

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

**FUNGOS DETERIORANTES DE EMPANADOS
CONGELADOS DE FRANGO: ISOLAMENTO,
CARACTERIZAÇÃO E CRESCIMENTO EM BAIXAS
TEMPERATURAS.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Fernanda Saccomori

**Santa Maria, RS Brasil
2013**

**FUNGOS DETERIORANTES DE EMPANADOS
CONGELADOS DE FRANGO: ISOLAMENTO,
CARACTERIZAÇÃO E CRESCIMENTO EM BAIXAS
TEMPERATURAS.**

Fernanda Saccomori

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos 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
2013**

Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

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

FUNGOS DETERIORANTES DE EMPANADOS CONGELADOS DE
FRANGO: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E CRESCIMENTO
EM BAIXAS TEMPERATURAS.

elaborada por
Fernanda Saccomori

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

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

Michele Hoeltz, Dr^a (UNISC)

Janio Morais Santurio, Dr^o (UFSM)

Santa Maria, 19 de dezembro de 2013.

Dedico este trabalho a minha mãe, pela dedicação, amor e pelo esforço na realização dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Celso e Vera e minhas irmãs, Angélica e Letícia por toda a atenção e apoio, e por sempre acreditarem nas minhas decisões.

A minha vó, Jurema, minha dinda Maria Clara e minha tia Carla, por todo tipo de ajuda e incentivo.

Ao meu namorado Juliano, pelo apoio constante e por me proporcionar momentos alegres e demonstrações diárias de amor e carinho.

Aos amigos que estiveram presente e incentivaram a realização do meu trabalho, em especial Camila Federle, Cadidja Coutinho e Kelly Pinheiro, pela amizade verdadeira e pelos momentos especiais e Jaque Nunes, que apesar da distância foi mais que uma companheira, ajudando-me nas horas difíceis.

As minhas colegas de laboratório Évelin Wigmann, Angélica Bernardi e Maria Alcano pela amizade e colaboração nas análises deste trabalho, e as novas amigadas conquistadas Raquel Jahn, Cátia Sherer e Carol Boeira.

A minha orientadora, prof^a Marina Venturini Copetti, pelo incentivo e oportunidade de realizar esta pesquisa, aos ensinamentos e ao exemplo de competência.

A todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho e fizeram parte desta etapa da minha vida. Muito obrigada!

RESUMO

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

FUNGOS DETERIORANTES DE EMPANADOS CONGELADOS DE FRANGO: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E CRESCIMENTO EM BAIXAS TEMPERATURAS.

AUTORA: FERNANDA SACCOMORI

ORIENTADORA: MARINA VENTURINI COPETTI

Data e Local da Defesa: 19 de dezembro de 2013, Santa Maria, RS, Brasil.

O consumo de empanados congelados de frango aumentou consideravelmente nas últimas décadas, uma vez que são produtos práticos e saborosos, capazes de satisfazer as necessidades dos consumidores. As características intrínsecas deste produto são favoráveis à proliferação de micro-organismos patogênicos e deteriorantes e a aplicação de baixas temperaturas tem sido o método mais empregado para prolongar a vida útil destes empanados cárneos congelados. A contaminação microbiológica em empanados pode se originar da matéria-prima utilizada para sua elaboração ou se produz durante a manipulação e operações de processamento e a multiplicação destes micro-organismos durante a estocagem pode modificar as propriedades sensoriais e nutricionais do alimento, além de representar um problema de segurança alimentar. Devido a sua habilidade em superar barreiras de temperatura e atividade de água, os fungos são os principais micro-organismos capazes de deteriorar o grupo dos alimentos congelados, o que, além do aspecto deteriorativo e perdas econômicas, representa um problema de saúde pública pela possibilidade de produção de micotoxinas no produto e exposição do consumidor. O objetivo deste estudo foi de identificar as principais espécies de fungos filamentosos envolvidas na deterioração de empanados congelados de frango, verificar metabólitos secundários produzidos pelas mesmas e avaliar o crescimento das duas espécies predominantes quando expostas à baixas temperaturas e, em paralelo, determinar a temperatura em balcões de congelamento de 6 supermercados da cidade de Santa Maria-RS. As espécies predominantes envolvidas na deterioração de empanados congelados de frango foram *Penicillium glabrum*, *Penicillium polonicum*, *Penicillium manginii*, *Penicillium solitum* e *Penicillium crustosum*. A análise do perfil de metabólitos secundários revelou capacidade de síntese de micotoxinas como ácido ciclopiazônico, citroviridina, roquefortina C, penitrem A e verrucosidina por alguns isolados. Os resultados demonstraram que o fungo *P. polonicum*, foi capaz de formar colônias visíveis na superfície dos empanados congelados de frango conservados à -5°C aos 120 dias. Para *P. glabrum* a menor temperatura que foi observado crescimento foi 0°C. A análise 'in loco' da temperatura dos supermercados revelou temperatura superior a -5°C em pelo menos um dos momentos avaliados, sendo que 4 de 6 supermercados (66%) apresentaram pelo menos um pico de temperatura acima de 0 °C, com um máximo de 9,8°C. Visto que há ocorrência de temperaturas de armazenagem de alimentos congelados nas quais os fungos *P. polonicum* e *P. glabrum* poderiam se desenvolver e sabendo-se que estas espécies têm a capacidade de produzir metabólitos tóxicos, ressalta-se a necessidade de maior atenção para pesquisas relacionadas a deterioração fúngica de alimentos congelados, origem da contaminação, formas de prevenção e possíveis implicações do consumo de produtos contaminados para a saúde pública.

PALAVRAS-CHAVE: Nugget; Deterioração; Fungos filamentosos; *Penicillium* sp.; Micotoxinas.

ABSTRACT

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

FUNGAL SPOILAGE IN FROZEN CHICKEN BREADED: IDENTIFICATION, METABOLITES PROFILE AND GROWTH IN LOW TEMPERATURES.

AUTHOR: FERNANDA SACCOMORI

ADVISOR: MARINA VENTURINI COPETTI

Date and Place of Defense: December 19th, 2013, Santa Maria, RS, Brazil.

Consumption of frozen chicken breaded has increased considerably in recent decades, since they are practical and tasty, able to meet the needs of consumers. The intrinsic characteristics of this product are favorable to the proliferation of pathogenic and spoilage micro -organisms and the application of low temperatures has been the method used to extend the life of these breaded meat. Microbiological contamination can originate in breaded raw material used for production or produced during the handling and processing operations and multiplication of these microorganisms during storage can modify the sensory and nutritional properties of the food, and pose a problem food security. Due to their ability to overcome barriers of temperature and water activity, fungi are the main micro -organisms able to degrade the group of frozen foods, which, besides the appearance and deteriorating economic losses, represents a public health problem by the possibility production of mycotoxins in the product and consumer exposure. The aim of this study was to identify the main species of filamentous fungi involved in the deterioration of frozen chicken breaded , check secondary metabolites produced by the same and assess the growth of the two predominant species when exposed to low temperatures and, in parallel, to determine the temperature at counters freeze 6 supermarkets in the city of Santa Maria - RS. The predominant species involved in the deterioration of frozen chicken breaded were *Penicillium glabrum*, *Penicillium polonicum*, *Penicillium manginii*, *Penicillium solitum* and *Penicillium crustosum*. The analysis of the secondary metabolite profile showed the capacity to synthesize mycotoxins as cyclopiazonic acid citroviridina, roquefortina C, penitren A and verrucosidina by some isolates. The results demonstrated that the fungus *P. polonicum*, was able to form visible colonies on the surface of frozen chicken breaded kept at -5°C for 120 days. For *P. glabrum* the lowest growth was observed that temperature was 0°C. A ' spot ' supermarkets temperature analysis revealed temperature higher than -5°C in at least one of the time points evaluated, and 4 supermarkets 6 (66%) had at least one peak temperature above 0°C, with a maximum of 9.8 °C. Since there is occurrence of storage temperatures at which frozen foods fungi *P. polonicum* and *P. glabrum* could develop and knowing that these species have the ability to produce toxic metabolites, emphasize the need for greater attention to research related to fungal spoilage of frozen foods, source of contamination, methods of prevention and possible implications of the consumption of contaminated for public health products.

KEY WORDS: Nugget; Spoilage; Filamentous fungi, *Penicillium* sp., Mycotoxins.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 8 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 10 |
| 2.1 Produção e consumo da carne de frango..... | 10 |
| 2.2 Processamento do empanado congelado de frango | 11 |
| 2.3 Comercialização de produtos cárneos e a cadeia de frio | 13 |
| 2.4 Influência da temperatura sobre o crescimento de micro-organismos | 15 |
| 2.5 Micro-organismos deteriorantes de carne e produtos cárneos conservados sob baixa temperatura..... | 17 |
| 3 OBJETIVOS | 22 |
| 3.1 Objetivo geral | 22 |
| 3.2 Objetivos específicos | 22 |
| 4 MANUSCRITO I..... | 23 |
| FUNGOS DETERIORANTES DE EMPANADOS CONGELADOS DE FRANGO..... | 23 |
| Resumo | 24 |
| 4.1 Introdução | 25 |
| 4.2 Materiais e Métodos | 26 |
| 4.2.1 Determinação da contagem total de colônias fúngicas..... | 27 |
| 4.2.2 Identificação de fungos filamentosos | 27 |
| 4.2.3 Determinação dos metabólitos secundários produzidos..... | 27 |
| 4.3 Resultados | 29 |
| 4.4 Discussão | 30 |
| 4.5 Referências bibliográficas..... | 34 |
| 5 MANUSCRITO II | 40 |
| INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA SOBRE A DETERIORAÇÃO FÚNGICA DE EMPANADOS CONGELADOS DE FRANGO INOCULADOS COM <i>Penicillium polonicum</i> E <i>Penicillium glabrum</i> | 40 |
| Resumo | 41 |
| 5.1 Introdução | 42 |
| 5.2 Materiais e Métodos | 44 |
| 5.2.1 Avaliação do crescimento de <i>Penicillium</i> spp. sob baixas temperaturas | 44 |
| 5.2.2 Preparação do inóculo | 44 |
| 5.2.3 Inoculação dos fungos em amostras de empanados congelados de frango | 45 |
| 5.2.4 Análise das amostras | 45 |
| 5.2.5 Inoculação dos fungos em meio de cultivo | 46 |
| 5.3 Resultados | 46 |
| 5.3.1 Avaliação das espécies <i>P. polonicum</i> e <i>P. glabrum</i> | 46 |
| 5.3.2 Avaliação das temperaturas nos estabelecimentos alimentícios | 47 |
| 5.4 Discussão | 48 |
| 5.4.1 Avaliação do crescimento das espécies predominantes | 48 |
| 5.4.2 Avaliação das temperaturas nos estabelecimentos alimentícios | 52 |
| 5.5 Referências Bibliográficas | 54 |
| 6 CONCLUSÕES..... | 60 |
| 7 BIBLIOGRAFIA | 61 |

1 INTRODUÇÃO

O consumo de produtos empanados de aves aumentou consideravelmente durante as últimas quatro décadas, por ser um produto conveniente, prático e saboroso, além de atender as necessidades dos consumidores no que se refere à praticidade de preparo. Dentre estes, uma das melhores histórias de sucesso foi a do empanado congelado de frango, introduzido no mercado norte-americano pelas cadeias de *fast-food* na década de 1970.

