

IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS EM ERVA-MATE (*ILEX PARAGUARIENSIS* ST. HIL.)

E. Bernardi, M.F. Caldeira, J.S. do Nascimento

Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Laboratório de Micologia, CP 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brasil.

RESUMO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), espécie nativa da América do Sul, é amplamente utilizada na fabricação da bebida mais tradicional e consumida no Rio Grande do Sul, que é o chimarrão. A presença de fungos neste material orgânico pode ser dependente de sua composição e acondicionamento. Para a realização deste trabalho foram adquiridas amostras de erva-mate comercializadas em diferentes estabelecimentos do Município de Pelotas, RS. As amostras foram transportadas até o Laboratório de Micologia onde foram processadas as análises de contagem e identificação de fungos filamentosos, de acordo com a metodologia padrão para alimentos. Foram analisadas 34 amostras sendo os gêneros *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. os principais contaminantes fúngicos encontrados. As amostras pura folha apresentaram contaminação superior às moídas, assim como as embaladas em pacotes metalizados frente às embaladas em pacotes de papel.

PALAVRAS-CHAVE: *Ilex paraguariensis*, *Aspergillus*, *Penicillium*, fungos, embalagens.

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF MOLDS IN MATE (*ILEX PARAGUARIENSIS* ST. HIL.). Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), a native species of South America, is used extensively in the production of the most traditional and consumed drink in Rio Grande do Sul, that is the mate tea. For the accomplishment of this research samples were acquired of mate marketed in different establishments of the city of Pelotas, RS. These samples were transported to the Laboratory of Mycology where the counting analyses and identification of molds in agreement with the methodology standards for foods were carried out. Thirty-four samples were analyzed as being of the genera *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp., the main mold contaminants found. The pure leaf samples presented higher contamination than the ground leaves, as did the tea in metallic packages compared to that in paper packages.

KEY WORDS: *Ilex paraguariensis*, *Aspergillus*, *Penicillium*, fungi, packages.

INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), espécie de origem sul-americana, é comum na vegetação nativa de uma extensa área que abrange Brasil, Argentina e Paraguai, sendo que na região sul do Brasil, a cultura desempenha importante papel sócio-econômico, principalmente, nas pequenas propriedades agrícolas.

O Estado do Rio Grande de Sul é o principal consumidor de erva-mate, principalmente, em virtude das tradições regionais, onde o produto é utilizado em infusão com água quente, no preparo de uma bebida típica popularmente conhecida como chimarrão (ESMELINDRO *et al.*, 2002; HEINRICH & MALAVOLTA, 2001). Antes de ser consumida, a erva-mate passa por processos de beneficiamento, onde

depois de cortados os ramos da planta, estes passam por secagem e moagem para posterior empacotamento. O produto é acondicionado em 2 tipos de pacotes: embalagens metalizadas e embalagens de papel, em tamanhos de 500 e 1.000 g. Ainda de forma menos expressiva também é comercializada em embalagem a vácuo.

O produto comercial da erva-mate, conforme especificado nas embalagens, apresenta duas composições básicas, sendo elas na forma moída, composta por 70% folhas e 30% outras partes do ramo e na forma pura-folha, composta por 100% folhas. Segundo BURGSTALLER (1994) a erva-mate processada apresenta as seguintes composições físico-químicas: teor de cinzas (5,07-6,60%), fibras (14,96-19,95%), gorduras (5,57-9,10%), proteínas (8,30-13,45%), glicose (1,30-6,14%), sacarose (3,60-6,90%) e cafeína (0,97-1,79%),

valores de porcentagem em base seca. Por se tratar de produto extremamente desidratado poucos são os microrganismos que podem se multiplicar neste material. Entretanto, os fungos filamentosos por apresentarem estruturas de resistência, podem permanecer no produto até que existam condições físicas e nutricionais para o seu desenvolvimento. O tempo e as condições de armazenamento relacionadas aos tipos de embalagens podem propiciar o desenvolvimento destes microrganismos (RUPOLLO *et al.*, 2004).

Pelo fato da erva mate ser consumida por grande parte da população do Rio Grande do Sul, torna-se importante o conhecimento dos contaminantes fúngicos presentes neste produto, para futuramente buscar as causas desta contaminação e conseqüentemente diminuir os riscos oferecidos aos consumidores.

