

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

**INVESTIGAÇÃO SOBRE A DETERIORAÇÃO
FÚNGICA DE EMPANADOS CONGELADOS DE
FRANGO: ORIGEM DA CONTAMINAÇÃO E
RESISTÊNCIA TÉRMICA DOS DETERIORANTES**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Évelin Francine Wigmann

Santa Maria, RS, Brasil,

2015

**INVESTIGAÇÃO DA DETERIORAÇÃO FÚNGICA DE
EMPANADOS CONGELADOS DE FRANGO: ORIGEM DA
CONTAMINAÇÃO E RESISTÊNCIA TÉRMICA DOS
DETERIORANTES**

Évelin Francine Wigmann

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

Orientador: Prof^a Dr^a Marina Venturini Copetti

Santa Maria, RS, Brasil,

2015

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado**

**INVESTIGAÇÃO DA DETERIORAÇÃO FÚNGICA DE EMPANADOS
CONGELADOS DE FRANGO: ORIGEM DA CONTAMINAÇÃO E
RESISTÊNCIA TÉRMICA DOS DETERIORANTES**

elaborada por
Évelin Francine Wigmann

Como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e
Tecnologia dos Alimentos**

COMISSÃO EXAMINADORA:

Marina Venturini Copetti, Dr^a (UFSM)
(Presidente/ Orientadora)

Cristiano Ragagnin de Menezes, Dr. (UFSM)

Michele Hoeltz, Dr^a (UNISC)

Rosa Cristina Prestes, Dr^a (UFSM)
(Suplente)

Santa Maria, 29 de janeiro de 2015.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, eu gostaria de agradecer a minha orientadora Professora Dr^a Marina, por ter me apresentado o mundo fascinante dos fungos e ter me dado a oportunidade desde a graduação de aprender um pouco sobre a sua experiência profissional. Muito obrigada por todo carinho e todos esses anos de laboratório!

O meu mais profundo e infinito agradecimento é para a minha mãe Zenaide e a minha vó *Oma* Olívia, por todo o incentivo, carinho e principalmente amor. Eu amo muito vocês!

Ao meu amado namorado Gabriel, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos, e permitir que eu me sinta bem até nos mais difíceis. Obrigada por todo amor, ele foi essencial para que eu chegasse até aqui! Te amo Baby!

As minhas melhores amigas, Kist, Walki, Paula, Bruna e Carolina pela amizade sincera e por permitirem que nunca faltassem momentos de descontração e muita alegria. Vocês são demais!

As minhas colegas e amigas de laboratório, Raquel, Cátia, Fernanda e Maríia por terem me ajudado nos experimentos com tanto empenho e responsabilidade. E a Angélica por toda parceria em Campinas e amizade.

Ao Professor Dr. Anderson, por ter permitido que eu finalizasse as pesquisas do mestrado na UNICAMP.

Aos meus queridos amigos da UNICAMP, muito obrigada por terem sido tão receptivos e carinhosos durante todo o tempo que estive no LMQA. Vocês foram incríveis!

A Professora Dr^a Maristela pela oportunidade de realizar o estágio na área de bacteriologia durante o mestrado no Instituto de Tecnologia em Alimentos (ITAL).

Enfim, a todos que compartilharam deste sonho de hoje eu me tornar Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Muito obrigada, meus amigos!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos
Universidade Federal de Santa Maria

INVESTIGAÇÃO DA DETERIORAÇÃO FÚNGICA DE EMPANADOS CONGELADOS DE FRANGO: ORIGEM DA CONTAMINAÇÃO E RESISTÊNCIA TÉRMICA DOS DETERIORANTES

AUTORA: ÉVELIN FRANCINE WIGMANN

ORIENTADORA: MARINA VENTURINI COPETTI

Data e Local de Defesa: 29 de janeiro de 2015, Santa Maria, RS, Brasil.

A indústria de alimentos tem modificado nas últimas décadas o foco de produção, uma vez que os hábitos alimentares dos consumidores foram alterados, em busca de alimentos práticos, rápidos e saborosos. Logo, foram criados os empanados congelados de frango, um dos maiores sucessos da indústria de *fast food*. Esta classe de produtos pré-prontos e congelados permite a armazenagem por longos períodos o que seleciona espécies de micro-organismos capazes de se desenvolver em condições de baixas temperaturas, com destaque para os fungos filamentosos psicrófilos. Apesar das perdas anuais serem estimadas em 1 a 1,5 % por deterioração fúngica de empanados congelados de frango, raros são os dados científicos disponíveis. O objetivo deste estudo foi realizar uma investigação micológica geral de uma indústria processadora de empanados congelados de frango, analisando as matérias-primas, os produtos originados e o ar ambiente de processamento. Assim como, o efeito dos tratamentos térmicos aplicados na fabricação dos empanados sob *Penicillium commune* (NGT 16/12), *Penicillium polonicum* (NGT 23/12 e NGT 33/12), *Penicillium glabrum* (NGT 29/12 e NGT 35/12), *Penicillium solitum* (NGT 30/12) e *Penicillium crustosum* (NGT 51/12), principais espécies relacionadas a deterioração destes produtos. As amostras de farinha apresentaram contagens entre 10^1 e 10^4 UFC/mL, predominando as espécies de *P. polonicum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus candidus*, *Eurotium amstelodami* e *Penicillium citrinum*. As amostras seguintes ao processamento apresentaram uma constante redução nas contagens para 10^1 UFC/g, com predominância de *P. polonicum*. Já nas amostras analisadas do produto final, 10% apresentaram contaminação por *P. glabrum*, espécie também predominante no ar ambiente da fábrica. Os resultados demonstraram que o *P. commune* (NGT 16/12), *P. polonicum* (NGT 23/12), *P. solitum* (NGT 30/12) e *P. crustosum* (NGT 51/12) são capazes de sobreviver aos tratamentos térmicos aplicados (fritura por imersão com óleo a 195-200 °C por 6 segundos) e cozimento em forno à 120-130 °C até alcançar a temperatura interna de 70 °C, quando inoculados nos empanados congelados de frango. Adicionalmente, foi verificado que o *P. polonicum* (NGT 23/12), espécie mais resistente aos tratamentos, manteve-se estável com média de contagem fúngica de 10^4 UFC/g desde a fritura até 6 minutos e 30 segundos de assamento, tendo 2,02 log UFC/g de redução com 72 °C e 3,29 log UFC/g de redução com 78 °C no interior do produto durante o assamento. De acordo com os resultados apresentados foi observado que tanto as farinhas utilizadas na fabricação dos empanados quanto o ar ambiente da indústria representam um perigo de contaminação, assim como foi verificado a sobrevivência de algumas das principais espécies deteriorantes de empanados aos tratamentos térmicos aplicados na indústria, logo estratégias devem ser adotadas para a redução de esporos fúngicos em possíveis fontes de contaminação e a necessidade de novas adequações dos tratamentos para eliminação de fungos filamentosos.

PALAVRAS-CHAVE: Fungos filamentosos. *Penicillium polonicum*. *Penicillium glabrum*. Produtos congelados. Tratamento térmico.

ABSTRACT

Master's Thesis
Postgraduate Program in Food Science and Technology
Federal University of Santa Maria

RESEARCH OF FUNGAL SPOILAGE IN FROZEN CHICKEN NUGGETS: ORIGIN OF THE CONTAMINATION AND THERMAL RESISTANCE OF THE FUNGI

AUTHOR: ÉVELIN FRANCINE WIGMANN

ADVISOR: MARINA VENTURINI COPETTI

Date and Place of Defense: January 29th, 2015, Santa Maria, RS, Brazil.

The food industry has changed in recent decades the focus of the production, since the eating habits of consumers have been directed to practical, fast and tasty foods. So, breaded frozen chicken were created, one of the biggest hits of the fast food industry. This class of pre-made and frozen products allows for long-term storage and can select species of microorganisms capable of growing in low temperatures, especially filamentous psychrophilic fungi. Despite annual losses are estimated at 1 to 1.5 % by fungal spoilage of frozen chicken nuggets, rare are the available scientific data. The objective of this study was to conduct a general mycological investigation of a processing industry of frozen chicken nuggets, analyzing the raw materials, the products in different processing steps and the ambient air of each unit of operation. It was also analyzed the effect of heating treatments applied in the manufacture of the nugget on inactivation of *Penicillium commune* (NGT 16/12), *Penicillium polonicum* (NGT 23/12 and 33/12), *Penicillium glabrum* (NGT 29/12 and NGT 35/12), *Penicillium solitum* (NGT 30/12) and *Penicillium crustosum* (NGT 51/12), main species related to deterioration of these products. The flour exhibited counts between 10^1 and 10^4 CFU/mL, predominating species *P. polonicum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus candidus*, *Penicillium citrinum* and *Eurotium amstelodami*. The following processed samples showed a steady reduction in scores for 10^1 CFU/g, with a predominance of *P. polonicum*. In the other hand, regarding the samples of final product analyzed, 10% were contaminated by *P. glabrum*, with was also the most predominant species of spoilers in the air environment. The results show that the *P. polonicum* (NGT 23/12), *P. commune* (NGT 16/12), *P. solitum* (NGT 30/12) and *P. crustosum* (NGT 51/12) were able to survive to the heat treatments applied (fried by immersion in oil at 195-200 °C for 6 seconds), and baking in oven at 120-130 °C until the internal temperature reached 70 °C when inoculated in the frozen chicken nuggets. Additionally, it was observed that *P. polonicum* (NGT 23/12), was the most heat resistant species, recovering counts of 10^4 CFU/g after frying for 6 minutes and 30 seconds of cooking, having 2,02 log CFU/g reduced at 72 °C and 3,29 log CFU/g reduced at 78 °C in the internal of the product during the baking. According to the results it was observed that both the flour used to manufacture breaded as the air industry environment pose a hazard, then strategies must be taken to reduce the presence of fungal spores in this points, possible sources of these fungal contamination.

KEYWORDS: Filamentous fungi. *Penicillium polonicum*. *Penicillium glabrum*. Frozen products. Heat treatment.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 Processamento de empanados de frango	11
2.2 Fontes de contaminação por micro-organismos deteriorantes	14
2.3 Higiene no ambiente de processamento	17
2.4 Tratamentos térmicos aplicados aos empanados congelados de frango e seus efeitos na qualidade sensorial e microbiológica	19
2.5 Tratamento e estabilidade térmica de fungos filamentosos.....	20
2.6 Micro-organismos deteriorantes de carne e produtos cárneos sob baixas temperaturas	22
3 OBJETIVOS.....	25
3.1 Objetivos gerais	25
3.2 Objetivos específicos	25
4 MANUSCRITO I	26
Resumo	27
4.1 Introdução.....	
4.2 Materiais e Métodos	29
4.2.1 Coleta das amostras	29
4.2.2. Avaliação quantitativa dos fungos filamentosos	30
4.2.3 Identificação dos fungos filamentosos	
4.2.4 Determinação da contaminação fúngica do ambiente de processamento.....	31
4.3 Resultados.....	31
4.4 Discussão	33
4.5 Referências Bibliográficas.....	36
5 MANUSCRITO II.....	44
Resumo	45
5.1 Introdução.....	46
5.2 Materiais e Métodos	47
5.2.1 Fungos filamentosos e preparo das suspensões de conídios	47

5.2.2 Avaliação da capacidade de sobrevivência de conídios de <i>Penicillium</i> spp. ao choque térmico em tampão fosfato pH 7.2.....	48
5.2.3 Efeito das etapas de fritura e cozimento de empanados de frango na sobrevivência de <i>Penicillium</i> spp.	49
5.2.3.1 Empanados de frango e inoculação com os conídios de <i>Penicillium</i> spp.	49
5.2.3.2 Efeito da fritura e cozimento sobre a inativação e sobrevivência de <i>Penicillium</i> spp. em empanados de frango.....	49
5.2.3.4 Enumeração de fungos nos empanados de frango submetidos à fritura e cozimento	50
5.2.4 Inativação de <i>P. polonicum</i> (cepa 23/12 NGT) durante o processamento térmico de empanados de frango	51
5.2.5 Análise estatística	51
5.3 Resultados.....	51
5.4 Discussão.....	53
5.5 Referências Bibliográficas.....	56
6 CONCLUSÕES	61
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

1 INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa a terceira posição no ranking dos maiores produtores mundiais de carne de frango, com produção total de cerca de 12,308 milhões de toneladas em 2013 (ABPA, 2014). A venda de produtos processados de frango tem se intensificado pela mudança de hábitos alimentares dos consumidores, em que a praticidade e conveniência são prioridades na escolha de consumo.

Neste contexto foram desenvolvidos os empanados congelados de frango, um dos maiores sucessos da indústria de *fast food*. Há muitos anos, a prática de empanar carnes já era realizada e conhecida pelo sabor e textura, obtendo logo rápida aceitação nas prateleiras dos supermercados. Além disso, os empanados congelados de frango apresentam valor agregado por serem produtos de fácil preparo e vida útil mais longa por serem congelados (OWENS, 2001).

A conservação pelo frio tem a vantagem de preservar grande parte do valor nutritivo e características sensoriais dos alimentos. Porém, embora os alimentos conservados a temperaturas inferiores à -10°C a princípio não permitam o crescimento microbiano, este método tem a desvantagem de não eliminar os micro-organismos presentes, apenas torna-os inativos. Desta maneira, ao encontrarem condições ambientais favoráveis, os micro-organismos são capazes de retomar a sua atividade (ADAMS & MOSS, 2000). Por esta razão é importante assegurar a boa qualidade das matérias-primas antes da refrigeração e congelamento, as práticas higiênicas durante o processamento do produto, além de manter um controle cuidadoso da temperatura ao longo da estocagem nas gôndolas dos supermercados (BAPTISTA & LINHARES, 2005).

A deterioração bacteriana, em geral, é mais comum em condições ideais de pH, atividade de água e temperatura (JAY, 2005). Nestas condições, os fungos estão em desvantagem devido ao maior tempo de geração que apresentam por serem eucariontes (PITT & HOCKING, 2009), porém os fungos filamentosos são mais versáteis que as bactérias na superação de barreiras de pH, temperatura e atividade de água, parâmetros frequentemente empregados pela indústria para controle microbiano.

Por mais que a deterioração fúngica não seja muito comum em carne de frango, ela acontece mais facilmente quando a superfície do produto se torna seca ou quando os parâmetros intrínsecos dos alimentos são impeditivos ao desenvolvimento de bactérias e leveduras, o que ocorre principalmente nos períodos pós-processamento, sobretudo durante o período de estocagem (JAY, 2005). Segundo dados internos de indústrias do setor, anualmente entre 1,0 a 1,5% da produção de empanados congelados de frango é perdida devido ao desenvolvimento fúngico nestes produtos durante a estocagem (WIGMANN et al., 2015).

Até meados do século passado a preocupação com a deterioração fúngica em gêneros alimentícios não era expressiva, uma vez que os fungos eram considerados causadores apenas da deterioração superficial de alimentos, mas a sua importância está cada vez mais evidente com as descobertas dos metabólicos tóxicos produzidos, as micotoxinas, e seus efeitos carcinogênicos e tóxicos sobre o organismo humano (SAMSON et al., 2002). Wigmann et al. (2015) comprovaram a capacidade das principais espécies deteriorantes de empanados congelados de frango produzirem micotoxinas como verrucosidina, penitrem A, citreoviridina, ácido ciclopiazônico e roquefortina C, representando assim um risco à saúde do consumidor.

Em produtos empanados, vários ingredientes são adicionados no momento da sua elaboração, os quais podem ser fontes de contaminação microbiana. Durante as etapas de *predust*, *batter* e *breader* os derivados de cereais utilizados poderão ser fontes de esporos fúngicos. Segundo Dill et al. (2009), é empregado farinha de trigo na formulação das coberturas, o que torna o produto suscetível a contaminação por várias espécies dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium* e *Fusarium* geralmente associados à infecção deste cereal (PITT & HOCKING, 2009).

Para evitar que micro-organismos estejam presentes no produto final, a indústria de alimentos costuma aplicar tratamentos térmicos para reduzir ou então eliminar possíveis contaminantes. No caso dos empanados de frango, a fritura e o assamento cumprem esta função (DILL et al., 2009). Por mais que na fritura, a temperatura do óleo seja bastante alta (195-200°C), os empanados são imersos por apenas alguns segundos com o intuito principal de melhorar a aparência do produto, tornando-o dourado. Sendo então, a maior parte dos micro-organismos eliminados durante o assamento, em que a temperatura de 120-130 °C do

forno atua com o intuito de alcançar 70 °C no centro do empanado. Porém, se algumas das espécies relacionadas resistirem aos tratamentos ou se houver recontaminação do produto, os fungos apresentam potencial de deterioração durante o período de estocagem.

Considerando-se o aspecto de recontaminação, o ar ambiente representa um ponto crítico na elaboração deste produto no setor de empacotamento (SVEUM et al., 1992), sendo esta a última etapa dentro da indústria, onde não haverá nenhum tratamento térmico posterior para eliminar possíveis contaminantes.

Para minimizar esta deficiência de informação e reduzir as perdas econômicas envolvidas com a deterioração fúngica de empanados congelados de frango torna-se necessário um estudo micológico das diferentes etapas do processamento de maneira a se averiguar a origem dos fungos potencialmente deteriorantes, assim como verificar a capacidade de sobrevivência das espécies isoladas de empanados congelados de frango deteriorados por fungos a tratamentos térmicos aplicados. A partir de então, será possível prevenir a subsequente deterioração, garantindo a elaboração de um produto adequado do ponto de vista sensorial e de segurança alimentar, o que ao mesmo tempo reduz as perdas decorrentes da rejeição por parte dos consumidores e reclamações com retorno do produto.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Processamento de empanados de frango

A comercialização de empanados congelados de frango foi incorporada à indústria de *fast food* no final dos anos 70, obtendo em pouco tempo êxito em vendas (BARBUT, 2012). Por mais que o consumo de empanados de frango seja considerado novo no mercado, é sabido que há muitos anos atrás já se realizava o ato de empanar carnes, logo é um alimento tradicional, porém com a facilidade de preparo exigida pelo mundo contemporâneo.