Parte do aumento no consumo deste tipo de produto cárneo ocorreu em virtude de mudanças no comportamento social da população, sobretudo pelo ingresso da mulher no mercado de trabalho, que promoveu uma mudança nos padrões alimentares da população. Na maioria dos casos, devido ao menor tempo dispendido no lar, as refeições tradicionais foram sendo substituídas por alimentos que proporcionam maior praticidade e rapidez no preparo, elevando a demanda por alimentos pré-prontos. A durabilidade destes alimentos também foi determinante para a boa aceitação do produto e sua introdução no mercado de alimentos industrializados (WILLIAMS, 1997), o que expandiu a utilização da cadeia de frios para conservação e garantia de manutenção da qualidade, sobretudo microbiológica, destes alimentos.

Sabe-se que durante as operações de processamento e manuseio, os alimentos, podem ser contaminados por uma vasta gama de micro-organismos. Nas etapas posteriores, principalmente no período pós-processamento durante a distribuição e armazenamento, uma parcela destes poderá se desenvolver e causar deteriorações, alterando tanto as propriedades nutritivas quanto sensoriais do alimento, além do risco de desencadear problemas de saúde (HUIS IN'T VELD, 1996).

A temperatura, atividade de água (a_w) e o potencial hidrogênio-iônico (pH) exercem grande influência sobre o tipo de microbiota capaz de crescer nos alimentos e provocar alterações. A deterioração bacteriana, em geral, é mais comum em condições ideais de pH, a_w e temperatura, sendo estes os principais parâmetros alterados pela indústria de alimentos para controlar o desenvolvimento microbiano em alimentos processados. Em condições ideais os fungos estão em desvantagem devido ao maior tempo de geração que apresentam por serem eucariontes quando comparados às bactérias, seres procariontes. Contudo, os fungos em geral são mais versáteis que as bactérias na superação de barreiras de temperatura, pH e a_w , sendo

capazes de se desenvolver e provocar alterações quando os parâmetros dos alimentos são impeditivos ao desenvolvimento bacteriano (JAY et al., 2005).

Até meados do século passado a preocupação com a deterioração fúngica em gêneros alimentícios não era tida como preocupante por muitos pesquisadores. Ainda em 1977, Delazari reportou que a atuação de bolores e leveduras seria localizada e apenas superficial, o que permitiria o aproveitamento da carne após cuidadosa remoção das partes afetadas. Atualmente, sabe-se que diversas espécies fúngicas são capazes de produzir metabólitos tóxicos que podem ser cancerígenos, constituindo um risco à saúde pública (IARC, 1993), enquanto que o crescimento de fungos deteriorantes resulta em alterações químicas, nutricionais com baixa aparência e alterações no sabor, levando o consumidor a rejeição (GIBSON; HOCKING, 1997).

O crescimento de fungos em alimentos mostra-se como um importante problema de falta de qualidade, e que é observado principalmente ao longo do período de estocagem. O desenvolvimento destes micro-organismos resulta na alteração de cor, odor, sabor textura e aspecto do alimento e provoca grande insatisfação e rejeição por parte dos consumidores (ANDERSEN; THRANE, 2006). A insatisfação do consumidor pode levar a perdas econômicas significativas na indústria alimentar, pois além de reclamar com a loja ou com o fabricante, o consumidor tende ainda a parar de comprar a marca, fazer propaganda boca a boca negativa, reclamar com órgãos privativos ou governamentais e iniciar um processo jurídico (HAWKINS et al., 2007).

Dados internos de empresas do setor avícola revelam que 1-1,5% dos empanados congelados de frango sejam descartados devido à deterioração por fungos. Embora sejam muitos os micro-organismos que podem contaminar os empanados de frangos, apenas aqueles com habilidade de se desenvolver em baixas temperaturas (psicrófilos e psicrotróficos) terão a capacidade de deteriorar este tipo de produto quando congelado. Nestas 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.

Apesar da importância do assunto, poucos dados relatam o papel dos fungos na deterioração de alimentos congelados e suas consequências e possíveis riscos para a saúde humana.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção e consumo da carne de frango

Nas últimas três décadas, a avicultura brasileira apresentou altos índices de crescimento. Seu produto, o frango, conquistou os mais exigentes mercados. O País se tornou o terceiro produtor mundial e líder em exportação. De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2012), atualmente a carne produzida no Brasil é comercializada para 142 países.

Embora presente em todo território nacional, a carne de frango tem destaque econômico na região Sul, que devido aos sistemas de produção integrados tem o Paraná e Rio Grande do Sul como principais fornecedores (MAPA, 2012).

A mudança dos hábitos de compra tradicionais e o movimento em direção a sociedades mais industriais estão resultando em uma maior proporção de alimentos vendidos sob a forma processada. Neste cenário, o processamento tem sido também uma aposta da indústria avícola por ser uma alternativa para elevar o consumo de carne de aves pela população devido ao aumento na diversidade de produtos ofertados e ao mesmo tempo pelo valor agregado aos recortes cárneos, aumentando assim o retorno financeiro (ABRAS, 2013; BORTOLUZZI, 2006).

Com a expansão deste mercado dos produtos de conveniência, os empanados congelados de frango ganharam destaque. Um exemplo é o empanado congelado de frango que foi introduzido por uma das cadeias de *fast-food* 2-3 décadas atrás e se tornou um grande sucesso para a indústria avícola e atualmente são vendidos em grandes quantidades em lojas de varejo na forma congelada (BARBUT, 2002). No Brasil os principais nomes fantasia sob os quais os empanados congelados de frango são comercializados são: Nuggets, Mini Chicken, Patitas, Auroggets, Tekitos, entre outros.

2.2 Processamento do empanado congelado de frango

A produção do empanado congelado de frango começa pela formatação do produto. Com o objetivo de se aproximar da aparência de uma porção íntegra de carne, são adicionados ingredientes não-cárneos como cloreto de sódio, fosfatos e polifosfatos, que aumentam a forma iônica do meio e a solubilidade das proteínas miofibrilares. Ingredientes como proteína de origem vegetal, também são empregados (ORDÓÑEZ, 2005).

De acordo com a Instrução Normativa nº 06 de 15 de fevereiro de 2001 que aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de empanados, define-se empanado como o produto cárneo industrializado obtido a partir de carnes de diferentes espécies de animais de açougue, acrescido de ingredientes, moldado ou não, e revestido de cobertura apropriada que o caracterize. Além disso, podem ainda ser adicionados ingredientes como farinhas, condimentos, molhos, vegetais e proteína de origem vegetal, a qual não deve ultrapassar 4% de adição. Os produtos empanados devem também apresentar no máximo 30% de carboidratos totais e um mínimo de 10% de proteína (BRASIL, 2001).

No processo produtivo é realizada primeiramente uma redução de tamanho dos recortes de carne. Este método desempenha papel fundamental na extração de proteínas solúveis, facilitando a ligação posterior da mistura (VARNAM; SUTHERLAND, 1995). Na sequência utiliza-se salmoura na mistura das matérias-primas cárneas. A salmoura, que contém aditivos e flavorizantes, homogeneíza e coloca em contato os ingredientes da formulação (ORDÓÑEZ, 2005).

Posteriormente, na etapa da moldagem é aplicado pressão a um bloco previamente congelado de mistura (ORDÓÑEZ, 2005). A pressão exercida pela máquina formadora empurra a massa congelada através de moldes com o formato desejado. Assim que os moldes estiverem preenchidos, uma placa que suporta os moldes movimentada-se liberando a massa já formada (ÁVILA, 1996).

Na sequência em geral é realizado o “*pre-dusting*”, processo de revestimento da carne com uma fina camada de farinha, farelos de pão ou uma combinação dos dois. Essa primeira camada de empanamento absorve a umidade superficial do produto formado (BARBUT, 2002). Posteriormente a peça passa pelo processo chamado “*battering*”, onde uma suspensão de ingredientes secos é usada para revestir o produto. O *batter* é uma suspensão de sólidos que age como elemento ligante entre o substrato e a camada mais externa de empanamento (GL-LABORATORIES WORLDWIDE, 2002). Os principais ingredientes encontrados nesta

mistura geralmente incluem farinha de trigo, farinha de milho, amido de milho, proteínas, gomas e agentes de fermentação (BARBUT, 2002). O *batter* deve apresentar características como miscibilidade, homogeneidade e viscosidade, fundamentais para o recobrimento do produto, possibilitando a adesão da camada subsequente de empanamento (BORTOLUZZI, 2006).

O empanamento é realizado na sequência, geralmente aplicado sobre a massa para melhorar a aparência e textura bem como aumentar o volume e peso do produto. Normalmente, o empanamento é feito à base de cereais. Essa farinha de cobertura final é conhecida como "*breader*" (BARBUT, 2002).

