

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA  
E TECNOLOGIA DOS ALIMENTOS**

**Gilson Parussolo**

**Avaliação micológica ao longo do processamento de salames e  
influência da umidade relativa sobre a produção de ocratoxina A  
por *Aspergillus westerdijkiae***

Santa Maria, RS  
2018

**Gilson Parussolo**

**Avaliação micológica ao longo do processamento de salames e influência da umidade relativa sobre a produção de ocratoxina A por *Aspergillus westerdijkiae***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marina Venturini Copetti

Santa Maria, RS  
2018

Parussolo, Gilson

Avaliação micológica ao longo do processamento de salames e influência da umidade relativa sobre a produção de ocratoxina A por *Aspergillus westerdijkiae* / Gilson Parussolo.- 2018.

78 p. ; 30 cm

Orientadora: Marina Venturini Copetti

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2018

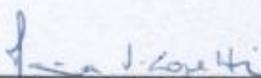
1. Deterioração fúngica 2. Segurança alimentar 3. Fungo toxigênico 4. Micotoxina 5. Embutido cárneo fermentado  
I. Venturini Copetti, Marina II. Título.

Gilson Parussolo

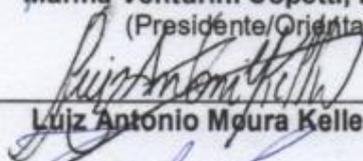
**Avaliação micológica ao longo do processamento de salames e influência da umidade relativa sobre a produção de ocratoxina A por *Aspergillus westerdijkiae***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**.

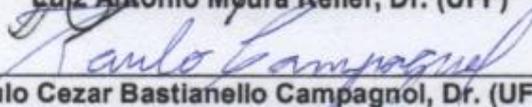
Aprovado em 30 de maio de 2018



\_\_\_\_\_  
**Marina Venturini Copetti, Dra. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)



\_\_\_\_\_  
**Luiz Antônio Moura Keller, Dr. (UFF)**



\_\_\_\_\_  
**Paulo Cezar Bastianello Campagnol, Dr. (UFSM)**

Santa Maria, RS  
2018

Aos meus pais, Giovani e Carmem,  
Dedico.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por ter me dado forças para chegar até aqui e adquirir o título de Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao PPGCTA (Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) pela contribuição para meu crescimento tanto profissional quanto pessoal.

À minha orientadora, professora Dr.<sup>a</sup> Marina Venturini Copetti por todo aprendizado passado desde meu estágio final do curso até agora durante o mestrado. Por todas às vezes que chamou minha atenção, mas sempre por uma boa causa! Saiba que sou muito grato a tudo isso! Meu muito obrigado!

Aos meus pais, Carmem Parussolo e Giuvani Luiz Parussolo por toda a força que me deram durante minha caminhada! Esse título não é para mim, mas sim para vocês! Aos meus irmãos, Giovana Parussolo e Gilnei Parussolo por todas as palavras ditas quando me encontrei para baixo!

Aos meus colegas de laboratório, Tamires, Andriele, Jéssica, Camila e Raquel por toda ajuda durante o experimento e por todas as risadas! Com vocês não tem dia ruim!! Ao Marcelo e Angélica por toda ajuda quando as dúvidas surgiam tanto na parte experimental quanto na parte escrita.

Ao Éverton e seus pais por toda força passada quando a “peteca” caía e até mesmo quando minha internet não funcionava! Vocês salvaram minha vida várias vezes! rsrs

Ao nosso pequeno/grande grupo da Pós, Micheli, Vitória, Marina, Rebeca, Suslin, Rosane e Suelen pela amizade durante esses dois anos que convivemos.

Muito obrigado a todos!!

*“Não deixe que as pessoas te façam desistir daquilo que você mais quer na vida. acredite. Lute. Conquiste. E acima de tudo, seja feliz.”*

(Autor desconhecido)

## RESUMO

### **Avaliação micológica ao longo do processamento de salames e influência da umidade relativa sobre a produção de ocratoxina A por *Aspergillus westerdijkiae***

AUTOR: Gilson Parussolo

ORIENTADORA: Marina Venturini Copetti

O salame é um derivado cárneo fermentado introduzido no Brasil pelos primeiros imigrantes italianos e que suas características organolépticas são muito influenciadas por fungos que crescem na parte externa do embutido. Se não forem adotados os devidos cuidados higiênicos durante sua produção e maturação, estes poderão ser colonizados por fungos toxigênicos. O objetivo deste trabalho foi investigar micologicamente matérias-primas, ar ambiente da área de produção e maturação e fungos presentes na superfície de salames além de analisar a produção e migração de ocratoxina A em salames inoculados com fungo produtor. Foram utilizadas duas indústrias para o estudo, das quais foram obtidas amostras de matérias-primas (pimenta-preta, noz moscada, envoltório, alho, mix de especiarias e carne) para se analisar micologicamente. Também foi realizada, em dois períodos, a amostragem do ar das áreas de produção e maturação e coleta de salames para análise dos fungos presentes na superfície do envoltório ao longo da maturação. As análises micológicas foram feitas em meio Dicloran Glicerol 18% (DG18) utilizando-se diluição e plaqueamento em superfície, para análise das matérias-primas e a técnica de esfregaço com swab em uma área de 25cm<sup>2</sup> para avaliação da superfície dos salames. DG18 também foi o meio de cultura utilizado para recuperação dos fungos do ar. Para os estudos de produção de ocratoxina A, foi realizada a inoculação de *Aspergillus westerdijkiae* (10<sup>4</sup> esporos) na superfície de salames, os quais foram incubados em diferentes umidades relativas (maturação normal, decrescendo de 95 a 75% ao longo de 35 dias; e umidades relativas fixas de 79%, 85% e 95% durante 21 dias), fazendo-se amostragens semanais para verificar a presença e distribuição da ocratoxina A no envoltório, borda externa e miolo do salame. As matérias-primas apresentaram baixa contaminação fúngica, com exceção da pimenta-preta. Para os salames verificou-se uma ampla variedade fúngica nas duas indústrias, com predominância de *Aspergillus* (sobretudo espécies xerofílicas), *Penicillium* e *Cladosporium*. Na indústria B foi observada a presença de *Aspergillus westerdijkiae*, fungo conhecido como produtor de ocratoxina A em produtos cárneos. O ar ambiente apresentou alta contaminação principalmente por *Cladosporium* sp. seguido de *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp., ficando em alguns casos, acima do limite de quantificação do aparelho (>10<sup>4</sup> UFC/cm<sup>3</sup>). Cerca de metade das espécies presentes no ar também foi isolada dos salames. Na

amostragem de ar também foi identificado *A. westerdijkiae* na indústria B. Visto que *A. westerdijkiae* não foi isolado de matérias-primas, o ar ambiente pode ser considerado um ponto crítico no que se refere à contaminação e propagação de fungos em áreas de processamento de alimentos. Em salames inoculados com *A. westerdijkiae* não foi possível detectar ocratoxina A nos 7 primeiros dias tanto na maturação normal quanto nas umidades relativas fixas. A maior quantidade de toxina foi detectada no envoltório, sendo a quantidade máxima identificada no 14º dia na umidade relativa de 79% (1135 µg/kg) enquanto que na maturação normal foi aos 21 dias (676,5 µg/kg). A toxina foi capaz de migrar para a borda externa (87,4 µg/kg em 0,79; 1,55 µg/kg na maturação normal). Não foi verificada migração da toxina para o miolo dos salames. Ao término desta pesquisa, concluiu-se que a presença de fungos toxigênicos superficiais em salames é de relevância para a saúde pública devido a sua capacidade de produção de micotoxinas ao se desenvolver no envoltório com difusão da mesma para o produto.

**Palavras-chaves:** Deterioração fúngica; Segurança alimentar; Fungo toxigênico; Micotoxina; Embutido cárneo fermentado.

## ABSTRACT

### **Mycological evaluation along salami processing and influence of relative humidity on the production of ochratoxin A by *Aspergillus westerdijkiae***

AUTHOR: Gilson Parussolo

ADVISOR: Marina Venturini Copetti

The salami is a fermented meat product introduced in Brazil by the first Italian immigrants. The organoleptic characteristics of this product are influenced by fungi growing on the sausage surface. If production and maturation is not carried out under hygienic conditions, they can be colonized by toxigenic fungi. The objective of this study was to investigate mycological quality of raw materials, ambient air from the area of production and maturation and surface of salami, as well as to analyze the production and migration of ochratoxin A in salami inoculated with a producer species. Two industries were used for the study, from which samples of raw material (black pepper, nutmeg, wrapper, garlic, spice mix and meat) were obtained for mycological analysis. It was also carried out, in two periods, the sampling of air from the production and maturation areas and the collection of salamis to analyze the fungi present on the surface of the wrapping during maturation. The mycological analyzes were done in 18% Dichloran Glycerol medium (DG18) using surface plating, for analysis of the raw materials and swab smear technique in an area of 25cm<sup>2</sup> to evaluate the salami surface. DG18 was also the culture medium used for recovering airborne fungi. For the production of ochratoxin A, *Aspergillus westerdijkiae* (10<sup>4</sup> spores) was inoculated on salami surface, which were incubated in different relative humidity (normal maturation, decreasing from 95 to 75% over 35 days; relative humidity of 79%, 85% and 95% for 21 days). Weekly samplings were carried out to verify the presence and distribution of ochratoxin A in the casing, outer border and salami crumb. The raw materials presented low fungal contamination, with the exception of black pepper. For salami, a wide fungal variety was verified in the two industries, predominantly *Aspergillus* (mainly xerophilic species), *Penicillium* and *Cladosporium*. In industry B the presence of *Aspergillus westerdijkiae* was observed, fungus known as ochratoxin A producer in meat products. The ambient air presented high contamination mainly by *Cladosporium* sp. followed by *Penicillium* sp. and *Aspergillus* sp., being in some cases, above the limit of quantification of the apparatus (>10<sup>4</sup> CFU / cm<sup>3</sup>). About half of the species present in the air were also isolated from the salami. *A. westerdijkiae* has also been identified in industry B. *A. westerdijkiae* has not been isolated from raw materials. In the case of *A. westerdijkiae*, ambient air can be considered a critical point in terms of contamination and propagation of fungi in processing areas of food. In salami inoculated with *A.*

*westerdijkiae* it was not possible to detect ochratoxin A in the first 7 days in both normal maturation and fixed relative humidities. The highest amount of toxin was detected in the casings, with the maximum amount detected at day 14 at the relative humidity of 79% (1135 µg/kg). Under normal maturation the maximum was detected at 21 days (676.5 µg/kg). The toxin was able to migrate from casing into the outer border (87.4 µg / kg at 0.79, 1.55 µg/kg at normal maturation). No migration of the toxin into the salamis core was observed. In conclusion, the presence of toxigenic fungi in salami surface is of public health concern due to their ability to produce mycotoxins as it develops in the casing with diffusion of toxin into the product.

**Keywords:** Fungal spoilage; Food safety; Toxigenic fungi. Mycotoxin; Fermented meat sausage.

## Lista de figuras

### Manuscrito I:

Figura 1. Fungos recuperados do ar interno de instalações artesanais de salame. A = área de produção da indústria A; B = área de maturação da indústria A; C = área de produção da indústria B, incontável; D = área de maturação da indústria B, com presença de *Aspergillus westerdijkiae* (fungos amarelo / ocre)..... 47

Figura 2. Distribuição de gêneros fúngicos organizados de acordo com a prevalência em cada amostragem de ar (I e II), durante a produção de salames na indústria A..... 48

Figura 3. Distribuição de gêneros fúngicos organizados de acordo com a sua prevalência em cada amostragem de ar (I e II) ao longo da produção de salames na indústria B ..... 49

### Manuscrito II:

Figura 1: Porções de partição do salame para análises..... 56

Figura 2: Esquema explicando o corte e a extração do centro (miolo) do salame: (A) Ferramenta de extração; (B) Ferramenta de extração com amostra em seu interior; (C) Ferramenta de extração com amostra e cilindro (20 mm) para corte do salame; (D) Cilindro cortando amostra de um lado a outro; (E) cilindro de corte com amostra sendo retirada; (F) Cilindro de carne retirado do centro do salame..... 57

Figura 3. Salames com 21 dias de maturação inoculados com *A. westerdijkiae* e incubados sob diferentes umidades relativas (UR). A: Maturação em câmara com UR variável (decrecente de 95% à 75%); B: UR 79%; C: UR 85%; D: UR 95%..... 67

Figura 4. Produção de ocratoxina A em diferentes porções de salames inoculados com *Aspergillus westerdijkiae* e maturados em diferentes condições de umidade relativa (R)..... 68

## Lista de tabelas

### **Manuscrito I:**

Tabela 1. Fungos isolados de matérias-primas de duas indústrias produtoras de salame artesanal..... 44

Tabela 2. Fungos isolados da superfície de salame coletados da indústria A durante a maturação de acordo com o período de amostragem..... 45

Tabela 3. Fungos isolados da superfície de salames coletados da indústria B durante a maturação de acordo com o período de amostragem ..... 46

### **Manuscrito II:**

Tabela 1. Atividade de água (aw) média dos salames nos diferentes dias de amostragem..... 66

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO.....   | 15 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....  | 17 |
| 2.1 Produtos cárneos curados.....  | 17 |
| 2.2 Contaminação fúngica e produção de micotoxinas em alimentos.....   | 19 |
| 2.3 Fungos e micotoxinas em produtos cárneos.....  | 22 |
| 3. OBJETIVOS.....  | 27 |
| 3.1 Objetivo geral.....  | 27 |
| 3.2 Objetivos específicos.....   | 27 |
| 4. MANUSCRITO I.....   | 28 |
| Avaliação de fungos presentes no ar ambiente, matérias-primas e superfície de salames produzidos no Sul do Brasil.....       | 28 |
| 5. MANUSCRITO II.....  | 50 |
| Efeito da umidade relativa de maturação sobre a produção de ocratoxina A por <i>Aspergillus westerdijkiae</i> em salame..... | 50 |
| 6. CONCLUSÃO.....  | 69 |
| 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....   | 70 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....   | 71 |

## 1. INTRODUÇÃO

O salame é um derivado cárneo fermentado introduzido no Brasil pelos primeiros imigrantes italianos, sendo sua fabricação de grande importância para a região Sul (TERRA, 2004). Conforme a Instrução Normativa 22/2000, que aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de produtos cárneos, entende-se por salame, um produto cárneo industrializado obtido de carne suína ou suína e bovina adicionado de toucinho, ingredientes, embutido em envoltório naturais ou artificiais, fermentado, maturado, defumado ou não e dessecado. A mesma legislação considera a presença de fungos característicos, uma consequência natural do seu processo tecnológico de fabricação (BRASIL, 2000).

O crescimento de fungos e leveduras na parte exterior (sobre o envoltório) durante o período de maturação dos salames desempenhará um papel de grande relevância em relação às características sensoriais produzidas, sendo em geral, considerado um fator de qualidade. Entre os efeitos desejáveis, tem-se a formação de aroma e sabor através da oxidação do lactato, da proteólise e da lipólise, degradação de aminoácidos, diminuição da rancidez oxidativa, diminuição da migração do oxigênio e redução da penetração da luz no produto (GRAZIA et al., 1986; BRUNA et al., 2001). Dentre os efeitos indesejáveis da presença fúngica, destaca-se a possibilidade de produção de compostos antibióticos e/ou tóxicos, por algumas espécies (SAMSON et al., 2004).

Dentre as toxinas produzidas por fungos, a ocratoxina A (OTA) é a de maior incidência em produtos cárneos, onde se destacam como fungos produtores o gênero *Aspergillus* (por exemplo, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus westerdijkiae* e *Aspergillus carbonarius*), sobretudo em países de clima tropical e o gênero *Penicillium* (por exemplo, *Penicillium verrucosum* e *Penicillium nordicum*), em países de clima temperado (IACUMIN et al., 2009; RODRIGUEZ et al., 2012; MONTANHA et al., 2018). Segundo a Agência Internacional de Pesquisa de Câncer (IARC), a OTA é considerada como possível agente carcinogênico (nefrocarcinogênica) em humanos, classificada no grupo 2B, sendo também considerada hepatotóxica, imunossupressora, teratogênica e nefrotóxica (IARC, 1993).

Os fungos que se desenvolvem na superfície do salame, tradicionalmente tem origem do ambiente de processamento e maturação deste derivado cárneo (ASEFA

et al., 2010), havendo retro-alimentação, poderá ser proveniente da adição de culturas *starter* (GOICOECHEA, 2010) ou ingredientes.

Alguns estudos demonstram que o ar ambiente influencia a contaminação de vários alimentos (SALUSTIANO, 2001; MEDEIROS et al., 2012). Poeira, ventilação e ocupação, tipo de atividade exercida e estágio da atividade em que os colaboradores exercem dentro de um determinado local, podem ser considerados como fatores determinantes do nível de contaminação fúngica do ar ambiente (LUOMA e BATTERMAN, 2001). Dentre os problemas relacionados à contaminação ambiental que poderá afetar o ser humano, têm-se as alergias, infecções, sinusite, síndrome de hipersensibilidade, doenças reumáticas e outras doenças imunes, problemas psiquiátricos e respiratórios decorrentes da aspiração de fungos e micotoxinas (SCHIRMER et al., 2008; KHAN e KARUPPAYIL, 2012).

Tanto países europeus como na América Latina investigaram a contaminação superficial e também do ar ambiente das áreas de processamento de diversas indústrias (GRAZIA et al., 1986; TOSCANI et al., 2007; CASTELLARI et al., 2010; GALVALISI, 2012; PERRONE et al., 2015). Alguns destes trabalhos avaliaram também a capacidade toxigênica dos isolados provenientes de produtos cárneos, como por exemplo, o salame. No Brasil existem poucas pesquisas, onde, em geral, são descritos apenas os gêneros fúngicos e algum método de controle aplicado (LAPPE et al., 2004; BRUSTOLIN, 2009; VIEIRA et al., 2013; SANTOS et al. 2016).

Na literatura não foram encontrados trabalhos avaliando a produção e migração de ocratoxina A por *A. westerdijkiae* ao longo da maturação do salame. Diante desta necessidade, o presente trabalho se propôs a isolar e identificar fungos presentes no ar do ambiente de produção e maturação, nas matérias-primas e salames em diferentes estágios de maturação. Verificar a produção de ocratoxina A por *A. westerdijkiae* e a difusão da micotoxina no salame maturado em diferentes condições de umidades relativas.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Produtos cárneos curados

Os produtos cárneos curados são produtos não submetidos a tratamento térmicos e sua temperatura do processamento não deve ultrapassar os 37°C. Para alcançar o objetivo de conservá-los sem que haja a necessidade de aplicação de métodos complementares, os produtos cárneos curados devem sofrer uma desidratação. Durante a etapa de maturação, perderão a umidade contida no seu interior para o ambiente (PÉREZ-ÁLVAREZ et al., 1997; SHIMOKOMAKI et al., 1998), limitando a variedade de micro-organismos capazes de se multiplicar.