Por definição na legislação brasileira, empanado de frango é o produto cárneo industrializado, obtido de carnes de diferentes espécies de animais de açougue. Podendo se apresentar com diferentes formatos, acrescido de ingredientes (proteínas de origem vegetal e/ou animal, aditivos, condimentos, especiarias, farinhas, vegetais, queijos, molhos, produtos cárneos industrializados) e revestido por cobertura apropriada. Trata-se de um produto cru, ou semicozido, ou cozido, ou semifrito, ou frito, ou outros. Quanto aos limites, é exigido o mínimo de 10% de proteína e máximo de 30% de carboidratos na formulação. Já referente a adição de proteínas não cárneas é permitido o uso máximo de 4% na forma de proteína agregada (BRASIL, 2001).

No processamento de empanados (Figura 1), a primeira operação a ser feita é a redução do tamanho da carne de frango congelada para formar pequenas porções, que juntamente com a adição da salmoura facilita a extração das proteínas miofibrilares, permitindo a ligação posterior da mistura (ORDOÑES, 2005). Em seguida, os outros ingredientes são incrementados na formulação tornando uma mistura homogênea, para melhorar a qualidade sensorial do produto (SAMS et al., 2001). Depois, esta mistura adquire forma prensando a massa dentro de um molde. Nesta etapa, a temperatura é um fator a ser controlado, num limite de -4 a -2 °C, para que o processo ocorra corretamente, sem se tornar mole ou desconfigurar depois de sair do molde desejado (OWENS, 2001).

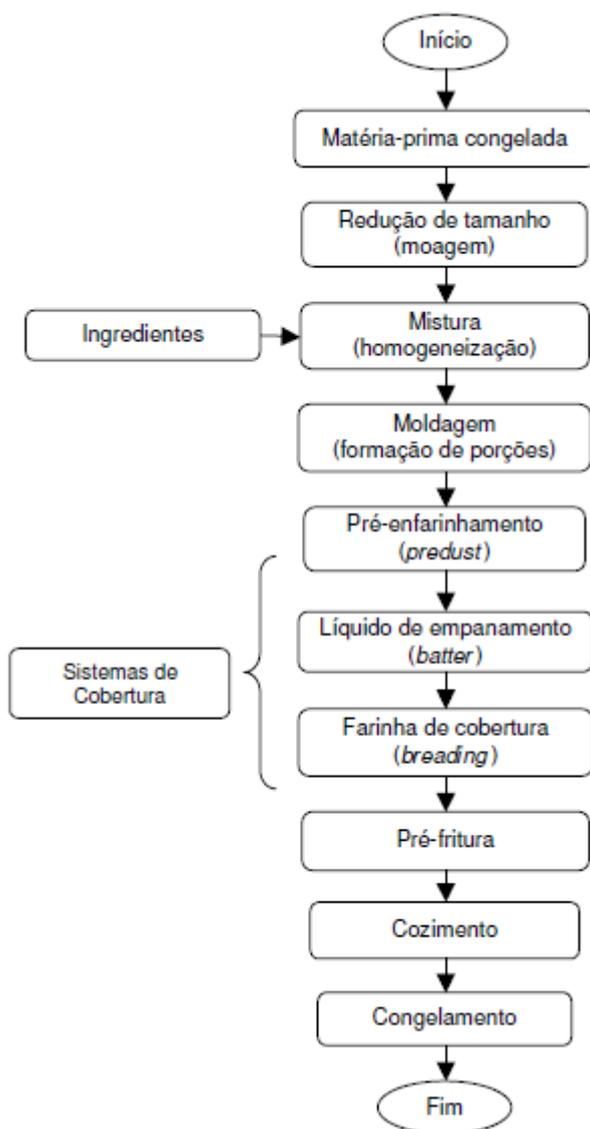


Figura 1 - Fluxograma do processamento de empanados congelados de frango (DILL et al., 2009).

Com a massa pronta e o formato adequado, iniciam-se as etapas de recobrimento dos empanados de frango. Geralmente, aplica-se uma camada inicial de *predust* (pré-enfarinhamento), uma camada de *batter* (suspensão de sólido em líquido) e uma de *breader*

(cobertura final) (BARBUT, 2002). Não há obrigatoriedade no uso de todas as camadas ou sequência correta. A duplicação de camadas de *batter* e *breader* serve como alternativa para melhorar o controle de *pick-up* (rendimento) (DEGENHART, 2003).

A camada de pré-enfarinhamento tem como função principal facilitar a adesão entre as camadas seguintes e o substrato, já que normalmente a superfície da massa é irregular, podendo ocorrer problemas de aderência das coberturas seguintes (DILL et al., 2009). Já o *batter* consiste em uma camada em pó de diversos ingredientes (amido, gomas e farinhas) podendo ser hidratado na forma de suspensão. Além de agir como camada ligante entre as camadas, também é responsável pelas características econômicas, influenciando na espessura do produto final (OLIVO, 2006). O *breader* é a última camada, com a finalidade de permitir melhor textura e aparência visual, além de absorção de umidade e gordura (BARBUT, 2002). Todas as etapas de cobertura podem ser acrescidas de variados tipos de farinha (trigo, milho, arroz e fécula de mandioca), condimentos, gomas e amidos (DILL et al., 2009).

A pré-fritura é o primeiro tratamento térmico realizado nos empanados e consiste no mergulho do produto em óleo sob altas temperaturas (180-200°C), por curto período de tempo (20 a 35s) (DILL et al., 2009). O objetivo desta operação é fixar a cobertura, retirar a umidade, absorver o óleo, aprimorar o sabor, proporcionar coloração desejável e textura crocante (SOORGI et al., 2012).

Um aspecto importante e que deve ser levado em consideração é o tipo de óleo usado na fritura, pois a sua composição reflete diretamente nas propriedades do alimento frito. O óleo mais utilizado pelas indústrias é o óleo de palma, que apesar de não ser considerado saudável, é benéfico pelo baixo teor de ácidos graxos insaturados prevenindo a oxidação, responsável pelo desenvolvimento de aromas indesejáveis (DILL et al., 2009). Para adquirir a viscosidade desejada nos empanados de frango durante a fritura podem ser aplicados três tipos de *batter*, que são: *batter* de adesão, *batter* de coesão e *batter* de tempura, sendo as principais diferenças a conformação das aplicações de cobertura, composição, função e tempo de processo (DILL et al., 2009).

Após a fritura, realiza-se o assamento, podendo ser a vapor ou apenas calor (DILL et al., 2009), sendo decisivo na redução da contaminação microbiana interna, além de, também ser responsável pelo desenvolvimento do aroma característico e sabor do produto (OLIVO, 2006).

Por fim, o congelamento dos empanados visa controlar o crescimento microbológico, aumentando a vida útil, além de preservar os aspectos sensoriais do produto (JAY, 2005). Os produtos empanados congelados tornam-se também menos susceptíveis à oxidação e à perda das camadas de empanamento, garantindo os atributos sensoriais do produto (BARBUT, 2002). É fundamental os produtos permanecerem sob baixas temperaturas até o momento de seu preparo, para que a qualidade microbológica mantenha-se estável durante o período de prateleira, visto que fungos potencialmente deteriorantes deste produto conseguem se desenvolver a temperaturas de até -5 °C (SACCOMORI et al., 2015).

2.2 Fontes de contaminação por micro-organismos deteriorantes

Em produtos empanados, vários ingredientes são adicionados no momento da sua elaboração, os quais podem ser fontes de contaminação microbiana. A prática de cobrir alimentos com farinhas é usada pela indústria de alimentos para melhorar a textura e para aumentar a variedade dos produtos, servindo como barreira para a perda de água durante a etapa de fritura, resultando em uma cobertura crocante e a carne do seu interior suculenta (FELLOWS, 1994).

Durante as etapas de *predust*, *batter* e *breader* os derivados de cereais utilizados poderão ser fontes de contaminação fúngica. É evidente que a quantidade de fungos isoladas a partir de farinhas são mais baixas do que as presentes nos cereais antes da moagem, e que fungos como *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. acabam predominando no alimento, pela alta capacidade de esporulação (PITT & HOCKING, 2009). Logo, se estes fungos não forem eliminados com o processamento térmico, apresentam potencial de deterioração do produto durante o período de estocagem (BARBUT, 2002). As condições abióticas mais importantes e usadas na influência do crescimento de fungos e produção de micotoxinas são a atividade de água, temperatura e a composição de gases, porém o uso de ácidos fracos, como ácido sórbico, ácido benzóico e ácido propiônico também servem como alternativa na prevenção destes micro-organismos (CHULZE et al., 2010).

Segundo Dill et al. (2009), é empregado farinha de trigo e milho como ingredientes básicos e farinha de arroz, soja e cevada como opcionais na formulação da cobertura *batter*, o que torna o produto suscetível à contaminação por várias espécies dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium* e *Fusarium*, geralmente associados à deterioração dos cereais (PITT & HOCKING, 2009). Segundo Graves e Hesseltine (1965), os primeiros estudos publicados de fungos em farinhas foram nos Estados Unidos por Bell (1909), o qual observou que as contagens fúngicas das farinhas usadas para panificação eram diferentes, mesmo em condições iguais de estocagem.

A utilização de cobertura de farinha de trigo apresenta também alguns problemas tecnológicos como a perda da crocância e a formação de um filme entre a camada e a carne, comprometendo a aderência, fato este que pode ser facilmente controlado com o uso de material protéico e gomas. Porém, apesar destas desvantagens a farinha de trigo é a mais usada na formulação de *predust* (DEGENHART, 2003).

A transformação de trigo em farinha começa com a limpeza e a lavagem dos grãos, partindo para o armazenamento em condições de 8-12% de umidade e atividade de água entre 0,40 e 0,65 para evitar o desenvolvimento de fungos. Antes da moagem, é adicionado água pulverizada para aumentar o conteúdo de umidade para 14-15% e atividade de água 0,68-0,70, pois o trigo seco é muito frágil para ser moído. Durante a moagem, os grãos passam por uma sequência de operações como moagem e peneiramento para separar o endosperma das camadas exteriores, as frações de endosperma internas são moídas para produzir a semolina e depois a farinha. Estes procedimentos acabam armazenando resíduos úmidos pela condensação da umidade nos rolos de quebra e acúmulo de farinha dentro do equipamento, o que gera a contaminação da farinha, principalmente, por fungos filamentosos (BERGHOFER et al., 2003).

Na Austrália, observou-se que havia a presença de 100% de fungos filamentosos no trigo e depois na obtenção da farinha em 96% das amostras, tendo apenas 1 log UFC/mL de redução, de 10^3 no grão para 10^2 UFC/mL na farinha. Os gêneros predominantes em todo processamento foram *Penicillium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Alternaria* e *Fusarium*, sendo as contagens reduzidas ao longo do processo de moagem do trigo. *Penicillium* sp. se destaca com aumento de 22% na contagem fúngica, do trigo até a farinha, comparado com os outros gêneros (BERGHOFER et al., 2003).

Em contrapartida, a contagem encontrada por Cabañas et al. (2008) na farinha de trigo foi maior, com 10^3 UFC/mL quanto aos fungos, o gênero *Aspergillus* teve 100% de ocorrência nas amostras e *Penicillium* sp. 96%. *Aspergillus candidus* foi a espécie predominante em farinha de trigo, segundo Weidenböner et al. (2000), seguido de espécies de *Penicillium* sp. (*Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium griseofulvum* e *Penicillium brevicompactum*) com 15% de ocorrência.

Para a cultura do milho, o gênero frequentemente isolado com altas contagens é o *Fusarium* sp., particularmente *Fusarium verticillioides*, *Fusarium semitectum* e *Fusarium proliferatum* (PITT et al., 1998). Outros fungos como *Aspergillus flavus* e *Fusarium graminearum* também estão associados às contaminações do grão (CHULZE et al., 2010). Sabe-se que estas espécies são produtoras de metabólitos tóxicos, as micotoxinas, durante o crescimento dos fungos sobre os mais diferentes substratos (PITT & HOCKING, 2009). Algumas delas permanecem restritas ao micélio fúngico, enquanto que a maior parte é secretada no alimento. E mesmo com a remoção ou destruição dos fungos, a maioria das micotoxinas irá permanecer no produto devido a sua resistência térmica (FILTENBORG et al., 1996). As toxinas fúngicas diferem muito nas suas propriedades químicas, biológicas e toxicológicas, possuem como efeitos tóxicos mais importantes o desencadeamento de diversos tipos de tumores e supressão imune (IARC, 1993; PETSKA & BONDY, 1994).

Considerando as micotoxinas como perigo à saúde pública, Cartillo et al. (2008) analisaram produtos à base de milho após serem fritos e assados verificando que 22,8 e 18,2 % das amostras mostram-se positivas para desoxinivalenol (DON), após serem submetidos aos tratamentos, respectivamente. Além disso, 1,7% dos produtos assados avaliados apresentaram contaminação por nivalenol (NIV). Já para Milanez et al. (2006) nas análises de floco e canjica de milho somente uma das 78 amostras continha traços de DON e NIV. Segundo Brera et al. (2006), durante a moagem, as aflatoxinas e zearalenonas reduzem suas quantidades aproximadamente quatro e dez vezes nos produtos finais, respectivamente.

Abdullah et al. (2000) revelaram em seu estudo que não só o armazenamento dos grãos deve ser uma forma de prevenir o desenvolvimento de fungos, mas também o armazenamento das farinhas merece atenção na prevenção da deterioração. Para a manutenção do conteúdo de umidade à 25 °C de 9,6% para a farinha de arroz, 10,7% para farinha de trigo e 10,5% para a farinha de milho, os níveis de atividade de água com 0,65 para

a farinha de arroz e trigo e 0,80 para a farinha de milho permite a estocagem por até 6 meses sem o aparecimento de bolor.

Os condimentos também podem ser uma fonte de contaminação fúngica. Segundo Witkowska et al. (2011), em estudo feito com condimentos comumente adicionados em produtos cárneos de frango, detectaram fungos filamentosos em 50% das amostras, que apesar de apresentarem baixas contagens (1 a 3 log UFC/g), só podem ser considerados seguros quando bem distribuídos na massa cárnea e armazenados adequadamente durante a vida útil do produto.

Em função dos condimentos terem origem tropical e pelos métodos usados na produção, estes produtos são frequentemente contaminados com fungos xerofílicos (PITT & HOCKING, 2009). O potencial de contaminação por micotoxinas encontrados em condimentos não representa uma ameaça para a saúde apresentando normalmente níveis baixos de aflatoxinas (40-160 mg/Kg), além da consideração que eles são diluídos na massa cárnea. A única preocupação seria se caso os fungos filamentosos dos condimentos contaminassem outros ingredientes, o que acabaria diminuindo a qualidade do produto final (PITT & HOCKING, 2009).

2.3 Higiene no ambiente de processamento

Condições higiênico-sanitárias adequadas nas indústrias de alimentos são um dos principais requisitos para a qualidade do produto final, além de ser uma exigência dos consumidores. Deseja-se que no alimento adquirido não haja nenhum tipo de contaminante químico, físico ou microbiológico (JAY, 2005). A carga microbiana final de um alimento representa a somatória dos micro-organismos presentes nas matérias-primas e também daqueles que se agregam no produto durante as várias etapas do processamento (CASTELLARI et al., 2010; BERGHOFER et al., 2003). Neste sentido, os sistemas de refrigeração e ar ambiente da fábrica também representam perigo de contaminação por fungos filamentosos em empanados congelados de frango.

Penicillium sp. foi o gênero mais encontrado em amostras do ar ambiente de uma indústria de produto cárneo curado. *Penicillium nalgiovense* esteve associado à deterioração do produto e também esteve presente nas superfícies das instalações e nos materiais de produção (ASEFA et al., 2010). A contaminação ocorre em diferentes estágios da produção, porém o que determina a capacidade de colonização nos alimentos é a espécie e a sua adaptabilidade em se multiplicar no produto em questão (CASTELLARI et al., 2010). Considerando 5 indústrias de embutido fermentado seco argentino, foram isoladas, em geral, 15 espécies diferentes no ar ambiente de fábrica, e 8 delas foram também encontradas em 50% das amostras coletadas em diferentes etapas do processamento, tais como *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium nordicum*, *Penicillium nalgiovense*, *Penicillium chrysogenum*, *Mucor racemosus*, *Rhizopus stolonifer*, *Eurotium amstelodami* e *Aspergillus ochraceus* (CASTELLARI et al., 2010).

Em indústrias de produtos cárneos, como linguiça e patê de fígado as espécies de *Penicillium* também foram predominantes no ar ambiente de processamento, juntamente com *Eurotium* sp. e *Cladosporium* sp., respectivamente. Porém os locais de maior contagem fúngica foram no gerador e nas cabines de defumação para a linguiça, e na refrigeração com alta ventilação para o patê de fígado (SORENSEN et al., 2008).

Numa indústria de macarrão, o sistema de ventilação nas etapas de processamento mostrou-se inadequado ocasionando contaminação dos produtos. Foram encontrados *Cladosporium* sp. (41,2% das amostras), *Penicillium* sp. (21,4%) e *Aspergillus* sp. (17,5%), além de *Fusarium* sp., *Mucor* sp., *Acremonium* sp., *Alternaria* sp., *Rhizopus* sp., *Syncephalastrum* sp. e leveduras nas amostras de ar do ambiente. E foi evidenciado que os três principais gêneros também eram os mais frequentes no ambiente de fora da fábrica, ou seja, os conídios não tiveram nenhum obstáculo para entrar na linha de produção. Problema este, que é intensificado com a circulação precária de ar nas instalações da fábrica (TSAI & LIU, 2009).

Kure et al. (2004) também comprovaram a importância da qualidade do ar ambiente quando os alimentos permanecem expostos por muito tempo durante o processamento. Num estudo realizado em quatro indústrias de queijos semi-duros os fungos *Penicillium commune*, *Penicillium palitans*, *Penicillium solitum* e *Penicillium roqueforti* foram isolados do ar de fábrica e por mais que em baixas concentrações, estavam presentes em todas as etapas

analisadas, sendo que as três primeiras espécies foram mais frequentes na sala de embalagem dos queijos em três das quatro indústrias (KURE et al., 2004).

2.4 Tratamentos térmicos aplicados aos empanados congelados de frango e seus efeitos na qualidade sensorial e microbiológica

A forma em que a indústria de empanados congelados de frango encontrou de melhorar as características microbiológicas e sensoriais foi realizando os procedimentos de fritura por imersão e cozimento em forno convencional (DILL et al., 2009).