Com base nestas informações, este trabalho teve como objetivo identificar e quantificar os principais fungos presentes em diferentes marcas comerciais de erva-mate, em relação à composição e às embalagens utilizadas para o empacotamento.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização deste trabalho foram adquiridas 34 amostras de erva-mate de diferentes marcas comerciais, conservadas em embalagem metalizada e de papel, comercializadas no Município de Pelotas, RS. As amostras foram transportadas até o Laboratório de Micologia/IB/UFPel, onde foram realizadas as análises.

O meio de cultura foi preparado previamente, utilizando-se 140 g de batatas descascadas e cortadas em cubos, cozidas em 1.000 mL de água destilada por aproximadamente 15min. No decoto filtrado adicionou-se 10 g de dextrose e 15 g de ágar e o volume foi completado para 1.000 mL. Esse meio foi esterilizado em autoclave a 121° C por 20min e, posteriormente, o pH corrigido para 3,5 mediante a adição de ácido tartárico a 10%, e vertido em placas de Petri estéreis. Porções de 25 g de erva-mate foram homogeneizadas em 225 mL de água peptonada (0,1%) e a partir desta realizaram-se diluições decimais até 1:10000. De cada diluição foram semeados em superfície com alça em "L", alíquotas de 0,1 mL, em duplicatas, em batata-dextrose-ágar acidificado (BDA) e incubados a 25° C por 5 dias para obtenção das unidades formadoras de colônias (UFC) (SIQUEIRA, 1995; SILVA *et al.*, 1997).

Para efeito de análise quantitativa foram consideradas apenas as diluições que apresentaram a formação de colônias entre 15 e 150 unidades, sendo posteriormente identificados os principais gêneros fúngicos presentes, através da elaboração de lâminas

descartáveis confeccionadas com fita adesiva. Para isto, pressionou-se um pedaço da fita adesiva contra a cultura do fungo, colando-a sobre uma lâmina contendo uma gota do corante azul de Amann. A visualização das estruturas fúngicas foi realizada em microscópio óptico para identificação, conforme FUNDER (1968), ELLIS (1971), BARNETT & HUNTER (1972) e SINGH *et al.* (1991).

Os resultados das contagens totais de unidades formadoras de colônias foram submetidos à análise de variação e as médias dos tratamentos comparadas estatisticamente pelo teste de Duncan, através do uso do programa estatístico SANEST.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apenas 14 (41,18%) das amostras de erva-mate analisadas apresentaram contagens de fungos filamentosos entre o padrão estipulado (15-150 UFC) para enumeração destes microrganismos, sendo que outras três amostras (8,82%) não apresentaram contaminação (Tabela 1). O número de colônias encontradas pode ser considerado baixo, apesar do processo de beneficiamento deste produto ainda ser rudimentar.

Os fungos encontrados em ordem decrescente foram: 24 colônias de *Aspergillus* sp. (70,59%), 19 de *Penicillium* sp. (55,88%), 5 de *Cladosporium* sp. (14,71%), 3 de *Paecilomyces* sp., *Rhizopus* sp. e *Syncephalastrum* sp. (8,82%) e uma de *Monilia* sp. (2,94%). Dados semelhantes a estes foram verificados por NUNES *et al.* (2003) em trabalho com arroz comercializado nos municípios de Pelotas e Rio Grande, RS, onde observaram *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. como sendo os principais contaminantes, sendo estes gêneros também identificados por COSTA & SCUSSEL (2002) como os mais importantes fungos presentes em grãos de feijão do Estado de Santa Catarina, e por ROSSETTO *et al.* (2005) em trabalho com grãos de amendoim. PINHO & FURLONG (2000) também verificaram os gêneros citados anteriormente como sendo os principais contaminantes em massa de pizza pré-fabricada comercializada no Rio Grande do Sul. RUSSOMANNO *et al.* (2004), utilizando o método do papel de filtro, analisaram 51 amostras de plantas medicinais, vendidas como chás (sachês) e encontraram *Aspergillus flavus* e *Fusarium moniliforme* em todos os tipos de chás examinados.

Por outro lado, RIBEIRO *et al.* (2003) citam a espécie *Fusarium moniliforme* como o principal contaminante de produtos derivados do milho comercializados em Recife, PE. Segundo DILKIN *et al.* (2002) algumas cepas de *F. moniliforme* são capazes de produzir micotoxinas em substratos à base de milho com teores de umidade de 34%.

Tabela 1 - Unidades formadoras de colônias (UFC) e gêneros fúngicos identificados em amostras de erva-mate comercializadas no Município de Pelotas, RS, 2004.