Acredita-se que esse processo tenha surgido há mais de 2000 anos na China (GOICOECHA, 2010). A produção industrial de derivados cárneos na Europa começou no Mediterrâneo com a utilização de pequenas fábricas, e, anos mais tarde, espalhou-se para o norte e oeste do continente europeu. Na Hungria essa técnica foi introduzida no ano de 1851, sendo dispersa nos Estados Unidos através de imigrantes da Europa Central que passaram a utilizar indústrias automatizadas de grande escala a partir do século XX (GOICOECHA, 2010). No Brasil, a técnica foi introduzida com a vinda de imigrantes europeus (TERRA, 2004) e atualmente a produção e consumo são expressivos no Sul do Brasil.

A esses produtos cárneos curados podem ser adicionadas culturas *starter*, as quais, além da padronização sensorial do produto, têm por objetivo inibir micro-organismos patogênicos, além de aumentar a vida de prateleira, sem que haja alterações na composição física do produto (LÜCKE, 2000). As culturas *starter* comercializadas para aplicação em produtos cárneos geralmente são oferecidas através de um mix de micro-organismos que irá potencializar a ação microbiana para atingir o objetivo pretendido ao término do processo. Dentre os micro-organismos mais empregados estão os gêneros *Lactobacillus* e *Pediococcus* (bactérias ácido lácticas) em associação com *Micrococcus* e *Staphylococcus* (BRUSTOLIN, 2009). No entanto, estes micro-organismos poderão afetar o desenvolvimento fúngico, incluindo a produção de micotoxinas (MEFTAH et al., 2018).

Os produtos cárneos curados podem ser classificados em dois grupos diferentes: produtos com integridade anatômica (Presunto Parma, bacon curado, presunto curado, copa, etc.) e produtos picados e embutidos (salame, salaminho, salame tipo Alemão, tipo Hamburguês, etc.) (BRASIL, 2000; HUI et al., 2012).

Em virtude da importância para este trabalho, será discutido com maior detalhamento o salame.

### 2.1.1 Salame: definição e processamento

Segundo a IN nº 22, de 31 de julho de 2000, salame é um produto cárneo industrializado obtido de carne suína ou suína e bovina adicionado de toucinho, ingredientes, embutido em envoltório naturais ou artificiais, fermentado, maturado, defumado ou não e dessecado (BRASIL, 2000).

Tecnologicamente, após o preparo, a matéria-prima é moída em granulometria desejada. A carne deve estar à temperatura de -1 °C e o toucinho à -7 °C, pois em temperaturas altas pode ocorrer a formação de uma “pseudo-emulsão” que pode permanecer, após o embutimento, entre a carne preparada e a tripa prejudicando a desidratação e aparência do produto final (TERRA, 2004). Posteriormente a isso, serão acrescentados aditivos e condimentos. Essa massa então é embutida em tripa natural ou de colágeno. Após o embutimento, o processo da produção seguirá em uma câmara de maturação com controle da temperatura (entre 18 °C e 26 °C), velocidade do ar (0,4 m/s por 2 a 4 dias) e umidade (85% a 90%) (LÜCKE, 1998; LÜCKE, 2000).

As transformações ocorridas durante a maturação do salame podem ser divididas em duas fases. Na primeira fase, durante os sete primeiros dias após o embutimento, acontece acidificação e a formação de cor. Nesta fase fermentativa, os carboidratos presentes serão metabolizados pelas bactérias ácido lácticas presentes, causando uma redução do pH, provocando a inibição das bactérias Gram negativas, dando espaço para as Gram positivas no interior do embutido (gêneros *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* e *Bacillus*) e fungos no exterior do embutido (*Penicillium* sp. e leveduras). As proteínas miofibrilares coagularão em função do acúmulo de ácidos e estabilizarão a emulsão que atingirá o ponto isoelétrico da proteína e, por conseguinte, diminuirá a capacidade de reter água (ORDÓÑEZ et al., 2005). Esta desidratação sofrida pelo produto determinará o início da segunda fase ou a maturação propriamente dita. Nesta fase os sabores e aromas de produto curado serão acentuados (ORDÓÑEZ et al., 2005). Ao final das duas fases de maturação o produto deverá apresentar pH entre 5,2 e 5,4 (FERNÁNDEZ et al., 2001).

A vida útil de um salame é maior se comparado com a de uma carne fresca, isso se relaciona à inibição sofrida por micro-organismos patogênicos e deteriorantes durante a fermentação e maturação do produto, devido aos valores reduzidos de pH e atividade de água, além da produção de compostos com ação antimicrobiana (ácidos orgânicos e bacteriocinas), permitindo sua conservação à temperatura ambiente (FERNÁNDEZ et al., 2001; HUGAS e MONFORT, 1997). O crescimento de fungos na superfície do salame ocorre em ambas às fases, mas se torna mais evidenciado na etapa de maturação. Os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* são os predominantes e contribuem para a formação das características sensoriais do embutido. Esse recobrimento da superfície é, em geral, considerado positivo, pois ajudará no controle da incidência de luz e oxigênio, além de atuar cataliticamente na rancificação da gordura. Quando houver um recobrimento excessivo de fungos, poderão surgir problemas no aroma e sabor devido à ação exagerada de enzimas proteolíticas e lipolíticas (TERRA, 2004).

## **2.2 Contaminação fúngica e produção de micotoxinas em alimentos**

Sabe-se que os fungos são habitantes universais do solo, água e ar podendo chegar ao alimento como deteriorantes ou até mesmo como produtores de micotoxinas, metabólitos esses, que ao serem ingeridos causarão enfermidades graves ao consumidor (TANIWAKI e SILVA, 2001).

Segundo Samson e Frisvad (2004), fungos e bactérias quando se desenvolvem em alimentos poderão provocar sua deterioração, ocasionando perdas econômicas no setor produtivo, além de representarem um perigo para a saúde do consumidor quando ingeridos.

### **2.2.1 Fontes de contaminação fúngica**

Diversos estudos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de apontar fatores predisponentes à contaminação de alimentos por fungos durante seu preparo ou industrialização. A atividade de água do produto final e temperatura de processamento e armazenamento são os principais fatores que definirão o crescimento fúngico em produtos cárneos, mas a qualidade da matéria-prima e do ar

ambiente tem sido mencionada como fator primordial para a instalação microbiana, ou seja, fontes de contaminação (PITT e HOCKING, 2009).

O requerimento de água para o crescimento fúngico irá depender do gênero e espécie. Em uma atividade de água de 0,95-0,99 o crescimento fúngico é favorecido desde que não haja competidores bacterianos. Em 0,65-0,90 fungos xerofílicos são favorecidos enquanto que em 0,88-0,99 leveduras se sobressairão (LEONG et al., 2011).

Referente à temperatura de armazenamento, os fungos possuem uma ótima temperatura de desenvolvimento em torno de 25° C. Abaixo dessa temperatura não há a completa inibição de crescimento, apenas um aumento no tempo de geração (HOANG et al., 2010).

A contagem inicial de fungos em um substrato alimentício influencia o tempo até a deterioração do produto, sendo este mais curto quanto maior for o número de micro-organismos em alimentos conservados sob as mesmas condições (BURGAIN et al., 2013).

Em relação à qualidade do ar ambiente, esta dependerá de diversos fatores, dentre eles a umidade relativa e ventilação. Quando a umidade relativa do ar se apresentar com altos valores, haverá transferência de água para o produto (RAO et al., 2016), o que favorecerá o desenvolvimento de micro-organismos que serão responsáveis por fazer a emissão de células, fragmentos, compostos voláteis e também esporos para o ar ambiente. (AGÊNCIA PORTUGUESA DO AMBIENTE, 2009; TERRA, 1998). Sodré (2006) afirma que em ambientes fechados, a contaminação pode ser proveniente de infiltrações ou também da má conservação do sistema de ventilação.

O Brasil possui a legislação nº 09, de 16 de janeiro de 2003 que apresenta padrões referentes à qualidade do ar interior em ambientes climatizados e de uso público e coletivo. Nesta norma apresenta-se o valor máximo recomendado em Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por m<sup>3</sup> de fungos (Valor Médio Recomendável -VMR- 750 UFC/m<sup>3</sup>). Nessa resolução ainda possui uma relação I/E<1,5, sendo "I" a quantidade de fungos no ambiente interior e "E" em ambiente exterior. Nesta, o VMR não deve ultrapassar do limite estipulado, caso contrário, deverá ser feito um diagnóstico e subsequentemente uma ação corretiva deverá ser adotada. Nesta norma ainda consta que não devem ser encontrados fungos patogênicos e toxigênicos.

Ainda não existe uma legislação que estabeleça parâmetros de qualidade do ar em indústrias de alimentos. Pensando nisso, Al-Dagal e Fung (1993) publicaram alguns estudos relacionados com testes rápidos de análise e qualidade microbiológica do ar ambiente de áreas processadoras de alimentos surgindo assim a Escala Fung. Essa escala estabelece limites em Unidades Formadores de Colônia (UFC) tanto para alimentos líquidos, quanto para sólidos, em superfície e no ar ambiente. Quando se refere ao ar ambiente, a escala possui três classes, sendo satisfatório, aceitável e insatisfatório (Quadro 1) podendo ser empregado tanto para fungos quanto para bactérias (AL-DAGAL e FUNG, 1993; FUNG, 2008).

Quadro 1: Escala Fung, relativa à contaminação fúngica no ar do ambiente de indústria alimentícias.

| <b>Valores</b>               | <b>Classificação e recomendação</b> |
|------------------------------|-------------------------------------|
| 0 a 100 UFC/m <sup>3</sup>   | Ar limpo / nenhuma preocupação      |
| 100 a 300 UFC/m <sup>3</sup> | Ar aceitável / ligeira preocupação  |
| > 300 UFC/m <sup>3</sup>     | Não aceitável / ações corretivas    |

Adaptado de: Al-Dagal e Fung, 1993.

A higienização do ar ambiente é, portanto um fator que deve ser levado a sério. Existem várias alternativas para redução da contaminação do ar em indústrias, mas devido à alta complexidade da indústria alimentícia, cada caso deve ser observado cuidadosamente para decidir sobre a metodologia mais adequada para ser empregada (SALUSTIANO, 2001). De modo geral, a desinfecção química do ar ambiente requer agentes germicidas que consigam fácil ingresso aos bioaerossóis, com isso aqueles em forma de gás ou névoa fina são os mais seguros (WILSON, 1958).

Para que o controle fúngico seja eficiente, deve-se saber a natureza da sujidade que se deseja remover e o método que será empregado para a remoção, sempre levando em consideração qual a forma que será realizada a avaliação da eficiência do método empregado (TELLES, 2011). Além disso, é importante que o agente sanitizante tenha um princípio ativo que seja eficiente contra os fungos

problemas de cada indústria alimentícia (<sup>1</sup>BERNARDI et al., 2018; <sup>2</sup>BERNARDI et al., 2018).

### 2.3 Fungos e micotoxinas em produtos cárneos

O desenvolvimento de fungos em superfícies de produtos cárneos é tido de certa maneira como inevitável, sendo o crescimento de algumas espécies considerado como um aspecto de qualidade durante o processo de maturação e secagem. Eles auxiliam na formação de aroma e sabor quando as condições das áreas de produção e da câmara de maturação forem adequadas, caso contrário, poderá favorecer uma microbiota indesejável (BRUSTOLIN, 2009). Nos produtos cárneos curados, os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são os mais isolados quando comparados com outros gêneros (LARSEN et al., 2001).

As alterações positivas, incrementadas pelo desenvolvimento de bolores desejados, sobretudo *P. nalgiovense*, são: o sabor típico mediado por oxidação do lactato, proteólise, degradação de aminoácidos, lipólise (GRAZIA et al., 1986; LEISTNER, 1984; LUCKE, 1998), a proteção contra colonizações espontâneas de bolores não desejáveis e bactérias (LUCKE e HECHELMANN, 1987), o retardamento da rancificação e estabilização da cor por atividade de catalases, o consumo de oxigênio e proteção contra luz (BACUS, 1986; BRUNA et al., 2001; LUCKE e HECHELMANN, 1987), perda de água uniforme devido à evaporação de água mais lenta (LUCKE, 1998) e facilidade na retirada da tripa (GRAZIA et al., 1986). A cobertura com bolores deve ser uniforme, esbranquiçada ou acinzentada, e isenta de manchas esverdeadas, marrons ou negras.

Por outro lado, dentre a biota indesejável, tem-se os fungos deteriorantes não micotoxigênicos e as espécies micotoxigênicas capazes de produzir, por exemplo, ocratoxina A (OTA) em derivados cárneos quando em condições favoráveis de ambiente e substrato. Nesta descrição, destacam-se as espécies o *Aspergillus ochraceus* e espécies relacionadas como *A. westerdijkiae*, *Penicillium nordicum* e *P. verrucosum* (IACUMIN et al., 2009). Em países de clima tropical, a ocorrência de *P. verrucosum* e *P. nordicum* é incomum, e a presença de OTA em alimentos se deve principalmente ao desenvolvimento de *A. ochraceus* e espécies correlatas como *A.*

*westerdijkae*, *A. carbonarius* e *A. niger*, não sendo frequente a presença de OTA em cereais utilizados para ração animal (MARQUES, 2006).

Já em países de clima temperado frequentemente os cereais, são contaminados com OTA. Com isso, durante a produção de rações animais, a OTA poderá ser introduzida através desses cereais utilizados nas formulações e permanecerá estável durante o processamento. A ingestão pelos suínos de rações contaminadas também é considerada uma fonte de OTA e, como consequência, haverá a contaminação dos derivados cárneos (GUILLAMONT et al., 2003).

Segundo Van der Merwe et al. (1965), a OTA possui uma meia vida longa devido a sua fácil ligação com as proteínas plasmáticas, sua circulação enterohepática e posterior reabsorção renal. Devido a sua alta estabilidade em alimentos contaminados e armazenados, 45% da OTA pode ser recuperada de amostras previamente contaminadas após três meses de armazenamento (TRENK et al. 1971).

A OTA possui um maior risco para humanos apresentando uma meia vida de 35 dias quando comparado com algumas outras espécies, onde para ratos é de 55-120 horas, para porco é de 72-120 horas e para macacos a meia vida encontra-se em 510 horas (O`BRIEN et al., 2001).

O Brasil possui a resolução nº 7 de 18 de fevereiro de 2011 regulamentada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA que dispõem sobre os Limites Máximos Tolerados (LMT) para micotoxinas em alguns alimentos, porém os produtos cárneos e seus derivados não estão contemplados. Na Comunidade europeia não está estipulado LMT de OTA em carnes e produtos derivados cárneos, porém a legislação italiana estabelece 1 µg/kg de OTA como LMT para carnes de porco e derivados e na Dinamarca o máximo tolerado para rins de suínos é de 25 µg/kg.

### **2.3.1 Efeito de culturas *starter* no controle de fungos em produtos cárneos**

Uma das maneiras de se prevenir o desenvolvimento de fungos toxigênicos em embutidos cárneos fermentados é a utilização de culturas *starter*, seja na massa cárnea ou na superfície do envoltório. A adição de culturas fúngicas como *starter* surgiu no ano de 1830, quando dois açougueiros da Hungria utilizaram fungos em linguiças fermentadas. A inoculação fúngica na superfície de linguiças era feita com

os próprios fungos presentes nos locais de maturação (“*houseflora*”) (LEISTNER, 1986). A variedade dos fungos que compõem a “*houseflora*” varia, principalmente, de acordo com o local onde é processado o embutido e as condições climáticas (LEISTNER, 1986).

Meftah et al. (2018) testaram *in vitro* o efeito de uma cultura *starter* comercial (*Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus sakei*, *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus xylosus* e *Debaryomyces hansenii*) e duas leveduras (*Candida zeylanoides* e *Rhodotorula mucilaginosa*) sobre o crescimento de fungos produtores de OTA (*Penicillium nordicum* e *Aspergillus westerdijkiae*) bem como a produção da mesma em um meio a base de carne. *P. nordicum* conseguiu produzir OTA em presunto. *C. zeylanoides* conseguiu reduzir a produção de OTA quando comparada com as outras culturas inoculadas no meio. Para *A. westerdijkiae* houve estimulação na produção de OTA através das culturas inoculadas quando comparado com o controle, principalmente pela cultura *starter* comercial.

Outros trabalhos focaram no estudo da microbiota de salames, na busca de espécies de fungos filamentosos capazes de imprimir características sensoriais agradáveis e com potencial para competir com espécies indesejáveis e assim possibilitar seu emprego como culturas *starter* na superfície de embutidos cárneos.

Em 1986, Grazia et al. realizaram suas pesquisas com indústrias que produziam salame em pequena e grande escala isolando as cepas fúngicas presentes. Verificou-se que os fungos geralmente encontrados em salames são altamente toxigênicos, e *P. verrucosum* var. *cyclopium* foi encontrado com maior facilidade em indústrias de pequena escala e *Aspergillus candidus* em indústrias de grande porte. Com isso, recomendaram a utilização de culturas em salame para evitar o crescimento de uma microbiota indesejável visando assim uma melhora no produto e evitando a contaminação por micotoxinas.

Castro et al. (2000) utilizaram cepas de *P. nalgiovense* como cultura *starter* em salames defumados, observando que quando este fungo era adicionado durante a produção, mostrou-se capaz de fazer o biocontrole de fungos filamentosos presentes em câmaras de maturação de salames tendo um desenvolvimento acelerado e recobrindo a maior parte da peça. O *P. nalgiovense* promoveu ainda um pequeno aumento de ácidos graxos livres e nitrogênio não proteico, sem percepção de diferença em relação a aspectos organolépticos quando comparado com salames sem inoculação.

Bruna et al. (2001) adicionou cepas de *Penicillium aurantiogriseum* em salames para verificar a produção de voláteis em relação a aceitação sensorial. Foi verificado níveis maiores de produtos de oxidação lipídica em salames com adição de extrato do fungo pesquisado além de produção de aldeídos, alcoóis ramificados e ésteres em salames com inoculação superficial de extrato fúngico. Em relação ao atributo sensorial foi verificado que os dois tratamentos receberam notas mais altas em todas as propriedades avaliadas mostrando que *P. aurantiogriseum* possui eficácia em combinação aos tratamentos. Porém deve-se ter cautela no uso desta espécie, visto que podem produzir algumas micotoxinas, como ácido penicílico e verrucosidina (FRISVAD e SAMSON, 2004).

No ano de 2009, Iacumin investigou a contaminação fúngica e presença de OTA na superfície de salames artesanais e industriais do norte da Itália. As espécies fúngicas mais presentes foram: *Penicillium nalgiovense*, *P. oxalicum*, *Aspergillus montevicensis* (*Eurotium amstelodami*), *P. olsonii*, *P. chrysogenum*, *P. verrucosum*, *P. viridicatum* e *Eupenicillium crustaceum* sendo que em um lote houve presença de *A. ochraceus*. Em torno de 45% das amostras apresentaram ocratoxina A (mínima de 3 e máxima 18 µg/kg). Quando esses salames passaram por uma lavagem e esfregação antes de irem para o consumidor final, a concentração de ocratoxina foi reduzida para baixo do limite de detecção. Dessa forma, concluiu-se que a presença de ocratoxina em tripa de salame não seria um indicativo de risco para saúde do consumidor, visto que a mesma aparentemente não se dissemina pela carne.