A imersão de alimentos em óleo no processo de fritura proporciona características únicas, como sabor agradável, cor e palatabilidade característicos (ADEDEJI et al., 2009). Porém, este método tem a desvantagem de incorporar muito óleo no alimento. Adedeji et al. (2009) afirma que isto pode ser minimizado com o uso da radiação micro-ondas à 6.7 W/g como pré-cozimento, seguido de fritura à temperatura de 170 °C do óleo.

A redução no tempo de processamento é uma das maiores buscas da indústria, neste aspecto a duração do tratamento após a pré-fritura pode ser reduzido de 11 minutos em forno convencional para 15 segundos com o cozimento em forno micro-ondas. Segundo Albert et al. (2009) nenhum dos tratamentos apresentou diferença significativa entre o rendimento, cor ou textura, porém as amostras do tratamento com micro-ondas exibiram cores mais claras, o que já era esperado, uma vez que a cobertura externa adquire cor dourada típica pela reação de *Maillard* em altas temperaturas.

A crocância é um dos parâmetros mais desejados pelos consumidores em empanados congelados de frango e a fritura está diretamente relacionada com esta qualidade, juntamente com as diversas formulações de coberturas, temperatura e tipo de óleo, tempo de fritura e formato do produto (CHEN et al., 2008; BAIXAULI et al., 2003; ALTUNAKAR et al., 2004). A adição da farinha de soja na cobertura mais externa melhora a textura dos empanados com fritura em óleo à 180 °C por 12 minutos, devido ao elevado teor de proteínas, logo resulta no aumento da viscosidade (DOGAN et al., 2005).

Por outro lado, de nada adianta a crocância externa se o interior do produto não for suculento. Varela et al. (2008) coletaram empanados pré-cozidos de supermercados e

verificaram a qualidade dos mesmos em diferentes tipos de cozimento. Os tratamentos em micro-ondas (1.15 minutos na potência máxima) apresentaram menor conteúdo de óleo e juntamente com os fritos (180 °C por 3 minutos em óleo de girassol) apresentaram maior conteúdo de umidade, critério associado à suculência.

Em seguida, o próximo tratamento térmico de empanados congelados de frango é o assamento (DILL et al., 2009). A tenacidade é o principal efeito sensorial durante o cozimento de carnes (CHRISTENSEN et al., 2000), e isso se deve as mudanças das estruturas da carne, tais como a destruição das fibras transversal e longitudinal, a formação de gel, agregação de proteínas sarcoplasmáticas e solubilização do tecido conjuntivo (TORNBORG, 2005). Segundo Leonhart et al. (2004) a utilização de cozimento com injeção de vapor em empanados de frango, é mais benéfica do que o cozimento em forno convencional, pois garante rendimento de até 98,5%, quando a temperatura do forno alcança 209 °C e o produto é exposto por 3,6 minutos.

Alimentos cozidos em produtos cárneos possuem duas funções, a de melhorar a palatabilidade e torná-lo seguro para o consumo (TORNBORG, 2005). Muitas técnicas experimentais de cozimento são difíceis de comparar, porque a maioria não define claramente a temperatura interna alcançada no alimento (COMBES et al., 2004). Informação de suma importância para favorecer a máxima redução microbiana dos alimentos.

Para aumentar a vida útil, o tratamento térmico de cozimento por calor seco é empregado em empanados congelados de frango, assim ocorre a inativação de possíveis micro-organismos vindos da matéria-prima ou daqueles adquiridos ao longo das etapas do processamento.

2.5 Tratamento e estabilidade térmica de fungos filamentosos

A indústria alimentícia possui várias opções de tratamentos térmicos para serem aplicados aos mais diversos tipos de produtos. A escolha do processamento ideal tem como prioridade a preferência e as expectativas nutricionais, microbiológicas e sensoriais do consumidor em relação ao alimento. No aspecto microbiológico, o emprego de tratamentos térmicos tem por objetivo a inativação de micro-organismos que possam ser uma ameaça à

saúde do consumidor ou que proporcionem a deterioração, prejudicando a aparência do alimento (JAY, 2005).

A microbiota de cada alimento está associada com a capacidade de sobrevivência dos micro-organismos que vão sendo adquiridos durante as etapas de processamento. As características próprias do alimento (fatores intrínsecos) e as condições do ambiente (fatores extrínsecos) são limitantes para a sobrevivência e multiplicação de micro-organismos (JAY, 2005).

A contaminação por bactérias em carne de frango, é em geral, mais comum pela maior probabilidade de fontes contaminantes, como a pele do animal, pelos, patas, conteúdo gastrintestinal, equipamentos, mãos e roupas de operários e água utilizada para lavagem das carcaças (ROÇA & SERRANO, 1995). Porém desde a década de 80, Gill & Lowry (1982) reportam a relevância da deterioração de produtos cárneos ocasionada por fungos filamentosos.

A deterioração fúngica se destaca em produtos cárneos nos quais a superfície do produto se torna seca ou quando os parâmetros intrínsecos são impeditivos ao desenvolvimento de bactérias e leveduras (JAY, 2005). Também a suscetibilidade e a falta de higiene ambiental na prevenção de fungos filamentosos nas indústrias de alimentos oportuniza o aumento das contagens e diversidade fúngica. Em empanados congelados de frango a presença de fungos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* se torna uma ameaça em função das farinhas adicionadas durante o processo (PITT & HOCKING, 2009).

Vários estudos sobre estabilidade térmica têm como foco fungos que produzam estruturas termorresistentes, como os ascósporos de *Byssochlamys* sp., *Eupenicillium* sp., *Talaromyces* sp. e *Neosartorya* sp. (PITT & HOCKING, 2009). E poucos relatam a importância de outros micro-organismos, por mais que sejam menos resistentes à aplicação de altas temperaturas, muitos deles apresentam capacidade de sobreviver aos tratamentos térmicos realizados na indústria.

Bucher et al. (2008) reportam a eliminação de *Salmonella* sp. de empanados à temperatura de 71°C, porém foi isolada em surtos envolvendo empanados pré-cozidos, desta maneira agências de vigilância sanitária tem relacionado o consumo de empanados congelados de frango insuficientemente cozidos como fator de risco para infecção alimentar por *Salmonella* sp. (CURRIE et al., 2005). Este fato demonstra que mesmo micro-organismos

sem estruturas de resistência térmica (como esporos) eventualmente podem sobreviver a esta etapa de processamento.

A presença dos fungos *Aspergillus niger*, *Penicillium corylophilum* e *Eurotium repens* foi reportada por Dagnas et al. (2014) como frequentemente isolados de produtos de panificação, mesmo após a aplicação do cozimento como tratamento térmico. Nas cepas analisadas verificou-se que o mesmo modelo preditivo em relação a temperatura (15-30°C) pode ser aplicado as três espécies, porém os efeitos de atividade de água (0.80-0.98) foram diferentes para *E. repens*, o que provavelmente se deve pelas espécies de *Eurotium* sp. serem xerofílicas, ou seja, se desenvolvem melhor em baixa atividade de água (PITT & HOCKING, 2009).

Em geral, os fungos filamentosos são mais sensíveis ao tratamento térmico comparado com as bactérias, com exceção dos esporos assexuais de fungos que são mais resistentes. Muitos fatores estão relacionados com a resistência dos micro-organismos, como a atividade de água, a quantidade de gordura, sais, carboidratos e proteínas, pH, número de micro-organismos, idade, compostos inibitórios, tempo, temperatura e efeito aos ultrassônicos (JAY, 2005). Adicionalmente, para os fungos filamentosos os fatores que se destacam na termorresistência são a presença de ácidos orgânicos, teor de sólidos solúveis, tipos de meios de aquecimento e a adição de conservantes (SLONGO et al., 2005).

2.6 Micro-organismos deteriorantes de carne e produtos cárneos sob baixas temperaturas

Fungos filamentosos constituem-se potenciais deteriorantes de carnes e produtos cárneos (DAVIES & BOARD, 1998). Porém, só representam ameaça quando as condições são desfavorecidas para as bactérias, já que estas são as principais causadoras da deterioração de carne de frango, sendo o conteúdo intestinal a fonte primária desses micro-organismos (JAY, 2005). Em produtos cárneos, as bactérias Gram-negativas diminuem o seu crescimento com tratamentos como o de irradiação ionizante, tratamentos com substâncias antibióticas, atividade de água mais baixas por secagem, salga ou refrigeração, ou métodos preventivos

(DAVIES & BOARD, 1998). A presença destes fatores representa uma oportunidade para o desenvolvimento de fungos.

Apesar das bactérias dominarem as contaminações relacionadas com o animal, os fungos estão presentes no ar ambiente das salas de processamento das indústrias, por isso estão normalmente associados à superfície das carnes (DAVIES & BOARD, 1998). Nos produtos cárneos, os fatores que influenciam no aparecimento de contaminação fúngica são a qualidade da matéria-prima, a manutenção da cadeia de frios, condições sanitárias das instalações (equipamentos), as características físicas e bioquímicas do produto e as boas práticas aplicadas ao processamento (SAMSON et al., 2004).

A temperatura é o fator mais importante na seletividade dos micro-organismos colonizadores da carne (DAVIES & BOARD, 1998), selecionando os gêneros e as espécies capazes de crescer em tal ambiente. Durante o congelamento, a inibição pode ocorrer por causa da redução na atividade de água que acompanha o congelamento, porém existem fungos filamentosos que podem se desenvolver em condições de baixas atividade de água (PITT & HOCKING, 2009). Os fungos filamentosos mais xerotolerantes são as espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Eurotium*, sendo também os gêneros mais envolvidos na deterioração de carnes (DAVIES & BOARD, 1998). Logo, no período de estocagem haverá tempo suficiente para o desenvolvimento de espécies destes grupos (SONJAK et al., 2011).

Wigmann et al. (2015) evidenciaram a presença de fungos filamentosos em empanados congelados de frango visivelmente deteriorados ainda dentro do período de validade. *Penicillium polonicum*, *Penicillium crustosum*, *Penicillium commune*, *Penicillium solitum*, *Penicillium manginii* e *Penicillium glabrum* foram as espécies predominantes nas amostras analisadas, sendo as quatro primeiras espécies produtoras de verrucosidina, penitrem A e roquefortina C, ácido ciclopiazônico e citreoviridina, respectivamente.

As perdas econômicas por deterioração fúngica de empanados congelados de frango são intensificadas pela não adoção das temperaturas recomendadas para o acondicionamento de alimentos congelados nos pontos de vendas. A temperatura de -18 °C é indicada pelo *Codex Alimentarius* (1976). Mensurações em balcões de produtos congelados de seis supermercados avaliados no município de Santa Maria (RS, Brasil) revelaram que todos apresentaram em algum momento temperaturas superiores ao recomendado, dando destaque para um deles, que em três momentos das 24 avaliações os produtos encontraram-se expostos à temperaturas positivas (SACCOMORI et al., 2014).

Na simulação de abuso de temperatura praticado nas gôndolas dos supermercados, Saccomori et al. (2015) observaram que o *Penicillium polonicum* teve melhor desenvolvimento quando inoculado em empanados congelados de frango comparado com o meio de cultura Ágar Batata Glicosado (PDA). Durante o armazenamento à -5 °C houve o aparecimento de colônias visíveis de *P. polonicum* na 17ª semana, em duas marcas diferentes de empanados de frango. Enquanto que o *Penicillium glabrum* apresentou temperatura de crescimento limitante à 0 °C, tanto em meio de cultura quanto nos empanados congelados de frango, sendo necessário 9 semanas de armazenamento nos empanados para o surgimento de colônias visíveis do fungo (SACCOMORI et al., 2015).

Em uma avaliação de presuntos com baixa atividade de água fabricados na Croácia, as espécies presentes durante o período de fabricação foram *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Eurotium* spp., porém durante o período de produção, o clima é característico pelo vento frio da região, o que favoreceu as espécies xerofílicas, tais como de *Eurotium* spp. (COMI et al., 2004).

Já a micobiota de linguiças gregas deterioradas por fungos e conservadas por refrigeração no período de estocagem, tiveram as espécies de *Penicillium* sp. em 60% das amostras, como *Penicillium solitum*, *Penicillium nalgiovense* e *Penicillium commune*, sendo as mais frequentes o *P. solitum*, *P. nalgiovense* e *Penicillium olsonii* (PAPAGIANNI et al., 2007).

As pesquisas sobre deterioração dos alimentos têm progredido bastante rapidamente no que se refere aos problemas bacteriológicos, mas o papel de fungos filamentosos e leveduras não é estudado com igual rigor. A deterioração fúngica em alimentos congelados não possui grande número de pesquisas sendo realizadas, embora definitivamente seja um ponto relevante em produtos conservados por baixas temperaturas.

A melhor forma de evitar as perdas econômicas enfrentadas pela indústria em relação aos empanados seria definir os pontos de contaminação, o que torna necessário a investigação desde a matéria-prima, os produtos originados em cada etapa do processamento até o produto final, incluindo a verificação da higiene ambiental durante a fabricação. Além disso, é de grande relevância avaliar a sobrevivência das espécies fúngicas aos tratamentos térmicos aplicados industrialmente, já que estes deteriorantes podem estar presentes na matéria-prima e não serem completamente inativadas durante o processamento.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

- Analisar micologicamente as matérias-primas utilizadas na fabricação de empanados congelados de frango, o produto em diferentes etapas do processamento e o ar do ambiente de produção, para se investigar a origem dos principais fungos deteriorantes deste alimento, bem como avaliar a resistência térmica e a capacidade de sobrevivência destes micro-organismos aos tratamentos térmicos aplicados industrialmente.

3.2 Objetivos específicos

- Isolar e identificar fungos presentes nas matérias-primas utilizadas para a elaboração de empanados congelados de frango, bem como do produto em diferentes etapas de elaboração;
- Isolar e identificar fungos presentes no ar do ambiente de processamento de empanados congelados de frango;
- Avaliar a resistência térmica de espécies de fungos filamentosos deteriorantes de empanados congelados de frango;
- Determinar a sobrevivência de conídios das espécies deteriorantes a tratamentos de fritura e assamento similares aos aplicados em indústrias de empanados congelados de frango.

4 MANUSCRITO I

Investigação da deterioração de empanados congelados de frango

Research of fungal spoilage in frozen chicken nuggets

Autores: Évelin Francine Wigmann¹, Raquel Carine Jahn¹, Cátia Daiane Scherer¹, Fernanda Saccomori¹, María de Jesús Alcano-González¹, Marina Venturini Copetti¹.

Afiliação:

¹Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais – CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

Manuscrito formatado de acordo com as normas para submissão da revista International Journal of Food Microbiology. A versão em inglês será elaborada posteriormente.

Resumo

A produção de empanados congelados de frango pela indústria de alimentos surgiu da demanda dos consumidores por produtos de fácil elaboração pela redução do tempo disponível para seu preparo. Esta classe de produtos pré-prontos e congelados permite uma armazenagem por longos períodos, nos quais poderá haver situações de abuso de temperatura permitindo sua deterioração por fungos filamentosos psicrófilos, sobretudo *Penicillium glabrum* e *Penicillium polonicum*. Segundo informações da indústria, isso representa perdas de produção anuais de 1 à 1,5 %. Logo, o objetivo deste estudo foi analisar micologicamente as matérias-primas, bem como os produtos de cada etapa do processamento e o ar do ambiente de elaboração de empanados congelados de frango a fim de investigar a origem da contaminação fúngica. Foram pesados 10 gramas de cada amostra adicionando 90 mL de água peptonada a 0,1% e o material foi homogeneizado durante 1 minuto em *Stomacher*, com inoculação em Ágar Dicloran Glicerol 18% (DG 18) para as farinhas; e em Ágar Batata Glicosado (PDA) com cloranfenicol para os produtos após adição de cada farinha, após fritura, após cozimento e produto final já embalado, seguido de incubação à 25 °C por 7 dias. Para análise da contaminação do ar ambiental, placas de Petri com DG 18 foram expostas por 10, 30 e 60 minutos em áreas consideradas de risco para a contaminação fúngica e incubadas nas mesmas condições acima descritas. As espécies foram identificadas através da observação de características macroscópicas e microscópicas dos isolados. As amostras de farinha apresentaram contagens entre 10^1 e 10^4 UFC/g, predominando as espécies *Penicillium polonicum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus candidus*, *Eurotium amstelodami* e *Penicillium citrinum*. As amostras seguintes ao processamento apresentaram uma constante redução nas contagens para 10^1 UFC/g, com predominância de *P. polonicum*. Já nas 10 amostras analisadas do produto final, apenas 10% apresentou contaminação por *P. glabrum*, espécie também predominante no ar ambiente da fábrica. De acordo com os resultados, foi observada a associação da contaminação do produto final com a presença da espécie no ambiente de processamento dos empanados, provável fonte de contaminação do produto.

Palavras-chave: fungos psicrófilos, farinha, ar ambiente, *Penicillium glabrum* e *Penicillium polonicum*.

4.1 Introdução

A indústria de alimentos está sempre se adaptando aos interesses dos consumidores. O aumento da produção urbana e a inclusão da mulher no mercado de trabalho resultaram na demanda por produtos de fácil e rápido preparo. A carne de frango é mais favorável para o processamento em comparação com outros tipos de carnes, por possuir sabor neutro, consistente e boa textura, além de cor clara (Petracci et al., 2013). Estas características permitem que os produtores inovem com sabores e texturas direcionadas para cada tipo de consumidor (Barbut, 2012). Neste contexto foram desenvolvidos os empanados congelados de frango, introduzidos no mercado norte-americano pelas cadeias de *fast food* na década de 1970. Além disso, apresentam valor agregado por serem produtos de conveniência devido ao seu fácil preparo e vida útil mais longa por serem congelados (Owens, 2001).

Os produtos armazenados em temperaturas baixas possuem a vantagem de preservar grande parte do valor nutritivo e características sensoriais dos alimentos. Porém, embora a conservação a temperaturas inferiores à -10°C a princípio não permitam o crescimento microbiano, este método tem a desvantagem de não eliminar os micro-organismos presentes, apenas torna-os inativos. Desta maneira, ao encontrarem condições ambientais favoráveis, os micro-organismos são capazes de retomar a sua atividade (Adams & Moss, 2000).