O empanado congelado de frango é então frito, com duas finalidades tecnológicas principais: a primeira é a de desenvolver uma cor castanho/dourado na superfície e segunda é a de "solidificar" o sistema de revestimento para mais tarde, durante a fase de distribuição o produto continuar íntegro apesar das vibrações ocorrentes durante o transporte. Adicionalmente esta etapa tem importância para a redução do número de contaminantes microbiológicos presentes na superfície do alimento antes do mesmo ser congelado (BARBUT, 2002). Para Bortoluzzi (2006), a temperatura recomendada é de 180°C em óleo de fritura e o tempo de 20 a 35 segundos, enquanto que Barbut (2002) recomenda 195°C durante um minuto.

O cozimento é o próximo tratamento, tornando-se decisivo na preservação do alimento, sendo a principal etapa para redução da contaminação microbiana interna, além de, também ser responsável pelo aroma característico, sabor e coloração final do produto (BORTOLUZZI, 2006; ZEUTHEN; BOGH-SORENSEN, 2003).

Por fim, o empanado é congelado. O processo de congelamento tem por objetivo o controle do crescimento microbiológico e a preservação dos aspectos organolépticos do produto. Os produtos empanados congelados tornam-se menos susceptíveis à oxidação e à perda das camadas de empanamento, mantendo as características originais por um período prolongado (BARBUT, 2002). É fundamental os produtos permanecerem sob baixas temperaturas até o momento de seu preparo.

2.3 Comercialização de produtos cárneos e a cadeia de frio

É crescente a busca, por parte do consumidor, de serviços e produtos de alimentação de fácil e rápido acesso, além da praticidade no preparo e consumo. Nessa realidade, os supermercados estão cada vez mais presentes no dia-a-dia das pessoas, compreendendo um tipo de estabelecimento dos mais complexos nos quais coexistem diferentes gêneros alimentícios, distribuídos em setores como padaria confeitaria, açougue, salsicharia, alimentos secos, produtos de autosserviço e prontos para o consumo (SOTO et al., 2006).

Segundo a Associação Brasileira de Supermercados (ABRAS), os supermercados são divididos em compacto, convencional, grande, e hipermercado, conforme Tabela 1:

Tabela 1 – Classificação dos supermercados segundo a Associação Brasileira de Supermercados (ABRAS),

| Classificação | Área de vendas | Número de itens | Seções |
|---------------|----------------------------|-----------------|--|
| Compacto | 250 a 1000 m ² | 7000 | Mercearia, hortifrutis, açougue, frios, laticínios e bazar. |
| Convencional | 1001 a 2500 m ² | 12000 | Mercearia, hortifrutis, açougue, frios, laticínios, bazar, padaria e peixaria |
| Grande | 2500 a 5000 m ² | 20000 | Mercearia, hortifrutis, açougue, frios, laticínios, bazar, padaria, peixaria, e eletroeletrônicos. |
| Hipermercado | + de 5000 m ² | 45000 | Mercearia, hortifrutis, açougue, frios, laticínios, bazar, padaria, peixaria, têxteis e eletroeletrônicos. |

Fonte: Adaptado de ABRAS

Além disso, vale ressaltar que nos últimos anos houve uma mudança nos hábitos alimentares da população brasileira juntamente com uma maior exigência de qualidade dos produtos alimentícios (SILVA JUNIOR, 2002). Tal decorre da grande preocupação do consumidor com os alimentos que consome atualmente e do receio que estes não sejam seguros para a saúde humana, ou seja, que não sejam inócuos (BAPTISTA; LINHARES, 2005). Dessa maneira é importante que os supermercados adaptem seus setores de produtos refrigerados à demanda do mercado, com necessidade de instalação de uma cadeia de frio adequada.

Neste contexto os alimentos congelados vêm se tornando cada vez mais frequentes na mesa do brasileiro e o interesse dos consumidores pelos produtos conservados sob baixas temperaturas deve-se ao fato de que estes se assemelham aos frescos, apresentando características organolépticas e higiênicas adequadas e satisfatórias, além de uma vida útil prolongada (ADAMS; MOSS, 2000).

Para todos os efeitos, os alimentos conservados a -10°C não permitem o crescimento de micro-organismos, visto que o congelamento é um método eficaz para a conservação dos alimentos. Contudo, é necessário não esquecer que nem a refrigeração nem o congelamento vão tornar um produto inseguro num produto seguro, porque a sua letalidade microbiológica é limitada e as toxinas pré-formadas vão persistir (ADAMS; MOSS, 2000).

O armazenamento por congelamento deve funcionar de modo a manter a temperatura dos alimentos a -18°C ou mais baixa, com um mínimo de desvios possível (*Codex Alimentarius*, 1976), tendo em vista que a temperatura de armazenamento determina a qualidade final do produto (ARCHER, 2004). O congelamento não só diminui a temperatura do produto como separa inicialmente a água que fica retida nos tecidos em forma de cristais de gelo. Tal efeito dificulta duplamente o desenvolvimento dos micro-organismos, a ação enzimática e, conseqüentemente, retarda a deterioração (FRANCO; LANDGRAF, 2002).

É justamente baseado na velocidade de deterioração do alimento que será determinado o tempo de vida útil de um produto, que nada mais é que o tempo em que o produto armazenado em determinadas condições de temperatura, permanece adequado para ser consumido (VITALI et al., 2004). Os alimentos são sistemas complexos e ativos. De acordo com Dias (2007) a vida útil, que é variável em função do processamento, da embalagem e da composição da matéria-prima, depende do tipo de alimento. A vida útil pode ser determinada pela combinação de análises microbiológicas e químicas de amostras dos alimentos, tomadas durante um certo período de tempo. A forma mais comum e direta é simular as condições desde a armazenagem, distribuição, exposição e uso por parte do consumidor, registrando e observando a sua evolução e suas alterações ao longo do tempo (DIAS, 2007). A vida útil será o período no qual se ateste que as características sensoriais, físicas, químicas e funcionais desejadas do alimento estejam mantidas, se armazenados sob as condições recomendadas nos rótulos (DIAS, 2007).

No processo de determinação da vida útil de um produto, muitas empresas realizam testes desafio ou *challenge test* no qual o alimento é submetido a condições de abuso, como elevação da temperatura de armazenamento e elevação da carga microbiana para que deste

modo se verifique a resistência do sistema alimentício ao processo deteriorativo (WHITE, 1984).

Um dos métodos mais eficientes para prolongar a vida útil dos produtos perecíveis é o congelamento. Este, é considerado a técnica mais bem sucedida para controlar a deterioração microbiana e assim conservar os alimentos à longo prazo (ARCHER, 2004), visto que com a aplicação deste método o conteúdo de nutrientes é largamente retido e o produto congelado assemelha-se ao produto fresco (ADAMS; MOSS, 2000).

Por outro lado, ocorrem muitas alterações químicas, bioquímicas e físicas durante a armazenagem dos alimentos sob baixas temperaturas, as quais conduzem a perdas mais ou menos acentuadas de qualidade dos produtos. De acordo com Hartel e Heldman (1997), em muitos casos, são estas reações e não o crescimento microbiano, que limitam a vida útil dos produtos refrigerados.

2.4 Influência da temperatura sobre o crescimento de micro-organismos

A temperatura é um dos fatores mais relevantes na conservação, preparação e confecção de alimentos, sendo o fator mais crítico na garantia da qualidade e no prolongamento da vida dos alimentos. Os abusos de temperatura têm um efeito especialmente adverso na facilitação da deterioração (PAIS, 2007). Segundo Jay (2005) a temperatura é de grande influência no crescimento dos micro-organismos, uma vez que todos os processos de crescimento são dependentes de reações químicas, as quais são afetadas pela temperatura.

Os micro-organismos podem ser definidos e classificados em quatro grupos gerais, de acordo com as temperaturas ideais para sua multiplicação, conforme a Tabela 2.

O intervalo de temperaturas que possibilita o crescimento de uma dada população microbiana é determinado de forma primordial pelos efeitos que a temperatura tem sobre as membranas e as enzimas dos micro-organismos que a compõem (GAR BUTT, 1997).

As temperaturas mínima e máxima para o crescimento de um micro-organismo dependem de fatores como o pH e a a_w . Se estes fatores relativos ao meio (pH e a_w) se encontrarem fora dos seus valores ótimos, a temperatura mínima aumentará e a temperatura máxima diminuirá, estreitando-se assim o intervalo de crescimento (GAR BUTT, 1997).

Tabela 2 – Definição e classificação dos micro-organismos de acordo com o crescimento nas diferentes faixas de temperatura

| Grupos | Temperatura de crescimento (°C) | | |
|----------------|---------------------------------|---------|---------|
| | Mínima | Ótima | Máxima |
| Psicrófilos | -5 a +5 | 12 a 15 | 15 a 20 |
| Mesófilos | 5 a 15 | 30 a 45 | 35 a 47 |
| Termófilos | 40 a 45 | 55 a 75 | 60 a 90 |
| Psicrotróficos | -5 a +5 | 25 a 30 | 30 a 35 |

Fonte: Dados obtidos e adaptados de Harrigan (1998) e Adams & Moss (1995).

Os micro-organismos psicrófilos e psicrotróficos multiplicam-se bem em alimentos refrigerados, sendo os principais agentes de deterioração de carnes, pescado, ovos, frangos e outros. Os mesófilos correspondem à grande maioria daqueles de importância em alimentos, inclusive a maior parte dos patógenos de interesse. Os fungos são capazes de crescer em faixa de temperatura mais ampla do que as bactérias. Muitos fungos são capazes de se multiplicar em alimentos refrigerados. As leveduras, por sua vez, não toleram bem as temperaturas altas, preferindo as faixas mesófilas e psicrófilas (FRANCO; LANDGRAF 2002).

