação.

Foi utilizada a técnica do esfregaço com *swab* nas superfícies das amostras, em uma área delimitada de 25 cm², onde foram selecionados 3 pernis por tratamento. Para cada amostra foram realizadas coletas em duplicata de cada pernil selecionado. O *swab* estéril foi umedecido em água peptonada à 0,1%, estéril, e esfregou-se o mesmo dentro da área superficial dos presuntos delimitada por moldes estéreis. Após a realização de diluições seriadas, uma alíquota de 100 µL foi retirada e inoculada, em triplicata, na superfície das placas de Petri contendo meio DG18 (Ágar Dicloran Glicerol 18% com cloranfenicol). Após, as placas foram incubadas em estufa a 25°C por 7 dias, quando procedeu-se a contagem. As análises micológicas foram desenvolvidas no Laboratório de Análises Micológicas de Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria-RS.

2.3 Amostragem do ar ambiente

A amostragem do ar ambiente ocorreu a partir de coletas em triplicatas da área de processamento dos presuntos ovinos (área quente e área fria), dentro da câmara de maturação e da câmara fria onde os presuntos foram armazenados após o período de maturação. Para realizar esta coleta, foi utilizado um amostrador de ar do tipo Andersen, Samplair (Biomérieux), no qual uma placa de Petri contendo o meio DG18 é acondicionada no equipamento. Foram aspirados 50 L de ar, em triplicata. As placas foram incubadas em estufa a 25°C por 7 dias.

Utilizou-se um fator de correção descrito no manual do amostrador para expressar o resultado do nível de contaminação do ar. Foi substituído o “n” por um número equivalente a “N” (apresentado na tabela que acompanha o amostrador). Foi calculado o volume ($V = \text{duração da amostragem} \times 0,1 \text{ m}^3$), e aplicou-se a equação 1 a seguir:

$$\text{Nível de contaminação do ar} = \frac{N}{V} \quad (1)$$

Onde, N: número relacionado à contagem “n”;

V: volume.

2.4 Isolamento e identificação dos fungos

Posteriormente a incubação e a contagem, as colônias foram isoladas em meio Czapeck Yeast Extract Agar (CYA) e identificadas conforme as recomendações para cada gênero. Para identificar as colônias de *Penicillium* sp. foram utilizados os esquemas de identificação propostos por Pitt (2004) e Frisvad e Samson (2004). A identificação de *Aspergillus* spp. foi realizada conforme Klich e Pitt (1988) e *Aspergillus* da seção Circumdati foram identificados segundo Frisvad et al. (2004). Outros gêneros de fungos foram identificados de acordo com Pitt e Hocking (2009).

Em resumo, a inoculação dos fungos ocorreu em três pontos em diferentes meios de cultura, seguindo de um período de cultivo em diferentes temperaturas (5, 25 e 37°C). Os fungos foram identificados através de análise macroscópica (diâmetro da colônia, exsudato, produção de pigmentos, cor) e análise microscópica (morfologia e tamanho).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 observa-se a diversidade de fungos presentes nos tratamentos I e II de presuntos curados ovinos, onde apresentam médias de contaminação próximas para ambos os tratamentos.

Tabela 1 – Fungos isolados da superfície dos presuntos curados ovinos de dois diferentes tratamentos após maturação.

Tratamentos	n	Média de contaminação (logUFC/g)	Variação (log10 ⁿ)	Fungos isolados nos presuntos curados a seco
I	3	6,47 ± 0,49	5,64 -7,24	<i>Aspergillus ruber</i> , Dematiáceo, <i>Aspergillus pseudoglaucus</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> , Levedura, <i>Aspergillus versicolor</i> , <i>Aspergillus penicillioides</i> , <i>Penicillium crustosum</i> , <i>Cladosporium</i> sp.
II	3	6,45 ± 0,68	5,28 -7,34	<i>Aspergillus pseudoglaucus</i> , <i>Aspergillus montevidensis</i> , <i>Aspergillus chevalieri</i> , <i>Aspergillus ruber</i> , <i>Cladosporium</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., Dematiáceo.