A qualidade dos alimentos armazenados depende das condições das matérias-primas antes da refrigeração e congelamento, a higienização durante as etapas do processamento, além da manutenção das condições de temperatura de maneira ininterrupta no decorrer destes processos e ao longo da estocagem (Baptista & Linhares, 2005), sendo que oscilações térmicas poderão desencadear o desenvolvimento e multiplicação de micro-organismos pré-existentes, sobretudo fungos psicrófilos, oriundos da contaminação durante as operações do processamento e manuseio, ou até mesmo, vindos da matéria-prima adicionada no produto (Saccomori et al., 2015). Uma parcela destes poderá se desenvolver e causar deteriorações, alterando as propriedades sensoriais, além do risco à saúde (Huis In't Veld, 1996).

Um estudo sobre empanados congelados de frango revelou que *Penicillium polonicum*, *Penicillium glabrum*, *Penicillium commune*, *Penicillium solitum*, *Penicillium crustosum* e *Penicillium manginii* são as principais espécies deteriorantes destes produtos, causando perdas econômicas para a indústria de alimentos. Além de representar risco à saúde

do consumidor, visto que possuem capacidade de sintetizar micotoxinas como verrucosidina, ácido ciclopiazônico, roquefortina C, penitrem A e citreoviridina (Wigmann et al., 2015).

Em produtos empanados, vários ingredientes são adicionados no momento da sua elaboração, os quais podem ser fontes de contaminação microbiana. Durante as etapas de *predust*, *batter* e *breader* os derivados de cereais utilizados poderão ser fontes de esporos fúngicos, os quais, se não forem eliminados com o processamento térmico, apresentam potencial de deterioração do produto durante o período de estocagem (Barbut, 2002). Segundo Dill et al. (2009), é empregado farinha de trigo na formulação das coberturas, o que torna o produto suscetível à contaminação por várias espécies dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium* e *Fusarium*, geralmente associados à infecção deste cereal (Pitt & Hocking, 2009).

Outro ponto crítico na elaboração deste produto é o ar ambiente no setor de empacotamento (Sveum et al., 1992), considerando que esta é a última etapa dentro da indústria, onde não haverá nenhum tratamento térmico posterior, também destaca-se a propriedade dos fungos se disseminarem contaminando o alimento.

O presente artigo tem como objetivo analisar micologicamente as matérias-primas utilizadas na fabricação de empanados congelados de frango bem como o produto final e o ar ambiente em diferentes etapas do processamento para verificar a origem dos agentes potenciais da deterioração deste alimento.

4.2 Materiais e Métodos

Foram analisadas as matérias-primas, amostras de empanados congelados de frango e do ar ambiente da produção, coletados em diferentes etapas do processamento de uma indústria do estado de Santa Catarina.

4.2.1 Coleta das amostras

Foram feitas duas coletas, uma no primeiro e outra no segundo semestre de 2013. Foram coletados 100 gramas de cada uma das amostras abaixo citadas, compondo 10 amostras de cada uma das matérias-primas e etapas do processamento: farinha *predust*; farinha *batter*; farinha *breader* (enfarinhamento final); condimentos; massa moldada; massa após adição da farinha *predust*; massa após adição da farinha *batter*; massa após a adição da farinha *breader*; empanado após a fritura; empanado após o assamento; empanado após o congelamento (produto pronto e embalado). No total, foram coletadas e analisadas 110 amostras do processamento de empanados congelados de frango.

4.2.2. Avaliação quantitativa dos fungos filamentosos

As amostras foram coletadas assepticamente em cada etapa do processamento, sendo pesadas porções de 10 gramas, seguido da adição de 90 mL de água peptonada 0,1%. Em seguida, a amostra foi homogeneizada em *Stomacher* durante um minuto. Após, o plaqueamento foi em Ágar Dicloran Glicerol 18% (DG 18) para as amostras de farinhas e condimentos. E em Ágar Batata Glicosado (PDA) suplementado com cloranfenicol para as amostras de empanado após o enfarinhamento, fritura, assamento e congelamento (produto pronto e embalado). Decorrido o período de incubação, os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por grama de produto (UFC/g).

A escolha do meio de cultura PDA foi baseada nos estudos conduzidos por Wigmann et al. (2015), que verificou ser o mais adequado para a detecção dos fungos em empanados congelados de frango. Davies & Obafemi (1985) acrescentam que os meios de cultura DRBC e DG 18 possuem mais conservantes na formulação (Dicloran e Rosa de Bengala, por exemplo), o que não é indicado para células que podem ter sido danificadas durante o congelamento dos empanados de frango e não consigam se desenvolver em meios de cultura com agentes de inibição, resultando em contagens mais baixas.

4.2.3 Identificação dos fungos filamentosos

Os fungos foram conservados em meio de Czapeck Extrato de Levedura (CYA) para posteriormente serem identificados conforme as chaves de cada gênero. O gênero *Aspergillus* foi identificado de acordo com Klich & Pitt (1988). A identificação do gênero *Penicillium* foi realizada conforme Pitt (2000), Pitt (1979) e Samson & Frisvad (2004). Já a identificação de espécies xerofílicas e outros gêneros fúngicos, de acordo com Pitt and Hocking (2009).

Os isolados de *Aspergillus* sp. foram inoculados em três pontos nas placas de CYA e Ágar Extrato de Malte (MEA) e foram incubados à 25 °C durante 7 dias. Adicionalmente às condições acima descritas, para a identificação do gênero *Penicillium* foi precedida a inoculação em meio de CYA com incubação nas temperaturas de 5 °C e 37 °C durante 7 dias.

Decorrido o período de cultivo, foram mensurados os diâmetros médios das 3 colônias e observadas as características macroscópicas nos diferentes meios de cultura, juntamente com os atributos microscópicos em microscópio óptico de cada isolado.

4.2.4 Determinação da contaminação fúngica do ambiente de processamento

Para a análise do ar ambiente adotou-se o método de sedimentação, foram colocadas placas de Petri contendo meio Ágar Dicloran Glicerol 18% e Ágar Dicloran Rosa de Bengala em duplicata nos diferentes tempos de exposição: 10 minutos, 30 minutos e 60 minutos (Samson et al., 2002) nos seguintes locais do processamento: na área de resfriamento (entre as etapas de assamento e congelamento), no congelamento (giro freezer), assim como em dois pontos da área de embalagem dos empanados. A escolha dos locais de coleta estabelecidos neste estudo para análise se deve ao empanado ser mais exposto ao ar ambiental nestas etapas do processamento, possibilitando a deposição de esporos fúngicos.

As placas foram incubadas à 25°C por 7 dias. Decorrido o período de incubação foram selecionadas as placas contendo entre 5 e 50 colônias, ou o maior tempo no caso de contagens inferiores a 5 UFC, seguindo-se o isolamento e identificação das espécies como descrito no item 4.2.3.

4.3 Resultados

No total foram isolados 495 fungos filamentosos englobando amostras de matérias-primas, das etapas de processamento e o empanado de frango pronto. E 43 fungos das amostras de ar coletadas de três pontos diferentes do ar ambiente de fabricação dos empanados de frango. Nas amostras de farinhas foi observada grande diversidade de gêneros e espécies envolvidos. Foram encontrados 12 gêneros diferentes, tais como *Absidia* sp., *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Curvularia* sp., *Eurotium* sp., *Eupenicillium* sp., *Fusarium* sp., *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp., *Syncephalastrum* sp., *Talaromyces* sp. e *Wallemia* sp. (Tabela 1).

O gênero *Penicillium* foi encontrado em 90 e 60% das amostras de farinhas *predust* e *breader*, respectivamente, e 50% nas duas farinhas de *Aspergillus* sp. A farinha *batter* apresentou 90% de frequência de ocorrência de *Aspergillus* sp. e *Eurotium* sp., e o gênero *Penicillium* sp. em 80% das amostras. *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp. e *Eurotium* sp. apresentaram as maiores médias de contagens fúngicas, com $1,62 \times 10^3$, $3,18 \times 10^1$ e $2,93 \times 10^1$ UFC/mL na farinha *batter*. Nas amostras de condimentos, a frequência foi baixa e com baixas contagens fúngicas também, apenas 10% das amostras apresentaram os gêneros *Talaromyces* sp. e *Fusarium* sp.

Durante o processamento foram coletadas amostras após cada operação unitária, e em todas as amostras o gênero *Penicillium* sp. foi o mais frequente. Nas amostras de massa moldagem e massa depois da adição da farinha *batter* o gênero *Fusarium* sp. ocorreu com a mesma frequência. Apenas na etapa de assamento dos empanados o único contaminante presente foi um fungo demáceo, com apenas 10% de frequência de ocorrência. As maiores médias das contagens fúngicas, na massa moldagem e massa após adição de farinha *breader* foi o *Fusarium* sp., na massa após adição de farinha *batter* e empanado após a fritura foi a *Wallemia* sp. e na massa com a adição de farinha *predust* foi o *Aspergillus* sp. (Tabela 2).

Nas Tabelas 3 e 4, são apresentadas as espécies de *Penicillium* sp. encontradas nas etapas de processamento dos empanados de frango. A espécie mais frequente na farinha *predust* e segundo mais ocorrente na farinha *breader* foi o *Penicillium polonicum* (presente em 40 e 20% destas amostras, respectivamente), sendo a maior contagem fúngica na farinha *predust* com $3,70 \times 10^2$ UFC/mL. Na farinha *breader* o fungo mais frequente foi o *P. citrinum* (40%) e com maior contagem fúngica de $2,62 \times 10^1$ UFC/mL. Seguido de *P. polonicum* e *P. funiculosum* com a mesma frequência de 20% nas farinhas *batter*. As amostras coletadas

após a adição das farinhas *predust*, *batter* e *breader* até a etapa de fritura apresentaram o *P. polonicum* como mais frequente e também com a maior média de contagem fúngica.

Quanto aos produtos finais, os empanados de frango analisados depois do processo de congelamento e embalados para distribuição, apresentaram contaminação de *Penicillium glabrum* em 10% das amostras.

No ar ambiente de fábrica foram identificados quatro gêneros distintos nos três pontos de coleta das amostras (área de resfriamento e 2 pontos na área de embalagem), são eles *Cladosporium* sp. *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. e *Talaromyces* sp. Maior biodiversidade foi encontrada no gênero *Penicillium*, que foi também o predominante em todos os locais de análise, incluindo as seguintes espécies: *P. brevicompactum*, *P. citrinum*, *P. chermesinum*, *P. glabrum*, *P. lividum*, *P. sclerotiorum* e *P. spinulosum*. Destacando o *Penicillium glabrum* por ter sido a única espécie que esteve presente em todas as salas onde foram expostas as placas de Petri, com exceção do giro freezer, onde não foram isolados fungos.

4.4 Discussão

A predominância de espécies de *Penicillium* e *Aspergillus* está relacionada com a composição das coberturas *predust*, *batter* e *breader* que constituem-se de misturas de vários tipos de farinhas, gomas e aditivos. A maioria das misturas utilizadas na indústria de alimentos contém farinha de trigo e milho (Dill et al., 2009), o que favorece a presença destes gêneros. Segundo estudos realizados na Austrália, o gênero predominante foi *Penicillium* na farinha de trigo com aumento de 22% nas contagens fúngicas do trigo até a farinha, mesmo que a contagem total de fungos filamentosos tenha reduzido 1 log UFC/mL (10^3 para 10^2 UFC/mL) (Berghofer et al., 2003). Porém Cabañas et al.(2008), obtiveram 100% de ocorrência de *Aspergillus* sp. nas amostras de farinha de trigo.

Já a alta contagem fúngica para as espécies de *Fusarium* sp., se deve provavelmente a presença de farinha de milho nas amostras (Pitt & Hocking, 2009), pois os principais fungos associados ao grão de milho são *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* e *Fusarium graminearum* (Chulze et al., 2010).

Apesar do uso de condimentos em produtos cárneos de frango ter sido uma ameaça em estudos de Witkowska et al. (2011), neste trabalho evidenciou-se que os condimentos tem pouca influência na contaminação e subsequente deterioração de empanados congelados de

frango, sendo que apenas uma das 10 amostras analisadas apresentou presença fúngica, com *Talaromyces variabile* e *Fusarium* sp., uma vez que os mesmos não foram isolados em etapas subsequentes, conclui-se que foram inativados durante o tratamento térmico aplicado aos empanados de frango.

Penicillium polonicum é bastante encontrado em cereais (Samson & Frisvad, 2004) o que está de acordo com o nosso estudo, já que as coberturas *predust* e *breader* apresentaram maior frequência de ocorrência nas amostras deste fungo.

A redução das espécies de *Penicillium* ao longo do processamento demonstra que algumas espécies não possuem a capacidade de resistir aos tratamentos térmicos, como o de fritura em óleo à 195-200 °C e assamento com temperatura de 120-130 °C em forno. E também a sobrevivência de outras, por se adaptarem ao produto cárneo, tornando-o assim uma fonte nutritiva.

Uma das hipóteses para a ausência de colônias fúngicas nas amostras analisadas após o tratamento de assamento é o limite de detecção pelo método adotado, já que observou-se que o *Penicillium polonicum* por mais que tenha sobrevivido ao tratamento de fritura teve sua contagem média reduzida comparada as amostras iniciais do processamento, que também não apresentaram contagens altas de fungos filamentosos. Outra alternativa é de o *Penicillium polonicum* ter sido inativado no assamento, e as amostras de empanados terem sido contaminadas novamente com o ar ambiente entre a etapa de assamento e congelamento, sendo assim não haverá nenhum tratamento térmico posterior para inativá-lo e o fungo terá tempo suficiente de se desenvolver no produto durante o período de estocagem.

Para alimentos congelados, o *Codex Alimentarius* (1976) recomenda a temperatura de -18 °C ou inferior durante o acondicionamento dos produtos nas gôndolas dos supermercados. A manutenção da temperatura durante o armazenamento de empanados congelados de frango constitui-se um fator determinante para o crescimento de espécies fúngicas. Saccomori et al. (2015) relataram a capacidade do *P. polonicum* se manter ativo à -5 °C por até 120 dias, e o *P. glabrum* à 0 °C por 63 dias. Estas informações são de extrema importância, visto que, em um outro estudo foi avaliado as temperaturas dos freezers de 6 supermercados de Santa Maria e em pelo menos um dos momentos avaliados, todos apresentaram temperatura superior a -5 °C, sendo que 66% (4/6) obtiveram um pico de temperatura acima de 0 °C (Saccomori & Copetti, 2014).

Segundo a Tabela 5, verifica-se a presença de várias espécies de *Penicillium* no ar ambiente de fábrica, o que poderá acarretar no despejo dos esporos fúngicos sobre o produto pronto. Considerando que se trata de um gênero normalmente associado ao crescimento em baixas temperaturas, ele poderá encontrar condições de deteriorar o produto posteriormente, sobretudo em situações de abuso de temperatura.

Observou-se a presença de *Penicillium glabrum* no ar de todos os ambientes de processamento, o que se torna relevante sendo ele considerado o fungo mais encontrado em amostras visivelmente mofadas de empanados congelados de frango (Wigmann et al., 2015). Com base nesta observação, acredita-se que o *P. glabrum* tenha papel importante na contaminação do produto no período compreendido entre o final das etapas de tratamento térmico e o início da embalagem. Assim, uma adequada higienização do ambiente de fabricação poderia prevenir a contaminação e subsequente deterioração do produto.

Estudos conduzidos por Asefa et al. (2010) verificaram a predominância de *Penicillium* sp. nas amostras de ar ambiente da produção de produto cárneo curado, o que demonstra a predominância destas espécies em indústrias de processamento de produto cárneo. Nielsen (2003) encontrou *Aspergillus versicolor* e *Penicillium chrysogenum* como os mais frequentes nas amostras de ar ambiente, porém nenhuma dessas espécies foi encontrada em nosso trabalho, o que comprova a teoria de que cada ambiente de processamento terá uma microbiota diferente dependente do produto industrializado.

Um estudo com embutido fermentado seco provou a relação do ar ambiente com a contaminação de 50% das amostras, entre as espécies, foram encontradas *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium nordicum*, *Penicillium nalgiovense* e *Penicillium chrysogenum*, além de *Rhizopus* sp, *Mucor* sp., *Eurotium* sp. e *Aspergillus* sp. Adicionalmente, em concordância com a nossa pesquisa o *Penicillium glabrum* foi isolado das amostras de ar na fábrica, porém não é uma ameaça para outros produtos cárneos, como em embutidos fermentados seco (Castellari et al., 2010).

Tsai & Liu (2009) sugerem que a contaminação de alimentos industrializados pelo ar ambiente venha ser pela passagem de conídios entre as janelas e portas da fábrica, o que faz com que a microbiota interna represente também aquela presente no ambiente externo da fábrica. Nestes casos, a ventilação inadequada dentro das salas de processamento poderia facilitar a circulação dos esporos pelos diferentes ambientes, contaminando o produto em várias etapas do processo. Kure et al. (2003) complementam sobre a necessidade de adoção de

Boas Práticas de Fabricação (BPF) principalmente nas áreas em que o alimento é mais exposto ao ar ambiente, onde há tráfego de funcionários, e principalmente que os sistemas de ventilação, quando empregados, fluam de áreas limpas para áreas sujas, minimizando assim a entrada de esporos das áreas sujas.

Samson et al. (2002) destacam a importância da higienização no ambiente de fábrica por ser um dos pontos críticos para propagação de esporos ou conídios e fragmentos de micélio fúngico. Estudos como o de Kure et al. (2003) comprovam esta afirmação, tendo encontrado espécies de *Penicillium* no ar ambiente de uma indústria de processamento de queijos, e relacionou o problema dos queijos à área de empacotamento.

Segundo Kure et al. (2008) altas contagens fúngicas em placas não significam necessariamente que haja maior probabilidade de ser a fonte principal de contaminação, pois os fungos encontrados podem não ser capazes de se adaptar e crescer no produto em questão, por este motivo o nosso estudo teve foco em espécies de *Penicillium*, pelo conhecimento anterior de serem as espécies predominantes em empanados congelados de frango em estudos conduzidos por Wigmann et al. (2015).