Amostra	Tipo de embalagem	Composição	UFC	Gêneros identificados
1	metalizada	moída	1,1 x 10 ²	<i>Aspergillus, Penicillium</i>
2	metalizada	moída	1,6 x 10 ²	<i>Aspergillus, Penicillium, Cladosporium</i>
3	metalizada	moída	< 15	<i>Aspergillus</i>
4	metalizada	moída	< 15	<i>Penicillium</i>
5	metalizada	moída	< 15	<i>Cladosporium</i>
6	metalizada	moída	< 15	<i>Aspergillus</i>
7	metalizada	moída	2,3 x 10 ²	<i>Aspergillus, Penicillium, Monilia</i>
8	metalizada	moída	< 15	<i>Aspergillus, Penicillium, Paecilomyces</i>
9	metalizada	moída	< 15	-
10	metalizada	moída	< 15	<i>Aspergillus</i>
11	metalizada	pura folha	1,45 x 10 ³	<i>Aspergillus, Rhizopus</i>
12	metalizada	pura folha	2,6 x 10 ²	<i>Aspergillus, Penicillium, Cladosporium</i>
13	metalizada	pura folha	8,4 x 10 ²	<i>Aspergillus, Syncephalastrum, Paecilomyces</i>
14	papel	moída	< 15	<i>Aspergillus, Penicillium</i>
15	papel	moída	1,05 x 10 ³	<i>Aspergillus</i>
16	papel	moída	3,2 x 10 ²	<i>Penicillium</i>
17	papel	moída	< 15	<i>Aspergillus</i>
18	papel	moída	< 15	-
19	papel	moída	< 15	<i>Aspergillus, Penicillium, Cladosporium, Rhizopus</i>
20	papel	moída	< 15	-
21	papel	moída	< 15	<i>Penicillium</i>
22	papel	moída	< 15	<i>Aspergillus, Penicillium</i>
23	papel	moída	< 15	<i>Aspergillus, Cladosporium, Syncephalastrum</i>
24	papel	moída	2,6 x 10 ²	<i>Penicillium</i>
25	papel	moída	3,3 x 10 ²	<i>Aspergillus, Penicillium, Rhizopus</i>
26	papel	moída	< 15	<i>Penicillium</i>
27	papel	moída	1,7 x 10 ²	<i>Penicillium</i>
28	papel	moída	< 15	<i>Aspergillus, Penicillium</i>
29	papel	moída	< 15	<i>Aspergillus, Penicillium, Paecilomyces</i>
30	papel	moída	<15	<i>Aspergillus, Penicillium</i>
31	papel	pura folha	1,6 x10 ²	<i>Aspergillus, Penicillium</i>
32	papel	pura folha	9,9 x10 ²	<i>Aspergillus</i>
33	papel	pura folha	1,7 x10 ²	<i>Aspergillus</i>
34	papel	pura folha	<15	<i>Aspergillus, Syncephalastrum</i>

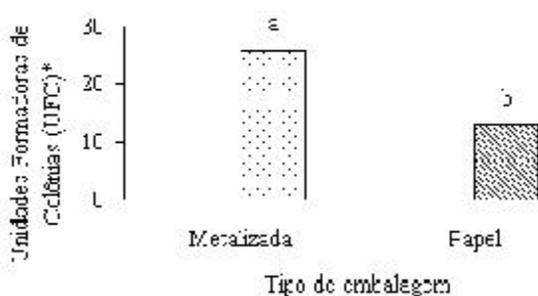


Fig. 1 - Unidades formadoras de colônia (UFC) de fungos filamentosos em erva-mate acondicionadas em embalagens metalizada e papel, comercializadas no Município de Pelotas, RS, 2004.

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo Teste de Duncan ($\alpha = 0,05$).

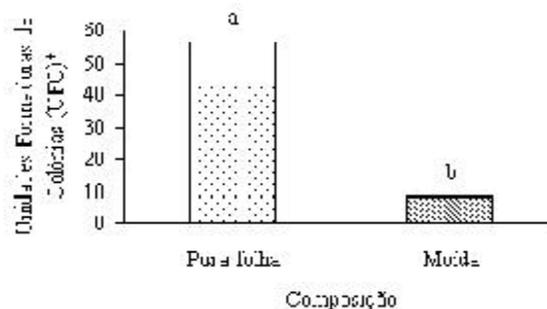


Fig. 2 - Unidades formadoras de colônia (UFC) de fungos filamentosos em erva-mate nas composições pura-folha e moída, comercializadas no Município de Pelotas, RS, 2004.