Foram identificados um total de 4 gêneros e 8 espécies fúngicas distintas, conforme apresentado na Tabela 1. Nas coletas de amostras do tratamento I dos presuntos, houve uma predominância de *Aspergillus ruber*, seguido das demais espécies. Nos pernis do tratamento II, a espécie *Aspergillus pseudoglaucus* foi a espécie predominante. Observa-se também que a variação foi a mesma para ambos os tratamentos. Apesar de pequena, porém em ambos os tratamentos, a presença de *Cladosporium* sp. e leveduras nos presuntos podem ser decorrentes da contaminação do ar, como relata Sousdaleff (2016), onde através do estudo de identificação de fungos anemófilos, foram encontradas *Cladosporium* sp. e leveduras em 100% das amostras de ar analisadas.

A presença de colônias fúngicas coloridas como *Cladosporium* sp., *Aspergillus* e *Penicillium* torna-se indesejável, visto que a legislação brasileira não permite a presença de fungos filamentosos, exceto os característicos do produto (fungos esbranquiçados) (Brasil, 2000).

Espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* predominaram durante os 70 dias de maturação dos presuntos. Jovita et al. (2001), relata que a predominância do gênero *Aspergillus* em presuntos está de acordo com as condições da atividade de água (Aw) e temperatura do produto, as quais desenvolvem-se rapidamente com a redução de Aw. Em estudos realizados por Alapont et al. (2014), o gênero *Penicillium* foi predominante na maioria de fungos isolados de superfícies de presuntos curados a seco e também em amostragens do ar ambiente das câmaras climáticas. O mesmo ocorreu na Eslovênia ao analisar a microbiota das superfícies de produtos cárneos curados (Sonjak et al., 2011). Países como Argentina e Uruguai, com condições climáticas semelhantes com o sul do Brasil, realizaram estudos de fungos isolados das superfícies de salames, revelando predominância do gênero *Penicillium*, com destaque para a espécie *Penicillium chrysogenum*, presente em amostras do tratamento I dos presuntos deste estudo (Castellari et. al., 2010). Alguns estudos como de Lima (2016), que apresentou uma



contagem de fungos em pernis curados de carne ovina de $6,60 \pm 0,36$ log UFC/g e, Bergamin Filho et al. (2010), que analisou presuntos crus elaborados com carne suína com 3,5% e 5% de sal, obtendo uma contagem de fungos de 5,58 log UFC/g e 5,38 log UFC/g, respectivamente, demonstram resultados superiores aos encontrados neste estudo.

Na Tabela 2 pode-se observar a diversidade fúngica no ar ambiente das áreas de processamento (área quente e fria) e nas câmaras de maturação (câmara climática) e câmara de armazenamento (câmara fria).

Tabela 2 – Nível de contaminação fúngica do ar ambiente das áreas de processamentos e armazenamento pernis ovinos curados.

Áreas de coleta	Nível médio de contaminação (log UFC/m ³)	Fungos isolados (por ordem de ocorrência)
Câmara climática	3,36	<i>Cladosporium</i> sp., <i>Mycelia sterilia</i> , <i>Penicillium</i> sp., <i>A. versicolor</i> .
Câmara fria	3,20	<i>Cladosporium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., <i>A. versicolor</i> .
Processamento área quente	3,20	<i>Cladosporium</i> sp., <i>P. corylophilum</i> , <i>Mycelia sterilia</i> , <i>A. versicolor</i> .
Processamento área fria	3,38	<i>Cladosporium</i> sp., <i>P. corylophilum</i> , <i>A. versicolor</i> .

Observa-se na Tabela 2, que as colônias de *Cladosporium* sp. estavam presentes em todas as áreas amostradas, tanto no ar externo (áreas quente e fria) quanto no ar interno (câmaras climática e fria), sendo este um dos gêneros aéreos com maior ocorrência em ambientes internos e externos em todo o mundo e, em ambientes de processamento de produtos cárneos (Andersen, 1995; Samson et al., 2004; Mižáková et al., 2002; Sørensen et al., 2008). Este fungo, está relacionado com a ocorrência de coloração negra (black spot) na superfície de presuntos curados (Leistner e Ayres, 1967; Racovita et al., 1969; Alía et al., 2016).