As espécies de *Penicillium glabrum* e *Penicillium polonicum*, principais deteriorantes de empanados congelados de frango, mostraram-se presentes em várias etapas do processamento, dando destaque para o *P. polonicum* nas farinhas e amostras analisadas durante a produção até a etapa de fritura, porém das 10 amostras analisadas após o assamento dos empanados nenhuma apresentou contaminação de espécies de *Penicillium*. Já nas 10 amostras analisadas do produto final, uma delas apresentou contaminação por *P. glabrum*, sendo também a espécie mais encontrada nos locais onde foram coletadas as amostras do ar ambiente. Estas informações revelam que provavelmente a maior fonte de contaminação de empanados congelados de frango seja o ar ambiente de fábrica principalmente entre a etapa de assamento e empacotamento.

4.5 Referências Bibliográficas

Adams, M. R. & Moss, M. O. 2000. Food Microbiology. 2ª ed. Royal Society of Chemistry. Londres, Reino Unido.

Asefa, D. T.; Kure, C. F.; Gjerde, R. O.; Omer, M. K.; Langsrud, S.; Nesbaken, T.; Skaar, I. 2010. Fungal growth pattern, sources and factors of mould contamination in dry-cured meat production facility. International Journal of Food Microbiology, 140, 131-135.

- Baptista, P. & Linhares, M. 2005. Higiene e Segurança Alimentar na Restauração. Forvisão - Consultoria em Formação Integrada. Guimarães, Portugal, I, 1ª ed. 2005.
- Barbut, S. Poultry Products Processing - An Industry Guide. 2002. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Barbut, S. Convenience breaded poultry meat products – New developments. 2012. Trends in food science and technology, 26, 14-20.
- Berghofer, L. K.; Hocking, A. D.; Miskelly, D.; Jansson, E. 2003. Microbiology of wheat and flour milling in Australia. International Journal of Food Microbiology, 85, 137-149.
- Cabañas, R.; Bragulat, M. R.; Abarca, M.L. Castellá, G.; Cabañes, F.J. 2008. Occurrence of *Penicillium verrucosum* in retail wheat flours from the Spanish Market. Food Microbiology, 25, 642-647.
- Castellari, C.; Quadrelli, A. M.; Laich, F. 2010. Surface mycobiota on Argentinean dry fermented sausages. International Journal of Food Microbiology, 142, 149-155.
- Chulze, S. N. Strategies to reduce mycotoxins levels in maize during storage: a review. 2010. Food Additives and Contaminants, 27, 651-657.
- Codex Alimentarius. Recommended International Code of Practice for the Processing in Handling of Quick Frozen Foods. CAC/RCP 8. p. 1-19. 1976.
- Davies, R.; Obafemi, A. 1985. Response of microorganisms to freeze-thaw stress. Microbiology of Frozen Foods R. K. Robinson (ed), Elsevier Applied Science Publishers.
- Dill, D.D.; Silva, A.P.; Luvielmo, M.M. 2009. Processamento de empanados: sistemas de cobertura. Estudos tecnológicos, 5, 33-49.
- Huis In't Veld, J. H. J. 1996. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. International Journal of Food Microbiology, 33, 1-18.
- Klich, M.A. & Pitt, J.I. 1988. A Laboratory Guide to Common *Aspergillus* species and their Teleomorphs. Common wealth scientific and Industrial research Organization, Sydney, pp. 115.
- Kure, C. F.; Skaar, I.; Holst-Jensen, A.; Abeln, E.C.A. 2003. The use of AFLP to relate cheese-contaminating *Penicillium* strains to specific points in the production plants. International Journal of Food Microbiology, 83, 195-204.
- Kure, C. F.; Borch, E.; Karlsson, I.; Homleid, J. P.; Langrud, S. 2008. Use of the selective agar medium CREAD for monitoring the level of airborne spoilage moulds in cheese production. International Journal of Food Microbiology, 122, 29-34.

- Nielsen, K. F. 2003. Mycotoxin production by indoor molds. *Fungal Genetics and Biology*, 39, 103-117.
- Owens, C. M. 2001. Coated poultry products. In: Sams, A. *Poultry Meat Processing*. CRC Press, FL.
- Petracci, M.; Bianchi, M.; Mudalal, S.; Cavani, C. 2013. Functional ingredients for poultry meat products. *Trends in Food Science & Technology*, 33, 27-39.
- Pitt, J.I. 1979. The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. London: Academic Press.
- Pitt, J.I. & Hocking, A.D. 2009. *Fungi and Food Spoilage*. Blackie Academic & Professional: London, pp. 593.
- Pitt, J.I. 2000. *A Laboratory Guide to Common Penicillium Species*. SYDNEY: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, pp. 197.
- Saccomori, F.; Wigmann, E.F.; Bernardi, A.O.; Alcano-González, M.J.; Copetti, M. V. 2015. Influence of storage temperature on the deterioration of frozen chicken nuggets inoculated with *Penicillium polonicum* and *Penicillium glabrum*. *International Journal of Food Microbiology*, 200, 1-4.
- Saccomori, F.; Copetti, M.V. 2014. Verificação das temperaturas dos balcões frigoríficos em supermercados de Santa Maria – RS. *Jornada Acadêmica Integrada*.
- Samson, R.A.; Hoekstra, E. S.; Frisvad, J.C.; Filtenborg, O. 2002. *Introduction to food- and airborne fungi*. The Netherlands, CBS.
- Samson, R.A.; Houbraken, J.A.M.P.; Kuijpers, A.F.A.; Frank, J.M.; Frisvad, J.C. 2004. New ochratoxin A or sclerotium producing species of *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology*, 50, 45-61.
- Samson, R.A., & Frisvad, J.C. 2004. *Penicillium* subgenus *Penicillium*: New taxonomic schemes, mycotoxins and other extrolites. *Studies in Mycology*, 49, 1-251.
- Sveum, W. H.; Moberg, L.J.; Rude, R.A.; Frank, J.F. 1992. Microbiological monitoring of the food processing environmental. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. (Ed.). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 3rd ed. Washington: Edwards Brothers, pp.51-74.
- Tsai, M.; Liu, H. 2009. Exposure to culturable airborne bioaerosols during noodle manufacturing in central Taiwan. *Science of the total environment*, 407, 1536-1546.
- Wigmann, E. F.; Saccomori, F.; Bernardi, A. O.; Frisvad, J.; Copetti, M. V. 2014. Toxigenic *Penicillia* spoiling frozen chicken nuggets. *Food Research International*, 67, 219-222.

Witkowska, A. M.; Hickey, D. K.; Gomez, M. A.; Wilkinson, M. G. 2011. The Microbiological quality of commercial herb and spice preparations used in the formulation of a chicken supreme ready meal and microbial survival following a simulated industrial heating process. *Food Control*, 22, 616-525.

Tabela 1 - Frequência da ocorrência (%) e média da contagem fúngica de amostras positivas (UFC/mL) das matérias-primas utilizadas na fabricação de empanados congelados de frango.

	Farinha <i>predust</i> n=10 CT= 4,6x10 ²		Farinha <i>batter</i> n=10 CT= 3,4x10 ²		Farinha <i>breader</i> n=10 CT= 2,9x10 ¹		Condimentos n=10 CT= 2x10 ¹	
	FO (%)	Média (UFC/mL)	FO (%)	Média (UFC/mL)	FO (%)	Média (UFC/mL)	FO (%)	Média (UFC/mL)
<i>Absidia</i> sp.	-	ND	10	1,25x10 ¹	-	ND	-	ND
<i>Aspergillus</i> sp.	50	1,76x10 ¹	90	3,18x10 ¹	50	1x10 ¹	-	ND
<i>Cladosporium</i> sp.	20	3,36x10 ¹	40	<10	40	1,28x10 ¹	-	ND
<i>Curvularia</i> sp.	-	ND	10	<10	-	ND	-	ND
Demáceos	10	1x10 ¹	-	ND	10	1x10 ¹	-	ND
<i>Eupenicillium</i> sp.	40	1,70x10 ¹	40	<10	-	ND	-	ND
<i>Eurotium</i> sp.	30	<10	90	2,93x10 ¹	-	ND	-	ND
<i>Fusarium</i> sp.	-	ND	70	1,62x10 ³	10	<10	10	1x10 ¹
<i>Paecilomyces</i> sp.	-	ND	20	1,03x10 ¹	-	ND	-	ND
<i>Penicillium</i> sp.	90	6,3x10 ¹	80	1,62x10 ¹	60	1,57x10 ¹	-	ND
<i>Syncephalastrum</i> sp.	-	ND	10	1,25x10 ¹	-	ND	-	ND
<i>Talaromyces</i> sp.	30	3,05x10 ¹	20	1,52x10 ¹	-	ND	10	1x10 ¹
<i>Wallemia</i> sp.	30	<10	30	1,16x10 ¹	-	ND	-	ND
Zigomiceto	-	ND	-	ND	20	1x10 ¹	-	ND

n= número de amostras analisadas; CT= Média da contagem fúngica das amostras; FO: % da frequência da ocorrência (número de amostras que apresentaram a espécie fúngica/ total de amostras analisadas); ND: Não detectado.

Tabela 2 - Frequência da ocorrência (%) e média da contagem fúngica de amostras positivas (UFC/mL) das etapas de fabricação de empanado de frango.

	Massa molde		Massa predust		Massa batter		Massa breader		Empanado frito		Empanado assado		Empanado pronto	
	n=10		n=10		n=10		n=10		n=10		n=10		n=10	
	CT= 1,2x10 ¹		CT= 3,5x10 ¹		CT= 4,05x10 ¹		CT= 5,4x10 ¹		CT= 2,62x10 ¹		CT= 1x10 ¹		CT= 1x10 ¹	
	FO	Média	FO	Média	FO	Média	FO	Média	FO	Média	FO	Média	FO	Média
%	UFC/g	%	UFC/g	%	UFC/g	%	UFC/g	%	UFC/g	%	UFC/g	%	UFC/g	
<i>Absidia</i> sp.	-	ND	-	ND	-	ND	10	1,62x10 ¹	-	ND	-	ND	-	ND
<i>Aspergillus</i> sp.	-	ND	20	1,5x10 ¹	30	<10	20	1,40x10 ¹	-	ND	-	ND	-	ND
<i>Cladosporium</i> sp.	-	ND	30	<10	-	ND	20	<10	10	1x10 ¹	-	ND	-	ND
Demáceos	-	ND	50	1,56x10 ¹	10	1,33x10 ¹	20	1,07x10 ¹	-	ND	10	1x10 ¹	-	ND
<i>Eurotium</i> sp.	-	ND	-	ND	10	<10	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND
<i>Fusarium</i> sp.	20	1,5x10 ¹	10	<10	60	1,18x10 ¹	50	2,58x10 ¹	10	1,5x10 ¹	-	ND	-	ND
<i>Geotrichum</i> sp.	-	ND	-	ND	-	ND	10	<10	-	ND	-	ND	-	ND
<i>Penicillium</i> sp.	20	1x10 ¹	40	1,25x10 ¹	60	2,09x10 ¹	80	1,48x10 ¹	20	1,06x10 ¹	-	ND	10	1x10 ¹
<i>Phoma</i> sp.	10	1x10 ¹	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND
<i>Syncephalastrum</i> sp.	-	ND	-	ND	-	ND	10	1,14x10 ¹	-	ND	-	ND	-	ND
<i>Talaromyces</i> sp.	-	ND	20	<10	20	<10	10	<10	-	ND	-	ND	-	ND
<i>Wallemia</i> sp.	-	ND	-	ND	20	2,41x10 ¹	10	1,62x10 ¹	10	3x10 ¹	-	ND	-	ND

n= número de amostras analisadas; CT= Média da contagem fúngica das amostras; FO: % da frequência da ocorrência (número de amostras que apresentaram a espécie fúngica/ total de amostras analisadas); ND: Não detectado.

Tabela 3 - Frequência da ocorrência (%) e média da contagem de espécies de *Penicillium* sp. (UFC/mL) das matérias-primas utilizadas na fabricação de empanado de frango. Para a análise das farinhas foi utilizado o meio de cultura Ágar Dicloran Glicerol 18% (DG 18).

	Farinha predust		Farinha batter		Farinha breader	
	FO (%)	Média (UFC/mL)	FO (%)	Média (UFC/mL)	FO (%)	Média (UFC/mL)
<i>P. biliaris</i>	10	2,05x10 ¹	-	ND	-	ND
<i>Penicillium</i> sp. série citrina	20	1,22x10 ¹	10	<10	10	1,04x10 ¹
<i>P. brevicompactum</i>	-	ND	10	1,16x10 ¹	-	ND
<i>P. chalybeum</i>	10	1,36x10 ¹	-	ND	-	ND
<i>P. chermesinum</i>	20	1x10 ¹	-	ND	-	ND
<i>P. citrinum</i>	30	1,05x10 ¹	30	1,38x10 ¹	40	2,62x10 ¹
<i>P. commune</i>	10	3,55x10 ¹	-	ND	-	ND
<i>P. corylophilum</i>	10	2,05x10 ¹	-	ND	-	ND
<i>P. chrysogenum</i>	10	5,47x10 ¹	10	1,28x10 ¹	-	ND
<i>P. crustosum</i>	10	8,46x10 ¹	-	ND	-	ND
<i>P. expansum</i>	-	ND	10	2,5x10 ¹	-	ND
<i>P. fellutanum</i>	20	5,43x10 ¹	-	ND	-	ND
<i>P. funiculosum</i>	-	ND	10	1,28x10 ¹	20	1x10 ¹
<i>P. glabrum</i>	20	2,61x10 ¹	-	ND	-	ND
<i>P. implicatum</i>	10	9,85x10 ¹	-	ND	-	ND
<i>P. janthinelum</i>	-	ND	10	<10	-	ND
<i>P. lividum</i>	30	3,39x10 ¹	20	<10	-	ND
<i>P. phoenicum</i>	10	5,75x10 ¹	-	ND	-	ND
<i>P. polonicum</i>	40	3,70x10 ²	-	ND	20	<10
<i>P. restrictum</i>	10	<10	10	<10	-	ND
<i>P. roseopurpureum</i>	10	8,46x10 ¹	-	ND	-	ND
<i>P. rugulosum</i>	20	1,19x10 ¹	-	ND	-	ND
<i>P. sclerotiorum</i>	30	2,06x10 ¹	10	<10	10	1,04x10 ¹
<i>P. spinulosum</i>	-	ND	20	<10	-	ND
<i>Penicillium</i> spp.	40	2,24x10 ¹	40	3x10 ¹	10	1x10 ¹

FO: % da frequência da ocorrência (número de amostras que apresentaram a espécie fúngica/ total de amostras analisadas); ND: Não detectado; n: número de amostras.

Tabela 4 – Frequência da ocorrência (%) e média da contagem de espécies de *Penicillium* (UFC/g) isolados de amostras de empanados de frango após a adição das farinhas (*predust*, *batter* e *breader*), tratamentos térmicos (fritura e assamento) e produto final. Para a análise das amostras foi utilizado o meio de cultura Ágar Batata Glicosado (PDA).

	Massa Molde		Massa <i>predust</i>		Massa <i>batter</i>		Massa <i>breader</i>		Empanado Frito		Empanado Assado		Produto pronto	
	n=10		n=10		n=10		n=10		n=10		n=10		n=10	
	FO	Média	FO	Média	FO	Média	FO	Média	FO	Média	FO	Média	FO	Média
	%	UFC/g	%	UFC/g	%	UFC/g	%	UFC/g	%	UFC/g	%	UFC/g	%	UFC/g
<i>P. biliae</i>	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND
<i>P. brevicompactum</i>	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	10	1x10 ¹	-	ND	-	ND
<i>P. citrinum</i>	-	ND	10	1x10 ¹	10	<10	20	1,07x10 ¹	-	ND	-	ND	-	ND
<i>P. crysogenum</i>	-	ND	-	ND	-	ND	10	1x10 ¹	-	ND	-	ND	-	ND
<i>P. decumbens</i>	-	ND	10	<10	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND
<i>P. expansum</i>	-	ND	-	ND	-	ND	10	2,31x10 ¹	-	ND	-	ND	-	ND
<i>P. glabrum</i>	-	ND	-	ND	-	ND	10	2x10 ¹	-	ND	-	ND	10	1x10 ¹
<i>P. lividum</i>	-	ND	20	<10	-	ND	10	1,14x10 ¹	-	ND	-	ND	-	ND
<i>P. minioletum</i>	-	ND	-	ND	-	ND	10	1x10 ¹	-	ND	-	ND	-	ND
<i>P. polonicum</i>	-	ND	20	2,37x10 ¹	20	3,12x10 ¹	40	2,42x10 ¹	10	<10	-	ND	-	ND
<i>P. rugulosum</i>	10	1x10 ¹	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND
<i>P. sclerotiorum</i>	-	ND	10	<10	10	1,8x10 ¹	20	<10	-	ND	-	ND	-	ND
<i>P. spinulosum</i>	10	1x10 ¹	-	ND	-	ND	20	<10	-	ND	-	ND	-	ND
<i>P. solitum</i>	-	ND	-	ND	20	3,47x10 ¹	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND
<i>Penicillium</i> spp.	-	ND	10	1x10 ¹	30	<10	40	1,40x10 ¹	20	1,25x10 ¹	-	ND	-	ND

FO: % da frequência da ocorrência (número de amostras que apresentaram a espécie fúngica/ total de amostras analisadas); ND: Não detectado; n: número de amostras.

5 MANUSCRITO II

Avaliação do processamento térmico na sobrevivência de conídios de *Penicillium* spp. deteriorantes de empanados congelados de frango

Survey of the thermal processing in survival of *Penicillium* spp. conidia spoiling frozen chicken nuggets

Autores: Évelin Francine Wigmann¹, Anderson de Souza Sant'Ana², Marina Venturini Copetti¹.

Afiliação: ¹Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais – CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

²Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos – CEP 13083-862, Campinas, SP, Brasil.

Manuscrito formatado de acordo com as normas para submissão da revista International Journal of Food Microbiology. A versão em inglês será elaborada posteriormente.