Em 2010, Sonjak et al. analisou a microbiota superficial de três produtos cárneos curados (pescoço suíno curado, presunto defumado e seco e salame) provenientes da Eslovênia durante as fases de maturação. *Penicillium* foi o gênero mais predominante aonde 8 espécies foram identificadas. Já *Aspergillus* spp. *Aspergillus versicolor* e *Cladosporium* spp. foram recuperados em apenas dois dos produtos. *P. nalgiovense* apareceu com menor frequência quando comparado com *P. nordicum*, com maior frequência. Ainda foram identificados 5 outros gêneros possivelmente produtores de micotoxinas (*A. versicolor*, *P. brevicompactum*, *P. chrysogenum*, *P. nordicum* e *P. polonicum*).

Na América do Sul, Goicoechea (2010) caracterizou a microbiota da superfície de salame produzidas em Balcarce, Argentina em duas estações do ano além de medir a capacidade toxigênica das cepas. Foram isolado cinco gêneros de fungos filamentosos: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Eupenicillium*, *Eurotium*, *Mucor*; e também

duas leveduras: *Candida* e *Debaryomyces*. Em relação à produção de micotoxinas, tanto no outono quanto no inverno *P. verrucosum* (maior frequência) e *A. flavus* produziram toxinas sendo que 27% dos isolados de *P. verrucosum* no outono e 72% no inverno produziram OTA.

Em seu trabalho, Galvalisi et al. (2012) isolou e identificou espécies de *Penicillium* em salames italianos produzidos no Uruguai e avaliou a capacidade de utilização como culturas iniciadoras. Os autores verificaram que todas as espécies isoladas que o *P. expansum* e *P. griseofulvum* produziram patulina e ácido ciclopiazônico, respectivamente. Já *P. nalgiovense*, *P. minioluteum*, *P. brevicompactum* e *P. puberulum* não produziram nenhuma toxina dentre as avaliadas, sendo uma possibilidade seu uso como culturas no fabrico de salames.

No Brasil as pesquisas realizadas são basicamente focadas na avaliação de métodos para o controle do desenvolvimento fúngico em salames (LAPPE et al., 2004; BRUSTOLIN, 2009; VIEIRA et al., 2013; SANTOS et al., 2016), havendo limitação de informações quanto as espécies presentes na superfície destes produtos, bem como no ar de produção. Também há uma lacuna internacional quanto a estudos para avaliar tanto a produção *in situ* de ocratoxina A por *A. westerdijkiae* quanto sua migração do envoltório ao interior do produto ao longo da maturação do salame.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Identificar os fungos presentes nas matérias-primas, no ar ambiente e na superfície de salames ao longo de sua maturação em duas indústrias de Santa Maria-RS e avaliar a produção de ocratoxina A por *Aspergillus westerdijkiae* inoculados na superfície e sua difusão em salames mantidos sob diferentes umidades relativas.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Quantificar, isolar e identificar fungos presentes nas matérias-primas utilizadas para a fabricação salames e na superfície deste ao longo de sua maturação;
- Quantificar, isolar e identificar fungos presentes no ar da área de processamento e câmara de maturação durante a produção de salames;
- Verificar a influência da umidade relativa sobre a produção de ocratoxina A por *Aspergillus westerdijkiae* inoculado na superfície de salames e sua migração no produto ao longo do tempo quando mantidos em umidades relativas de 95% - 75% (decrecente), 79%, 85% e 85% (constante).

#### **4. MANUSCRITO I**

**Avaliação de fungos presentes no ar ambiente, matérias-primas e superfície de salames produzidos no Sul do Brasil**

Manuscrito submetido à revista FOOD RESEARCH INTERNATIONAL.

## Evaluation of fungi present in ambient air, raw materials and surface of salami produced in southern Brazil

### Highlights

- A microbiota fúngica de salame, matérias-primas e ar ambiente das instalações foi avaliada;
- A superfície dos salames e o ar ambiente apresentaram alta contaminação fúngica;
- *Cladosporium*, *Penicillium* e *Aspergillus* foram os gêneros mais comumente encontrados;
- *A. westerdijkiae* ocratoxigênico estava presente no ar e em produtos da indústria B.

## Resumo

A presença de fungos na superfície de produtos cárneos pode ser considerada normal, e até um fator de qualidade, uma vez que as espécies presentes não sejam capazes de produzir micotoxinas ou antibióticos, apenas incrementando características sensoriais típicas de um produto curado. O objetivo deste trabalho foi avaliar os fungos presentes nas matérias-primas, na superfície de salames e no ar ambiente das áreas de produção e maturação. As amostras foram coletadas em duas indústrias (A e B) localizadas em Santa Maria, RS, aos 0, 7 e 14 dias de maturação, em dois períodos. Com exceção de algumas especiarias, as matérias-primas apresentaram baixa contaminação em ambas as indústrias. Nos salames houve ampla diversidade fúngica, com destaque para espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*. A contaminação do ar foi elevada em ambas as indústrias, sendo incontáveis ( $>10^4$  UFC/ m<sup>3</sup>) em 2/14 das coletas na indústria A e 8/14 na indústria B. Na indústria B houve presença de *Aspergillus westerdijkiae*, espécie produtora de ocratoxina A e problemática para a indústria cárnea, tanto nos salames quanto no ar ambiente nos dois períodos de coleta. Cerca de metade das espécies presentes no ar também foram isoladas dos salames. A retroalimentação do sistema (ar-salame-ar) pode ser responsável pela manutenção tanto de espécies desejáveis, quanto indesejáveis em uma determinada fábrica de salames. Visto que *A. westerdijkiae* não foi isolado de matérias-primas, a higienização do ambiente (com ausência de salames em maturação no ambiente) seria fundamental para sua eliminação e assim prevenir a contaminação de novos lotes. Com base nas observações deste trabalho, ar ambiente pode ser considerado um ponto crítico quando se refere à contaminação e propagação de fungos em áreas de processamento de alimentos.

**Palavras-chave:** *Aspergillus westerdijkiae*; Salame; Fungos no ar; Diversidade fúngica; Fungo ocratoxigênico.

## 1. Introdução

O salame do tipo italiano é um derivado cárneo produzido com carne suína e/ou bovina, com adição de toucinho, embutido em envoltório natural ou artificial, posteriormente fermentado, maturado e dessecado (BRASIL, 2000). Esse produto cárneo foi introduzido no Brasil juntamente com a vinda de imigrantes italianos que se instalaram principalmente na região Sul do país, e desde então a produção de salame apresenta um segmento de relevância para a indústria cárnea (CASTRO et al., 2000).

Durante a maturação do salame poderá haver a formação de uma camada de fungos filamentosos e leveduras na parte exterior, sendo considerada por alguns como um fator de qualidade, visto que algumas espécies atribuem características de aroma e sabor ao produto curado (BRUNA et al., 2001). Contudo, dependendo das espécies que se desenvolverem, a formação desta camada fúngica poderá acarretar efeitos indesejáveis, como produção de antibióticos e/ou micotoxinas, ambos representando perigo à saúde do consumidor (LARSEN et al., 2001).

A microbiota que se desenvolve na superfície de produtos cárneos fermentados pode ser influenciada por diversos fatores como nível de contaminação e diversidade de espécies presentes na matéria-prima e com a qualidade do ar ambiente onde é realizada a produção e a maturação do produto (PITT, 2004).

Trabalhos indicam o ar como importante fonte de contaminação fúngica em alimentos processados (SAMSON et al., 2004; BATTILANI et al., 2007; SØRENSEN et al., 2008; ASEFA et al., 2010). Segundo a Organização Mundial da Saúde, mais da metade dos ambientes de produção de alimentos possuem a qualidade do ar precária devido à má higienização de equipamentos de ar condicionado e a falta de supervisão periódica para identificação de possíveis focos que estão contaminando o mesmo (WHO, 1984).

Dentre os fungos presentes na superfície dos salames geralmente tem-se a predominância de *Penicillium* sp. (*Penicillium brevicompactum*, *P. glabrum*, *P. griseofulvum*, *P. nalgiovense*, *P. verrucosum*, dentre outros) dos quais muitos são benéficos, ajudando no processo de cura através da produção de odor característico de produto curado enquanto que outros apresentam a capacidade de produção de micotoxinas, como é o caso do *P. brevicompactum*, *P. griseofulvum* e *P. verrucosum* (Grazia et al., 1985; Galvalisi et al., 2012). Quando em ambiente propício, estas

espécies poderão produzir ácido micofenólico, ácido ciclopiazônico e ocratoxina A, respectivamente (Iacumin et al., 2009; Ndagijimana et al., 2008).

Não foram encontrados trabalhos avaliando a presença e diversidade de fungos na superfície de salames e no ar do ambiente de maturação no Brasil, sendo os dados disponíveis na literatura concentrados em países de clima temperado. Com isso, objetivou-se investigar os fungos filamentosos que se desenvolvem na superfície de salames e encontram-se dispersos no ar ambiente da área de produção e da sala de maturação em duas indústrias processadoras localizadas no Sul do Brasil.

## **2. Materiais e métodos**

A amostragem dos salames foi realizada em Santa Maria, RS, em dois períodos (nov / 2016 e mar / 2017, ago / 2017 e nov / 2017), em duas indústrias (A e B). Ambas as empresas apresentaram desenvolvimento de fungos na superfície de salame.

Foram coletadas amostras de matérias-primas utilizadas para produção dos salames [pimenta preta (2 amostras), alho (4 amostras), noz moscada (1 amostra), mix de condimentos e conservantes (2 amostras), envoltórios (4 amostras) e carne (4 amostras)], ar do ambiente da área de produção e da câmara de maturação, além de 60 salames (aos 0, 7 e 14 dias de maturação). As amostras coletadas foram conduzidas ao Laboratório de Micologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria e mantidas sob refrigeração até o momento da análise, feita no mesmo dia da coleta.

### **2.1 Análise das matérias-primas**

Assepticamente, pesou-se 10 gramas de cada amostra em um recipiente asséptico, adicionou-se 90 mL de água peptonada a 0,1% e então se fez a homogeneização em Smasher (Biomérieux®) seguindo por diluições seriadas. Retirou-se uma alíquota de 100 µL e inoculou-se, em duplicata, na superfície de placas de Petri contendo Ágar Dicloran Glicerol 18% com cloranfenicol (DG18). As placas foram incubadas em estufa à 25 °C por 7 dias para crescimento fúngico.

## 2.2 Análise dos salames

Para análise dos salames utilizou-se a técnica do esfregação com *swab* na superfície da amostra, em uma área delimitada de 25 cm<sup>2</sup>. Umedeceu-se o *swab* estéril em água peptonada à 0,1%, estéril, e esfregou-se o mesmo dentro da área a ser amostrada, homogeneizou-se o mesmo em tubo contendo 9 mL em água peptonada à 0,1%, estéril, realizando-se diluições seriadas na sequência. Retirou-se uma alíquota de 100 µL e inoculou-se, em duplicata, na superfície de placas de Petri contendo DG18. As placas foram incubadas em estufa a 25°C por 7 dias para posterior contagem e isolamento fúngico.

## 2.3 Análise do ar ambiente

Para amostragem do ar ambiente da área de produção e dentro da câmara de maturação utilizou-se um amostrador de ar do tipo Andersen, Samplair (Biomérieux®) onde se acondicionou uma placa de Petri contendo meio DG18. A amostragem de ar foi feita em duplicata e a quantidade de ar aspirada foi de 50 litros (média de 30 segundos de exposição).

As placas foram incubadas em estufa a 25°C por 7 dias para enumeração fúngica. Após esse período, realizou-se a contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) e calculou-se a média da duplicata amostrada (n) bem como a identificação dos gêneros predominantes.

Para expressar o resultado, utilizou-se um fator de correção descrito no manual do equipamento. Substituiu-se o "n" por um número equivalente a "N" (apresentado na tabela que acompanha o equipamento). Calculou-se o volume (V onde  $V = \text{duração da amostragem} \times 0,1\text{m}^3$ ) e por fim, aplicou-se a fórmula apresentada pelo equipamento:

$$\text{Nível de contaminação do ar} = \frac{N}{V}$$

Onde, N: número correspondente à contagem "n"

V: volume

Foi realizada ainda a amostragem do ar de fora da indústria para fins de comparação seguindo a mesma técnica e incubação.

## 2.4 Isolamento e identificação de fungos filamentosos

Após a incubação, as colônias foram isoladas em meio Czapeck Yeast Extract Agar (CYA) e identificadas de acordo com as recomendações para cada gênero. A identificação de *Aspergillus* spp. seguido Klich e Pitt (1988) e *Aspergillus* da seção Circumdati foram identificados segundo Frisvad et al. (2004). Manuais de identificação propostos por Pitt (2000) e Frisvad e Samson (2004) foram utilizados para identificação de *Penicillium* sp.

Resumidamente, os fungos foram inoculados em três pontos em diferentes meios de cultura e, após um período de cultivo em diferentes temperaturas (5, 25 e 37°C), a identificação dos diferentes fungos foram realizadas macroscópica (diâmetro da colônia, cor, exsudato, produção de pigmentos) e exame microscópico (morfologia e tamanho), seguindo os esquemas propostos em cada chave.

## 3. Resultados

### 3.1 Matérias-primas

Em geral a microbiota dominante dos ingredientes é composta por leveduras, *Cladosporium* sp. e fungos xerofílicos. Os fungos isolados das matérias-primas das 2 indústrias estudadas podem ser visualizados na Tabela 1. Foram identificados apenas 4 gêneros de fungos filamentosos: *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* e *Wallemia*.

As maiores contagens fúngicas das matérias-primas foram encontradas nas especiarias. As amostras de especiarias (pimenta preta e noz moscada) apresentaram espécies xerofílicas de *Aspergillus* e *Wallemia* o que não foi observado mix de especiarias. A pimenta preta foi a que apresentou maior contaminação (média de  $1,75 \times 10^4$  UFC/g).

### 3.2 Análise de ar ambiente

Nas Figuras 1A e 1B pode-se observar a diversidade fúngica no ar da indústria A. A figura 1C mostra números incontáveis de colônias sugestivas de *Cladosporium* sp. (sombra verde escura) da indústria B na área de produção e na figura 1D presença de muitas colônias fúngicas sugestivas de *A. westerdijkiae* (sombra amarelo/ocre) recuperadas do ar ambiente da indústria B no primeiro período de amostragem, bem como o predomínio de colônias sugestivas de *Penicillium* sp. (sombra cinza) na área de maturação.

Nas Figuras 2 e 3 observa-se que o número de fungos presentes no ar foi superior ao limite máximo quantificável pelo amostrador de ar ( $10^4$  UFC/m<sup>3</sup>) em 2/14 coletas realizadas na indústria A, enquanto isso, ocorreu em 8/14 amostragens de ar da indústria B.

Quanto à diversidade de fungos filamentosos nas amostragens de ar ambiente, na indústria A foram identificados 7 gêneros e 22 espécies, enquanto na B foram identificados 6 gêneros e 10 espécies.

*Cladosporium* foi o gênero predominante tanto no ar do ambiente interno quanto externo, em ambas as indústrias avaliadas, na maioria das amostragens realizadas, incluindo as incontáveis.

Confirmou-se a presença de *A. westerdijkiae* no ar do ambiente interno nos três dias de coleta no 1º período na indústria B, tanto na câmara de maturação quanto na área de produção. No segundo período de coleta, *A. westerdijkiae* apenas foi detectado no ar da câmara de maturação no 14º dia, ainda que em baixas quantidade.

### 3.3 Análise dos salames

Para os salames da indústria A foram identificados um total de 5 gêneros e 15 espécies fúngicas; enquanto que para a indústria B foram identificados 5 gêneros e 10 espécies distintas (Tabelas 2 e 3).

Na primeira coleta de amostras da indústria A, *Cladosporium* sp. e *Penicillium glabrum* foram recuperados de todas as superfícies de salames avaliadas. Para esta indústria, a diversidade de fungos, tanto em espécies de *Aspergillus* quanto em *Penicillium*, foi maior no final do período de maturação dos salames na primeira amostragem, se comparada à segunda. O oposto foi observado em relação às contagens de fungos. Isso poderia estar relacionado a um novo procedimento adotado, onde a indústria A começou a borrifar uma solução de 10% de sorbato de potássio na superfície dos salames após 3 dias de maturação para controlar o crescimento de fungos. Reduziu a diversidade de fungos na segunda coleta de amostras, no entanto, as contagens totais aumentaram.

No segundo período de amostragem dos salames na indústria A verificou-se que as contagens fúngicas obtiveram um aumento, em contrapartida, houve diminuição da diversidade da microbiota. Leveduras e *Cladosporium* sp. apareceram em todos os dias de coleta. No dia 7 *P. brevicompactum* (60%), *P. polonicum* (20%)

e *P. spinulosum* (80%) estavam presentes sendo que *P. spinulosum* se fez presente em menor frequência de ocorrência no 14º dia de coleta (20%).

Na indústria B no segundo período de análise *Cladosporium* sp., leveduras e *P. griseofulvum* estavam presentes em 100% das amostras nas três coletas.

*P. viridicatum* se fez presente nos dias 7 e 14 (80% e 20%, respectivamente). *A. westerdijkiae* estava presente em 20% dos salames ao final da maturação, demonstrando que o processo de higienização do local de maturação não foi suficiente para a completa eliminação de fungos potencialmente toxigênicos da indústria B.

#### 4. Discussão

Intensa presença fúngica, sobretudo composta por espécies xerofílicas, tem sido relatada em especiarias. Os resultados micológicos obtidos com amostra de pimenta preta foram semelhantes ao reportado por GARCIA (2018) em avaliação de especiarias, no qual este produto foi o mais contaminado entre todas analisadas (média de  $7,35 \times 10^5$  UFC/g).

Em relação à noz moscada, DHARMAPUTRA et al. (2015) verificou presença de *Aspergillus niger* e *Endomyces fibuliger* em amostras coletadas de agricultores, enquanto que para grãos armazenados o fungo dominante foi *A. pseudoglaucus* seguido de *A. chevalieri* onde esse fez-se presente nesta pesquisa.

A frequente presença de *Cladosporium* sp. e leveduras em alimentos, muitas vezes decorrentes de contaminação do ar, tem sido relatada por autores. Soudaleff (2016) encontrou *Cladosporium* sp. e leveduras, em trabalho sobre identificação de fungos anemófilos, em 100% das amostras de ar analisadas, similar aos resultados de avaliação de ar nos ambientes de produção e maturação de salame desta pesquisa.