O frio tem sido reconhecido como um excelente método de conservação de alimentos, além de ser seguro e confiável (MURMANN et al., 2004). O congelamento e a refrigeração fazem parte dos métodos normalmente empregados pela indústria alimentar para a conservação dos produtos.

Por congelamento, entende-se como manter o alimento a temperaturas que garantam o seu congelamento completo. Os alimentos começam a congelar no intervalo de -0,5°C a -3°C e o congelamento completo só pode, regra geral, ser mantido por armazenagem à temperaturas iguais ou inferiores à -18°C. Do ponto de vista tecnológico, a rapidez de congelamento é normalmente avaliada pelo tempo necessário para que toda a massa do alimento ultrapasse o intervalo térmico entre -1°C a -5°C, uma vez que é neste intervalo que congela 80% da sua água de constituição (DIAS, 2007).

A conversão de água em gelo aumenta a concentração de solutos dissolvidos na água não congelada e assim reduz a a_w do alimento. Deste modo, o congelamento tem um duplo efeito inibidor sobre os micro-organismos, afetando o crescimento devido à aplicação de temperaturas inferiores ao seu mínimo e à obtenção de baixas concentrações de água disponível (RIZVI, 2002).

2.5 Micro-organismos deteriorantes de carne e produtos cárneos conservados sob baixa temperatura

A microbiota das carcaças de frango e seus derivados são representados por micro-organismos provenientes principalmente das aves vivas e, outra parte, incorporada em qualquer uma das etapas do abate ou do processamento primário (FRANCO; LANDGRAF, 2002).

Segundo Jay (2005), as bactérias são as principais causadoras da deterioração de carne de frango, sendo o conteúdo intestinal a fonte primária desses micro-organismos. A maioria delas cresce na superfície, com os produtos de decomposição difundindo-se vagarosamente para o interior da carne. Embora a deterioração por bolores não seja muito comum neste tipo de carne, ela pode e realmente acontece em algumas condições. Quando os produtos apresentam um alto teor de água e são armazenados sob alta umidade eles tendem a se deteriorar pela ação de bactérias e leveduras, as quais apresentam um metabolismo mais rápido, levando vantagem competitiva. A deterioração por bolores ocorre mais facilmente quando a superfície do produto se torna seca ou quando este é armazenado sob condições que não favoreçam o crescimento de bactérias e leveduras, como em baixas temperaturas (LOWRY; GILL, 1984; SONJAK, 2011).

Em carnes processadas outros ingredientes serão adicionados no momento à elaboração do produto, os quais podem ser fontes de contaminação (KUEHN; MAILLARD, 1962). Durante as etapas de “*pré-dust*”, “*battering*” e empanamento dos empanados congelados de frango os derivados de cereais utilizados poderão ser fontes de esporos fúngicos, os quais, caso sobrevivam ao tratamento térmico empregado, apresentam potencial de deterioração do produto durante o período de estocagem. Etapas de resfriamento rápido por correntes de ar também seriam fontes potenciais de esporos fúngicos (SCHOLTE, 2002), muitos dos quais introduzidos no ambiente pelas próprias matérias-primas farináceas. Fungos são micro-organismos ubíquos associados com a deterioração e biodeterioração de uma grande quantidade de alimentos e rações. Vários gêneros como *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Alternaria* ou *Penicillium* estão envolvidos em diferentes tipos de deterioração de alimentos cárneos (PITT; HOCKING, 1997).

Carnes vermelhas armazenadas sob temperaturas de refrigeração geralmente deterioram como um resultado do crescimento bacteriano, sendo caracteristicamente manifestando odores

indesejáveis produzidos pela flora do desenvolvimento. Os bolores, que apresentam crescimento mais lento podem causar a deterioração, aparecendo como colônias visíveis, mas apenas quando as condições de armazenagem seletivamente limitam o desenvolvimento bacteriano. Normalmente, os bolores irão se desenvolver na carne em temperaturas próximas de 0°C, quando ocorre a desidratação da superfície que inibe o crescimento bacteriano (LOWRY; GILL, 1984). A degradação da carne também pode ocorrer quando ela é completamente ou parcialmente descongelada. Algumas espécies fúngicas deterioradoras podem crescer a temperaturas abaixo de -5 °C (LOWRY; GILL, 1984). É a temperatura de armazenamento que determinará se haverá crescimento rápido, lento, inativação ou até morte dos micro-organismos (JAY et al., 2005).

Após o congelamento, reduzidos são os micro-organismos capazes de se desenvolver nestas condições de baixas temperaturas. A inibição pode ocorrer por causa da redução na a_w que acompanha o congelamento. Todos os micro-organismos necessitam de água para o crescimento, mas alguns, referidos como xerotolerantes, podem suportar relativamente áridas condições. Bolores tendem a ser mais xerotolerantes do que bactérias ou leveduras, assim nestes produtos cárneos congelados existe a possibilidade de desenvolvimento de fungos filamentos psicrófilos e psicrotróficos (LOWRY; GILL, 1984). Durante o período de estocagem, haveria tempo suficiente para o desenvolvimento de espécies destes grupos (SONJAK, 2011).

Grande progresso tem sido feito no estudo de aspectos bacteriológicos de deterioração dos alimentos, mas o papel de fungos e leveduras não foi estudado com igual rigor. Os fungos psicrotróficos e seu papel na deterioração de alimentos congelados não têm sido um campo de grande número de pesquisas, embora definitivamente seja um problema em alimentos conservados em baixas temperaturas.

Para Ingrain e Uackey (1976), temperaturas mínimas de crescimento para fungos podem ocorrer de -10 a -12 °C. Mas alguns autores (LEISTNER; RODEL, 1981) defendem a opinião de que o crescimento é possível a temperaturas abaixo de -18°C.

Lowry e Gill, (1984) realizaram um estudo para avaliar a deterioração por fungos em carne bovina, para isso isolaram os principais bolores contaminantes de carne congelada e concluíram que as espécies conhecidas como “mancha negra” contaminantes eram *Cladosporium herbarum*, *Cladosporium cladosporioides*; *Penicillium hirsutum* e *Chrysosporium pannorum*. E para esses fungos a temperatura mínima de crescimento foi -5°C. Produtos mofados podem resultar de alimentos congelados em temperaturas de -10°C ou

acima (KUEHN; MAILLARD, 1962). Nestas condições o crescimento bacteriano encontra-se inibido pela baixa temperatura de armazenamento.

Até algumas décadas atrás os fungos presentes em alimentos eram tratados simplesmente como “bolores” e o reconhecimento de um determinado gênero ou espécie era geralmente considerado desnecessário (WILLIAMS et al., 2006). Esse fato pode ser mostrado por Thornton (1974), quando relatou as quatro formas de deterioração por fungos reconhecidas na indústria da carne. Estas eram conhecidas pelos termos descritivos, mancha negra (ou ponto negro), mancha branca (ou ponto branco), filamentos emaranhados e mofo azul-esverdeado.

A estrutura básica dos bolores é formada por filamentos denominados hifas, em geral de coloração transparente, que em conjunto formam o micélio, o qual é responsável pelo aspecto característico das colônias. Em geral as hifas se desenvolvem profundamente na massa dos alimentos, embora em geral as colônias somente sejam observadas visualmente na superfície. Isto se deve ao maior aporte de oxigênio que permite a formação de esporos fúngicos, sendo estes os responsáveis pela coloração da colônia (FRISVAD; SAMSON, 1991).

Entretanto, o que modificou substancialmente a atitude do homem frente à contaminação fúngica dos alimentos foi a descoberta de que muitos dos fungos contaminantes de alimentos eram capazes de produzir uma grande variedade de substâncias tóxicas, as micotoxinas (VAAMONDE et al., 2003).

As micotoxinas são metabólitos secundários naturais produzidos por fungos durante seu crescimento sobre os substratos nas diferentes etapas de produção de *commodities* agrícolas no campo sob uma ampla gama de condições climáticas e/ou durante o armazenamento dos alimentos. Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) estima-se que as micotoxinas afetam um quarto das culturas alimentares do mundo, incluindo muitos alimentos básicos e ração animal, bem como culturas comerciais, como o café de alto valor econômico (KRSKA, 2009).

Existem mais de 300 micotoxinas conhecidas, bastante diferentes em suas estruturas químicas e seus modos de ação no organismo animal. Em razão disso e dos seus efeitos sobre a saúde pública mundial, estudos tem dado bastante atenção para a detecção desses metabólitos tóxicos, uma vez que a presença dessas substâncias tem sido correlacionada a várias patologias humanas, apresentado o rim, o fígado e o sistema imune como os principais alvos dessas doenças (HUSSEIN; BRASEL, 2001; BEHM et al., 2012; MARAGOS, 2009).

Além disso, algumas dessas micotoxinas são carcinogênicas em animais de laboratórios e considera-se a possibilidade de terem efeitos correspondentes em humanos (IARC, 1993). Estas micotoxinas incluem aflatoxinas, ocratoxina A, fumonisinas e tricotecenos. Em função dos riscos e possíveis perigos associados à saúde, instituições e organizações nacionais e internacionais, como a Comissão Europeia, Organização Mundial de Saúde e a FAO tem adotado limites regulatórios em produtos alimentícios para as principais classes dessas micotoxinas e limites individuais para certos metabólitos tóxicos (BERG, 2003; KRŠKA, 2009). Além de coordenarem estudos visando a prevenção da contaminação por micotoxinas através da adoção de estratégias para a redução do desenvolvimento de fungos toxigênicos nas diferentes etapas de produção, processamento e estocagem dos alimentos.

Penicillium é um dos gêneros fúngicos mais difundidos e isolados de produtos alimentares, acarretando consideráveis perdas econômicas. Diversas espécies de *Penicillium* podem produzir micotoxinas que representam um risco potencial à saúde humana e de animais (PITT; HOCKING, 1997; SAMSON et al., 2004). Há inúmeras espécies de *Penicillium* também capazes de se desenvolver à temperaturas de refrigeração (Pitt, 2000). *Penicillium aurantiogriseum* cresce à temperaturas de refrigeração (5 – 8°C) e tem sido relatado isolado como deteriorante de massas frescas (VALLONE et al., 2001) e recheio de massa (ZARDETTO, 2004). Estudos conduzidos por Wyatt e Parish (1995), com suco de laranja relataram germinação de *Penicillium citrinum* depois de 51h a 10°C e em *P. italicum* foi observado crescimento micelial a 0°C. Estas características fisiológicas o tornam agentes preocupantes de deterioração em produtos conservados a baixas temperaturas.