Resumo

A deterioração fúngica causa grandes perdas econômicas para a indústria de alimentos, resultando em um produto com alterações de cor, sabor e principalmente aparência indesejável, o que proporciona rejeição por parte dos consumidores. Além disso, existe a possibilidade de algumas espécies produzirem micotoxinas, representando um perigo de saúde pública. Os empanados congelados de frango são focos de deterioração por fungos filamentosos, principalmente por *Penicillium polonicum*, *Penicillium glabrum*, *Penicillium commune*, *Penicillium solitum* e *Penicillium crustosum*, correspondendo a perdas anuais estimadas de 1 a 1,5%. O objetivo deste trabalho foi avaliar a resistência térmica dos isolados de *Penicillium commune* (NGT 16/12), *Penicillium polonicum* (NGT 23/12 e NGT 33/12), *Penicillium glabrum* (NGT 29/12 e NGT 35/12), *Penicillium solitum* (NGT 30/12) e *Penicillium crustosum* (NGT 51/12) e o efeito dos tratamentos térmicos de fritura e assamento aplicados na indústria de alimentos sobre essas espécies. E depois, a seleção da cepa mais resistente aos tratamentos, verificar qual a temperatura e tempo capazes de diminuir a contagem do fungo inoculado no empanado de frango. Primeiramente, verificou-se a capacidade dos conídios das espécies de sobreviverem ao choque térmico no tampão fosfato pH 7.2 em tubos TDT (*Thermal Death Tubes*). Após foi inoculado cada fungo separadamente nos empanados congelados de frango e aplicado o tratamento de somente frito, somente assado e do tratamento combinado (frito e assado). Neste experimento, estabeleceu-se a partir do número de reduções decimais durante o tratamento completo, o fungo que menos foi afetado pelo processamento. As análises confirmaram que nenhuma das cepas é termorresistente, pois foram inativados com o choque térmico no tampão fosfato pH 7.2 em tubos TDTs. Já os conídios inoculados de cada cepa nos empanados de frango e submetidos aos tratamentos, o *P. commune* NGT 16/12, *P. polonicum* NGT 23/12, *P. solitum* NGT 30/12 e *P. crustosum* NGT 51/12 demonstraram sobrevivência no tratamento combinado (fritura e assamento). Sendo que a cepa mais resistente ao processo foi o *P. polonicum* NGT 23/12, que reduziu a 3,29 log UFC/g da contagem inicial nos empanados quando alcançou 78 °C de temperatura interna aos 10 minutos e 30 segundos de assamento. Estes dados evidenciam a necessidade de novas adequações para a indústria processadora de empanados congelados de frango direcionadas à eliminação de fungos filamentosos contaminantes.

Palavras-chave: Deterioração fúngica, *Penicillium polonicum*, fritura e assamento.

5.1 Introdução

O crescimento microbiano representa um importante obstáculo na indústria de alimentos, frequentemente desencadeado por falhas na higienização e na implantação de programas de qualidade que contribuam para a inativação de possíveis micro-organismos originados geralmente a partir da matéria-prima ou durante as etapas de processamento (Tondo & Bartz, 2011). O desenvolvimento de fungos pode resultar em vários tipos de deterioração como sabor indesejável, formação de toxinas, descoloração, apodrecimento e formação de propágulos patogênicos e alergênicos (Samson et al., 2002).

As bactérias, em geral, são as responsáveis pela deterioração em produtos cárneos em fatores ideais de pH, atividade de água e temperatura (Jay, 2005). Nestas condições, os fungos são desfavorecidos devido ao maior tempo de geração (Pitt & Hocking, 2009). Contudo, os fungos filamentosos são mais versáteis que as bactérias na superação de barreiras de pH, temperatura e atividade de água, parâmetros frequentemente empregados pela indústria para controle microbiano. Logo, por mais que a deterioração fúngica não seja muito comum em carne de frango, ela acontece mais facilmente quando a superfície do produto se torna seca ou quando os parâmetros intrínsecos dos alimentos são impeditivos ao desenvolvimento de bactérias e leveduras, o que ocorre principalmente nos períodos pós-processamento, sobretudo durante o período de estocagem (Jay, 2005).

A conservação dos alimentos pelo frio tem a vantagem de preservar grande parte do valor nutritivo e características sensoriais dos alimentos. No entanto, embora os alimentos conservados a temperaturas inferiores à -10°C a princípio não permitam o crescimento microbiano, este método tem a desvantagem de não eliminar os micro-organismos presentes, apenas torna-os inativos. Desta maneira, ao encontrarem condições ambientais favoráveis, os micro-organismos são capazes de retomar a sua atividade (Adams & Moss, 2000). Por esta razão é importante assegurar a boa qualidade das matérias-primas antes da refrigeração e congelamento, a inocuidade durante o processamento do produto, além de manter um controle cuidadoso da temperatura ao longo da estocagem nas gôndolas dos supermercados (Baptista & Linhares, 2005).

Vários estudos reportam o isolamento de fungos filamentosos em produtos cárneos (López-Díaz et al., 2001; Comi et al., 2004; Papagianni et al., 2007; Asefa et al., 2009; Iacumin et al., 2009; Castellari et al., 2010; Sonjak et al., 2011). E poucas pesquisas existem

sobre a deterioração fúngica de empanados congelados de frango, porém há a perda estimada de 1 a 1,5 % destes produtos na indústria brasileira (Wigmann, et al., 2015a). Neste mesmo artigo, os autores mencionam que os fungos *Penicillium glabrum*, *Penicillium polonicum*, *Penicillium commune*, *Penicillium solitum* e *Penicillium crustosum* são as principais espécies relacionadas com essas perdas apresentando deterioração visível em empanados congelados de frango no decorrer do período de estocagem.

Sabe-se que os tratamentos térmicos de fritura por imersão em óleo e assamento fazem parte das etapas de processamento de empanados congelados de frango tendo como função principal melhorar as características sensoriais e microbiológicas do produto (Barbut, 2009). Logo, torna-se importante o estudo da termorresistência e o efeito dos tratamentos de fritura e assamento sob a sobrevivência de espécies de *Penicillium* predominantemente envolvidas na deterioração de empanados congelados de frango. Assim como, a partir do conhecimento da espécie mais resistente ao processo, verificar o número de reduções decimais obtidos com estes tratamentos em função da temperatura alcançada no interior do empanado de frango.

5.2 Materiais e Métodos

5.2.1 Fungos filamentosos e preparo das suspensões de conídios

Os fungos utilizados neste estudo foram *Penicillium commune* (16/12 NGT), *Penicillium polonicum* (23/12 NGT e 33/12 NGT), *Penicillium glabrum* (29/12 NGT e 35/12 NGT), *Penicillium solitum* (30/12 NGT) e *Penicillium crustosum* (51/12 NGT). Todas as cepas testadas foram isoladas a partir de empanados congelados de frango deteriorados, oriundos da devolução por consumidores insatisfeitos com o produto adquirido. A identificação destes isolados foi confirmada através de análise de metabólitos secundários (Wigmann et al., 2015a).

Para o preparo das suspensões de conídios, placas contendo Ágar Extrato de Malte (MEA) (extrato de malte, 20 g (Neogen, EUA); glicose, 20 g (SPlab, BR); ágar, 20 g (Kasvi, BR); peptona, 1 g (Kasvi, BR); água destilada, 1 L) foram inoculadas com cada cepa fúngica, seguindo-se incubação a 25 °C por 7 dias. Os conídios foram coletados através de raspagem do micélio de cada placa usando solução estéril de água destilada e Tween 80, quando mais de

90% dos conídios foram observados no campo das lâminas do microscópio óptico. Então, foi realizada a filtração com gaze estéril para retenção do micélio e fragmentos de hifas. Logo, foi feita centrifugação a 11 962, 6 × g (Sorvall RC-5C, Dupont, EUA) por três vezes consecutivas a 5 °C por 15 minutos, intercalando-se lavagens com água destilada estéril a cada ciclo (Silva et al., 2010).

A concentração de conídios nas suspensões de cada fungo foi padronizada em 10⁸ conídios/mL com o auxílio de câmara de Neubauer e confirmadas através de inoculação em MEA (5 dias/ 25 °C), seguindo-se de estocagem a -18°C, por até 4 meses.

5.2.2 Avaliação da capacidade de sobrevivência de conídios de *Penicillium* spp. ao choque térmico em tampão fosfato pH 7.2

Considerando-se que uma das hipóteses para deterioração dos empanados de frango, seja a sobrevivência de conídios ao tratamento térmico aplicado durante as etapas de fritura e assamento, buscou-se verificar se os conídios das cepas estudadas possuíam capacidade de sobreviver ao choque térmico em tampão fosfato pH 7.2 (fosfato de potássio, 34 g (Inlab, BR); água destilada, 500 mL). Nos *Thermal Death Tubes* (TDT; 8 mm de diâmetro externo, 6 mm de diâmetro interno e 1 mm de espessura) foram adicionados 1 mL de solução tampão fosfato e 1 mL da suspensão de cada uma das cepas de *Penicillium* spp.

Os tubos TDTs foram posteriormente selados e dispostos em banho-maria (Tecnal TE 057, Tecnal, BR) com água a 80°C por 10 e 30 minutos. Os binômios tempo/temperatura utilizados correspondem as condições para confirmação da resistência térmica dos fungos (Beuchat & Pitt, 2001). Após o tratamento, os tubos TDTs foram retirados do banho-maria e imediatamente resfriados. Em seguida, os tubos TDTs foram abertos e foi feito plaqueamento em superfície de MEA suplementado com cloranfenicol (1 mL/L de meio de cultura) e incubação a 25 °C por 7 dias. Decorrido o período de incubação procedeu-se a verificação da inativação dos conídios (ausência de colônias fúngicas nas placas). Os experimentos foram realizados em quintuplicata e repetidos duas vezes.

5.2.3 Efeito das etapas de fritura e assamento de empanados de frango na sobrevivência de *Penicillium* spp.

5.2.3.1 Empanados de frango e inoculação com os conídios de *Penicillium* spp.

Os empanados de frango foram cedidos por uma indústria processadora de alimentos. Os empanados de frango utilizados eram semi-prontos, ou seja, coletados na etapa anterior ao processo de fritura e assamento feito pela indústria, para permitir a simulação do efeito dos tratamentos térmicos em laboratório. As suspensões de conídios foram inoculadas nos empanados em quantidade suficiente para se atingir uma concentração final de 10^6 conídios/g.

5.2.3.2 Efeito da fritura e assamento sobre a inativação e sobrevivência de *Penicillium* spp. em empanados de frango

Após a inoculação dos conídios, dividiram-se os empanados congelados de frango nos seguintes grupos: i) empanados de frango submetidos somente ao processo de fritura, ii) empanados de frango submetidos somente ao processo de assamento e iii) empanados de frango submetidos ao processo completo (fritura e assamento). Paralelamente, dois grupos controle foram preparados: i) controle positivo e ii) controle negativo. As condições de fritura e assamento aplicadas visaram simular as condições de processamento na indústria.

O tratamento de fritura foi realizado em um recipiente de alumínio com óleo de soja (Soya, Bunge Brasil) à 195-200°C. Já o assamento foi realizado em forno elétrico industrial (8-4000W, Imequi, BR), à temperatura de 120-130°C até que o empanado alcançasse a temperatura interna de 70 °C. Esta temperatura corresponde à temperatura mínima para o assamento do produto durante o processamento industrial.

Para o tratamento do grupo de amostras somente a serem fritos, os empanados de frango congelados (temperatura inicial de 0°C) foram imersos por 6 segundos em óleo de soja a 195-200 °C.

No tratamento do grupo de amostras somente a serem assados, os empanados de frango (temperatura inicial de aproximadamente 0°C no interior do empanado) foram assados em forno elétrico industrial à temperatura de 120-130°C.

E para o grupo de amostras submetido ao tratamento combinado (fritura, seguido de assamento), os empanados foram fritos por 6 segundos em óleo de soja a 195-200 °C. Sendo imediatamente assados em forno elétrico industrial à temperatura de 120-130°C até que o empanado alcançasse 70 °C no centro do produto.

No grupo de controle positivo, os empanados de frango foram inoculados com o respectivo fungo e não foram submetidos ao tratamento térmico.

No grupo de controle negativo, os empanados de frango não tiveram inoculação de fungos e também não foram submetidos ao tratamento térmico.

Os dados de temperatura foram coletados no início e no final de cada experimento com o auxílio de um coletor de dados de temperatura (Termopar flexível de cobre e constantan tipo T, RSA, BR). Estes experimentos foram repetidos duas vezes.

5.2.3.3 Enumeração de fungos nos empanados de frango submetidos aos tratamentos

As amostras de empanados de frango submetidas aos processos de fritura e/ou assamento foram pesadas (10 g), seguindo-se adição de 90 mL de água peptonada 0,1% e homogeneização (*Stomacher 400, Seward Lab System, EUA*) por 1 minuto. Posteriormente, alíquotas foram plaqueadas em MEA suplementado com cloranfenicol (100 mg/L de meio de cultura), seguindo-se incubação a 25 °C por 7 dias. Decorrido o período de incubação, as colônias foram enumeradas e os resultados expressos em unidades formadoras de colônias por grama de produto (UFC/g). Determinou-se o número de reduções decimais alcançadas por cada operação unitária estudada (fritura, assamento e fritura + assamento), considerando-se a população inicial (N_o) e população final (N_f) dos fungos inoculados nos empanados de frango, através da equação ($N_o - N_f = n^\circ$ de reduções decimais).

5.2.3.4 Inativação de *Penicillium polonicum* (cepa 23/12 NGT) durante o processamento térmico de empanados de frango

A cepa mais resistente aos tratamentos térmicos simulados no item 5.2.3.2, foi selecionada para estudo nesta etapa. Os empanados de frango foram inoculados com suspensão de conídios de *P. polonicum* (23/12 NGT) visando-se atingir uma concentração de 10^5 conídios/g. Posteriormente, os empanados de frango foram submetidos ao processamento térmico, que consistiu de fritura com óleo de soja à 195-200°C por 6 segundos, seguindo-se cozimento em forno à 120-130°C. Para se determinar a inativação de *P. polonicum* (cepa 23/12 NGT) durante o assamento dos empanados de frango, amostras foram coletadas em diferentes intervalos até o tempo máximo utilizado pela indústria durante esta etapa (10 – 12 minutos). A enumeração dos fungos foi realizada conforme item 5.2.3.3. Os experimentos foram repetidos duas vezes.

5.2.5 Análise estatística

Para a análise estatística foi feito uma análise de variância (ANOVA) seguido do teste Scott-Knott na versão 7.6 (Campina Grande, Brasil) com nível de significância $p \leq 0.05$ (Silva & Azevedo, 2002).

5.3 Resultados

Nenhuma das cepas estudadas, *P. commune* (NGT 16/12), *P. polonicum* (NGT 23/12 e NGT 33/12), *P. glabrum* (NGT 29/12 e NGT 35/12), *P. solitum* (NGT 30/12) e *P. crustosum* (NGT 51/12) apresentaram capacidade de sobrevivência ao choque térmico em tampão fosfato pH 7.2 nos tubos TDTs.

A contagem fúngica média do grupo de controle negativo, ou seja, não inoculados e não submetidos ao tratamento térmico, foi de 2,60 log UFC/g de empanado de frango. Na Figura 1, encontra-se a relação da temperatura interna (°C) dos empanados de frango durante a fritura e o assamento de acordo com o tempo (minutos) até que o centro do alimento alcance

70 °C, temperatura de controle utilizada pela indústria. Observou-se que na maioria das cepas inoculadas nos empanados a temperatura de 70 °C foi alcançada entre 7 e 8 minutos durante o assamento em forno.

Verificaram-se as médias e desvio padrão das reduções decimais de cada cepa inoculada no empanado de frango durante os tratamentos de somente fritos, somente assados e tratamento combinado (frito e assado) na Tabela 1. De acordo com os resultados, o *P. commune* (NGT 16/12), *P. polonicum* (NGT 23/12), *P. glabrum* (NGT 29/12), *P. solitum* (NGT 30/12) e *P. crustosum* (NGT 51/12) apresentaram diferença significativa ($p \leq 0.05$) entre as cepas somente quando foi realizado o tratamento combinado. Os tratamentos de somente fritos e somente assados obtiveram reduções decimais semelhantes.

No tratamento combinado (fritura e assamento), o *P. polonicum* (NGT 23/12) apresentou a menor redução decimal em comparação com as outras cepas de 1,78 log UFC/g, e o *P. polonicum* (NGT 33/12) a maior redução decimal de 5,24 log UFC/g, ou seja, o menos resistente ao processo.

Após a verificação do *P. polonicum* (NGT 23/12) ser a cepa mais resistente no tratamento combinado aplicado ao empanado de frango, a Figura 2 demonstra o tempo (minutos) dos tratamentos aplicados (fritura e assamento), média da contagem fúngica (log UFC/g) e temperatura (°C) interna dos empanados de frangos.

Nesta etapa, constatou-se que a partir da fritura até 1 minuto e 30 segundos de assamento teve 0,91 log UFC/g de redução, de 5,71 para 4,80 log UFC/g. E que até 6 minutos e 30 segundos de assamento, as contagens fúngicas mantiveram-se estáveis (aproximadamente 4 log UFC/g) com um aumento da temperatura de 23 para 64 °C internamente no empanado. Já quando a temperatura aumentou de 64 para 72°C houve redução de 0,79 log UFC/g aos 8 minutos e 30 segundos de assamento, e quando comparado ao controle positivo teve 2,02 log UFC/g de redução. Quando se alcançou a temperatura interna de 78 °C aos 10 minutos e 30 segundos a redução em comparação com os 8 minutos e 30 segundos foi de 1,27 log UFC/g durante o assamento, e em relação ao controle positivo foi de 3,29 log UFC/g.

5.4 Discussão

A inibição das cepas ao choque térmico aplicado aos conídios era esperada, pelo fato dos fungos estudados não produzirem estruturas de resistência, como os ascósporos, comuns em espécies de *Byssochlamys* sp., *Eupenicillium* sp., *Talaromyces* sp. e *Neosartorya* sp. (Pitt & Hocking, 2009). Testes de resistência térmica por 10 minutos comprovam que conídios de *Eurotium amstelodami*, *Eurotium chevalieri*, *Aspergillus candidus* e *Wallemia sebi* numa contagem inicial de 2 log UFC/mL foram inativados à temperatura de 70 °C, e à 50 °C obtiveram 107, 128, 102 e 42 % de sobreviventes, respectivamente (Pitt & Christian, 1970).