*Cladosporium* sp. é considerado um dos gêneros aéreos mais frequentes em ambientes internos e externos em todo o mundo (Samson et al., 2004), isso pode ser explicado pela facilidade de disseminação pelo vento, consequência atribuída ao tamanho dos conídios (2 a 4 µm) (Pasanen et al., 1991). É também bastante frequente no ambiente de processamento de produtos cárneos (Leistner e Ayres, 1967; Racovita et al., 1969; Grazia et al., 1986; Kaur et al., 1992; Andersen, 1995; Mizáková et al., 2002; Sørensen et al., 2008). No passado, esse fungo esteve relacionado com a ocorrência da coloração negra na superfície de presuntos

curados (Leistner e Ayres, 1967; Racovita et al., 1969). Apesar desses relatos de *Cladosporium* sp. como fungo de deterioração, a presença deste gênero pode ser benéfica em certas situações. O *Cladosporium* é considerado como GRAS (Generally Regarded as Safe) e tem sido investigado como agente de controle biológico de fungos fitopatogênicos em pinus (Moricca et al., 2001) e café (Chalfoun et al., 2007), e com ação promissora na inibição de espécies toxigênicas (Angélico, 2012). *Cladosporium cladosporioides* foi capaz de germinar e se desenvolver normalmente, retardando o início da germinação dos conídios de *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger* e *Fusarium verticillioides*, isolados de café, por até 20 dias em teste de competição *in vitro* (Angélico, 2012).

Se essa dinâmica também for válida em embutidos cárneos, sua presença poderia inibir a colonização dos produtos por espécies indesejadas, em especial o fungo ocratoxigênico *A. westerdijkiae*. Esse fungo pode ser facilmente confundido com *A. ochraceus* e outros da sessão Circumdati devido as características da colônia serem muito parecidas, sendo que muitos fungos anteriormente identificados como *A. ochraceus* na realidade tratam-se de *A. westerdijkiae* (Frisvad et al., 2004).

*A. westerdijkiae* é considerado um dos principais fungos produtores de ocratoxina A em diferentes alimentos (Frisvad et al., 2004; Pitt & Hocking, 2009). Recentemente foi relatado como produtor desta micotoxina em presunto curado (Vipotnik, Rodríguez e Rodrigues, 2017).

Uma vez que a presença de *A. westerdijkiae* representa um perigo no que concerne à produção de ocratoxina A, considerada a micotoxina de maior relevância em produtos cárneos, recomendou-se que fosse feita uma cuidadosa higienização do ambiente de produção e maturação da indústria B. Os proprietários optaram pela sanitização com hipoclorito de sódio, incluindo aplicação de agente de difusão aérea baseado em ortofenilfenol. Acredita-se que este procedimento tenha influenciado os resultados da segunda amostragem de ar desta indústria.

A presença frequente de *Penicillium* spp. em áreas que processam alimentos cárneos foi relatada por Sørensen et al. (2008). Estes pesquisadores observaram que *Penicillium* foi o gênero predominante em uma fábrica de embutidos cárneos fermentados dinamarquesa, enquanto que *Cladosporium* sp. predominou em outra.

*P. brevicompactum* foi isolado de produtos cárneos em diferentes estudos, embora nunca como espécie dominante (LEISTNER & AYRES, 1967; GRAZIA et al., 1986; ANDERSEN, 1995; GALVALISI et al., 2012), sendo capaz de produzir a

micotoxina ácido micofenólico (FRISVAD & SAMSON, 2004). Em contrapartida, Galvalisi et al. (2012) demonstrou que *P. brevicompactum* isolado de salame tipo italiano uruguaio não foi capaz de produzir micotoxinas quando testado. *P. chrysogenum* tem sido frequentemente isolado de embutidos cárneos fermentados e curados (LEISTNER & AYRES, 1967; RACOVITA et al., 1969, GRAZIA et al., 1986; ANDERSEN, 1995; LOPEZ-DIAZ et al., 2001; FRISVAD et al., 2004; IACUMIM et al., 2009) , apresentando como inconveniente a possibilidade de contaminação do produto com antibiótico (penicilina) e micotoxinas (roquefortina C e penitrem A) (Frisvad e Samson, 2004). Os autores destacaram que a composição da micobiota pode afetar a qualidade final do produto e é de grande importância que os fungos produzam enzimas apenas durante o processo de maturação e que nunca sejam capazes de produzir compostos tóxicos ao longo do processo.

Casado, Borrás e Aguilar (1991) observaram que a micobiota de presunto espanhol curado apresentou-se mais baixa no primeiro período de maturação, onde as leveduras foram isoladas com maior frequência em todo o processo, resultados parecidos com o obtido neste estudo. Asefa et al. (2010) verificou que em produtos a base de carne, as leveduras dominaram a superfície desde o início até no estágio de secagem e maturação sendo interrompido o seu crescimento apenas quando empregado processo de defumação.

GALVALISI et al. (2012) demonstrou que *P. griseofulvum* isolado de salame italiano uruguaio foi capaz de produzir a micotoxina ácido ciclopiazônico. Os autores destacam que a composição da micobiota poderá afetar a qualidade final do produto sendo de grande importância que os fungos produzam enzimas apenas durante o processo de maturação e que jamais sejam capazes de produzir compostos tóxicos ao longo de todo processo.

Em relação à lavagem dos salames para remoção de fungos da superfície, essa prática é frequente no Brasil no final da maturação, sendo também comum na Itália (Iacumin et al., 2009). Esses autores demonstram que um método no qual o revestimento do salame é escovado e lavado para remoção de fungos poderia reduzir a ocratoxina A e eliminar o risco potencial à saúde do consumidor (Iacumin et al., 2009). Por outro lado, lavar o salame no meio do processo de maturação poderá prejudicar o processo. Além disso, esta prática deve ser realizada com cautela, pois durante a lavagem, uma alta carga de esporos fúngicos será liberada no ar. Esses esporos podem atuar como fonte de contaminação para salames. Atuando como

uma espécie de cultura inicial, eles poderiam dominar a superfície desses produtos no final da maturação.

Maior similaridade foi encontrada entre a diversidade de espécies isoladas do ar ambiente e a superfície de salames do que com as matérias-primas. A mesma analogia é válida para a presença da espécie *A. westerdijkiae*, que foi isolada apenas na superfície dos salames e do ar interno. Observações semelhantes foram feitas por Sørensen (2008) sobre a presença de *Penicillium* em plantas e produtos derivados cárneos dinamarqueses.

## 5. Conclusão

Este trabalho avaliou a diversidade de fungos no ambiente de produção, matérias-primas e superfície de salames elaborado por duas indústrias no Sul do Brasil. Foi possível observar variação nos fungos encontrados nas duas indústrias, localizadas na mesma cidade. Destaca-se a presença intensa de *Aspergillus westerdijkiae* na indústria B (tanto na superfície do produto quanto no ar ambiente), o fungo é potencialmente produtor de ocratoxina A, sendo a principal micotoxina relacionada a produtos cárneos. Os dados desta pesquisa permitem inferir que o ar ambiente tem papel relevante na contaminação de produtos e na manutenção de uma espécie no ambiente de produção e maturação. As matérias-primas parecem não ter um papel importante na contaminação de salames.

## 6. Referências

- Andersen, S.J. (1995). Compositional Changes in surface mycoflora during ripening of naturally fermented sausages. *Journal of Food Protection*, 58, 426–429.
- Andersen, S.J., Frisvad, J.C. (1994). Penicillin production by *Penicillium nalgiovense*. *Letters in Applied Microbiology*, 19, 486–488.
- Angélico, C.L. (2012). Aplicação do agente biológico *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries “Cladosporin” como bioprotetor da qualidade do café (*Coffea arabica* L.). Tese de doutorado. Universidade Federal de Lavras.
- Asefa, D.T., Kure, C.F., Gjerde, R.O., Omer, M.K., Langsrud, S., Nesbakken, T., Skaar, I. (2010). Fungal growth pattern, sources and factors of mould contamination in a dry-cured meat production facility. *Food Microbiology*, 140, 131-135.

- Battilani, P., Pietri, V.A., Giorni, P., Formenti, S., Bertuzzi, T., Toscani, T., Virgili, R., Kozakiewicz, Z. (2007). *Penicillium* populations in dry-cured ham manufacturing plants. *Food Protection*, 70, 975 – 80;
- Brasil. Ministério da Agricultura. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº. 22, de 31 de julho de 2000. Regulamento técnico de identidade e qualidade de salame. Publicada no Diário Oficial da União de 03/08/00.
- Bruna, J.M., Hierro, E.M., De La Hozm, L., Mottram, D.S., Fernández, M., Ordóñez, J.Á. (2001). The contribution of *Penicillium aurantiogriseum* to the volatiles composition and sensory quality of dry fermented sausages. *Meat Science*, 59, 97–107.
- Casado, M. J.M., Borrás, M. A. D., Aguilar, R. V. (1991). Fungal flora present on the surface of cured Spanish ham. Methodological study for its isolation and identification. *Fleischwirtschaft*, 71, 1300-1302.
- Castellari, C., Quadrelli, A.M., Laich, F. (2010). Surface mycobiota on Argentinean dry fermented sausages. *Food Microbiology*, 142, 149–155.
- Castro, L.C., Luchese, R.H., Martins, J.F.P. (2000). Efeito do uso da cepa starter de *Penicillium nalgiovense* na qualidade de salames. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 20 (1).
- Chalfoun, S.M., Cunha, R.L., Carvalho, V.L., Nogueira, D.A. (2007). Seletividade de fungicidas cúpricos e sistêmicos sobre o fungo *Cladosporium cladosporioides* em cafeeiro. *Summa Phytopathologica*, 33, 93-95.
- Dharmaputra, O.S., Ambarwati, S., Retnowati, I., Nurfadila, N. (2015). Fungal infection and aflatoxin contamination in stored nutmeg (*Myristica fragrans*) kernels at various stages of delivery chain in north sulawesi province. *Biotropia*, 22, 129 – 139.
- Escher, F.E., Koehler, P.E., Ayres, J.C. (1973). Production of ochratoxins A and B on country cured ham. *Applied Microbiology*, 26, 27-30.
- Frisvad, J.C., Samson, R.A. (2004). Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*: a guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in Mycology*, 49, 1–251.
- Frisvad, J.C., Mick Frank, J., Houbraken, J., Kuijpers, A.F.A. Samson, R.A. (2004). New ochratoxina A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Studies in Mycology*, 50, 23-43.
- Galvalisi, U., Lupo, S., Piccini, J., Bettucci, L. (2012). *Penicillium* species present in Uruguayan salami. *Revista Argentina de Microbiología*, 44, 36-42.

- Garcia, M.V., Parussolo, G., Moro, C.B., Bernardi, A.O., Copetti, M.V. (2018). Fungi in spices and mycotoxigenic potential of some *Aspergilli* isolated. *Food Microbiology*, 73, 93-98.
- Grazia, L., Romano, P., Bagni, A., Roggiani, D., Guglielmi, G. (1986). The role of moulds in the ripening process of salami. *Food Microbiology*, 3, 19-25.
- Iacumin, L., Chiesa, L., Boscolo, D., Manzano, M., Cantoni, C., Orlic, S., Comi G. (2009). Moulds and ochratoxin A on surfaces of artisanal and industrial dry sausages. *Food Microbiology*, 26, 65–70.
- Iacumin, L., Milesi, S., Pirani, S., Comi, G., Chiesa, L.M. (2011). Ochratoxigenic mold and ochratoxin A in fermented sausages from different areas in Northern Italy: occurrence, reduction or prevention with ozonated air. *Food Safety*, 31, 538–545.
- Kaur, H., Joshi, D.V., Kwatra, M.S., Jand, S.K. (1992). Preliminary studies on mycoflora of pig sausages. *Indian Journal of Comparative Microbiology, Immunology and Infectious Diseases*, 13, 31–33.
- Klich, M.A., Pitt, J.I. (1988). A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. CSIRO Division of Food Processing, North Ryde, NSW.
- Kulshrestha, P., Singh, C., Gupta, A., Mahajan, S., Sharma, R. (2014). Mycoflora associated with spices. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(5), 741-746
- Leistner, L., Ayres, J.C. (1967). Mold fungi and meat products. *Die Fleischwirtschaft*, 47, 1320–1326.
- Larsen, T.O., Svendsen, A., Smedsgaard, J. (2001). Biochemical characterization of ochratoxin A-producing strains of the genus *Penicillium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 3630–3635.
- Lopez-Diaz, T.M., Santos, J.A., Garcia-Lopez, M.L., Otero, A. (2001). Surface mycoflora of a Spanish fermented meat sausage and toxigenicity of *Penicillium* isolates. *Food Microbiology*, 68, 69-74.
- Mizáková, A., Pipová, M., Turek, P. (2002). The occurrence of moulds in fermented raw meat products. *Journal of Food Science*, 20, 89–94.
- Moricca, S., Ragazzi, A., Mitchelson, K.R., Assante, G. (2001). Antagonism of the two-needle pine stem rust fungus *Peridermium pini* by *Cladosporium tenuissimum* *in vitro* and *in planta*. *Phytopathology*, 91, 457-468.

- Ndagijimana, M., Chaves-López, C., Corsetti, A., Tofalo, R., Sergi, M., Paparella, A., Guerzoni, M.E., Suzzi, G. (2008). Growth and metabolites production by *Penicillium brevicompactum* in yoghurt. *Food Microbiology*, 127, 276-283.
- Pasanen, A.L., Pasanen, P., Jantunen, M.J., Kalliokski, P. (1991). Significance of air humidity for fungal spore release into the air. *Atmospheric Environment*, 25, 459–62.
- Perrone, G., Samson, R.A., Frisvad, J.C. Susca, A., Gunde-Cimerman, N., Epifani, F., Houbraken, J. (2015). *Penicillium salami*, a new species occurring during seasoning of dry-cured meat. *International Journal of Food Microbiology*, 193, 91–98.
- Pitt, J.I. (2004). *Guía de laboratorio para la identificación de especies comunes de Penicillium*. 1th ed. España.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D. (2009). *Fungi and Food Spoilage*, 3<sup>a</sup> ed. Springer Dordrecht Heidelberg, London.
- Prelle, A.; Spadazo, D.; Garibaldi, A.; Gullino, M.L. (2014). Co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in spices commercialized in Italy. *Food Control*, 39, 192–197.
- Racovita, A., Racovita, A., Constantinescu, T. (1969). The importance of mould layers on salami. *Die Fleischwirtschaft*, 49, 461–466.
- Samson, R.A., Frisvad, J.C., Hoekstra, E.S. (2004). Introduction to Food- and Airborne Fungi. *Centraalbureau voor Schimmelcultures*, Utrecht.
- Scaramuzza, N., Diaferia, Berni, C. E. (2015). Monitoring the mycobiota of three plants manufacturing Culatello (a typical Italian meat product). *International Journal of Food Microbiology*, 203, 78-85.
- Sørensen, L.M., Jacobsen, T., Nielsen, P.V., Frisvad, J.C., Kock, A.G. (2008). Mycobiota in the processing areas of two different meat products. *Food Microbiology*, 124, 58-64.
- Sousdaleff, M. (2016). 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.
- Van Den Berg, M. A. (2010). Functional characterization of penicillin production strains. *Fungal Biology Reviews*, 24(1-2), 73-78.
- Vila, G.S., Pose, G.N., Segura, J.A., Ludemann, V. (2016). Diversidad de hongos filamentosos en el emplume de emutidos secos producidos en la región pampeana. *Senasa*. 40-49.

Vipotnik, Z., Rodríguez e Rodrigues, P. (2017). *Aspergillus westerdijkiae* as a major ochratoxin A risk in dry-cured ham based-media. *Food Microbiology*, 241, 244-251.

Wigmann, E.F., Jahn, R.C., Scherer, C.D., Saccomori, F., Alcano-González, M.A., Copetti, M.V. (2018). Detection and identification of *Penicillium* spp. in a frozen chicken nuggets production facility. *Food Microbiology*, 70, 42-48.

World Health Organization. The role of food safety in health and development (1984). <http://www.who.int/en/> / Accessed 20 February 2018.

**Tabela 1.** Fungos isolados de matérias-primas de duas indústrias produtoras de salame artesanal.

|                                     | INDÚSTRIA A  |                         | INDÚSTRIA B  |  |
|-------------------------------------|--|-------------------------|--|--|
|                                     | Amostragem I   | Amostragem II           | Amostragem I   | Amostragem II                                  |
| <b>Pimenta-preta</b> (n=2)          | Levedura,<br><i>Cladosporium</i> sp.;<br><i>A. pseudoglaucus</i> ;<br><i>W. sebij.</i> | <i>Mycelia sterilia</i> | -  | -  |
| <b>Envoltório</b> (n=4)             | <i>Cladosporium</i> sp.;<br>Levedura.  | ND                      | <i>Cladosporium</i> sp.;<br>Levedura.                        | <i>Cladosporium</i> sp.;<br><i>P. citrinum</i> |
| <b>Alho</b> (n=4)                   | ND   | ND                      | <i>Cladosporium</i> sp.;<br>Fungos dematiáceos;<br>Levedura. | ND   |
| <b>Carne moída</b> (n=4)            | <i>Cladosporium</i> sp.;<br>Levedura.  | <i>P. griseofulvum</i>  | ND   | ND   |
| <b>Noz-moscada</b> (n=1)            | <i>A. chevalieri</i> ;<br><i>A. ruber</i>  | -                       | -  | -  |
| <b>Mistura de especiarias</b> (n=2) | -  | -                       | <i>Cladosporium</i> sp.<br>Levedura,                         | ND   |

ND: Não detectado.

**Tabela 2.** Fungos isolados da superfície de salame coletados da indústria A durante a maturação de acordo com o período de amostragem.