Quanto às características fisiológicas, verifica-se que os fungos filamentosos são menos exigentes que as leveduras e que as bactérias em relação à umidade, pH, temperatura e nutrientes, revelando notável capacidade de adaptação e crescimento sob condições extremamente variáveis (JAY, 2005; BORGES et al., 2002; LEITÃO et al., 1988; PITT; HOCKING, 2009.)

Muitos modelos matemáticos têm sido desenvolvidos para a predição a influência dos fatores temperatura e a_w e suas interações sobre o crescimento de micro-organismos que degradam alimentos processados (MCMEEKIN et al., 2002), mas a modelagem preditiva do crescimento de fungos filamentosos não recebeu a mesma atenção que a modelagem do crescimento bacteriano. Isto pode ser devido a inerente complexidade de quantificação do crescimento dos fungos (GIBSON; HOCKING, 1997).

De acordo com Adams e Moss (2000) muitos parâmetros podem afetar o destino da estrutura da comunidade microbiana dos alimentos, pois eles determinam que grupo de micro-

organismo permanecerá dormente, irá proliferar ou morrerá. Os efeitos combinados desses parâmetros, mas particularmente a_w , pH e temperatura, desempenham um importante papel na gênese das associações dos micro-organismos. Todavia, o efeito dos vários fatores intrínsecos e extrínsecos não podem ser avaliados de forma independente no crescimento dos micro-organismos, mas sim de suas interações (SINIGAGLIA et al., 1998).

Segundo Samson et al (2004), os fatores que determinam as culturas fúngicas que se desenvolverão nos produtos cárneos são a qualidade da matéria-prima, a manutenção da cadeia de frios, as condições sanitárias das instalações (equipamentos), as características físicas e bioquímicas do produto e as práticas de gestão no processamento. Estes fatores não somente se restringem ao processo de produção, mas também envolvem a responsabilidade da cadeia de comercialização de alimentos perecíveis de origem animal.

Raros são os estudos sobre a deterioração fúngica de alimentos congelados e devido à relevância do tema, este estudo propôs-se a investigar as principais espécies de fungos deteriorantes de empanados congelados de frango, sua capacidade de produzir metabólitos tóxicos e a habilidade das espécies prevalentes em se desenvolver sob condições de baixas temperaturas. Complementarmente, determinou-se a temperatura presente em balcões de supermercados onde estes produtos são expostos à venda, em diferentes supermercados de Santa Maria – RS, de modo a permitir inferências sobre a possibilidade de ocorrência de deterioração destes produtos em condições reais de armazenagem.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Determinar as principais espécies de fungos filamentosos deteriorantes de empanados congelados de frango e verificar a influência da temperatura de armazenagem sobre seu desenvolvimento nestes produtos.

3.2 Objetivos específicos

- Isolar e identificar fungos filamentosos envolvidos na deterioração de empanados congelados de frango visivelmente mofados e oriundos de reclamações de clientes;
- Verificar os principais metabólitos secundários produzidos pelas espécies prevalentes em empanados congelados de frango deteriorados;
- Estudar a influência da temperatura de armazenamento sobre o crescimento das principais espécies envolvidas na deterioração de empanados congelados de frango;
- Observar a temperatura de armazenamento de empanados congelados de frango em supermercados de médio e grande porte na cidade de Santa Maria-RS;

4 MANUSCRITO I

Fungos deteriorantes de empanados congelados de frango

Fungal spoilage in frozen chicken breaded

Autores: Fernanda Saccomori¹, Évelin Francine Wigmann¹, Angélica Bernardi Olivier¹, Jens Frisvad², 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.

²Technical University of Denmark, Department of Biotechnology, Building 221- DK-2800, Lyngby, Dinamarca.

Resumo

O consumo de produtos empanados de frango tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas, por serem produtos práticos e saborosos, capazes de satisfazer as necessidades dos consumidores. Porém, ao mesmo tempo em que atende às demandas energéticas e nutricionais dos humanos, estes produtos também proporcionam um meio favorável à proliferação de micro-organismos patogênicos e deteriorantes. A contaminação microbiológica em empanados vem com a matéria-prima ou se produz durante a manipulação e operações de processamento. Em etapas posteriores uma parte destes agentes pode se desenvolver e modificar as propriedades sensoriais e nutricionais do alimento, além de representar um risco para a saúde dos consumidores. Por serem ricos em nutrientes e apresentarem atividade de água alta, os empanados congelados de frango são produtos suscetíveis a rápida deterioração microbiana, e a forma mais eficiente de prolongar sua vida-útil é através do congelamento. Devido a diferenças fisiológicas e metabólicas, algumas espécies fúngicas são capazes de se desenvolver em produtos empanados congelados. O objetivo deste estudo foi de identificar as espécies de fungos filamentosos envolvidas com a deterioração de empanados congelados de frango. Para tanto, foram analisadas 7 amostras de empanados de frango congelados que apresentaram crescimento visível de fungos em sua superfície. As espécies predominantes foram *Penicillium glabrum*, *Penicillium polonicum*, *Penicillium manginii* e *Penicillium crustosum*. A análise do perfil de metabólitos secundários produzidos por alguns isolados revelou capacidade de síntese de micotoxinas como ácido ciclopiazônico, citroviridina, roquefortina C, penitrem A e verrucosidina. Desta maneira cabe ressaltar que além da deterioração provocada no produto e das correspondentes perdas econômicas, o crescimento de fungos em alimentos implica no problema de segurança alimentar devido ao risco de exposição do consumidor às micotoxinas.

Palavras-chave: bolores, empanados cárneos congelados, deterioração, fungos psicrotróficos e *Penicillium*.

4.1 Introdução

Segundo dados do relatório anual da União Brasileira de Avicultura (UBABEF), a produção de carne de frango chegou a 12,645 milhões de toneladas em 2012. O Brasil manteve a posição de maior exportador mundial e de terceiro maior produtor de carne de frango, atrás dos Estados Unidos e da China. Ao que se refere à comercialização, as exportações de frango industrializado se mantiveram estáveis, em 180 mil toneladas (+0,3% em relação ao ano de 2011) (UBABEF, 2013). A indústria avícola tem apostado na diversificação de produtos como uma alternativa para elevar o consumo de carne de aves pela população e ao mesmo tempo agregar valor ao produto, aumentando assim o retorno financeiro (Silva, 2004). Assim, um segmento que expandiu consideravelmente nos últimos anos foi o dos produtos de conveniência dentre os quais se destacam os empanados congelados de frango.

Originalmente, os empanados congelados de frango eram elaborados com músculo de peito de frango, envolvido por uma massa, empanado e depois frito. A utilização de matéria-prima composta por recortes cárneos, pele e carne mecanicamente separada por algumas indústrias surgiu posteriormente no mercado, para dar vazão aos recortes gerados no processamento (desossa) das carcaças, oriundos da crescente procura dos consumidores por cortes de frango em detrimento da carcaça inteira. Além disso, as especiarias utilizadas também variaram, e dependem ainda do mercado consumidor (Barbut, 2002). Atualmente existem no mercado produtos com diferentes composições cárneas. Outros fatores determinantes para a expansão do segmento, como o aumento da população urbana e a inclusão da mulher no mercado de trabalho fizeram com que aumentasse a demanda por produtos alimentícios de fácil preparo. Neste cenário foram desenvolvidos os produtos reestruturados empanados, proporcionando melhor aproveitamento dos músculos que seriam subutilizados ou mesmo descartados, além de serem fáceis de preparar e servir, por serem empanados e cozidos (Owens, 2001).

Além dos micro-organismos oriundos da matéria-prima (tanto dos cortes cárneos quanto dos amidos, farinhas de empanamento e condimentos), sabe-se que durante as operações de processamento e manipulação este alimento pode ser contaminado por uma vasta gama de micro-organismos. Posteriormente, durante as etapas de distribuição e armazenamento, sobretudo se houverem condições de abuso da temperatura de conservação, uma parcela destes micro-organismos poderá se desenvolver e causar depleção no valor nutritivo do produto (Dainty, 1996; Huis in't veld, 1996), alteração nas características

sensoriais, além de representarem um risco para desencadear casos de doenças de origem alimentar (Currie et al., 2005).

Os produtos que apresentam um alto teor de água e são armazenados sob alta umidade normalmente tendem a se deteriorar pela ação de bactérias e leveduras, as quais apresentam um metabolismo mais rápido e a consequente vantagem competitiva. Enquanto que a deterioração por fungos filamentosos ocorre mais facilmente quando a superfície do produto se torna seca ou quando este é armazenado sob baixas temperaturas, o que limita o crescimento de bactérias e leveduras, (Lowry & Gill, 1984; Sonjak, 2011).

O desenvolvimento de fungos em alimentos congelados é um problema presente na indústria de alimentos, verificado principalmente devido à longa vida de prateleira destes produtos conferida pela armazenagem em temperaturas de congelamento, geralmente entre 120 e 180 dias no caso dos empanados de frango. A observação de colônias fúngicas em gêneros alimentícios provoca a rejeição do produto por parte dos consumidores e consequentemente prejuízos econômicos às empresas envolvidas (Kotler, 2003). Além disso, pode colocar em risco a saúde do consumidor em função da ingestão dos metabólitos secundários tóxicos produzidos por certas espécies fúngicas, as micotoxinas.

Apesar da importância do tema, raríssimos são os estudos sobre deterioração fúngica de empanados cárneos congelados (Hegazy & Agami, 2011).