O comportamento das espécies neste estudo foi pesquisado devido aos resultados prévios de Wigmann (2015b) em que na análise micológica da cadeia produtiva de empanados congelados de frango foi detectada alta incidência de algumas das principais espécies deteriorantes nas matérias-primas adicionadas no produto (farinha *predust* e farinha *breader*), surgindo o questionamento da probabilidade destes fungos, apesar de psicrófilos (Samson et al., 2002), conseguirem sobreviver as condições estabelecidas no tratamento combinado (fritura e assamento) pela indústria de alimentos.

Devido a inexistência de trabalhos semelhantes na literatura, os resultados obtidos têm valor significativo, servindo como ponto de partida para trabalhos mais abrangentes sobre a sobrevivência de espécies fúngicas em empanados congelados de frango.

As espécies *P. polonicum* NGT 23/12, *P. commune* NGT 16/12, *P. solitum* NGT 30/12 e *P. crustosum* NGT 51/12 sobreviveram ao tratamento combinado (fritura, seguido de assamento) quando inoculados em empanados congelados de frango, mesmo sendo característico destas espécies serem inativadas a estas temperaturas de exposição sem o empanado como meio nutritivo.

No experimento, o *P. polonicum* apresentou diferença entre as duas cepas inoculadas nos empanados de frango (Tabela 1). Sendo o *P. polonicum* NGT 23/12 o mais resistente em comparação com as outras cepas ao tratamento completo (fritura e assamento), e o *P. polonicum* NGT 33/12 o menos resistente. Acredita-se que a contaminação por *P. polonicum* se deva a adição de farinhas contaminadas (Wigmann, 2015b), logo não há como definir o momento em que os grãos são infectados durante a colheita ou que os fungos iniciaram a deterioração da farinha. O que pode resultar em conídios com idades possivelmente distintas,

sendo um dos fatores interferentes na resistência térmica dos fungos filamentosos (Samson et al., 2002).

Os tratamentos de somente fritos e somente assados não apresentaram diferença significativa, porém observou-se que a fritura teve efeito sobre a inativação de micro-organismos presentes no alimento de até 1,92 log UFC/g no tratamento com o *P. crustosum* NGT 51/12, contrariando a afirmação de que a única função da fritura é melhorar as características sensoriais do produto, como a crocância (Chen et al., 2008).

A partir da seleção da cepa mais resistente que foi o *P. polonicum* NGT 23/12 (Figura 2) verificou-se que o empanado frito teve uma redução de 0,91 log UFC/g, por outro lado com o tratamento combinado foi de 2,02 log UFC/g ao alcançar 72 °C no interior do empanado de frango. Extrapolando-se as observações laboratoriais caso a indústria esteja trabalhando com matéria-prima de alta contagem fúngica pode ser necessário aplicar um processamento com temperaturas mais altas afim de garantir a inocuidade do empanado de frango. Visto que até mesmo *Salmonella* foi isolada de empanados à 71 °C (Bucher, 2008).

Logo a temperatura de 70°C pode não estar eliminando as bactérias patogênicas normalmente associadas a este produto, e tão menos o *P. polonicum*, que representa perdas econômicas sobretudo se houvesse abuso de temperatura durante a armazenagem (Saccomori et al., 2015) e além disso um risco na saúde do consumidor, pela possibilidade de produzir micotoxinas.

Embora muitos micro-organismos possam contaminar os empanados de frangos, apenas aqueles com habilidade de se desenvolver em baixas temperaturas terão a capacidade de deteriorar este tipo de produto congelado. Em condições de baixa temperatura, o tempo de geração estará ainda mais elevado e o problema na maioria das vezes se tornará evidente no decorrer do período de estocagem, seja na empresa processadora, nas gôndolas de supermercados ou na residência de consumidores (Saccomori et al., 2015).

O perigo de multiplicação dos fungos durante o período de estocagem aumenta com o descumprimento das leis sobre a temperatura ideal dos alimentos congelados durante o armazenamento. Saccomori & Copetti (2014), verificaram que 4 dos 6 supermercados analisados apresentaram pelo menos em algum momento temperaturas acima de 0°C. Ou seja, as falhas da indústria associadas ao armazenamento incorreto por parte dos varejistas, permitem a multiplicação dos fungos psicrófilos contaminantes do produto e potencializa os problemas de deterioração fúngica em empanados congelados de frango.

Até meados do século passado a preocupação com a deterioração fúngica em gêneros alimentícios não era expressiva, uma vez que os fungos eram considerados causadores apenas da deterioração superficial de alimentos, mas a sua importância está cada vez mais evidente com as descobertas dos metabólicos tóxicos produzidos por esse grupo, as micotoxinas, e seus efeitos carcinogênicos e tóxicos sobre o organismo humano (Samson et al., 2002). Estudos revelaram que o *P. polonicum* produziu verrucosidina em condições laboratoriais, neurotoxina de alta toxicidade, tendo o empanado congelado de frango como forma de crescimento (Wigmann et al., 2015a).

Nem mesmo o aquecimento do alimento na casa do consumidor pode ser considerado um fator de diminuição na contaminação microbiana dos empanados congelados de frango, já que segundo Roccatto et al. (2015), além das especificações das embalagens nem sempre serem adequadas visando a qualidade microbiológica do produto, também há o problema do consumidor não seguir corretamente o que deve ser realizado para que o alimento esteja seguro. Níveis de apenas 10 UFC/g inoculados de *Salmonella* Typhimurium são suficientes para o crescimento em produtos cozidos à base de carne de frango quando aplicações inadequadas são realizadas pelo consumidor (Roccatto et al., 2015).

Na análise micológica realizada por Wigmann (2015b) no empanado depois de frito a média de contagem fúngica foi de 1,42 log UFC/g em condições reais na indústria de alimentos, então um dos intuitos deste artigo foi tentar reduzir esta carga fúngica observada na etapa de fritura em empanados congelados de frango.

De acordo com os resultados encontrados no experimento com o *P. polonicum*, cepa mais resistente aos tratamentos (Tabela 1), verificou-se que o alcance de 68 °C no interior do empanado obteve a redução de apenas 0,23 log UFC/g, quando comparado ao empanado frito e à 72 °C obteve 1,11 log UFC/g, sendo essas temperaturas não suficientes para diminuir a carga fúngica em condições reais de 1,42 log UFC/g apresentadas no empanado frito. Somente com a temperatura de 78 °C interna do produto que esta contaminação seria eliminada resultando em 2,38 log UFC/g de redução.

Estes dados evidenciam a necessidade de novas adequações para a indústria processadora de empanados congelados de frango, tendo-se comprovado que o controle da temperatura interna de 70 °C durante o assamento não é capaz de diminuir a contagem fúngica dos principais fungos filamentosos deteriorantes deste produto.

5.5 Referências Bibliográficas

- Adams, M. R. & Moss, M. O. 2000. Royal Society of Chemistry. Food Microbiology. Londres, Reino Unido.
- Albert, A.; Perez-Munuera, I.; Quiles, A.; Salvador, A.; Fiszman, S. M.; Hernando, I. 2009. Adhesion in fried bateres nuggets: Performance of diferente hydrocolloids as predest using three cooking procedures. Food Hydrocolloids, 23, 1443-1448.
- Asefa, D. T.; Kure, C. F.; Gjerde, R. O.; Omer, M. K.; Lansgrud, S.; Nesbakken, T.; Skaar, I. 2010. Fungal growth pattern, sources and factors of mould contamination in dry-cured meat production facility. International Journal of Food Microbiology, 140, 131-135.
- Baptista, P. & Linhares, M. 2005. Higiene e Segurança Alimentar na Restauração. Forvisão - Consultoria em Formação Integrada. Guimarães, Portugal, I.
- Beuchat, L. R. and Pitt, J. I. 2001. Detection and enumeration of heat-resistance molds. In *Compendium of the Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 4th edn ed. Downes, F. P. and Ito, K. pp. 217-222. Washington, DC: APHA.
- Bucher, O.; D'aoust, J. Y.; Holley, R.A. 2008. Thermal resistance of *Salmonella* serovars isolated from raw, frozen chicken nuggets/strips, nugget meat and pelleted broiler feed. International Journal of Food Microbiology, 124, 195-198.
- Castellari, C.; Quadrelli, A. M.; Laich, F. 2010. Surface mycobiota on Argentinean dry fermented sausages. International Journal of Food Microbiology, 142, 149-155.
- Comi, G.; Orlic, S.; Redzepovic, S.; Urso, R.; Iacumin, L. 2004. Moulds isolated from Istrian dried ham at the pre-ripening and ripening level. International Journal of Food Microbiology, 96, 29-34.
- 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.
- Jay, J. M. 2005. Microbiologia de Alimentos, 6^a Ed. ArtMed, Porto Alegre.
- Lakins, D. G.; Echeverry, A.; Alvarado, C.Z.; Brooks, J.C. Brashears, M.T.; Brashears, M.M. 2008. Quality of and Mold Growth on White Enriched Bread for Military Rations Following Directional Microwave Treatment. Journal of Food Science, 73, 99-103.
- López-Díaz, T.-M.; Santos, J.-A.; García-López, M.-L.; Otero, A. 2001. Surface mycoflora of a Spanish fermented meat sausage and toxigenicity of *Penicillium* isolates. International Journal of Food Microbiology, 68, 69-74.
- Papagianni, M.; Ambrosiadis, I.; Filiouisis, G. 2007. Mould growth on traditional greek sausages and penicillin production by *Penicillium* isolates. Meat Science, 76, 653-657.

- Pitt, J.I. & Hocking, A.D. 2009. Fungi and Food Spoilage. Blackie Academic & Professional: London, pp. 593.
- Pitt, J. I.; Christian, J. H. B. 1970. Heat resistance of xerophilic fungi based on microscopical assessment of spore survival. *Applied Microbiology*, 20, 682-686.
- Roccatto, A.; Uyttendaele, M.; Cibin, V.; Barrucci, F.; Cappa, V.; Zavagnin, P.; Longo, A.; Ricci, A. 2015. Survival of *Salmonella Typhimurium* in poultry-based meat preparations during grilling, frying and baking. *International Journal of Food Microbiology*, 197, 1-8.
- Saccomori, F.; Wigmann, E.F.; Bernardi, A.O.; Alcano-González, M.J.; Copetti, M. V. 2015. Influence of storage temperature on the deterioration of frozen chicken nuggets inoculated with *Penicillium polonicum* and *Penicillium glabrum*. *International Journal of Food Microbiology*, 200, 1-4.
- Saccomori, F.; Copetti, M.V. 2014. Verificação das temperaturas dos balcões frigoríficos em supermercados de Santa Maria – RS. *Jornada Acadêmica Integrada*.
- Samson, R.A.; Hoekstra, E. S.; Frisvad, J.C.; Filtenborg, O. 2002. Introduction to food- and airborne fungi. The Netherlands, CBS.
- Silva, F.A.S.E.; Azevedo, C.A.V. 2002. Versão do programa computacional Assistant para o sistema operacional Windows. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 4,71-78.
- Silva, A. R.; Sant'Ana, A.S.; Massaguer, P.R. 2010. Modelling the lag time and growth rate of *Aspergillus section Nigri* IOC 4573 in mango nectar as a function of temperature and pH. *Journal of Applied Microbiology*, 109, 1105-1116.
- Sonjak, S.; Licen, M.; Frisvad, J. C.; Gunde-Cimerman, N. 2011. The mycobiota of three dry-cured meat products from Slovenia. *Food Microbiology*, 28, 73-376.
- Tondo, E. C.; Bartz, S. 2009. *Microbiologia e sistemas de gestão da segurança de alimentos*. Porto Alegre: Sulina.
- Wigmann, E. F.; Saccomori, F.; Bernardi, A. O.; Frisvad, J.; Copetti, M. V. 2015a. Toxigenic *Penicillia* spoiling frozen chicken nuggets. *Food Research International*, 67, 219-222.
- Wigmann, E. F. 2015b. Investigação da deterioração fúngica de empanados congelados de frango: origem da contaminação e resistência térmica dos deteriorantes. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Tabela 1 – Média e desvio padrão do inóculo de cada espécie fúngica e do número de reduções decimais dos tratamentos térmicos de fritura, assamento e tratamento combinado (fritura + assamento) aplicados sobre espécies de *Penicillium*.

Cepa	Identificação	Inóculo inicial (log UFC/g)	Reduções decimais a partir do inóculo (log UFC/g)		
			Fritura	Assamento	Fritura + Assamento
NGT 16/12	<i>P. commune</i>	5,85±0,00	1,02 ± 0,05a*	0,08 ± 0,10a	2,92 ± 0,11b
NGT 23/12	<i>P. polonicum</i>	5,62±0,10	1,00 ± 0,15a	0,02 ± 0,00a	1,78 ± 0,96b
NGT 29/12	<i>P. glabrum</i>	3,34±0,06	1,25 ± 0,21a	0,17 ± 0,09a	3,35 ± 0,05b
NGT 30/12	<i>P. solitum</i>	4,78±0,12	1,01 ± 0,03a	0,04 ± 0,11a	2,21 ± 0,62b
NGT 33/12	<i>P. polonicum</i>	5,23±0,08	1,66 ± 0,49a	0,20 ± 0,04a	5,24 ± 0,06a
NGT 35/12	<i>P. glabrum</i>	4,85±0,10	1,76 ± 0,24a	0,27 ± 0,13a	4,85 ± 0,08a
NGT 51/12	<i>P. crustosum</i>	5,64±0,70	1,92 ± 0,32a	0,88 ± 0,61a	2,56 ± 0,12b

*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

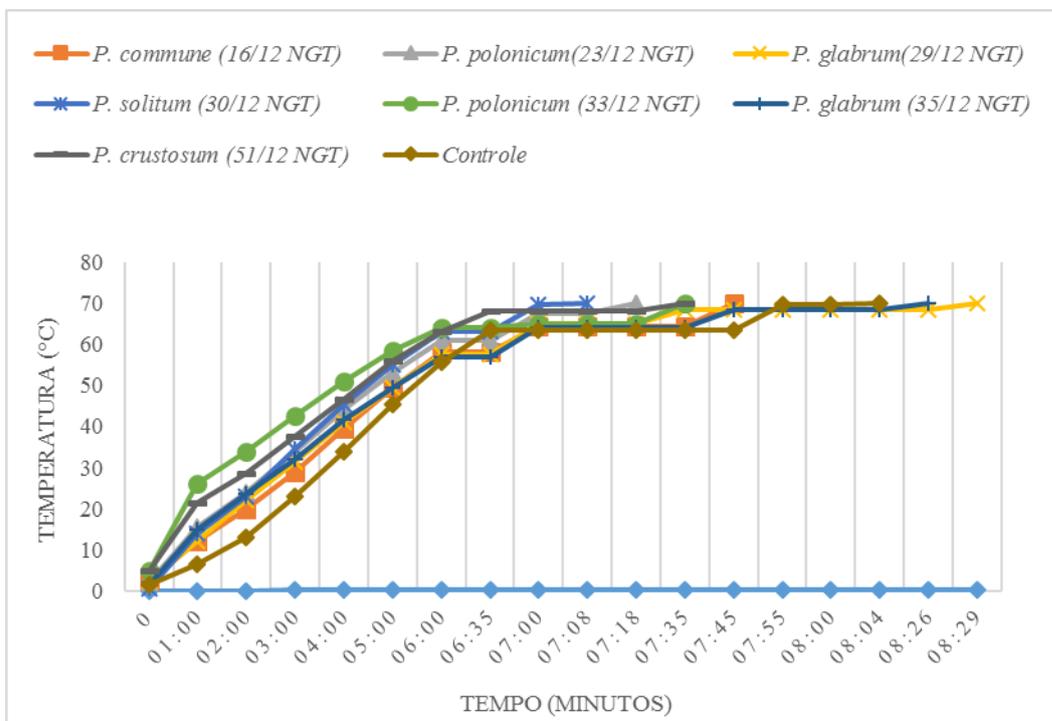


Figura 1 – Relação entre tempo (minutos) e temperatura (°C) atingida no interior de empanados de frango inoculados com *Penicillium* spp. durante a etapa de assamento.

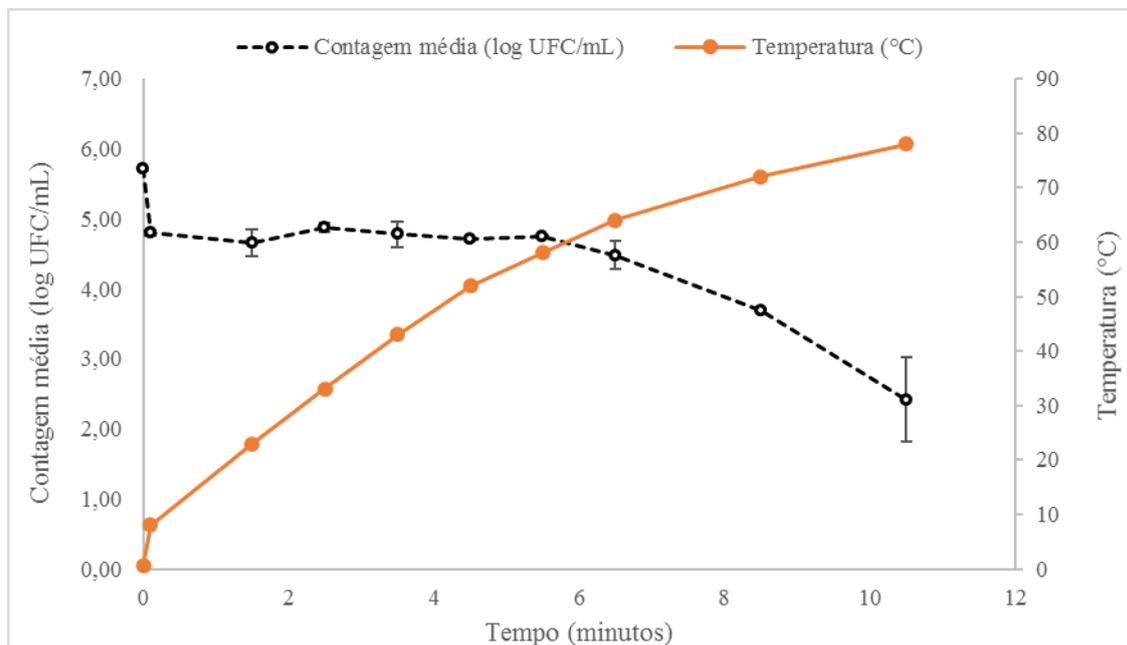


Figura 2 – Resultados de tempo (minutos), média da contagem fúngica (log UFC/g) e temperatura (°C) de empanados de frango inoculados com *Penicillium polonicum* NGT 23/12 ao longo dos tratamentos térmicos (fritura, seguido de assamento).