Foi observada uma baixa diversidade de fungos, tanto para as espécies de *Penicillium* quanto para *Aspergillus*. Sørensen et al. (2008), relatou a presença de *Penicillium* sp. em áreas de processamento de embutidos cárneos fermentados em uma fábrica da Dinamarca. O mesmo ocorreu em estudos realizados por Asefa et al. (2010), onde verificou-se a predominância do gênero *Penicillium* sp. em amostras do ar ambiente de processamento de produto cárneos curados, demonstrando sua predominância em indústrias de produtos cárneos. No estudo micológico de produtos cárneos realizado por Sonjak et al. (2011), encontraram isolados predominantes do gênero *Penicillium*, além da presença de *Aspergillus versicolor* e *Cladosporium* spp., em produtos cárneos curados. Nielsen (2003) relata em seu estudo uma frequência de ocorrência alta de *Aspergillus versicolor* em amostras de ar ambiente.

4. CONCLUSÃO

O presente estudo avaliou a diversidade de fungos presentes na superfície de pernis ovinos curados e no ar das áreas de processamento, maturação e armazenamento dos mesmos. Foi observada predominância de espécies xerofílicas de *Aspergillus* (*A. pseudoglaucus*, *A. montevidensis*, *A. chevalieri* e *A. ruber*). Os resultados das análises micológicas do ar ambiente parecem não ter influenciado a microbiota dos produtos, visto que algumas espécies predominantemente identificadas na superfície dos pernis não foram recuperadas do ar destes ambientes. As espécies xerofílicas de *Aspergillus* presentes

27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020



ON LINE

7º Simpósio de
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

não apresentam potencial toxigênico descrito na literatura científica, e podem agregar sabores e aromas desejáveis, possibilitando futuramente seu emprego biotecnológico para padronização do produto.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAPONT, C.; LÓPEZ-MENDOZA, M. C.; GIL, J. V.; MARTÍNEZ-CULEGRAS, P. V. Mycobiota and toxigenic *Penicillium* species on two Spanish dry-cured ham manufacturing plants. **J. Food Add. & Cont.: Part A**, v. 31, p. 93-104, 2014.

ALÍA, A.; ANDRADE, M. J.; RODRÍGUEZ, A.; REYES-PRIETO, M.; BERNÁLDEZ, V.; CÓRDOBA, J. J. Identification and control of moulds responsible for black spot spoilage in dry-cured ham. **Meat Science**, v. 122, p. 16-24, 2016.

ANDERSEN, S. J. Compositional changes in surface mycoflora during ripening of naturally fermented sausages. **J. Food Prot.**, v. 58, p. 426 – 429, 1995.

ASEFA, D.; KURE, C. F.; GJERDE, R. O.; LANGSRUD, S.; OMER, M. O.; NESBAKKEN, T.; SKAAR, I. A HACCP plan from mycotoxigenic hazards associated with dry-cured meat production processes. **Food Control**, v. 22, p. 831-837, 2010.

BATTILANI, P.; PIETRI, A.; GIORNI, P.; FORMENTI, S.; BERTUZZI, T.; TOSCANI, T.; VIRGILI, R.; KOZAKIEWICZ, Z. *Penicillium* population in dry-cured ham manufacturing plants. **J. Food Prot.**, v. 70, p. 975-980, 2007.

BERGAMIN FILHO, W.; COSTA, M. R.; FELÍCIO, P. E.; SILVEIRA, E. T. F. Método acelerado de processamento de presunto cru. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 30, n. 2, p. 494-500, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa nº 22, de 31 de julho de 2000. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de copa, de jerked beef, de presunto tipo Parma, de presunto cru, de salame, de salaminho, de salame tipo alemão, de salame tipo calabrês, de salame tipo friolano, de salame tipo napolitano, de salame tipo hamburgueres, de salame tipo Italiano, de salame tipo Milano, de linguiça colonial e pepperoni. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 3 ago. 2000. Seção 1, p. 15-28.

CASTELLARI, C.; QUADRELLI, A. M.; LAICH, F. Surface mycobiota on Argentinean dry fermented sausages. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 142, p. 149-155, 2010.