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo Teste de Duncan ($\alpha = 0,05$).

As amostras de erva-mate em embalagens metalizadas apresentaram contaminação por fungos filamentosos superiores às embalagens de papel (Fig. 1). Supõe-se que a diferença no grau de contaminação entre estas duas embalagens seja favorecida em função da aeração e manutenção da umidade. As embalagens metalizadas funcionam como uma câmara de crescimento favorável ao desenvolvimento de fungos, devido maior retenção da umidade mínima necessária ao fungo, especialmente quando as embalagens apresentem algum furo.

Com relação à composição do produto analisado, verifica-se que as amostras compostas por pura-folha apresentaram número de fungos filamentosos superiores às amostras de erva-mate moída (Fig. 2). Provavelmente, isto pode ser atribuído ao fato destes fungos encontrados apresentarem ampla distribuição no ambiente, provavelmente provenientes do cultivo ou da manipulação.

Alguns fungos encontrados neste trabalho são agentes importantes de deterioração de alimentos, outros podem ser produtores de toxinas, as chamadas micotoxinas, dentre os quais destacam-se *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. que, dependendo da espécie e das condições de armazenamento, podem produzir aflatoxinas e ocratoxinas, respectivamente (FRANCO & LANDGRAF, 2000; RODRIGUEZ-AMAYA & SABINO, 2002). Estas micotoxinas, dependendo da quantidade ingerida, podem ser nocivas à saúde humana, vindo a ser carcinogênicas ou hepatotóxicas. LEONI *et al.* (2001) encontraram 27 amostras de grãos de café (20,45%) contaminadas com ocratoxina A, ou seja, com o metabólito tóxico produzido por espécies do gênero *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp., comprovando a necessidade de conhecimento dos contaminantes presentes nos alimentos. Para FRANCO *et al.* (1989) e PINTOS *et al.* (1994) a possibilidade de formação de câncer em células orofaríngeas está associada, principalmente, à temperatura em que o chimarrão é ingerido. Já para GOLDENBERG (2002), embora o mecanismo exato da carcinogênese seja incerto, o consumo de chás apresenta um significativo papel no desenvolvimento de câncer oral e orofaríngeal, principalmente em partes do mundo onde este hábito prevalece.

As unidades formadoras de colônias encontradas nas amostras foram baixas, devido ao grau de desidratação do produto. Entretanto, a erva-mate com maior porcentagem de fungos pode se deteriorar mais rapidamente se as condições de armazenamento forem propícias ao desenvolvimento destes fungos no produto, a exemplo das condições encontradas nas embalagens metalizadas, que apresentaram maior concentração destes microrganismos. Na etapa de "sapeco" a erva-mate é submetida ao aquecimento, que varia dos 400° C na entrada e 65° C na saída, com tempo de residência em torno de oito minutos. Na

etapa seguinte, chamada de "secagem", a temperatura varia de 90 a 110° C e o tempo médio é de 3h (ESMELINDRO *et al.* 2002). Com a utilização desta metodologia de preparo, muitas estruturas fúngicas, principalmente vegetativas, provavelmente sejam inativadas, tornando o material livre de muitos microrganismos. Entretanto, se o procedimento posterior de embalagem não for seguido rigorosamente, os fungos existentes irão se proliferar facilmente, especialmente naquelas condições mais propícias.

CONCLUSÕES

Os fungos *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. são os contaminantes que predominam na erva-mate comercializada na região de Pelotas, RS.

A porcentagem de contaminação por fungos é maior na erva-mate pura-folha do que na moída.

Atenção mais rigorosa no consumo de erva-mate, em relação à presença de fungos, deve ser tomada nas amostras compostas por pura-folha, especialmente quando contidas em embalagens metalizadas.