6 CONCLUSÕES

- O gênero *Penicillium* foi o predominante nas amostras analisadas, tendo sido isoladas pelo menos 29 espécies diferentes. Ressalta-se a predominância dos gêneros *Aspergillus* e *Eurotium* na farinha *batter*, e de *Fusarium* sp. e *Talaromyces* sp. nos condimentos;
- Com relação as espécies, o *Penicillium polonicum* teve destaque pela maior frequência de ocorrência nas amostras de farinha *predust*, massa *predust*, massa *batter*, massa *breader* e empanado frito;
- Foi observada redução na contaminação fúngica ao longo do processamento térmico aplicado na indústria, sendo que somente *Penicillium brevicompactum* e *Penicillium polonicum* foram isolados em amostras após a fritura;
- No produto final (empanado de frango congelado e embalado) foi isolado *Penicillium glabrum* em 1 das 10 amostras;
- O *Penicillium glabrum* também foi a espécie mais frequentemente isolada do ar nas áreas de processamento analisadas, evidenciando a possibilidade de deposição dos esporos do ar na superfície dos empanados congelados de frango, provocando a recontaminação do produto;
- Não foi evidenciada resistência térmica nas cepas de *Penicillium commune* (NGT 16/12), *Penicillium polonicum* (NGT 23/12 e NGT 33/12), *Penicillium glabrum* (NGT 29/12 e NGT 35/12), *Penicillium solitum* (NGT 30/12) e *Penicillium crustosum* (NGT 51/12), quando submetidas ao choque térmico nos tubos TDTs (*Thermal Death Tubes*) em tampão fosfato pH 7.2;
- *Penicillium commune* (NGT 16/12), *Penicillium polonicum* (NGT 23/12), *Penicillium solitum* (NGT 30/12) e *Penicillium crustosum* (NGT 51/12) sobreviveram ao tratamento aplicado de fritura seguido de assamento, quando conídios foram inoculados nos empanados congelados de frango;
- O *Penicillium polonicum* (NGT 23/12) foi a cepa mais resistente aos tratamentos térmicos (fritura seguido de assamento) em comparação com as outras cepas demais estudadas;

- Verificou-se que o *Penicillium polonicum* (NGT 23/12) se manteve aproximadamente com 4 log UFC/g depois do tratamento de fritura até os 6 minutos e 30 segundos, quando apresentou temperatura interna de 68 °C;
- Durante o assamento dos empanados inoculados com o *P. polonicum* (NGT 23/12), a redução foi de 2,02 log UFC/g no tempo de 8 minutos e 30 segundos com temperatura no centro do produto de 72 °C e aos 10 minutos e 30 segundos com 78 °C internamente obteve 3,29 log UFC/g, quando comparados ao controle positivo (empanado inoculado com o fungo e sem a aplicação dos tratamentos térmicos);
- A média de contagem fúngica durante o assamento dos empanados inoculados com o *P. polonicum* (NGT 23/12) comparados com o empanado frito apresentou 0,23, 1,11 e 2,38 log UFC/g quando a temperatura interna do produto alcançou 68, 72 e 78 °C, respectivamente. Identificando mais uma deficiência no processamento em relação as temperaturas empregadas nos tratamentos térmicos, considerando que nem mesmo o controle interno do produto à 72 °C é suficiente para a inocuidade do produto final.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As principais espécies de *Penicillium* relatadas na literatura como deteriorantes de empanados congelados de frango foram as predominantes tanto na matéria-prima e produto no decorrer das fases de elaboração quanto no ar do ambiente de processamento de empanados congelados de frango.

O nível de contaminação das matérias-primas utilizadas para a elaboração do produto em etapas prévias ao tratamento térmico pode ser considerado um fator relevante. O experimento conduzido com o *Penicillium polonicum* (NGT 23/12), cepa mais resistente aos tratamentos térmicos, demonstrou que a inativação do micro-organismo nos níveis de ocorrência observados neste estudo somente seria possível quando o interior do produto atingisse temperaturas próximas a 78 °C no, ou seja, 8 °C acima da temperatura preconizada pelas indústrias (70 °C).

Outro fator a ser considerado é que, mesmo após a eliminação dos fungos contaminantes através do tratamento térmico, existe a possibilidade de re-contaminação do empanado por esporos fúngicos de espécies potencialmente deteriorantes dispersas no ar do ambiente de produção, sobretudo no período compreendido entre a saída do produto do forno de assamento e o momento de serem embalados. Estudos complementares são necessários para avaliação da sensibilidade destas espécies aos agentes sanitizantes disponíveis no mercado.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAH, N.; NAWAWI, A.; OTHMAN, I. Fungal spoilage of starch-based foods in relation to its water activity (a_w). **Journal of Stored Products Research**. v. 36, p. 47-54. 2000.

ABPA. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Anais eletrônicos**. Disponível em: <http://www.ubabef.com.br/file/publicacoes/8ca705e70f0cb110ae3aed67d29c8842.pdf> Acesso em: 04 jan. 2015.

ADAMS, M. R. & MOSS, M. O. Royal Society of Chemistry. **Food Microbiology**. Londres, Reino Unido. 2ª ed. 2000.

ADEDEJI, A. A.; NGADI, M. O.; RAGHAVAN, G. S. V. Kinetics of mass transfer in microwave precooked and deep-fat fried chicken nuggets. **Journal of Food Engineering**. V. 91. P. 146-153. 2009.

ALBERT, A.; PEREZ-MUNUERA, I.; QUILES, A.; SALVADOR, A.; FISZMAN, S. M.; HERNANDO, I. Adhesion in fried bateres nuggets: Performance of diferente hydrocolloids as predust using three cooking procedures. **Food Hydrocolloids**. v. 23. p. 1443-1448. 2009.

ALTUNAKAR, B.; SAHIN, S.; SUMNU, G. Functionality of batters containing different starch types for deep-fat frying of chicken nuggets. **European Food Research and Technology**. v. 218. p. 318-322. 2004.

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 dry-cured meat production facility. **International Journal of Food Microbiology**. v. 140. p. 131-135. 2010.

BAIXAULI, R.; SANZ, T.; SALVADOR, A.; FISZMAN, S.M. Effect of the addition of dextrin or dried egg on the rheological and textural properties of batters for fried. **Food Hydrocolloids**. v. 17. p. 305-310. 2003.

BAPTISTA, P. & LINHARES, M. **Higiene e Segurança Alimentar na Restauração**. Forvisão - Consultoria em Formação Integrada. Guimarães, Portugal. v. I, 1ª ed. 2005.

BARBUT, S. Poultry Products Processing - An Industry Guide. CRC Press, **Boca Raton, FL**, p. 550. 2002.

BARBUT, S. Convenience breaded poultry meat products – New developments. **Trends in Food Science and Technology**. v. 26, p.14-20. 2012.

BERGHOFER, L. K.; HOCKING, A. D.; MISKELLY, D.; JANSSON, E. Microbiology of wheat and flour milling in Australia. **International Journal of Food Microbiology**. v. 85, p.137-149. 2003.

BRASIL. **Ministério da Agricultura e Abastecimento**. Instrução Normativa nº 6, de 15 de fevereiro de 2001. Regulamento técnico de identidade e qualidade de empanados. 2001.

BRERA, C.; CATANO, C.; SANTIS, B.; DEBEGNACH, F.; GIACOMO, M.; PANNUNZI, E.; MIRAGLIA, M. Effect of Industrial Processing on the Distribution of Aflatoxins and Zearalenona in Corn-Milling Fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 54. p. 5014-5019. 2006.

BUCHER, O.; D'AOUST, J. Y.; HOLLEY, R.A. Thermal resistance of Salmonella serovars isolated from raw, frozen chicken nuggets/strips, nugget meat and pelleted broiler feed. **International Journal of Food Microbiology**.v. 124. P. 195–198, 2008.

CABANÑAS, R.; BRAGULAT, M. R.; ABARCA, M.L. CASTELLÁ, G.; CABAÑES, F.J. Occurrence of *Penicillium verrucosum* in retail wheat flours from the Spanish Market. **Food Microbiology**. v. 25. p. 642-647. 2009.

CASTELLARI, C.; QUADRELLI, A. M.; LAICH, F. Surface mycobiota on Argentinean dry fermented sausages. **International Journal of Food Microbiology**. v. 142. p. 149-155. 2010.

CASTILLO, M.A.; MONTES, R.; NAVARRO, A.; SEGARRA, R.; CUESTA, G.; HERNÁNDEZ, E. Occurrence of deoxynivalenol and nivalenol in Spanish corn-based food products. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 21. p. 423-427. 2008.

CHEN, H-H.; KANG, H.; CHEN, S. The effects of ingredients and content on the rheological properties of batters and physical properties of crusts in fried foods. **Journal of Food Engineering**. v. 88. p. 45-54. 2008.

CHULZE, S. N. Strategies to reduce mycotoxins levels in maize during storage: a review. **Food Additives and Contaminants**. v. 27, n. 5, p. 651-657. 2010.

CHRISTENSEN, M.; PURSLOW, P. P.; LARSEN, L. M. The effect of cooking temperature on mechanical properties of whole meat, single muscle fibres and perimysial connective tissue. **Meat Science**. v. 55. p. 301-307. 2000.

CODEX ALIMENTARIUS. **Recommended International Code of Practice for the Processing and Handling of Quick Frozen Foods**. CAC/RCP 8. p. 1-19. 1976.

COMBES, S.; LEPETIT, J.; DARCHE, B.; LEBAS, F. Effect of cooking temperature and cooking time on Warner-Bratzler tenderness measurement and collagen content in rabbit meat. **Meat Science**. v. 66. p. 91-96. 2004.

COMI, G.; ORLIC, S.; REDZEPOVIC, S.; URSO, R.; IACUMIN, L. Moulds isolated from Istrian dried ham at the pre-ripening and ripening level. **International Journal of Food Microbiology**. v. 96. p. 29-34. 2004.

CURRIE, A.; MACDOUGALL, L.; ARAMINI, J.; GAULIN, C.; AHMED, R.; ISAACS, S. Frozen chicken nuggets and strips and eggs are leading risk factors for *Salmonella* Heidelberg infections in Canada. **Epidemiology and Infection**. v. 133. p. 809-816. 2005.

DAGNAS, S.; ONNO, B.; MEMBRÉ, J.-M. Modeling growth of bakery product spoilage molds as a function of water activity, temperature and pH. **International Journal of Food Microbiology**. v. 186. p. 95-104. 2014.

DAVIES, A.; BOARD, R. The microbiology of meat and poultry. **Thompson Science**. London, UK. 1^a ed. 1998.

DEGENHART, J. Empanamento de produtos cárneos. **Aditivos & Ingredientes**. v. 28. p. 77-79. 2003.

DILL, D.D.; SILVA, A.P.; LUVIELMO, M.M. Processamento de empanados: sistemas de cobertura. **Estudos tecnológicos**, v. 5: p. 33-49. 2009.

DOGAN, S. F.; SAHIN, S.; SUMNU, G. Effect of soy and rice flour addition on batter rheology and quality of deep-fat fried chicken nuggets. **Journal of Food Engineering**. v. 71.

p. 127-132. 2005.

FELLOWS, P. **Tecnologia del procesado de los alimentos**. Zaragoza, Editorial Acribia S.A, p. 535. 1994.

FILTENBORG, O.; FRISVALD, J.C.; SVENDENSEN, J.A.; Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 45, p. 581-585. 1996.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Filamentous fungi in foods and feeds: ecology, spoilage and mycotoxin production. In Arora, D. K.; Mukeriji, K. G. Marth, E. H. (Eds.). Handbook of applied mycology. **Foods and Feeds**, New York: Marcel Dekker. v. 3. P. 31-68. 1992.

GRAVES, R. R.; HESSELTINE, C. W. **Fungi in Flour and Refrigerated Dough Products**. Northern Regional Research Laboratory. Peoria, Illinois. v. 7.1965.

GILL, C. O.; LOWRY, P. D. Grow at sub-zero temperatures of black spot fungi from meat. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 52. p. 245-250. 1982.

IARC. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans: Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Lyon, France: **International Agency for Research on Cancer**. v. 56, p. 571. 1993.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. Porto Alegre: Editora Artmed. 6ª Ed. 2005.

KURE, C. F.; SKAAR, I.; BRENDEHAUG, J. Mould contamination in production of semi-hard cheese. **International Journal of Food Microbiology**. v. 93. p. 41-49. 2004.

KURE, C. F.; BORCH, E.; KARLSSON, I.; HOMLEID, J. P.; LANGRUD, S. Use of the selective agar medium CREAD for monitoring the level of airborne spoilage moulds in cheese production. **International Journal of Food Microbiology**. v. 122. p. 29-34. 2008.

LEONHARDT, C.; SANTOS, H. C. P.; MARCZAK, L. D. F.; ZAPATA-NOREÑA, C. P. Otimização do cozimento de filé de frango empanado em forno de injeção direta de vapor. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 24. p. 43-46. 2004.

MILANEZ, T. V.; VALENTE-SOARES, L. M.; BAPTISTA, G. G. Occurrence of

trichothecene mycotoxins in Brazilian corn-based food products. **Food Control**. v. 17. p. 293-298. 2006.

OLIVO, R. **O mundo do frango: cadeia produtiva da carne de frango**. Criciúma. 2006.

ORDOÑEZ, J. A. **Tecnologia de alimentos: alimentos de origem animal**. 1ª ed., Porto Alegre: Editora Artmed. 2005.

OWENS, C. M. Coated poultry products. In: Sams, A. **Poultry Meat Processing**. CRC Press, FL. 2001.

PAPAGIANNI, M.; AMBROSIADIS, I.; FILIOUSIS, G. Mould growth on traditional greek sausages and penicillin production by *Penicillium* isolates. **Meat Science**. v. 76. p. 653-657. 2007.

PETSKA, J.J.; BONDY, G.S. **Immunotoxic effects of mycotoxins**. In: **Mycotoxins in Grain: Compounds other than Aflatoxin**. J. D. Miller & H. L. Trenholm, eds. Eagan Press, St. Paul, MN, p. 339-358, 1994.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D.; MISCAMBLE, B. F. DHARMAPUTRA, O. S.; KUSWANTO, K. R. RAHAYU, E. S.; SARDJONO. The mycoflora of food commodities from Indonesia. **Food mycology**. v.1. p. 41-60. 1998.

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

ROÇA, R. O.; SERRANO, A. M. Abate de bovinos: alterações microbianas da carcaça. **Higiene Alimentar**. São Paulo, v. 9, n.35, p. 8-13, 1995.

SACCOMORI, F. Fungos deteriorantes de empanados congelados de frango: isolamento, caracterização e crescimento em baixas temperaturas. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). 2013.

SACCOMORI, F.; WIGMANN, E.F.; BERNARDI, A.O.; ALCANO-GONZÁLEZ, M.J.; COPETTI, M. V. Influence of storage temperature on the deterioration of frozen chicken nuggets inoculated with *Penicillium polonicum* and *Penicillium glabrum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 200, p. 1-4. 2015.

SACCOMORI, F.; COPETTI, M.V. Verificação das temperaturas dos balcões frigoríficos em supermercados de Santa Maria – RS. Jornada Acadêmica Integrada. 2014.

SAMS, A. **Poultry Meat Processing**. CRC Press, Boca Raton, FL: USA. 2001.

SAMSON, R.A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O. **Introduction to food- and airborne fungi**. The Netherlands, CBS. 2002.

SAMSON, R.A.; HOUBRAKEN, J.A.M.P.; KUIJPERS, A.F.A.; FRANK, J.M. & FRISVAD, J.C. New ochratoxin A or sclerotium producing species of *Aspergillus* section *Nigri*. **Studies in Mycology**, v. 50.p. 45-61. 2004.

SLONGO, A. P.; MIORELLI, S.; ARAGÃO, G. M. F. Influência de diferentes fatores na termorresistência de *Neosartorya fischeri* em suco de mamão. **Alimentos e Nutrição**. Araraquara. v. 16. p. 377-387. 2005.

SONJAK, S.; LICEN, M.; FRISVAD, J. C.; GUNDE-CIMERMANN, N. 2011. The mycobiota of three dry-cured meat products from Slovenia. **Food Microbiology**. v. 28. p. 73-76. 2011.

SOORGI, M.; MOHEBBI, M.; MOUSAVI, S. M.; SHAHIDI, F.; Effect of Methylcellulose, Temperature, and Microwave Pretreatment on Kinetic of Mass Transfer During Deep Fat Frying of Chicken Nuggets. **Food Bioprocess Technology**. v.5.p.1521-1530. 2012.

SORENSEN, L. M.; JACOBSEN, T.; NIELSEN, P.V.; FRISVAD, J. C.; KOCH, A. G. Mycobiota in the processing areas of two different meat products. **International Journal of Food Microbiology**. v. 124. p. 58-64. 2008.

SVEUM, W. H.; MOBERG, L.J.; RUDE, R.A.; FRANK, J.F. **Microbiological monitoring of the food processing environmental**. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. (Ed.). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3rd ed. Washington: Edwards Brothers, p.51-74, 1992.

TORNBERG, E. **Effects of heat on meat proteins – Implications on structure and quality of meat products**. v. 70. 2005.

TSAI, M.; LIU, H. Exposure to culturable airborne bioaerosols during noodle manufacturing

in central Taiwan. **Science of the Total Environment**. v. 407. p. 1536-1546. 2009.

VARELA, P.; SALVADOR, A.; FISZMAN, S. M. Methodological developments in crispness assessment: Effects of cooking method on the crispness of crusted foods. **Food Science and Technology**. v. 41. p. 1252-1259. 2008.

WEIDENBÖRNER, M.; WIECZOREK, C.; APPEL, S. KUNZ, B. Whole wheat and white wheat flour – the mycobiota and potential mycotoxins. **Food Microbiology**. v. 17. p. 103-107. 2000.

WIGMANN, E. F.; SACCOMORI, F.; BERNARDI, A. O.; FRISVAD, J.; COPETTI, M. V. Toxigenic *Penicillia* spoiling frozen chicken nuggets. **Food Research International**. v. 67. p. 219-222. 2015.