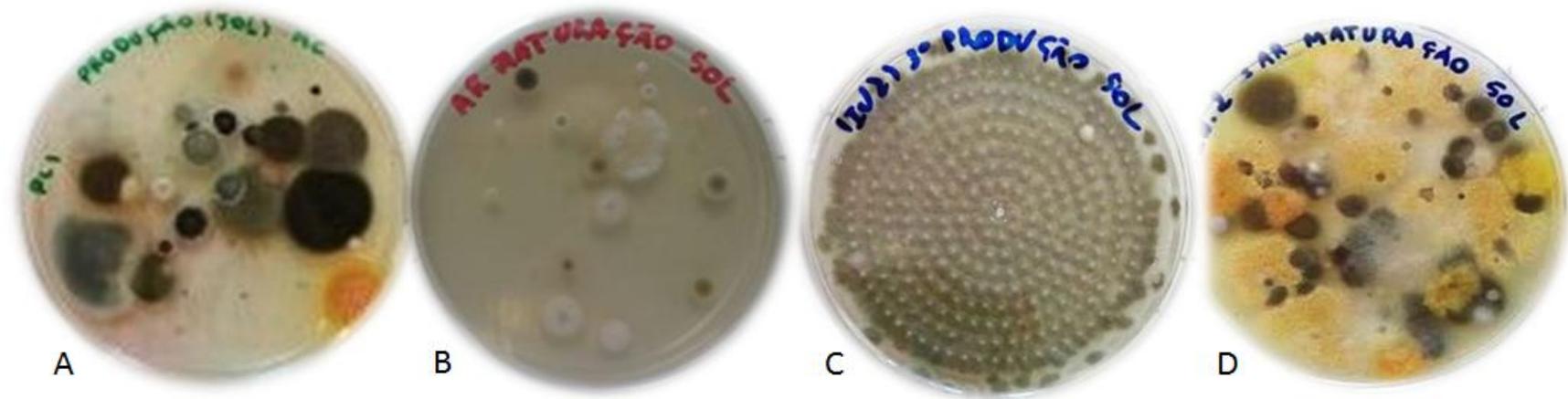
| INDÚSTRIA A                       | AMOSTRAGEM I                          |   |  |  |  |  | AMOSTRAGEM II                            |  |  |  |  |   |
|-----------------------------------|---------------------------------------|---|--|--|--|--|--|--|--|--|--|---|
|                                   | Dia 0                                 |   | Dia 7                                    |  | Dia 14                                   |  | Dia 0                                    |  | Dia 7                                    |  | Dia 14                                   |   |
|                                   | MÉDIA                                 | VARIÇÃO   | MÉDIA                                    | VARIÇÃO  | MÉDIA                                    | VARIÇÃO  | MÉDIA                                    | VARIÇÃO  | MÉDIA                                    | VARIÇÃO  | MÉDIA                                    | VARIÇÃO   |
|                                   | 7X10 <sup>1</sup> UFC/cm <sup>2</sup> | <10 para 1.5X10 <sup>2</sup> UFC /cm <sup>2</sup> | 9.8X10 <sup>4</sup> UFC /cm <sup>2</sup> | 7.8X10 <sup>3</sup> para 2.22X10 <sup>5</sup> UFC /cm <sup>2</sup> | 7.3X10 <sup>3</sup> UFC /cm <sup>2</sup> | 4.5X10 <sup>1</sup> para 2.8X10 <sup>4</sup> UFC/cm <sup>2</sup> | 2.8X10 <sup>1</sup> UFC /cm <sup>2</sup> | <10 para 6X10 <sup>1</sup> UFC/cm <sup>2</sup> | 5.3X10 <sup>5</sup> UFC /cm <sup>2</sup> | 2.2X10 <sup>5</sup> para 9,4X10 <sup>5</sup> UFC/cm <sup>2</sup> | 1.2X10 <sup>5</sup> UFC /cm <sup>2</sup> | 2.1X10 <sup>4</sup> para 2.8X10 <sup>5</sup> UFC /cm <sup>2</sup> |
| FUNGOS                            | FO (%)                                | VI (%)  | FO (%)                                   | VI (%)   | FO (%)                                   | VI (%)   | FO (%)                                   | VI (%)   | FO (%)                                   | VI (%)   | FO (%)                                   | VI (%)  |
| <i>Aspergillus candidus</i>       | -                                     | -   | -  | -  | 40                                       | 0 – 63.3   | -  | -  | -  | -  | -  | -   |
| <i>Aspergillus montevideensis</i> | -                                     | -   | -  | -  | 20                                       | 0 – 3.3  | -  | -  | -  | -  | -  | -   |
| <i>Aspergillus niger</i> complex  | -                                     | -   | -  | -  | 20                                       | 0 – 7.54   | -  | -  | -  | -  | -  | -   |
| <i>Aspergillus pseudoglaucus</i>  | -                                     | -   | 80                                       | 0 – 79.1   | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -   |
| <i>Aspergillus</i> sp.            | -                                     | -   | -  | -  | 20                                       | 0 – 14.3   | -  | -  | -  | -  | -  | -   |
| <i>Cladosporium</i> sp.           | 20                                    | 0 - 25  | 40                                       | 0 – 2.67   | 20                                       | 0 – 10.7   | 20                                       | 0 - 100  | 40                                       | 0 – 13.5   | 20                                       | 0 – 0.87  |
| Levedura                          | 60                                    | 0 - 40  | -  | -  | -  | -  | 40                                       | 0 - 100  | 100                                      | 10.81 – 93.9   | 100                                      | 92.8 - 100  |
| <i>Mycelia sterilia</i>           | -                                     | -   | 20                                       | 0 – 6.89   | -  | -  | -  | -  | 20                                       | 0 – 0.9  | 20                                       | 0 – 7.14  |
| <i>Penicillium carneum</i>        | -                                     | -   | 40                                       | 0 – 22.7   | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -   |
| <i>Penicillium brevicompactum</i> | -                                     | -   | 80                                       | 0 – 66.9   | 80                                       | 0 – 14.7   | -  | -  | 60                                       | 0 – 73.9   | -  | -   |
| <i>Penicillium chrysogenum</i>    | -                                     | -   | -  | -  | 40                                       | 0 - 52   | -  | -  | -  | -  | -  | -   |
| <i>Penicillium corylophilum</i>   | 20                                    | 0 - 60  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -   |
| <i>Penicillium crustosum</i>      | -                                     | -   | -  | -  | 20                                       | 0 – 1.3  | -  | -  | -  | -  | -  | -   |
| <i>Penicillium glabrum</i>        | 20                                    | 0 - 25  | 40                                       | 0 – 29.5   | 40                                       | 0 – 84.9   | -  | -  | -  | -  | -  | -   |
| <i>Penicillium polonicum</i>      | -                                     | -   | 20                                       | 0 – 10.3   | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -   |
| <i>Penicillium raistrickii</i>    | -                                     | -   | -  | -  | 20                                       | 0 - 10   | -  | -  | 20                                       | 0 – 5.73   | -  | -   |
| <i>Penicillium</i> sp.            | 20                                    | 0 - 20  | -  | -  | 20                                       | 0 – 28.6   | -  | -  | -  | -  | -  | -   |
| <i>Penicillium spinulosum</i>     | -                                     | -   | 20                                       | 0 – 36.4   | 60                                       | 0 - 50   | -  | -  | 80                                       | 0 – 10.2   | 20                                       | 0 – 2.3   |
| <i>Talaromyces</i> sp.            | 20                                    | 0 - 20  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -   |
| <i>Wallemia sebi</i>              | 40                                    | 0 - 25  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -   |

FO: Frequência de ocorrência / VI: Variação da infecção / -: Espécies de fungos não estavam presentes. \* Não típico.

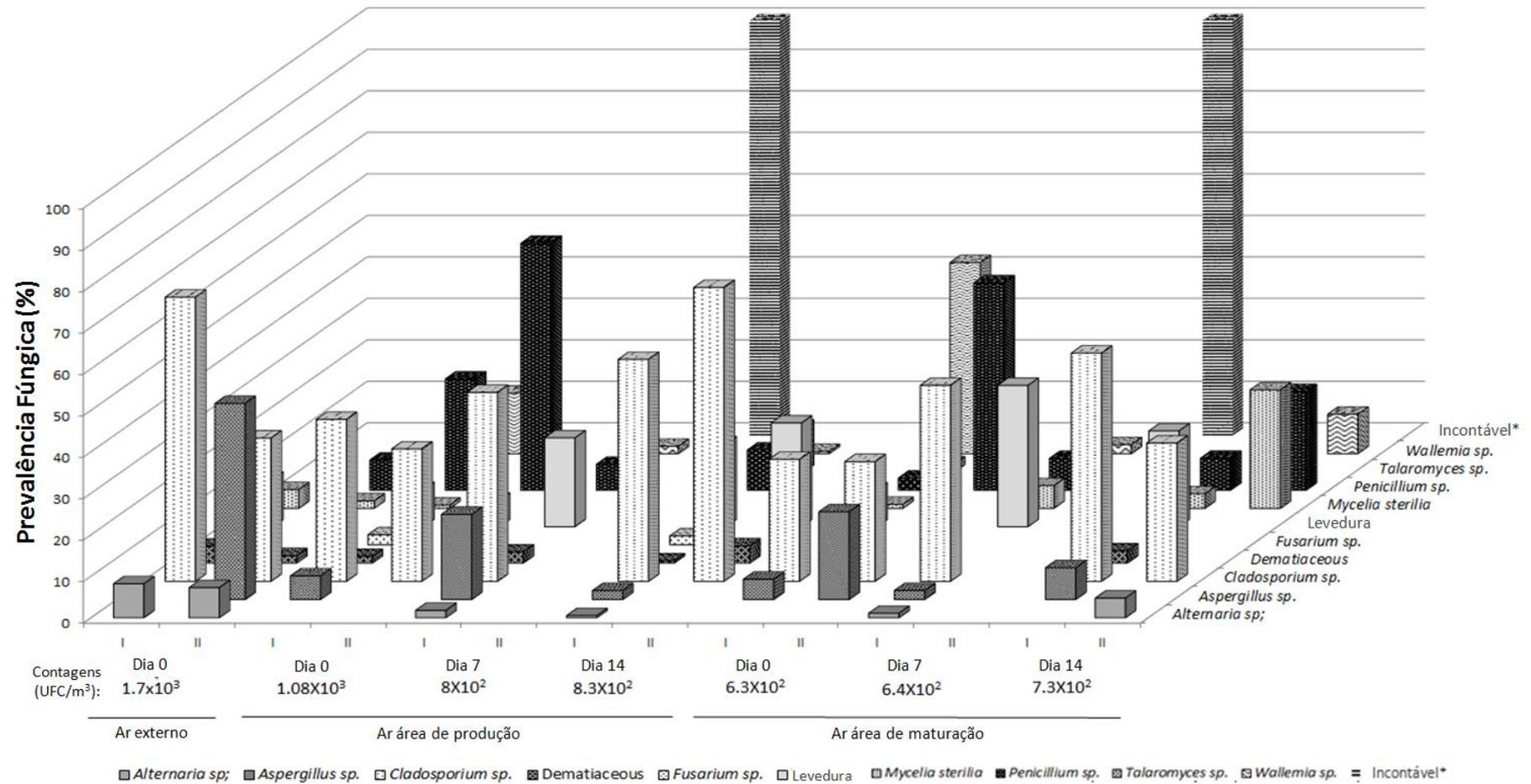
**Tabela 3.** Fungos isolados da superfície de salames coletados da indústria B durante a maturação de acordo com o período de amostragem.

| INDÚSTRIA B                       | AMOSTRAGEM I |           |        |            |        |             | AMOSTRAGEM II |             |        |             |        |             |
|-----------------------------------|--------------|-----------|--------|------------|--------|-------------|---------------|-------------|--------|-------------|--------|-------------|
|                                   | Dia 0        |           | Dia 7  |            | Dia 14 |             | Dia 0         |             | Dia 7  |             | Dia 14 |             |
|                                   | MÉDIA        | VARIÇÃO   |        |            |        |             |               |             |        |             |        |             |
| FUNGOS                            | FO (%)       | VI (%)    | FO (%) | VI (%)     | FO (%) | VI (%)      | FO (%)        | VI (%)      | FO (%) | VI (%)      | FO (%) | VI (%)      |
| <i>Aspergillus montevidensis</i>  | -            | -         | 20     | 0 – 1.58   | 20     | 0 – 10.6    | -             | -           | -      | -           | -      | -           |
| <i>Aspergillus niger</i> complex  | -            | -         | -      | -          | -      | -           | -             | -           | -      | -           | 40     | 0 – 0.47    |
| <i>Aspergillus pseudoglaucus</i>  | -            | -         | -      | -          | 60     | 0 – 4.53    | 40            | 0 – 5.88    | -      | -           | 20     | 0 – 0.43    |
| <i>Aspergillus ruber</i>          | -            | -         | 20     | 0 – 4.54   | 80     | 0 – 5.55    | -             | -           | -      | -           | -      | -           |
| <i>Aspergillus westerdijkiae</i>  | -            | -         | 40     | 0 – 6.66   | 20     | 0 – 0.29    | -             | -           | 20     | 0 – 0.23    | -      | -           |
| <i>Cladosporium</i> sp.           | 80           | 0 – 27.3  | 40     | 0 – 6.66   | -      | -           | 60            | 0 – 11.5    | 20     | 0 – 0.23    | 40     | 0 – 1.33    |
| <i>Curvularia</i> sp.             | 20           | 0 – 33.3  | -      | -          | -      | -           | -             | -           | -      | -           | -      | -           |
| Levedura                          | 100          | 66.7 - 95 | 100    | 86.7 - 100 | 100    | 80.1 – 94.9 | 100           | 17.6 – 45.4 | 100    | 18.9 – 98.1 | 100    | 2 – 94      |
| <i>Mycelia sterilia</i>           | -            | -         | 20     | 0 – 3.92   | -      | -           | -             | -           | -      | -           | -      | -           |
| <i>Penicillium griseofulvum</i> * | -            | -         | -      | -          | -      | -           | 100           | 50 – 81.5   | 100    | 0.95 – 79.7 | 100    | 4.74 – 95.3 |
| <i>Penicillium italicum</i>       | -            | -         | -      | -          | -      | -           | -             | -           | -      | -           | 20     | 0 – 0.43    |
| <i>Penicillium roqueforti</i>     | -            | -         | -      | -          | -      | -           | -             | -           | -      | -           | 20     | 0 – 5.21    |
| <i>Penicillium viridicatum</i> *  | -            | -         | -      | -          | -      | -           | -             | -           | 80     | 0 – 1.39    | 20     | 0 - 2       |
| <i>Wallemia sebi</i>              | -            | -         | 20     | 0 – 1.96   | 100    | 0.64 – 5.55 | 40            | 0 – 13.6    | -      | -           | -      | -           |

FO: Frequência de ocorrência / VI: Variação da infecção / -: Espécies de fungos não estavam presentes. \* Não típico.



**Figura 1.** Fungos recuperados do ar interno de instalações artesanais de salame. A = área de produção da indústria A; B = área de maturação da indústria A; C = Área de produção da indústria B, incontável; D = área de maturação da indústria B, com presença de *Aspergillus westerdijkiae* (fungos amarelo / ocre).

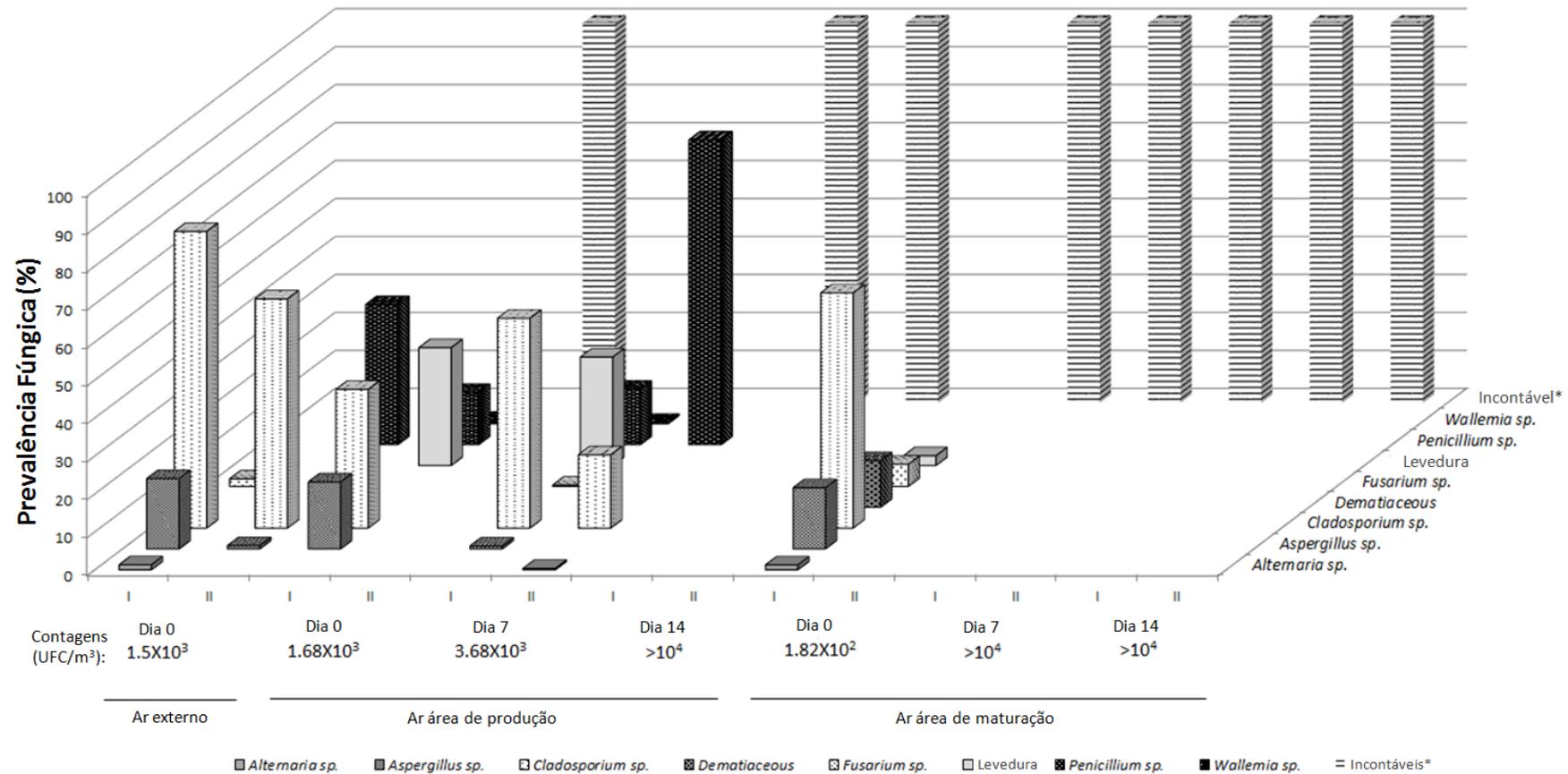


**Figura 2.** Distribuição de gêneros fúngicos organizados de acordo com a prevalência em cada amostragem de ar (I e II), durante a produção de salames na indústria A.

\* Incontável => 10<sup>4</sup> UFC / m<sup>3</sup>.

*Aspergillus* spp. recuperados do ar ambiente (*A. candidus*, *A. chevalieri*, *A. pseudoglaucus*, *A. montevicensis*, complexo *A. versicolor* e *A. niger*).

*Penicillium* spp. recuperados do ar ambiente (*P. olsonii*; *P. corylophilum*; *P. fellutanum*; *P. citrinum*; *P. glabrum*; *P. paxilli*; *P. meatum*; *P. brevicompactum* e *P. aetiopicum*)



**Figura 3.** Distribuição de gêneros fúngicos organizados de acordo com a sua prevalência em cada amostragem de ar (I e II) ao longo da produção de salames na indústria B.

\* Incontável => 10<sup>4</sup> UFC / m<sup>3</sup>.

*Aspergillus* spp. recuperado do ar ambiente (*A. versicolor*; *A. westerdijkiae* e *A. montevidensis*)

*Penicillium* spp. recuperado do ar ambiente (*P. fellutanum*; *P. paxilli*; *P. brevicompactum*; *P. griseofulvum* e *P. viridicatum*)

## 5. MANUSCRITO II

**Efeito da umidade relativa de maturação sobre a produção de ocratoxina A por *Aspergillus westerdijkiae* em salame**

Manuscrito submetido à revista INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY.