CEBRIÁN, E.; RODRÍGUEZ, M.; PEROMINGO, B.; BERMÚDEZ, E.; NÚÑEZ, F. Efficacy of the Combined Protective Cultures of *Penicillium chrysogenum* and *Debaryomyces hansenii* for the control of Ochratoxin A Hazards in Dry-Cured Ham. **Toxins**, v.11, p. 12, 2019.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Comunicado técnico (94) – Ciência e Tecnologia de Carnes: Presunto Cru Ovino**. ISSN 1982-5382, Bagé, 2017.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*: A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. **Stud. Mycol.**, v. 49, p. 1-173, 2004.

JOVITA, M. R.; GONZÁLEZ, A. M.; BREÑA, F. N. Población microbiana del jamón Ibérico y su contribución en la maduración. Cultivos iniciadores. In: BARROSO, J. V. (Ed.), *Tecnología del Jamón Ibérico: de los sistemas tradicionales a la explotación racional del sabor y el aroma*. Madrid: **Mundi Prensa**, p. 343-366, 2001.

KLICH, M. A.; PITT, J. I. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. **CSIRO Division of Food Processing**, North Ryde, NSW, 1988.

LEISTNER, L.; AYRES, J. C. Mold fungi and meat products. **Die Fleischwirtschaft**, v. 47, p. 1320-1326, 1967.

LIMA, I. A. **Produtos cárneos curados e dessecados da carne ovina adicionados de ingredientes funcionais**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, 138 p., 2016. MARTÍN, A.; CÓRDOBA, J. J.; ARANDA, E.; CÓRDOBA, M. G.; ASENSIO, M. A. Contribution of a selected fungal population to the volatile compounds on dry-cured ham. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 110, p. 8-18, 2006.

MARTÍN, A.; CÓRDOBA, J. J.; NÚÑEZ, F.; BENITO, M. J.; ASENSIO, M. A. Contribution of a selected fungal population to proteolysis on dry-cured ham. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 92, p. 55-66, 2004.

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br



- MIŽÁKOVÁ, A.; PIPOVÁ, M.; TUREK, P. The occurrence of moulds in fermented raw meat products. **Journal of Food Science**, v. 20, p. 89-94, 2002.
- NIELSEN, K. F. Mycotoxin production by indoor molds. **Fungal Genetics and Biology**. v. 39, p. 103-117, 2003.
- NUNEZ, F.; RODRIGUEZ, M. M.; BERMUDEZ, M. E.; CORDOBA, J. J.; ASECIO, M. A. Composition and toxigenic potential of the mould population on dry-cured Iberian ham. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 32, p. 185-197, 1996.
- PERRONE, G.; SAMSON, R. A.; FRISVAD, J. C.; SUSCA, A.; GUNDE-CIMERMAN, N.; EPIFANI, F.; HOUBRAKEN, J. *Penicillium salamii*, a new species occurring during seasoning of dry-cured meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 193, p. 91 – 98, 2015.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. *Fungi and Food Spoilage*, 3ª ed. **Springer Dordrecht Heidelberg**, London. 2009.
- RACOVITA, A.; RACOVITA, A.; CONSTANTINESCU, T. The importance of mould layers on salami. **Die Fleischwirtschaft**, v.49, p. 461-466, 1969.
- SAMSON, R. A.; FRISVAD, J. C.; HOEKSTRA, E. S. *Introduction to Food and Airborne Fungi*. **Centraalbureau voor Schimmelcultures**, Utrecht, 2004.
- SONJAK, S.; LIËN, M.; FRISVAD, J. C.; GUNDE-CINERMAN, N. The mycobiota of three dry-cured meat products from Slovenia. **Food Microbiol.**, v. 28, p. 373-376, 2011.
- SØRENSEN, L. M.; JACOBSEN, T.; NIELSEN, P. V.; FRISVAD, J. C.; KOCK, A. G. Mycobiota in the processing áreas of two different meat products. **Food Microbiology**, v.124, p. 58-64, 2008.
- SOUSDALEFF, M. **Caracterização de fungos de ar indoor e ar outdoor dos laboratórios da UTFPR Campus Campo Mourão/PR**. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2016.

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br