O presente trabalho teve por objetivo avaliar as espécies fúngicas prevalentes em empanados congelados de frango que apresentaram desenvolvimento de colônias visíveis de fungos em sua superfície durante a armazenagem e comercialização em supermercados e verificar os principais metabólitos secundários produzidos pelas espécies prevalentes.

4.2 Materiais e Métodos

Foram analisadas sete amostras comerciais de empanados congelados de frango processados por diferentes indústrias do estado de Santa Catarina, oriundos da devolução do produto por clientes pelo fato de apresentarem deterioração visível por fungos filamentosos em sua superfície, dentro do período de validade.

4.2.1 Determinação da Contagem Total de Colônias Fúngicas

As amostras foram descongeladas e processadas de maneira asséptica. Foram pesadas porções de 25 gramas do produto, seguindo de adição de 225 mL de água peptonada a 0,1% e homogeneização em aparelho *Bagmixer* durante 1 minuto. Foram realizadas diluições seriadas seguidas de plaqueamento em dois meios microbiológicos: Ágar Batata Glicosado (PDA) e Ágar Dicloran Glicerol 18 % (DG 18%), ambos suplementados com cloranfenicol, incubando a 25 °C por 7 dias e à 5°C por 21 dias, em virtude do aumento do tempo de geração dos micro-organismos à baixas temperaturas. Decorrido o período de incubação, os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por grama de produto (UFC/g).

4.2.2 Identificação de fungos filamentosos

Os fungos foram isolados 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). Já a identificação do gênero *Penicillium* foi realizada conforme Pitt (2000), Pitt (1979) e Samson & Frisvad (2004).

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 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 determinados os diâmetros médios das 3 colônias com régua e observadas as características macro e microscópicas em cada meio de cultivo, os quais juntamente com o perfil de metabólitos secundários produzidos foram utilizados para a identificação das espécies.

4.2.3 Determinação dos metabólitos secundários produzidos

Foram avaliados nove isolados de *Penicillium* de maior ocorrência nos empanados congelados de frango deteriorados. Selecionou-se um isolado da espécie predominante em cada amostra e outras duas espécies que embora não foram as predominantes, também apresentaram alta contagem na amostra. Estes isolados foram enviados para o *Center for Microbial Biotechnology*, da *Technical University of Denmark* (CMB-DTU), onde foi determinado o perfil de metabólitos secundários produzidos por cada espécie.

No CMB-DTU se consolidaram os estudos sobre a utilização de metabólitos secundários fúngicos com fins taxonômicos. As metodologias para análise de perfil de metabólitos secundários se encontram implantadas naquele centro desde longa data (Filtenborg et al., 1983) e na forma como foi utilizada para este trabalho foi relatada por Smedsgaard (1997) e será descrita brevemente.

Os isolados foram inoculados em 3 pontos nos meios de Agar Czapeck Extrato de Levedura (CYA) e Agar Extrato de Levedura e Sacarose (YESA), e cultivados durante 7 dias à 25°C. Decorrido o período de incubação, 3 *plugs* de aproximadamente 3mm foram cortados das placas, transferidos para um tubo de 1,5mL e submetidos ao procedimento de extração.

A extração dos metabólitos foi realizada pela adição de 800µL de uma solução de acetato de etila:diclorometano:metanol (3:2:1, v/v/v) com 1% de ácido fórmico e submetendo o conjunto à ultrassonicação durante 55min. O produto eluído foi transferido para um frasco novo e os solventes foram evaporados *overnight* em capela de fluxo laminar. Anterior ao momento da detecção, o extrato seco foi ressuscitado em 500µL de metanol e filtrado através de filtro Milex PFTE (politetrafluoroetileno) de 0,45µm. Os metabólitos foram examinados através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), conforme descrito por Smedsgaard (1997).

4.2.3.1 Análise e identificação dos metabólitos

Um volume de 3µL do extrato foi injetado em um cromatógrafo HPLC Agilent 1100 (Waldbron, Alemanha), equipado com detectores de arranjo de di-iodos e fluorescência. Para separação dos compostos foi utilizada uma coluna C18 Luna (II) (50mm×2 mm).

Um gradiente linear de água contendo 0,05% de ácido trifluoracético (TFA) e

acetonitrila contendo 0,05% de TFA foi utilizado como fase móvel, partindo de 15% de acetonitrila e alcançando 100% de acetonitrila em 20min, sendo que a proporção do gradiente final era mantida durante 5 min antes de retornar as condições iniciais.

O detector de arranjo de diodos cobriu a faixa de um espectro UV entre 200-600nm a cada 0,7 segundos. Os cromatogramas à 210 e 280nm foram utilizados para a detecção no detector de diodos e no de fluorescência foi utilizado um comprimento de onda de 230nm para excitação e 450nm para emissão.

Os metabólitos encontrados em cada isolado foram identificados com base nos índices de retenção relativos às alquifenonas e os espectros dos compostos foram comparados com banco de dados interno.

4.3 Resultados

Na tabela 1 pode-se observar os resultados da contagem total de fungos filamentosos nas sete amostras de empanados congelados de frango em dois diferentes meios (PDA e DG 18%). As contagens em temperatura de 25 °C variaram entre 10^1 e 10^8 UFC/g, apresentando valores semelhantes nos dois meios de cultura testados. A amostra com contagem de 10^1 UFC/g, apresentou também crescimento de leveduras. Por outro lado o meio de PDA mostrou-se mais adequado para a detecção dos fungos quando considerado a temperatura de incubação de 5°C.

Estão reportados também os fungos filamentosos (tabela 1) que foram isolados a partir das amostras de empanados congelados de frango. Um total de 4 gêneros fúngicos estavam presentes nas diluições consideradas, sendo o gênero *Penicillium* o mais frequentemente isolado, seguido pelo gênero *Aspergillus*.

Na tabela 2 estão reportados os isolados das espécies predominantes nas amostras deterioradas com seus respectivos metabólitos produzidos.

4.4 Discussão

A predominância dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* também foi observada em estudo conduzido por Hegazy & Agami (2011) em empanados cárneos congelados adquiridos em supermercados no Egito, com predominância de *Aspergillus* spp. Ao contrário das amostras analisadas em nosso estudo, as reportadas por Hegazy & Agami (2011) não estavam deterioradas. Sabe-se que o gênero *Penicillium* apresenta um maior número de espécies capazes de se desenvolver em temperaturas abaixo de 5°C (Pitt & Hocking, 2009), assim, embora presente, a população de *Aspergillus* sp. sofre pouca alteração enquanto que a de *Penicillium* sp. se eleva, provocando a deterioração do produto.

Sonjak et al., (2011), em estudo micológico de produtos cárneos curados, encontraram isolados de *Penicillium* como gênero dominante. Porém, para esses produtos pode ser esperado, já que muitas espécies deste gênero são psicrófilas (Frisvad & Samson, 1991). *Aspergillus versicolor* e *Cladosporium* spp., assim como nos nossos resultados também foram identificados nesses produtos cárneos.

Estudos anteriores realizados por Samson et al., (2002) afirmam que espécies de *Penicillium* são frequentemente isolados a partir de substratos cárneos deteriorados, incluindo produtos processados. Em geral, as espécies de *Penicillium* habitam o solo, porém por produzirem conídios são propagados pelo ar, logo, se espalham com facilidade, podendo instalar-se em reservatórios como o ser humano, poeira, matérias-primas, esgotos e superfícies de equipamentos e manipulação (Scholte et al., 2002). Em destaque, na análise dos empanados ocorreu a predominância de quatro espécies: *Penicillium glabrum*, *Penicillium polonicum*, *Penicillium manginii* e *Penicillium crustosum*.

De acordo com Samson & Frisvad (2004) pode haver uma tendência de *P. polonicum* crescer no milho e no trigo em climas mais quentes. *P. polonicum* também pode contaminar produtos como carne seca, e ser fonte de contaminação em farinha de trigo. Assim, uma das hipóteses da contaminação em empanados congelados de frango pode ser oriunda dos ingredientes usados no “pre-dusting”, “batter” ou no empanamento, que incluem farinha de trigo, milho e cereais (Barbut, 2002).

Segundo Samson (2004), os fatores que determinam as culturas fúngicas que se desenvolverão nos produtos cárneos são a qualidade da matéria-prima, a manutenção da cadeia de frios, as condições sanitárias das instalações (equipamentos), as características físicas e bioquímicas do produto e as práticas de gestão no processamento. Acredita-se que os

ingredientes adicionados no momento da elaboração dos empanados congelados de frango possam ser fontes de contaminação. Durante as etapas de pré-enfarinhamento, adição do líquido de empanamento e farinha de cobertura são colocados derivados de cereais, os quais poderão conter esporos fúngicos com potencial de deterioração do produto durante o período de estocagem (Barbut, 2002).

No caso dos empanados congelados ocorrem as etapas de cozimento e de pré-fritura, que reduzem a carga microbiana oriunda principalmente da matéria-prima e manipulação. O óleo utilizado apresenta a temperatura de 180 °C por 20-35 segundos (Ávila, 2006). No entanto não foram encontrados estudos relatando a temperatura alcançada no interior do produto, visto que mesmo *Salmonella* sp., micro-organismo eliminado de empanados à temperatura de 71°C (Bucher, 2008), foi reportado e isolado 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 surto de infecção alimentar por *Salmonella* sp. (Currie, 2005). Este fato demonstra que mesmo micro-organismos sem estruturas de resistência térmica (como esporos) eventualmente podem sobreviver a esta etapa de processamento.

Por outro lado, seria esperado que a barreira proporcionada pela estocagem do produto em temperaturas de congelamento fosse suficiente para controlar o desenvolvimento microbiano (Patsias et al., 2006). Porém, a existência de fungos psicrófilos/psicrotróficos faz com que produtos congelados, muitas vezes armazenados abaixo de -10°C, deixem de ser microbiologicamente estáveis (Pitt & Hocking, 2009).

O armazenamento em temperatura adequada de congelamento irá preservar as qualidades do produto cárneo, mas não irá servir como uma garantia do mesmo, visto que os micro-organismos não são destruídos, enquanto que as temperaturas acima do recomendado irão agravar os problemas de qualidade se houver alta contagem inicial de micro-organismos (Nortjé et al., 1989), devido a possibilidade de multiplicação de espécies psicrófilas e psicrotróficas.