## **Influence of relative humidity on the production of ochratoxin A by *Aspergillus westerdijkiae* on salami**

### **Highlights**

- A produção e difusão de ocratoxina A (OTA) em salames superficialmente inoculados com *Aspergillus westerdijkiae* foi investigada;
- Quantidades elevadas de OTA podem ser produzidas por *A. westerdijkiae* em salame;
- A produção de OTA por *A. westerdijkiae* é influenciada pela umidade relativa;
- A maior parte da OTA se acumula no envoltório do salame;
- Foi observada difusão da OTA para a borda, mas não foi detectada OTA no centro dos salames;
- Poucos são os dados disponíveis na literatura sobre a migração de OTA em salame.

## Resumo

A ocorrência de ocratoxina A (OTA) em produtos cárneos pode ser atribuída à micotoxina proveniente de matérias-primas e / ou fungos que se desenvolvem na superfície dos produtos durante sua maturação. O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de OTA por *Aspergillus westerdijkiae* inoculado artificialmente na superfície do salame e avaliar sua difusão no produto ao longo de sua maturação, bem como estudar o efeito da umidade relativa do ar (UR) sobre a produção desta micotoxina. Salames foram inoculados superficialmente com um mix de 3 cepas de *A. westerdijkiae* isolados de salames e dois experimentos distintos foram realizados. No primeiro, o salame foi maturado em câmara com UR decrescente (de 95% para 75%) por 35 dias. No outro, os salames foram incubados em caixas com UR controlada (79%, 85% ou 95%) por 21 dias. Amostragens foram feitas no início dos experimentos e a cada 7 dias, subdividindo-se os mesmos em envoltório, borda externa e miolo para análises. Não foi detectada OTA até 7 dias de maturação. A maior quantidade desta toxina se concentrou no envoltório (máximo de 676,5 µg/kg aos 21 dias de maturação em câmara e 1135 µg/kg aos 14 dias, quando incubados a 79%). Detectou-se OTA na borda externa (1,55 à 87,35 µg/kg) e não foi detectada no miolo dos salames. Este trabalho demonstrou que o desenvolvimento de *A. westerdijkiae* em salames permite a difusão da OTA para o interior do produto e que a UR do ambiente de maturação exerce influência sobre a produção de OTA.

**Palavras-chave:** Micotoxina; Embutido cárneo fermentado; *Aspergillus ochraceus*; Difusão da ocratoxina.

## 1. Introdução

A ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina que possui elevada toxicidade e segundo a Agência Nacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC) é considerada como possível agente carcinogênico em humanos, com ação hepatotóxica, imunossupressora, teratogênica, nefrotóxica e nefrocarcinogênica (IARC, 1993). A Organização Mundial da Saúde (FAO/WHO, 2007) estabelece que a Ingestão Semanal Tolerável Provisória (PTWI) de OTA é de 112 ng/Kg p.c./semana. A ingestão de alimentos com níveis elevados poderá causar degeneração do túbulo proximal renal e nefropatia intersticial (FAO/WHO, 2007).

A OTA estruturalmente consiste de um grupo para-clorofenólico contendo uma molécula de di-hidroisocoumarina que está amido-ligada à L-fenilalanina. Seu nome foi atribuído em função do isolado fúngico do qual primeiramente foi detectada por Van der Merwe (1965), *Aspergillus ochraceus* CBS 263.67. Após estudos polifásicos na seção Circumdati, Frisvad et al. (2004) verificaram que o então denominado *A. ochraceus* CBS 263.67 se tratava de uma espécie distinta, e que passou a se denominar *Aspergillus westerdijkiae* CBS 263.67/ NRRL 3174. Atualmente acredita-se que muitos fungos identificados como *A. ochraceus* possam ser *A. westerdijkiae* (Samson et al., 2006), cuja principal distinção é sua incapacidade de crescer à 37°C e produzir esclerócios de coloração branca a creme (Frisvad et al., 2004). *A. westerdijkiae*, em geral, produz OTA em maiores quantidades e de maneira mais consistente que *A. ochraceus* (Samson et al., 2006).

Considerando alimentos em geral, em climas temperados as principais espécies produtoras de OTA em gêneros alimentícios são *Penicillium verrucosum* e *Penicillium nordicum*, enquanto em clima tropical se destacam *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae*, *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus niger* (Pitt & Hocking, 2009).

A OTA é a micotoxina de maior incidência em produtos cárneos curados. Sua presença nestes produtos é atribuída a micotoxina oriunda das matérias-primas [ex. especiarias (Gareis & Scheuer, 2000; Pleadin et al., 2015) e *carry over* em carne de animais expostos à OTA pela dieta (Dall'asta et al., 2010; Perši et al., 2014)], e principalmente aos bolores que se desenvolvem na superfície dos produtos durante a maturação (Iacumin et al., 2009; Dall'asta et al., 2010; Sørensen et al., 2010; Rodríguez et al., 2012).

Os principais fungos produtores de OTA reportados em produtos cárneos tem sido *P. verrucosum* e *P. nordicum*, em maior quantidade, e *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae* em algumas ocasiões (Iacumin et al., 2009, 2011; Castellari et al., 2010).

Vários fatores ecofisiológicos influenciam a multiplicação fúngica e produção de OTA. Pesquisas têm destacado importantes diferenças no comportamento de espécies produtoras de OTA (*P. verrucosum*, *P. nordicum* e *A. westerdijkiae*) quando cultivadas em substratos baseados em produtos cárneos sob diferentes condições de atividade de água (aw) do substrato e temperatura de incubação (Battilani et al., 2007; Rodríguez et al., 2015, Vipotnik et al., 2017). *A. westerdijkiae* se mostrou capaz de produzir OTA em maiores quantidades e em condições mais amplas, quando comparado ao *P. nordicum* em meio de cultura baseado em presunto curado (Vipotnik et al., 2017).

Na literatura não foram encontrados trabalhos avaliando a produção de OTA por *Aspergillus westerdijkiae* diretamente em salames. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de OTA por *A. westerdijkiae* inoculado na superfície de salames e sua migração no produto ao longo do período de maturação, e estudar o efeito da umidade relativa do ambiente sobre a produção e migração desta micotoxina.

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1 Preparação dos salames**

Um total de 32 salames (com um comprimento médio de 16 cm e um diâmetro de 50 mm) foram elaborados artesanalmente em envoltório de colágeno. Os mesmos foram adquiridos prontos com um produtor local da cidade de Sana Maria – RS onde foram conservados *over night* sob refrigeração e conduzidos ao Laboratório de Micologia de Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil para a inoculação fúngica e início dos experimentos.

### **2.2 Inoculação**

Para a inoculação, foram selecionadas três cepas de *A. westerdijkiae* conhecidamente ocratoxigênicas e isoladas de salames. Preparou-se um mix contendo  $10^4$  conídios por mL e 1 mL desta solução foi inoculado na superfície de cada salame, espalhando-se com uma alça estéril.

Foram separados 2 salames sem inoculação e 2 salames inoculados para se verificar a influência dos esporos na contaminação por OTA antes da incubação (T0). Os demais salames foram separados em 2 grupos para realização dos diferentes experimentos.

### 2.3 Produção de OTA ao longo da maturação de salames em câmara

Dez salames foram conduzidos para maturação em câmara com parâmetros controlados (Menoncin Ind. Com. Ltda., Erechim, Brasil) a 20°C por 35 dias. Os parâmetros de umidade relativa (UR) adotados seguiram segundo Cichoski, Zis e Franceschetto (2009), com adaptações, sendo: Nos 5 primeiros dias UR= 95%, no 6º dia UR= 93%, no 7º dia UR= 90 %, no oitavo dia UR= 87%, no nono dia UR= 84%, no décimo dia UR= 81%, no 11º dia UR= 78% e do 12º ao 35º dia de maturação RH= 75%.

Dois salames foram retirados aleatoriamente após 7, 14, 21, 28 e 35 dias de maturação para análises de OTA e aw.

### 2.4 Influência da UR sobre a produção de OTA em salames

Para avaliar o efeito da umidade relativa sobre a produção de OTA em salame, soluções com diferentes concentrações de cloreto de sódio (23,5%, 19% e 8%) foram preparadas de modo a atingir aw 0,79, 0,85 e 0,95. As soluções foram colocadas em três caixas plásticas transparentes de 30L e mantidas hermeticamente seladas por 24 horas antes do início do experimento.

Após o período de 24 horas, foram verificadas as aw da solução e só assim seis salames foram suspensos em varões dentro das caixas contendo a solução, sendo conduzidas para dentro de uma câmara com temperatura constante de 20°C.

Dois salames foram retirados aleatoriamente de cada caixa após 7, 14 e 21 dias para análises de OTA e aw.

### 2.5 Partição do salame para análises

Após cada amostragem, os salames eram congelados para facilitar a partição do mesmo (envoltório, borda externa e miolo), como mostra na Figura 1.

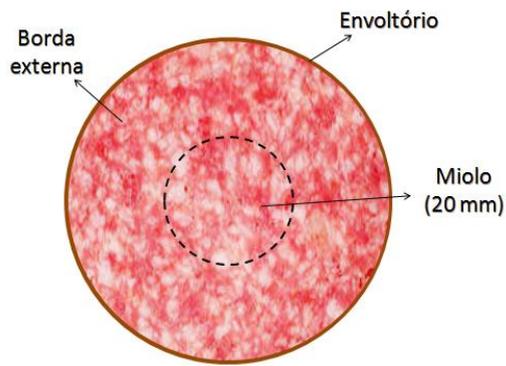


Figura 1: Porções de partição do salame para análises.

Para realizar a extração do miolo, criou-se uma ferramenta, cujo esquema pode ser visualizado na Figura 2.

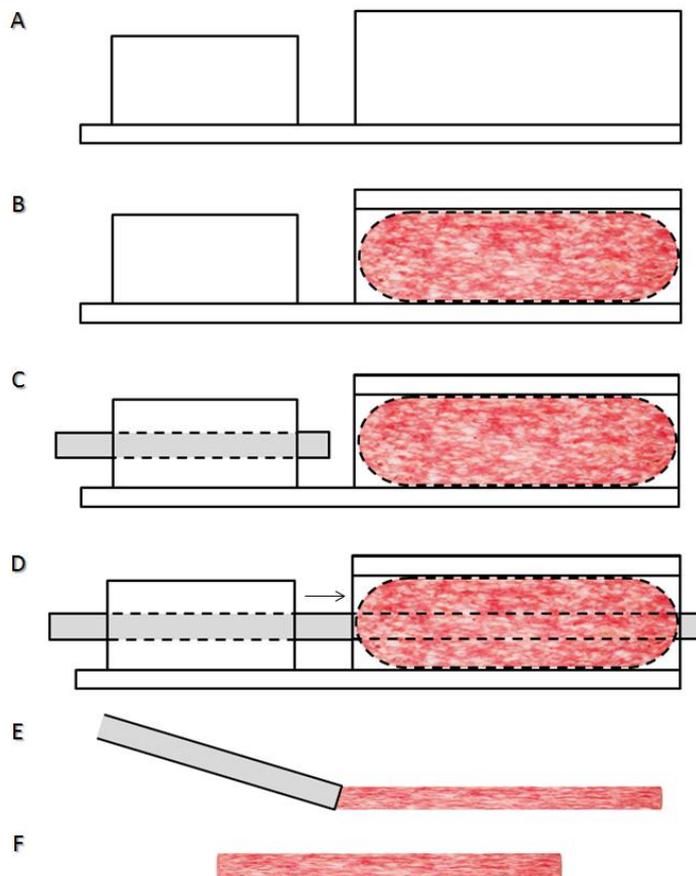


Figura 2: Esquema explicando o corte e a extração do centro (miolo) do salame: (A) Ferramenta de extração; (B) Ferramenta de extração com amostra em seu interior; (C) Ferramenta de extração com amostra e cilindro (20 mm) para corte do salame; (D) Cilindro cortando amostra de um lado a outro; (E) cilindro de corte com amostra sendo retirada; (F) Cilindro de carne retirado do centro do salame.

As amostras de envoltório, borda externa e miolo obtido com a partição do salame foram codificadas e enviadas para o Laboratório de Análises Micotoxicológicas - LAMIC, da Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil, para detecção e quantificação de OTA.

## 2.6 Análise de ocratoxina (OTA)

As amostras foram codificadas e encaminhadas ao Laboratório de Análises Micotoxicológicas – LAMIC, da Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil, para detecção e quantificação de OTA.

Doze mililitros de solvente de extração (acetonitrila/ água/ ácido acético 84: 16: 1, v/v/v) foram adicionados a 3 gramas das amostras de salame pesadas em um tubo de polipropileno com capacidade de 50mL. A extração foi realizada durante 10 min em um shaker tipo vortex (MA-541, Brasil). Após sedimentação por gravidade, cada extrato foi diluído na proporção 1:9 com solvente de diluição (acetonitrila/água/ ácido fórmico 49: 50: 1, v/v/v) e 5 mL do extrato diluído foi injetado em um sistema LC-MS/MS.

Para os experimentos de recuperação, 3 g de 3 amostras de salame e 3 amostras de envoltório foram pesadas e contaminadas em um nível de concentração (5 mg/L). Após a homogeneização do material, as amostras foram mantidas over night em temperatura ambiente.

As análises foram realizadas por método de LC-MS/MS baseado em Sulyok et al. (2006), com adaptações. Brevemente, um equipamento API 5000 LC-MS/MS System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) equipado com um uma fonte de ionização em electrospray Turbo Ion Spray (ESI) e um Sistema de HPLC 1200 Series (Agilent, Waldbronn, Germany). A separação cromatográfica foi realizada à 35°C com uma coluna Agilent Zorbax C18 150 x 4.6 mm i.d., 5 mm de tamanho de partícula, equipada com uma coluna guarda C18 4 x 3 mm i.d. (Agilent, USA).

A acetonitrila e o metanol (grau LC) e ácido fosfórico (p.a.) foram adquiridos do J.T.Baker, Brasil. O padrão analítico da OTA foi obtido da Romer Labs, Tulln, Áustria. A água foi sucessivamente purificada por osmose reversa em um sistema Milli-Q da Millipore (USA).

## 2.7. Determinação da atividade da água

Para realizar a medição da atividade de água das amostras de salame retirou-se pequenos pedaços do produto em diferente pontos (tanto exterior quanto interior) e foi realizado uma homogeneização, colocou-se dentro de cubetas próprias para medição, tampou-se as mesmas e codificou-se cada amostra em triplicata até o momento da análise.

A atividade da água foi medida em AquaLab 4TE (Decagon Devices) a 25 ° C  $\pm$  1.

## 3. Resultados

A Tabela 1 mostra os valores médios de aw nos diferentes tempos de maturação do salame, de acordo com a UR da incubação. Pode-se observar uma pequena redução da aw do produto ao longo do tempo, com exceção dos salames conservados em UR 95%, que permaneceu constante.

Na Figura 3 são apresentados salames obtidos de cada tratamento no 21º dia de maturação. É possível observar que o salame oriundo da câmara de maturação, com UR decrescente apresentou menor cobertura fúngica quando comparado aos salames mantidos em caixas plásticas herméticas sob UR constante.

Na Figura 4 são apresentados os valores de OTA produzidos nas diferentes porções de salames superficialmente inoculados com *A. westerdijkiae* e incubados em diferentes condições de UR.

Para assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos nas análises, foram calculados o limite de quantificação (1 µg/kg) e limite de detecção (0,25 µg/kg) através da relação sinal/ruído (LOQ=10/1, LOD=3/1), respectivamente. Para o cálculo da estimativa de recuperação do método (95 %), foram realizadas análises de triplicatas de amostras fortificadas com 5 µg/kg de padrão de OTA. A linearidade foi avaliada através do coeficiente de determinação ( $R^2$ ), calculado após injeção em triplicata de curvas analíticas com sete diferentes níveis de concentração. Para quantificação, foram utilizadas curvas analíticas com  $R^2 > 0,99$ . Por não existir material de referência certificada (MRC) para a matriz analisada, foi analisado juntamente com a sequência de amostras, MRC de cevada (FAPAS 17173), além de amostras de salame artificialmente contaminadas.

Não foi detectada OTA até os 7 dias de maturação, independente da UR do ambiente em que os salames foram incubados.

Nos salames mantidos em ambientes com UR constante, o máximo de OTA foi detectado aos 14 dias de maturação no envoltório, havendo um decréscimo na quantidade de OTA detectada aos 21 dias. Foi observada diferença nos níveis de OTA nos salames mantidos nas diferentes UR (79, 85 e 95%), mesmo com a  $a_w$  dos salames apresentando valores muito próximos (Tabela 1). Isto demonstra a influência da UR do ambiente sobre a produção de OTA por *A. westerdijkiae*.

O máximo de OTA detectado foi de 1135  $\mu\text{g}/\text{kg}$  no envoltório aos 14 dias de incubação, e de 87,4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  na borda de salames aos 21 dias, ambos quando mantidos na UR 79%. Em nenhuma das condições foi detectada OTA no miolo dos salames conservados sob UR constante.

Nos salames maturados em câmara com UR variável, decrescendo de 95 à 75% ao longo do tempo, a OTA foi detectada majoritariamente no envoltório, sendo observada uma pequena migração da toxina (OTA=1,55  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) para a borda do salame no final da maturação. Em nenhum momento foi detectada OTA no miolo do salame. A contaminação no envoltório foi detectada a partir do 14º dia e o pico foi observado no 21º dia (OTA média=676,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), decrescendo e atingindo 419,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  aos 35 dias de maturação.

#### 4. Discussão

O conteúdo aquoso de um substrato sofre influência da umidade do ambiente em que está inserido. Se for mantida em temperatura constante em ambiente hermeticamente fechado, haverá trocas entre a água presente em uma amostra e o vapor de água no ambiente em que se encontra até que se alcance o equilíbrio, sendo então a umidade relativa de equilíbrio numericamente igual à  $a_w$  do substrato. Em situações práticas a  $a_w$  é o principal fator ambiental governando o desenvolvimento de fungos em alimentos (Pitt & Hocking, 2009). As condições ecofisiológicas ótimas (determinadas em matriz vegetal) para crescimento e produção de OTA por *A. westerdijkiae* são  $a_w$  de 0,93 a 0,99 e temperatura de 28 a 32 °C e (Gil-Serna et al., 2014).