REFERÊNCIAS

- BARNETT, H.L. & HUNTER, B.B. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Minnesota: Burgess Publishing Company, 1972. 241p.
- BURGSTALLER, J.A. *700 hierbas medicinales*. Buenos Aires: Edicial SA, 1994. Disponível em: <http://reality.sgi.com/omar/personal/argentina/mate_refs.html>. Acesso em: 20 jul. 2005.
- COSTA, L.L.F. & SCUSSEL V.M. Toxigenic fungi in beans (*Phaseolus vulgaris* L.) classes black and color cultivated in the state of Santa Catarina, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, n.33, p.138-144, 2002.
- DILKIN, P.; MALLMANN, C.A.; ALMEIDA, C.A.A.; STEFANON, E.B.; FONTANA, F.Z.; MILBRADT, E.L. Production of fumonisins by strains of *Fusarium moniliforme* according to temperature, moisture and growth period. *Brazilian Journal of Microbiology*, n.33, p.111-118, 2002.
- ELLIS, M.B. *Dematiaceous hyphomycetes*. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1971. 608p.
- ESMELINDRO, M.C.; TONIAZZO, G.; WACZUK, A.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, D. Caracterização físico-química da erva-mate: influência das etapas do processamento industrial. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.22, n.2, p.193-204, 2002.
- FRANCO, B.D.G.M. & LANDGRAF, M. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Atheneu, 2000. 182 p.
- FRANCO, E.L.; KOWALSKI, L.P.; OLIVEIRA, B.V. Risk factors for oral cancer in Brazil: a case control study. *International Journal of Cancer*, n.41, p.992-1000, 1989.
- FUNDER, S. *Practical mycology. manual for identification of fungi*. New York: Hafner, 1968. 146p.
- GOLDENBERG, D. Maté: a risk factor for oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncology*, n.38, p.646-649, 2002.

- HEINRICH, R. & MALAVOLTA, E. Composição mineral do produto comercial da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). *Ciência Rural*, v.31, n.5, p.781-785, 2001.
- LEONI, L.A.B.; FURLANI, R.P.Z.; SOARES, L.M.V.; OLIVEIRA, P.L.C. Ochratoxin A in Brazilian green coffee. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.21, n.1, p.105-107, 2001.
- NUNES, I.L.; MAGAGNIN, G.; BERTOLIN, T.E.; FURLONG, E.B. Arroz comercializado na região sul do Brasil: aspectos micotológicos e microscópicos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.23, n.2, p.190-194, 2003.
- PINHO, B.H. & FURLONG, E.B. The occurrence of molds, yeasts and mycotoxins in pre-cooked pizza dough sold in southern Rio Grande do Sul. *Brazilian Journal of Microbiology*, n.31, p.99-102, 2000.
- PINTOS, J.; FRANCO, E.L.; OLIVEIRA, B.V.; KOWAISKI, L.P.; CURADO, M.P.; DEWAR, R. Mate, coffee, and tea consumption and risk of cancers of the upper aerodigestive tract in southern Brazil. *Epidemiology*, n.5, p.583-590, 1994.
- RIBEIRO, S.A.L.; CAVALCANTI, M.A.Q.; FERNANDES, M.J.S.; LIMA, D.M.M. Fungos filamentosos isolados de produtos derivados do milho comercializados em Recife, Pernambuco. *Revista Brasileira de Botânica*, v.26, n.2, p.223-229, 2003.
- RODRÍGUEZ-AMAYA, D.B. & SABINO, M. Mycotoxin research in Brazil: the last decade in review. *Brazilian Journal of Microbiology*, n.33, p.1-11, 2002.
- ROSSETTO, C.A.V.; SILVA, O.F.; ARAÚJO, A.E.S. Influência da calagem, da época de colheita e da secagem na incidência de fungos e aflatoxinas em grãos de amendoim armazenados. *Ciência Rural*, v.35, n.2, p.309-315, 2005.
- RUPOLLO, G.; GUTKOSKI, L.C.; MARINI, L.J.; ELIAS, M.C. Sistemas de armazenamentos hermético e convencional na conservabilidade de grãos de aveia. *Ciência Rural*, v.34, n.6, p.1715-1722, 2004.
- RUSSOMANNO, O.M.R.; KRUPPA, P.C.; VALESAN, A.M.C.; MELINSKI, A.R.; BIKAWA, P.M. Ocorrência de fungos em chás comercializados. *Summa Phytopathologica*, v.30, n.1, 2004.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. São Paulo: Livraria Varela, 1997. 295p.
- SINGH, K.; FRISVAD, J.C.; THRANE, U.; MATHUR, S.B. *An illustrated manual on identification of some seed-borne Aspergilli, Fusaria, Penicillia and their mycotoxins*. Hellerup: Danish Government Institute of Seed Pathology and Department of Biotechnology, 1991. 133p.
- SIQUEIRA, R.S. *Manual de microbiologia de alimentos*. Rio de Janeiro: EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa Agroindustrial de Alimentos, 1995. 95p.

Recebido em 31/10/05

Aceito em 30/12/05