Para ilustrar a magnitude do problema de abuso de temperatura, pesquisas realizadas em países no Sul da Europa constataram que 30% dos alimentos refrigerados foram mantidos em temperatura acima de 10 °C em refrigeradores domésticos e à varejo. E até mesmo no Norte da Europa, 5% apresentaram temperatura acima de 13°C na venda à varejo e 21% com temperatura superando os 10 °C nos refrigeradores domésticos (Kennedy et al., 2005).

Além do armazenamento inadequado, operações anteriores como o transporte dos produtos podem colocar em risco a integridade do mesmo. Se a cadeia de frio não for

mantida, carnes e produtos cárneos congelados necessitam de temperatura especial de conservação. Deste modo, as temperaturas para transporte destes alimentos são de -18 a -15°C (Silva Jr, 2002).

Outros estudos, conduzidos por Kuehn & Maillard (1962) reportaram as espécies fúngicas contaminantes de amostras de tortas de frutas congeladas. Assim como nos nossos resultados, foram encontradas, entre outras, as espécies *Cladosporium* sp, *Aspergillus versicolor*, *Penicillium funiculosum*, além de outras 31 espécies de *Penicillium*. Foram encontrados a 0 ° C, os fungos *Aureobasidium pullulans*, *Penicillium* spp., uma espécie desconhecida do gênero *Sphaeropsidaceous* e *Mucor ramannianus*. A 5°C foi encontrado um total de 25 colônias de fungos do gênero *Penicillium*, entre outras espécies.

Além das alterações sensoriais, sobretudo na aparência, provocada pelo desenvolvimento de fungos filamentosos na superfície de empanados congelados de frango, deve ser ressaltado que estes micro-organismos podem representar um perigo à saúde dos consumidores, se forem espécies patogênicas ou produtoras de micotoxinas (Monaci et al., 2005; Toscani et al., 2007; Iacumin et al., 2009). Estas toxinas podem ser sintetizadas por diversas espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* (Frisvad & Thrane, 2002; Frisvad et al., 2004).

Com relação ao perigo toxicológico, de acordo com Frisvad & Thrane (2002), a maioria das espécies identificadas neste estudo são incapazes de produzir metabólitos tóxicos conhecidos. Porém, sabe-se que *P. polonicum* é produtor de micotoxinas como: Penitrem A, ácido ciclopiazônico, ácido ciclopáldico e ácido ciclopólico. Algumas toxinas, ainda apenas parcialmente caracterizados como glicopeptídeos nefrotóxicos também tem sido isoladas desta espécie (Samson & Frisvad, 2004) e podem estar envolvidos na nefropatia endêmica dos Bálcãs (Frisvad & Thrane, 2002). A potente neurotoxina verrucosidina, é relatada como sendo produzida também por *P. polonicum*. Dessa forma, é esperado que cereais e produtos cárneos contaminados com este fungo, apresentem esta toxina (Samson & Frisvad, 2004). No empanado congelado de frango por ser um produto cárneo e levar em sua composição alguns tipos de cereais, pode ser esperado que com a elevação da temperatura os fungos encontrem condições para a produção destas micotoxinas.

O ácido penicílico tem sido encontrado em *P. polonicum*. Isto aumenta a nefrotoxicidade da ocratoxina A, como tem sido mostrado em experimentos com suínos (Stoev et al., 2001). Todos os membros da série *Viridicata*, como *P. aurantiogriseum*, *P. tricolor* e *P. viridicatum* podem produzir ácido penicílico e ocorrem em cereais juntamente com *P. verrucosum*, produtor de ocratoxina A, assim, muitas vezes a ocratoxina A e ácido penicílico ocorrem concomitantemente (Samson & Frisvad, 2004).

Em nosso estudo, a determinação dos metabólitos secundários produzidos pelos isolados, revelou a presença de micotoxinas como ácido ciclopiazônico, verrucosidina, citreoveridina, penitrem A e roquefortina C.

A neurotoxina verrucosidina mostra-se como a responsável por uma doença neurológica em bovinos (Wilson et al., 1981) e demonstrou o mesmo efeito em ensaios experimentais em ratos (Fink Gremmels et al., 1991). A outra neurotoxina, citreoviridina, produzida por várias espécies de *Penicillium*, é a toxina responsável pela doença de Keshan, com maior prevalência na China e pela doença cardíaca aguda, o beribéri, com várias descrições no Japão (Hou et al, 2006;. Nishie et al., 1988, Ueno, 1974). Esta última doença é caracterizada por paralisia ascendente, convulsões e parada respiratória. Além disso, esta micotoxina mostra-se como um potente agente teratogênico em ratos (Morrissey & Vesonder, 1986).

Já o ácido ciclopiazônico produz alterações degenerativas e necrose no fígado, pâncreas, baço, rim, glândulas salivares, miocárdio e músculo esquelético em ratos (Morrissey & Norred, 1985). Também tem sido associado com quadros de intoxicação humana (Rao & Husain, 1965), como toxicoses de milho mofado, conhecida como "envenenamento por Kodua" (Bhide, 1962). Esta doença não letal é caracterizada em humanos por fadiga, tremores, fala imperceptível e náuseas (Rao & Husain, 1985). Além disso, o ácido cilopiazônico é conhecido por sua ação imunossupressora mesmo em baixas dosagens (Pitt, 2000).

As micotoxinas neurotóxicas Penitrem A e Roquefortina C são substâncias consideradas tremorgênicas por induzirem tremores musculares, ataxia e convulsões (Boysen et al., 2002). Vários estudos reportaram casos de intoxicação por estes metabólitos tóxicos em cães (Boysen et al., 2002; Walter, 2002; Young et al., 2003). Os sinais clínicos desses animais eram confundidos com envenenamento por estricnina ou intoxicação aguda por alguma substância. Porém, a análise do conteúdo intestinal revelou a presença destas micotoxinas associadas com a ingestão de alimentos mofados como farinha a base de cereais, macarrão e derivados lácteos.

Frente a isso, percebe-se o perigo que os consumidores podem estar expostos. Assim, mostra-se necessário o desenvolvimento de mais estudos para se verificar as condições em que estas espécies se desenvolvem, bem como o momento no qual poderiam produzir estas micotoxinas em empanados cárneos congelados. Pois é de conhecimento que ocorre um aumento gradativo da população fúngica, metabolicamente ativa, até que se ocorra a formação de colônias visíveis na superfície dos alimentos.

4.5 Referências bibliográficas

- Ávila, C. P. 2006. Formados In: Olivo, R. (Ed.) O mundo do frango: cadeia produtiva da carne de frango. Criciúma, 48p.
- Baghdadi, H. H., El Tawila, M. M. 1990. Aflatoxin content of some species collected from local markets in Alexandria. The Bulletin of the High Institute of Public Health 20,1003-1009.
- Barbut, S. 2002. Poultry Products Processing - An Industry Guide. CRC Press, Boca Raton, FL, 550p.
- Bhide, N. K. 1962. Pharmacological study and fractionation of *Paspalum scrobiculatum* extract British. Journal of pharmacology and chemotherapy 18, 7-18.
- Boysen, S.R., Rozanski, E. A., Chan, D. L., Grobe, T. L., Fallon, M. J., Rush, J.E. 2002. Tremorgenic mycotoxicosis in four dogs from a single household. Journal of the American Veterinary Medical Association 221, 1441-1444.
- 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.
- Currie, A., Macdougall, L., Aramini, J., Gaulin, C., Ahmed, R., Isaacs, S. 2005. Frozen chicken nuggets and strips and eggs are leading risk factors for *Salmonella* Heidelberg infections in Canada. Epidemiology and Infection 133, 809 – 816.
- Dainty, R. H. 1996. Chemical/biochemical detection of spoilage. International Journal of Food Microbiology 33, 19-33.
- Filtenborg, O., Frisvald, J.C., & Svendensen, J.A. 1983. Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. Applied and Environmental Microbiology 45,581-585.
- J. Fink-Gremmels, J. Henning, A., Leistner, A. 1991. Quantitative determination of verrucosidin producing *Penicillium aurantiogriseum*. Microbiologie, aliments, nutrition = Microbiology, foods and feeds, nutrition 5,155–160.
- Frisvad, J.C.; Samson, R.A. 1991. Filamentous fungi in foods and feeds: ecology, spoilage and mycotoxin production. In Arora, D. K.; Mukerji, K. G.; Marth, E. H. (Eds.), Handbook of applied mycology, Foods and Feeds, New York: Marcel Dekker, vol. 3, pp. 31-68.
- Frisvad, J.C., Thrane, U., Mycotoxin production by common filamentous fungi. In: Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C., Filtenborg, O. (Eds.), Introduction to Food- and Airborne Fungi, sixth ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, 2002.