Maior parte dos estudos disponíveis na literatura relativos à produção de OTA em produtos cárneos ou meios baseados em carne é direcionada aos fungos *P. nordicum* e *P. verrucosum*, visto que são tradicionalmente de maior prevalência em países europeus. No entanto, visto que a ocorrência de *A. westerdijkiae*/ *A. ochraceus* tem sido descrita em produções de salame na Argentina (Vila et al.,

2016), Itália (Iacumin et al., 2009), e na superfícies de outros produtos cárneos maturados em diversos países (Strzelecki & Badura, 1972; Sutic et al., 1972; Huerta et al., 1987, Rojas et al., 1991, Nunez et al., 1996; Comi et al., 2004; Wang et al., 2006; Costa, 2014) maior atenção deve ser dada à esta espécie. Adicionalmente, trabalhos realizados em substratos com base cárnea indicam que *A. westerdijkiae* é capaz de crescer e produzir OTA em uma faixa mais ampla de temperatura e aw quando comparado ao *P. nordicum* (Vipotnik et al., 2017).

A não produção de OTA até os 7 dias de maturação também foi relatado por Berni et al. (2017), em estudo conduzido com salames inoculados com *P. nordicum* e maturados em UR 75-85%, entre 14-20°C.

Níveis bastante altos de OTA no envoltório e migração de pequena quantidade para a camada externa do salame também foi descrita por Spotti et al. (1999) em salames inoculados com *P. verrucosum*. A quantidade máxima de OTA detectada internamente por aqueles pesquisadores foi de 2,9 µg/Kg aos 35 dias de maturação. Por outro lado, Iacumin et al. (2009, 2011) detectou OTA apenas nos envoltórios de embutidos cárneos maturados (sem inoculação fúngica), não havendo presença da mesma em 0,5 cm de borda dos embutidos (Limite de Detecção –LOD– 0,1 µg/Kg). Estes autores verificaram que a lavagem e escovação da superfície dos salames reduziu a contaminação de OTA para valores inferiores ao LOD. Com base nos dados obtidos, sugerem que este procedimento poderia limitar ou eliminar completamente o risco de exposição a esta micotoxina (Iacumin et al., 2009).

Da mesma maneira que foi observado neste trabalho, o decréscimo da OTA presente em salames ao longo da maturação já foi descrita por outros autores (Spotti et al., 1999; Berni et al., 2017). Em estudos conduzidos por Berni et al. (2017), avaliando contaminação em envoltórios de salames inoculados com *P. nordicum*, o pico de contaminação por OTA ocorreu aos 18 dias (média= 177,79 µg/kg), decrescendo e mantendo-se próximo à 50 µg/kg aos 29 e 45 dias de maturação. Spotti et al. (1999) também avaliou produção de OTA ao longo da maturação em salames elaborados em envoltórios naturais e artificiais e inoculados com *P. verrucosum*. O maior nível de OTA em salames com envoltório artificial foi aos 28 dias de maturação (1879 µg/Kg), havendo redução ao longo do tempo.

Esta redução pode estar relacionada à metabolização microbiana, sobretudo por bactérias ácido-lácticas (Spotti et al., 1999). No ano de 2008, Fuchs et al. fizeram a desintoxicação de OTA adicionando bactérias ácido-lácticas (BAL) e

obtiveram como resultado uma redução considerável, em torno de 95%. Quando adicionado *Pediococcus parvulus* no mosto para produção de vinho observou-se que o mesmo ao final do terceiro dia conseguiu uma redução de 50% da OTA presente e após o sexto dia a redução chegou até 80% (Abrunhosa et al., 2014). Por outro lado, em meio de cultura cárneo sem presença de competidores, a produção de OTA por *P. nordicum* e *P. verrucosum* foi superior aos 12 dias de incubação quando comparada aos 6 dias de cultivo (Rodríguez et al., 2015).

Por outro lado, a interação microbiana também pode elevar os níveis de OTA. Meftah et al. (2018) observou que *Candida krusei*, *Candida zeylanoides*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Rhodotorula glutinis*, a mistura destas leveduras e a cultura iniciadora co-inoculadas com *A. westerdijkiae* em meio de cultura elaborado com chouriço industrial, chouriço tradicional e presunto (sob condições de atividade de água, concentração de sal e temperatura que refletiam as condições de cura destes produtos) embora tenham inibido o crescimento fúngico, estimularam a produção de OTA. Os autores comentam que a inibição do crescimento pode ser considerada um fator de estresse para o fungo, o que potencialmente resulta na ativação do metabolismo secundário com consequente produção de OTA. Isto poderia justificar o menor desenvolvimento fúngico na superfície do salame A (Figura 3) e maior nível de OTA dentre os demais salames avaliados aos 21 dias (Figura 4).

Estudos demonstram que a velocidade de crescimento e a produção de OTA não estão diretamente relacionadas. Pesquisa realizada por Vipotnik et al. (2017) avaliando o crescimento *A. westerdijkiae* e a produção de OTA em meio de cultura baseado em presunto seco curado mostrou que não houve correlação entre o crescimento fúngico e a produção de micotoxina em diferentes valores de  $a_w$  e temperatura. Mesma observação foi feita por Rodríguez et al. (2015) em estudo realizado com *P. nordicum* e *P. verrucosum* cultivados em meio à base de “salsichón”.

## 5. Conclusão

Este trabalho demonstrou que a presença de *A. westerdijkiae* na superfície do salame permite a difusão da OTA com contaminação da borda externa do produto, mesmo com a retirada do envoltório. Da mesma forma, foi possível observar que a

umidade relativa influenciou a produção de OTA por *A. westerdijkiae* em salame principalmente na UR de 79%.

## 6. Referências

- Abrunhosa, L., Ines, A., Rodrigues, A.I., Guimarães, A., Pereira, V.L., Parpot, P., Mendes-Faia, A., Venâncio, A., 2014. Biodegradation of ochratoxin A by *Pediococcus parvulus* isolated from Duoro wines. *Int. J. Food Microbiol.* 188, 45–52.
- Battilani, P., Pietri, V.A., Giorni, P., Formenti, S., Bertuzzi, T., Toscani, T., Virgili, R., Kozakiewicz, Z., 2007. *Penicillium* populations in dry-cured ham manufacturing plants. *J. Food Prot.* 70, 975 – 80.
- Berni, E., Montagna, I., Restivo, F.M., Degola, F., 2017. Ochratoxin A control in meat derivatives: intraspecific biocompetition between *Penicillium nordicum* strains. *J. Food Qual.* 8.
- Castellari, C., Quadrelli, A.M., Laich, F., 2010. Surface mycobiota on Argentinean dry fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 142,149–155.
- Canel, R.S., Wagner, J.R., Stenglein, S.A., Ludemann, V., 2013. Indigenous filamentous fungi on the surface of Argentinean dry fermented sausages produced in Colonia Caroya (Córdoba). *Int. J. Food Microbiol.*, 164: 81–86.
- Cichoski, A. J., Zis, L. C., Franceschetto, C., 2009. Physicochemical and microbiological characteristics of the surface of Italian salami containing potassium lactate. *J. Food Sci. Technol.* 29, 546-552.
- Comi, G., Orlic, S., Redzepovic, S., Urso, R., Iacumin L, 2004. Moulds isolated from Istrian dried ham at the pre-ripening and ripening level. *Int. J. Food Microbiol.* 96, 29-34.
- Costa, P.M.C., 2014. Identificação de fungos filamentosos e quantificação de ocratoxina A em produtos cárneos ao longo do período de cura. Master dissertation (Master's degree in Quality and Food Safety). Instituto Politécnico de Bragança,
- Dall'Asta, O., Galaverna, G., Bertuzzi, A., Moseriti, A., Pietri, A., Dossena, A., Marchelli, R., 2010. Occurrence of ochratoxin A in raw ham muscle, salami and dry-cured ham from pigs fed with contaminated diet. *Food Chem*, 120, 978-983.
- Frisvad, J.C., Frank, M.J., Houbraken, J.A.M.P., Kuijpers, A.F.A., Samson, R.A., 2004. New ochratoxin producing species in *Aspergillus* section *Circumdati*. *Stud. Mycol.*, 50, 2343.

- Fuchs, S., Sontag, G., Stidl, R., Ehrlich, V., Kundi, M., Knasmüller, S., 2008. Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1398–1407.
- Gareis, M., Scheuer, R., 2000. Ochratoxin A in meat and meat products. *Arch. Lebensmittelhyg.* 51, 102–104.
- Gil-Serna, J., Vazquez, C., Sandino, F.G., Valle, A.M., González-Jaén, M.T., Patiño, B., 2014. Evaluation of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus steynii* and *Aspergillus westerdijkiae* in green-coffee based medium under different environmental conditions. *Food Res Int.*, 61, 127-131.
- Huerta, T., Sanchis, V., Hernandez, J., Hernandez, E., 1987. Mycoflora of dry-salted Spanish ham. *Microbiologie - Aliments - Nutrition*, 5, 247-252.
- International Agency of Research on Cancer (IARC), 1993. *Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans*, 56.
- Iacumin, L., Chiesa, L., Boscolo, D., Manzano, M., Cantoni, C., Orlic, S., Comi, G., 2009. Moulds and ochratoxin A on surfaces of artisanal and industrial dry sausages. *Food Microbiol.*, 26, 65–70.
- Iacumin, L., Milesi, S., Pirani, S., Comi, G., Chiesa, L.M., 2011. Ochratoxigenic mold and ochratoxin A in fermented sausages from different areas in Northern Italy: occurrence, reduction or prevention with ozonated air. *J. Food Saf.*, 31, 538–545.
- Meftah, S., Abid, S., Dias, T., Rodrigues, P., 2018. Effect of dry-sausages culture and endogenous yeasts on *Aspergillus westerdijkiae* and *Penicillium nordicum* growth and OTA production. *J. Food Sci. Technol.*, 87, 250-258.
- Nunez, F., Rodriguez, M.M., Bermudez, M.E., Cordoba, J.J., Asensio, M.A., 1996. Composition and toxigenic potential of the mould population on dry-cured Iberian ham. *Int. J. Food Microbiol.*, 32, 185-197.
- Perši, N., Pleadin, J., Kovačević, D., Scortichini, G., Milone, S., 2014. Ochratoxin A in raw materials and cooked meat products made from OTA-treated pigs. *Meat Sci.*, 96, 203–210.
- Pitt, J.I. and Hocking, A.D., 2009. *Fungi and Food Spoilage*. Blackie Academic & Professional: London, 593.
- Pleadin, J., Kovačević, D., Perši, N., 2015. Ochratoxin A contamination of the autochthonous dry-cured meat product “Slavonski Kulen” during a six-month production process. *Food Control*, 57, 377-384.

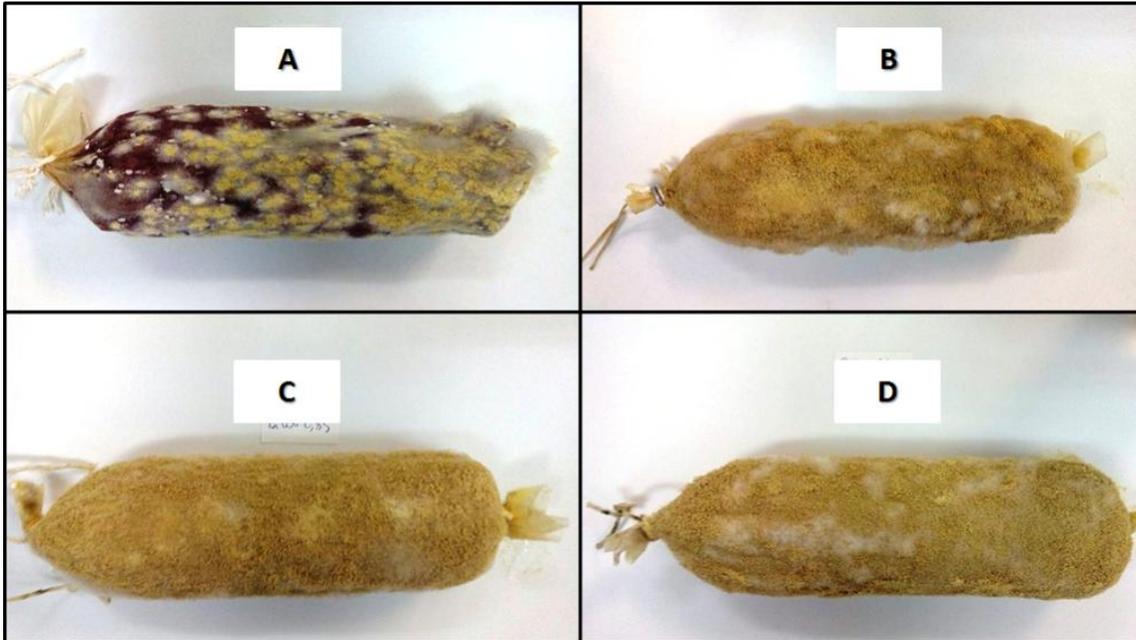
- Rodríguez, A., Bernáldez, V., Rodríguez, M., Andrade, M.J., Núñez, F., Córdoba, J.J., 2015. Effect of selected protective cultures on ochratoxin A accumulation in dry-cured Iberian ham during its ripening process. *J. Food Sci. Technol.*, 60, 923-928.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Martín, A., Delgado, J., Córdoba, J.J., 2012. Presence of ochratoxin A on the surface of dry-cured Iberian ham after initial fungal growth in the drying stage. *Meat Sci.*, 92, 728–734.
- Rojas, F.J., Jodral, M., Gosálvez, F., Pozo, R., 1991. Mycoflora and toxinogenic *Aspergillus flavus* in Spanish dry-cured ham. *Int. J. Food Microbiol.*, 13, 249-256.
- Samson, R.A., Hong, S.B., Frisvad, J.C., 2006. Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *J Mycol Med.*, 44, 133-148.
- Sørensen, L.M., Jacobsen, T., Nielsen, P.V., Frisvad, J.C., Kock, A.G., 2008. Mycobiota in the processing areas of two different meat products. *Food Microbiol.*, 124, 58-64.
- Spotti, E., Busolli, C., Palmia, F., 1999. Sviluppo di colture fungine di importanza rilevante nell'industria dei prodotti carnei. *Industria Conserve.* 74:23-34.
- Strzelecki, E.L., Badura, L., 1972. Occurrence of aflatoxinogenic molds on dry Cracower sausage. *Acta Microbiol Pol B*, 4, 233-239.
- Sulyok, M., Berthiller, F., Krska, R., Schuhmacher, R., 2006. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 20, 2649-2659.
- Sutic, M., Ayres, J.C. and Koehler, P.E., 1972. Identification and aflatoxin production of moulds isolated from country cured hams. *Appl. Microbiol.*, 23, 656-658.
- Van der Merwe, K.J., Steyn, P.S., Fourie, L., 1965. Mycotoxins Part II The constitution of ochratoxin A, B, and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* Wilh. *J. Chem. Soc.*, 7083-7088.
- Vila, G.S., Pose, G.N., Segura, J.A., Ludemann, V., 2016. Diversidad de hongos filamentosos en el emplume de embutidos secos producidos en la región pampeana. *SNS*, 10, 40-49.
- Vipotnik, Z., Rodríguez, A., Rodrigues, P., 2017. *Aspergillus westerdijkiae* as a major ochratoxin A risk in dry-cured ham based-media. *Food Microbiol.*, 241, 244 – 251.
- Wang, X., Ma, P., Jiang, D., Peng, Q., Yang, H., 2006. The natural microflora of Xuanwei ham and the no-mouldy ham production. *J. Food Eng.*, 77, 103-111.

World Health Organization (FAO/WHO). *Evaluation of certain food additives and contaminants*. FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 68, 2007.

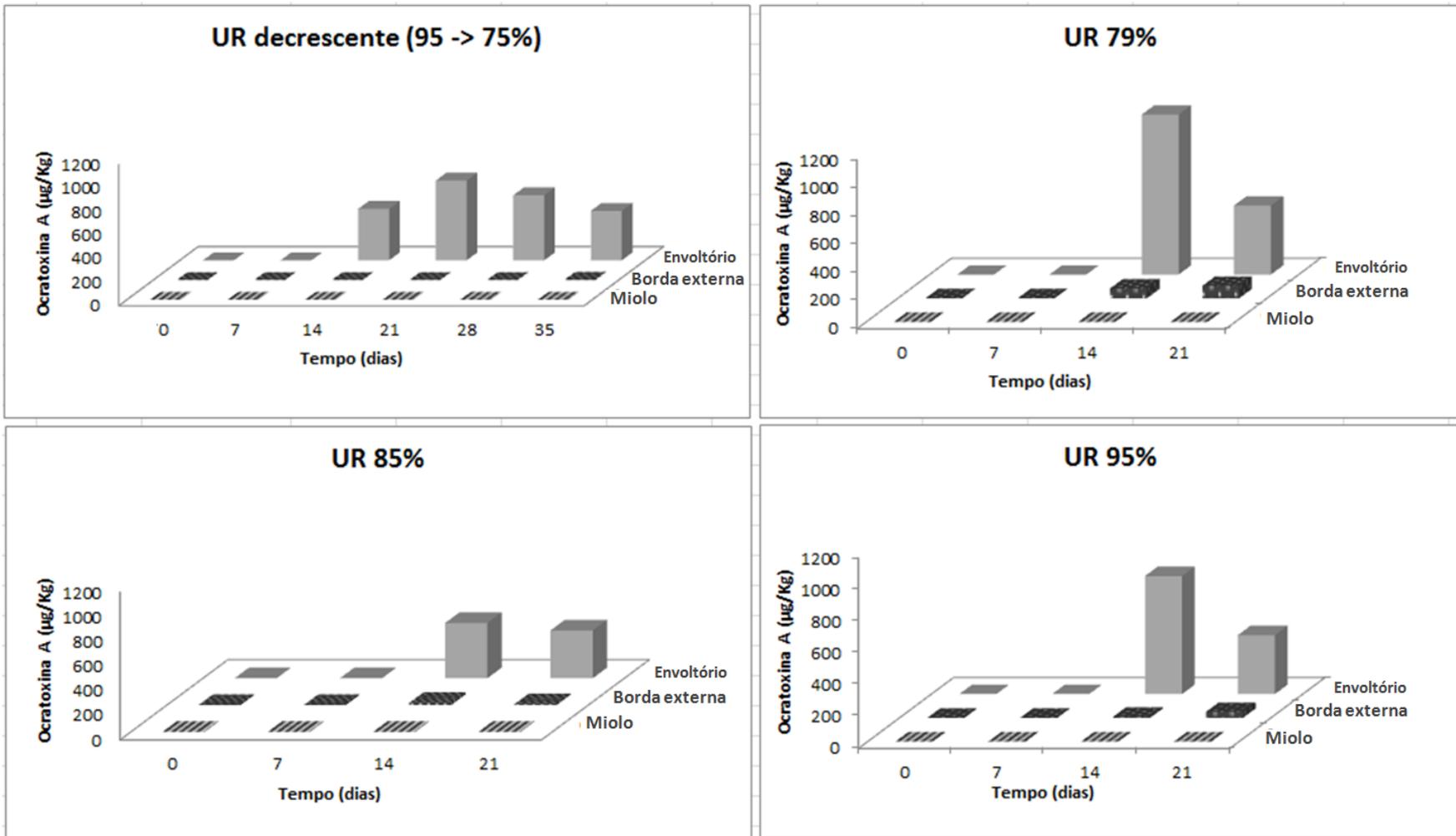
**Tabela 1.** Atividade de água (aw) média dos salames nos diferentes dias de amostragem.

|               | <b>Umidade relativa (UR)</b> |            |            |            |
|---------------|------------------------------|------------|------------|------------|
|               | <b>95 à 75%</b>              | <b>79%</b> | <b>85%</b> | <b>95%</b> |
| <b>Dia 0</b>  | 0,98                         | 0,98       | 0,98       | 0,98       |
| <b>Dia 07</b> | 0,97                         | 0,98       | 0,98       | 0,98       |
| <b>Dia 14</b> | 0,95                         | 0,97       | 0,97       | 0,98       |
| <b>Dia 21</b> | 0,92                         | 0,97       | 0,97       | 0,98       |
| <b>Dia 28</b> | 0,91                         | -          | -          | -          |
| <b>Dia 35</b> | 0,90                         | -          | -          | -          |

-: não realizado.



**Figura 3.** Salames com 21 dias de maturação inoculados com *A. westerdijkiae* e incubados sob diferentes umidades relativas (UR). A: Maturação em câmara com UR variável (decrescente de 95% à 75%); B: UR 79%; C: UR 85%; D: UR 95%.



**Figura 4.** Produção de ocratoxina A em diferentes porções de salames inoculados com *Aspergillus westerdijkiae* e maturados em diferentes condições de umidade relativa (UR).

## 6 CONCLUSÃO

A análise das matérias-primas e superfície do salame ao longo da maturação revelou uma ampla diversidade fúngica, com predomínio dos gêneros *Aspergillus* (sobretudo espécies xerofílicas), *Penicillium* e *Cladosporium*. Destaca-se a intensa presença de *Aspergillus westerdijkiae*, espécie relevante no que concerne à produção de ocratoxina A, na superfície de salames de uma das indústrias avaliadas (indústria B), embora não tendo sido isolado das matérias-primas.

O ar dos ambientes de produção e maturação de salames em ambas as indústrias avaliadas apresentou alta contaminação fúngica, estando acima do limite de quantificação em algumas ocasiões. Os gêneros *Cladosporium*, *Penicillium* e *Aspergillus* foram os mais frequentemente isolados. Cerca de metade das espécies presentes no ar também foi isolada dos salames. Na indústria A, a contaminação apresentou-se mais baixa e a diversidade fúngica mais alta quando comparada à indústria B. *A. westerdijkiae* foi observado em altas quantidades no ar da indústria B. Mesmo após uma sanitização mais intensa, não foi possível eliminar completamente o fungo do ambiente, apenas reduzir sua ocorrência no lote seguinte.

Os salames superficialmente inoculados com *A. westerdijkiae* e maturados sob condições controladas de temperatura e umidade relativa embora apresentassem intenso desenvolvimento fúngico, não foi detectada ocratoxina A até os 7 dias pós inoculação. Esta micotoxina foi detectada no envoltório a partir do 14º dia, com pico aos 21 dias de maturação. A ocratoxina A também foi detectada na borda de salames, após remoção do envoltório, ao final da maturação (35 dias). Não foi detectada a presença desta micotoxina na parte central dos salames avaliados.

Foi observada influência da umidade relativa ambiente sobre a produção de ocratoxina A nos salames inoculados com *A. westerdijkiae* e mantidos sob umidades relativas constantes à 20°C. Nestes salames também não foi detectada a micotoxina até os 7 dias de maturação. Nas diferentes umidades relativas o pico de ocratoxina A foi detectado no envoltório aos 14 dias de maturação, sendo a máxima quantidade produzida na umidade relativa de 79%. A toxina também foi detectada na borda dos salames, após remoção do envoltório, no 14º e 21º dia de maturação sob as diferentes umidades relativas avaliadas. Não houve migração da toxina até o centro dos salames ao longo do período observado (21 dias).

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A intensa presença de *Aspergillus westerdijkiae*, espécie conhecidamente produtora de grandes quantidades de ocratoxina A, em salames é bastante preocupante. Visto que esta espécie não foi isolada de matérias-primas, estando restrita ao ambiente e salames avaliados, considera-se crucial uma intensa higienização dos ambientes de produção e maturação, sem a presença de salames, com especial cuidado na aplicação dos agentes sanitizantes também na forma de aerossóis e adoção programa continuado de higienização da indústria até o controle do problema.

A avaliação da presença de ocratoxina A em salames naturalmente infectados por *A. westerdijkiae* seria de grande relevância e merece atenção, visto que pode se tratar de um problema de saúde pública, uma vez que foi mostrada a difusão da mesma desde o envoltório até a borda deste produto cárneo quando artificialmente inoculado com *A. westerdijkiae* ocratoxigênico.

O desenvolvimento deste trabalho permitiu acompanhar a realidade de duas indústrias produtoras de salames em Santa Maria-RS, uma das quais é habilitada à comercialização dos produtos em todo território nacional. Os dados de diversidade fúngica obtidos são inéditos, visto que os estudos disponíveis na literatura em sua maioria são oriundos de países europeus, com clima bastante diferente do nosso país ou, mais raramente, de estudos conduzidos em outros países da América do Sul.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência Portuguesa do Ambiente. Qualidade do Ar em Espaços Interiores: **Um Guia Técnico**. Amadora, 2009.

Al-Dagal, M. M.; Fung, D. Y. C. Aeromicrobiology: An assessment of a new meat research complex. **J Environ Health**. v. 56. p. 7–14. 1993.

ASEFA, D. T.; KURE, C. F.; GJERDE, R. O.; OMER, M. K.; LANGSRUD, S.; NESBAKKEN, T.; SKAAR, I. Fungal growth pattern, sources and factors of mould contamination in a dry-cured meat production facility. **International Journal of Food Microbiology**. v.140. p. 131-135. 2010.

BACUS, J. Utilization of microorganisms in meat processing. **Letchworth: Research Studies Press**. p. 170, 1986.

<sup>1</sup>BERNARDI, A. O.; STEFANELLO, A.; GARCIA, M. V.; PARUSSOLO, G.; STEFANELLO, R. F.; BROMBILLA, C.; COPETTI, M. V. In vitro efficacy of commercial sanitizers against fungi of concern in food industry. Submitted. 2018.

<sup>2</sup>BERNARDI, A. O.; SILVA, T. S.; STEFANELLO, A.; GARCIA, M, V.; PARUSSOLO, G.; PRESTES, R, C.; COPETTI, M. V. Efficiency of a fumigant sanitizer against food and airborne fungi. Submitted. 2018.

BRASIL. Agência Nacional de vigilância Sanitária. Resolução nº 9 de 16 de janeiro de 2003. Padrões Referenciais de Qualidade do Ar Interior em Ambientes Climatizados Artificialmente de Uso Público e Coletivo.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 7 de 18 de fevereiro de 2011. Limites Máximos Tolerados.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº. 22, de 31 de julho de 2000. Regulamento técnico de identidade e qualidade de salame. Publicada no Diário Oficial da União de 03/08/00.

BRUNA, J. M.; HIERRO, E. M., DE LA HOZ, L.; MOTTRAM, D. S.; FERNÁNDEZ, M., ORDÓÑEZ, J. A. The contribution of *Penicillium aurantiogriseum* to the volatiles composition and sensory quality of dry fermented sausages. **Meat Science**. v.59. p.97–107. 2001.

BRUSTOLIN, J. C. Uso de natamicina no controle do desenvolvimento de fungos em salame tipo italiano. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria – Rio Grande do Sul. 2009.

BURGAIN A, BENSOUSSAN M, DANTIGNY P. Effect of inoculum size and water activity on the time to visible growth of *Penicillium chrysogenum* colony. **Food Microbiology**. v. 163. p. 180-183. 2013.

CASTELLARI, C.; QUADRELLI, A. M.; LAICH, F. Surface mycobiota on Argentinean dry fermented sausages. **International Journal of Food Microbiology**. p. 149–155. 2010.

CASTRO, L. C.; LUCHESE, R. H.; MARTINS, F. P. Efeito do uso de cepa starter de *Penicillium nalgiovense* na qualidade de salames. **Food Science and Technology**. v. 20, n. 1. 2000.

FERNÁNDEZ, M.; ORDÓÑEZ, J.A.; BRUNA, J. M .; HERRANZ, B.; HOZ, L. Accelerated ripening of dry fermented sausages. **Food Science & Technology**. v. 11. p. 201-209. 2001.

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. **Studies in Mycology**. v. 49. p. 1–173. 2004.

FUNG, C., 2008. Rapid methods and automation in microbiology: 25 years of developments and predictions. **Anais do VI workshop MRAMA – Alimentaria**. 2008. Espanha. p.113-117. Disponível em: [http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Monografico\\_VI\\_workshop\\_MRAMA.pdf](http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Monografico_VI_workshop_MRAMA.pdf). Acesso em 10 jan.. 2018.

GALVALISI, U., LUPO, S., PICCINI, J., BETTUCC, L. Penicillium species present in Uruguayan salami. **Revista Argentina de Microbiología**. ISSN 0325-7541. p. 36-42. 2012.

GOICOECHEA, A. L. **Especies fúngicas micotoxigénicas en productos cárnicos embutidos secos**. Facultad de ciencias agrarias. Universidad Pública de Navarra. Balcarce, Argentina. 2010.

GRAZIA, L.; ROMANO, P.; BAGNI, A.; ROGGIANI, D; GUGLIELMI, G. The role of moulds in the ripening process of salami. **Food Microbiology**. v.3. p.19-25. 1986.

GUILLAMONT M, LINO C., BAETA M., PENA A., SILVEIRA M, Determination of Ochratoxin A in chicken, pig and turkey muscle collected at central zone of Portugal. **6º Encontro Química dos Alimentos, Actas**, Lisboa. 2003.

HUGAS, M.; MONFORT, J. M. Bacterial starter cultures for meat fermentation. **Food Chemistry**. v. 59. n. 4. p. 547-55. 1997.

HUI, Y. H.; LAGARRETA, I. G.; ROSMINI, M .R. **Ciencia y tecnología de carnes**. Editora LIMUSA, México. 2012.

HOANG, C.P., KINNEY, K.A., CORSI, R.L., SZANISZLO, P.J., .Resistance of green building materials to fungal growth. **International Biodeterioration Biodegradation**. v. 64 (2). p. 104–113. 2010.

IACUMIN, L.; CHIESA, L.; BOSCOLO, D.; MANZANO, M.; CANTONI, C.; ORLIC, S.; COMI, G. Moulds and ochratoxin A on surfaces of artisanal and industrial dry sausages. **Food Microbiology**. v. 26. p. 65-70. 2009.

International Agency of Research on Cancer (IARC). **Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans**. v. 56. 1993.

KHAN, A. A. H.; KARUPPAYIL, S. M. Fungal pollution of indoor environments and its management. **Saudi Journal of Biological Sciences**. p. 405 – 426. 2012.

LARSEN, T. O.; SVENDSEN, A.; SMEDSGAARD, J. Biochemical characterization of ochratoxin A-producing strains of the Genus *Penicillium*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 67. p. 3630-3635. 2001.

LEISTNER, L. Mold-ripened foods. **Fleischwirt**. v. 66. p. 1385–1388. 1986.

LEONG, S.L., PETTERSSON, O.V., RICE, T., HOCKING, A.D., SCHNURER, J., The extreme xerophilic mould *Xeromyces bisporus* –Growth and competition at various water activities. **Food Microbiology**. v.145 (1). p. 57–63. 2011.

LAPPE, R.; KUBOTA, E. H.; HECKTHEUER, L. H. R.; TERRA, L. M. Influência da utilização do extrato hidroalcoólico de própolis sobre o desenvolvimento de fungos e características físico-químicas e sensoriais do salame tipo italiano. Dissertação apresentada no Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos – Universidade Federal de Santa Maria. 2004.

LÜCKE, F. K. Utilization of microbes to process and preserve meat. **Meat Science**. v. 56. p. 105-115. 2000.

LÜCKE, F. K. **Fermented meats**. In: LUND, B. M.; BAIRD-PARKER, A. C.; GOULD, G.W. (Org.). *The microbiology safety and quality of food*. Gaithersburg: Aspen Publ.. v. 19. p. 420-444. 2000.

LÜCKE, F. K. Fermented sausages. **Microbiology of fermented foods**. 2nd ed, London: Blackie Academy Professional. v. 2. p. 441-483. 1998.

LUOMA, M; BATTERMAN, S. A. Characterization of Particulate Emissions from Occupant Activities in Offices. **Indoor Air**. v.11, n.1. p.35-48. 2001.

Lücke, F.K.; Hechelmann, H. Starter cultures for dry sausages and raw ham. Composition and effect. **Fleischwirtschaft**. v. 67. 307- 314. 1987.

MARQUES, L. A. Aplicação de Técnicas Avançadas de Espectrometria de Massas em Ciências de Alimentos e Perfumaria. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. p. 10. 2006.

MEDEIROS, M. A. S.; LIMA, J. S., FERREIRA<sup>1</sup>, N. S., VITORINO, L. C., SOARES, M. P. Qualidade microbiológica do ar em ambientes de uma Instituição de ensino do sudoeste goiano. **Global science and technology**. v. 05. n. 03. p. 36–46. 2012.

MEFTAH, S., ABID, S., DIAS, T., RODRIGUES, P. Effect of commercial starter cultures and native yeasts on Ochratoxin A production in meat products. **7<sup>o</sup> Journées Scientifiques Internationales sur la Valorisation des Bioressources**. Tunisie. 2016. Disponível em: <https://bibliotecadigital.ipb.pt/handle/10198/14219>. Acesso em: 17 de jan. de 2018.

MONTANHA, F. P.; ANATERA, A.; BURCHARDA, J. F.; LUCIANOA, F. B.; MECAB, G.; MANYESB, L.; PIMPÃOA, C. T. Mycotoxins in dry-cured meats: A review. **Food and Chemical Toxicology**. v. 111. p. 494–502. 2018.

O`BRIEN E.; HEUSSNER A.; DIETRICH D. Species-, Sex-, and cell type-specific effects of ochratoxin A and B. **Toxicological Sciences**. v. 63. p. 256-264. 2001.

ORDÓNEZ, J. A. P.; RODRÍGUEZ, M. I. C.; ÁLVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLÓN, G. D. G. F.; PERALES, L. H; CORTECERO, M. D. S. **Tecnologia de alimentos: alimentos de origem animal**. Vol. 2. Porto Alegre. 2005;

PEREZ-ALVAREZ, J. A.; SANCHEZ-RODRÍGUEZ, E.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; ASUNCIÓN GAGO-GAGO, M.; RUÍZ-PELUFFO, C.; ROSMINI, M. PAGAN-MORENO, M. J.; LÓPEZ-SANTOVEÑA, F.; ARANDA-CATALÁ, V. Chemical and

color characteristics of “lomo embuchado” during salting seasoning. **Journal of Muscle Foods**. p. 395-411. 1997.

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**. p. 91–98. 2015.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. Blackie Academic & Professional : London. p. 593. 2009.

RAO VK, Aruna B, Rafiyuddin Md, Rao KN, Girisham S, Reddy SM, González-Redondo P. Effect of relative humidity on biodeterioration of poultry feed and ochratoxin A production by *Penicillium* species. **Cogent Food & Agriculture**. v. 2. 2016.

RODRÍGUEZ, A.; RODRÍGUEZ, M.; MARTÍN, A.; DELGADO, J.; CÓRDOBA, J. J. Presence of ochratoxin A on the surface of dry-cured Iberian ham after initial fungal growth in the drying stage. **Meat Science**. v. 92. p. 728–734. 2012.

SALUSTIANO, V. C. **Avaliação da microbiota do ar de ambientes de processamento em uma indústria de laticínios e seu controle por agentes químicos**. Tese de doutorado. Universidade Federal de Viçosa – Minas Gerais. 2001.

SAMSON, R. A.; FRISVAD, J. C. *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes, mycotoxins and other extrolites. **Studies in Mycology**. 49. 2004.

SANTOS, P.; CENCE, K.; ZORTEA, M.; ZENI, J.; SILVEIRA, M. M.; GUIMARÃES, D. O.; VALDUGA, E.; CANSIAN, R. L.; BACKES, G. T. Avaliação de quitinase para o controle de fungos Filamentosos in vitro. **XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática – ENZITEC**. 2016.

SCHIRMER, W. N.; PIAN, L. B.; SZYMANSKI, M. S.E. GAUER, M. A. Air pollution in internal environments and sick building syndrome. **Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe**, España y Portugal. p. 3583 – 3590. 2008.

SHIMIKOMAKI, M.; FRANCO, B. D. M.; BISCANTINI, T. M.; PINTO, M. F.; TERRA, N. N.; ZORN, T. M. T. Charqui meats are hurdle technology meat products. **Food Reviews International**. p. 339-349. 1998.

SODRÉ, E. Avaliação da qualidade do ar do interior de locais públicos: formaldeído, acetaldeído e acetona. Dissertação de Mestrado em Ciências Químicas. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2006.

SONJAK S., LICEN M., FRISVAD, J. C., GUNDE-CIMERMAN, N. The mycobiota of three dry-cured meat products from Slovenia. **Food Microbiology**. p. 1 - 4. 2010.

TELLES, E. M. A higienização na prevenção e no controle do biofilme: uma revisão. 44p. **Monografia** (Curso de Especialização em Produção, Tecnologia e Higiene de Alimentos de Origem Animal) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. p. 44. 2011.

TANIWAKI, M. H.; SILVA, N. Fungos em alimentos: ocorrência e detecção. **Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL**. Campinas, SP. 2001.

TERRA, N. N. **Apontamentos de tecnologia de carnes**. São Leopoldo. E. Unisinos. 1998.

TERRA, N. N. TERRA, A. B. M.; TERRA, L. M. **Defeitos nos Produtos Cárneos: Origens e Soluções**. São Paulo: Varela. 2004.

TOSCANI, T., MOSERITI, A., DOSSENA, A, DALL'ASTA, C., SIMONCINI, N., VIRGILI, R. Determination of ochratoxin A in dry-cured meat products by a HPLC–FLD quantitative method. **Journal of Chromatography B**. p. 242–248. 2007.

TRENK, H. L.; BUTZ, M. E.; CHU, F. S. Production of ochratoxins in different cereal products by *Aspergillus ochraceus*. **Applied Microbiology**. v. 21. n. 6. p. 1032 – 1035, 1971.

Van der MERWE, K. J.; STEYN, P. S.; FOURIE, L.; DE SCOTT, B.; THERON, J. J. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. **Nature**, v. 205 p. 1112-1113. 1965.

VIEIRA, D. C.; TERRA, N. N.; KUBOTA, E. H.; SILVEIRA, D. D. Controle de mofo em salaminho e salame tipo italiano, através de desinfecção por natamicina, ultravioleta, ozônio e ionização do ar. Dissertação apresentada no Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos – Universidade Federal de Santa Maria. 2013.

WILSON, G.S. **Disinfection and sterilization**: theory and practice. [S.l.]: D. Van Nostrand Company INC., p. 396. 1958.