- Hegazy, N. F., Agam Y, E. M. 2011. Quality and safety evaluation of marketed breaded chicken and production of a high quality nuggets product. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 5, 661-672.
- Hou H, Li Q, and Qi Y. 2006. Effect on relevant of *Penicillium citreoviridin* toxin production. *Chinese Journal of Public Health* 22, 811–812.
- Huisin't Veld, J. H. J. 1996. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *International Journal of Food Microbiology* 33, 1-18.
- 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.
- Kennedy, J., Jackson, V., Blair, I. S., McDowell, D. A., Cowan, C., Bolton, D. J. 2005. Food safety knowledge of consumers and the microbiological and temperature status of their refrigerators. *Journal of Food Protection* 10, 1421-1430.
- Klich, M.A.; Pitt, J.I.,A. 1988. *Laboratory Guide to Common Aspergillus species and their teleomorphs*. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Sydney. 115p.
- Kotler, P. 2003. *Marketing de A a Z: 80 conceitos que todo profissional precisa saber*. second. ed. Rio de Janeiro: Campus.
- Kuehn, H., Maillard, G. F. 1962. Psychrophilic and Mesophilic Fungi in Fruit-Filled Pastries. *Applied Microbiology* 10, 354-358.
- Lowry, P.D., Gill, C.O. 1984. Development of a Yeast Microflora on Frozen Lamb stored at -5°C. *Journal of Food Protection* 47, 309-311.
- Monaci, L., Palmisano, F., Matrella, R., Tantillo, G. 2005. Determination of ochratoxin A at part-per-trillion level in Italian salami by immunoaffinity clean-up and highperformance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography* 1090, 184–187.
- Morrissey, R.E., Norred, W. P., Cole, R. J. Dorner, J. D. 1985. Toxicity of the mycotoxin, cyclopiazonic acid, to Sprague-Dawley rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 77, 94 – 107.
- Morrissey, R. E., Vesonder, R. F. 1986. Teratogenic potential of the mycotoxin, citreoviridin, in rats. *Food and Chemical Toxicology* 24, 1315-1320.
- Nishie K, Cole RJ, and Dorner JW. 1988. Toxicity of citreoviridin. *Research Communications in Chemical Pathology Pharmacology* 59, 31–52.
- Nortjé, G. L., Nel, L., Jordaan, E., Naudé, R. T. 1989. A microbiological survey of fresh meat in the supermarket trade. *Meat Science* 25, 99-112.

- Owens, C. M. 2001. Coated Poultry Products. In: Sams, A. R. (Ed.), Poultry Meat Processing, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 227-241.
- Patsias, A., Chouliara, I., Badeka, A., Savvaidis I.N., Kontominas, M.G. 2006. Shelflife of a chilled precooked chicken product stored in air and under modified atmospheres: microbiological, chemical, sensory attributes. *Food Microbiology* 23, 423–429.
- Pitt, J. I. 1979. The genus *Penicillium* and its teleomorphick states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. London: Academic Press, 634p.
- Pitt, J.I., 2000. A Laboratory Guide to Common *Penicillium* Species. Sydney: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, 197p.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D. 2009. Fungi and Food Spoilage. Blackie Academic & Professional: London.
- Rao, L. B., Husain, A. 1985. Presence of cyclopiazonic acid in kodo millet (*Paspalum scrobiculatum*) causing “Kodua poisoning” in man and its production by associated fungi. *Mycopathologia* 89, 177 – 180.
- Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C., Filtenborg, O. 2002. Introduction to Food- and Airborne Fungi, sixth ed. Utrecht, Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Samson, R. A., Frisvad, J. C. 2004. *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes, mycotoxins and other extrolites. *Studies in Mycology* 49, 1-251.
- 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.
- Scholte, R.P.M., Samson, R.A., Dijksterhuis, J. 2002. Spoilage fungi in the industrial processing of food. In: Samsons, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C., Filtenborg, O. (Eds.), Introduction to Food- and Airborne Fungi, sixth ed. Centaalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht.
- Sillker, J. H., Elliott, R. B., Bairdparker, A. C. 1980. Microbial ecology of food. first ed. Vol. 2, New York, London, Toronto, San Francisco: Academic press.
- Silva junior, Ê. A. 2002. Manual de controle higiênico sanitário em alimentos. São Paulo: Livraria Varela.
- Silva, L. P. 2004. Avaliação do Prazo de Vida Comercial de Lingüiça de Frango Preparada com Diferentes Concentrações de Polifosfato. Dissertação de Mestrado apresentado ao curso de Medicina Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal Fluminense.
- Smedsgaard, J. 1997. Micro-scale extraction procedure for standardized screening of fungal metabolite production in cultures. *Journal of Chromatography A* 760, 264–270

- Sonjak, S., Ličen, M., Frisvad, J. C., Gunde-Cimerman, N. 2011. The mycobiota of three dry-cured meat products from Slovenia. *Food Microbiology* 28, 373-376.
- Sorensen L. M., Jacobsen, T., Nielsen, P. V., Frisvad, J. C., Koch, A. G. 2008.. Mycobiota in the processing areas of two different meat products. *International Journal of Food Microbiology* 124, 58–64.
- Splittstoesser, D. F. 1987. Fruits and fruit products. In Beuchat L. R.(Ed.) *Food and beverage mycology*. Second ed.. New York, AVI/Van Nostrand Reinhold. pp. 101-128
- Stoev, S. D., Paskalev, M., MacDonald, S., Mantle, P. G. 2001. Experimental one year ochratoxin A toxicosis in pigs. *Experimental and Toxicologic Pathology* 53 481–487.
- Toscani, T., Moseriti, A., Dossena, A., Dall'asta, C., Simoncini, N., Virgili, R. 2007 Determination of ochratoxin A in dry-cured meat products by a HPLC-FLD quantitative method. *Journal of Chromatography* 855, 242–248.
- Ueno, Y. 1974. Citreoviridin from *Penicillium citreo-viride* Biourge. In *Mycotoxins*. Edited by J. F. H. Purchasc. Elsevier, New York. 283p.
- União Brasileira de Avicultura – UBABEF. Relatório Anual, 2013. Disponível em: http://www.abef.com.br/ubabef/publicacoes_relatoriosanuais.php. Acesso em novembro de 2013.
- Walter, S. L. 2002. Acute penitrem A and roquefortine poisoning in a dog. *The Canadian Veterinary Journal* 43, 372–374.
- Wilson, B. J., Byerly, C. S., Burka, L.T. 1981. Neurologic disease of fungal origin in three herds of cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 179, 480–481.
- Wyatt, M. K.; Parish, M. E. 1995. Spore germination of citrus juice-related fungi at low temperatures. *Food Microbiology* 12, 237-243.
- Young, K. L., Villar, D., Carson, T. L., Ierman, P. M., Moore, R. A., Bottoff, M. R. 2003. Tremorgenic mycotoxin intoxication with penitrem A and roquefortine in two dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 222, 52-53.

Tabela 1 – Resultado da contagem total e identificação dos fungos filamentosos isolados em amostras de empanados congelados de frango visualmente mofadas.

| Amostra | MEIOS | | | | ESPÉCIES PRESENTES | |
|---------|-------------|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|--|
| | Temperatura | PDA (UFC/g) | | DG 18% (UFC/g) | | |
| | | 5°C | 25°C | 5°C | | 25°C |
| A | | 8.0x10 ⁷ | 3.8x10 ⁶ | - | 2.4x10 ⁶ | <i>P. corylophilum</i> , <i>P. implicatum</i> , <i>P. manginii</i> * |
| B | | 5.6x10 ⁸ | 2.6x10 ⁶ | - | 4.4x10 ⁶ | <i>P. commune</i> , <i>P. glabrum</i> * |
| C | | 1.2x10 ⁸ | 7.2x10 ⁸ | - | 5.0x10 ⁷ | <i>P. glabrum</i> , <i>P. polonicum</i> * |
| D | | 1.0x10 ⁵ | 1.47x10 ⁵ | 1.6x10 ⁴ | 1.64x10 ⁵ | <i>A. ustus</i> , <i>Cladosporium</i> sp., <i>P. glabrum</i> , <i>P. polonicum</i> * |
| E | | 2.0x10 ¹ | 1.0x10 ¹ | - | 5.0x10 ¹ | <i>A. fumigatus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>P. crustosum</i> *, <i>P. fellutanum</i> |
| F | | 1.0x10 ⁶ | 2.3x10 ⁶ | - | 2.0x10 ⁶ | <i>P. chermesinum</i> , <i>P. funiculosum</i> , <i>P. glabrum</i> *, <i>P. solitum</i> |
| G | | 2.0x10 ⁴ | 2.6x10 ⁵ | 2x10 ⁴ | 2.3x10 ⁵ | <i>P. glabrum</i> * |

A, B, C, D, E, F e G: diferentes amostras de empanados de frango

PDA e DG 18%: meios de cultura (Ágar Batata e Ágar Dicloran Glicerol 18%)

UFC/g: unidades formadoras de colônia por grama de empanado de frango

*: Espécie de maior ocorrência na amostra.

Tabela 2 – Resultado dos metabólitos produzidos pelas principais espécies deterioradoras de empanados congelados de frango

| Cepas | Identificação Taxonômica | Metabólitos |
|-----------|------------------------------|---|
| 1/12 NGT | <i>Penicillium manginii</i> | citreoviridina*, citreomontanina |
| 16/12 NGT | <i>Penicillium commune</i> | ácido ciclopáldico, ácido ciclopiazônico*, FKI-3389, chomanols |
| 23/12 NGT | <i>Penicillium polonicum</i> | anacina, ciclopenol, ciclopenina, dehidrociclopeptina, verrucosidina*, deoxiverrucosidina, viridicatol, 3- metociviridacatina, verrucofortina |
| 29/12 NGT | <i>Penicillium glabrum</i> | ácido astérico, geodina, citromicetina, asperflavina, questina |
| 39/12 NGT | <i>Penicillium glabrum</i> | geodina, citromicetina, questinol |
| 33/12 NGT | <i>Penicillium polonicum</i> | anacina, cyclopenol, ciclopenina, dehidrociclopeptina, verrucosidina*, deoxiverrucosidin, viridicatol, 3- metoxiviridicatina, verrucofortina. |
| 30/12NGT | <i>Penicillium solitum</i> | compactina, solistatina, viridicatina, viridicatol, ciclopeptina, ciclopenol, ciclopenil, androstina A. |
| 51/12 NGT | <i>Penicillium crustosum</i> | ácido astérico, tomitrem A & E, penitrem A*, roquefortina C*, ciclopenina. viridicatol, viridicatina |
| 35/12 NGT | <i>Penicillium glabrum</i> | ácido astérico, geodina, questina, questinol. |

* : Micotoxinas

5 MANUSCRITO II

Influência da temperatura sobre a deterioração fúngica de empanados congelados de frango inoculados com *Penicillium polonicum* e *Penicillium glabrum*

Influence of temperature on fungal spoilage of frozen chicken breaded inoculated with *Penicillium polonicum* and *Penicillium glabrum*.

Autores: Fernanda Saccomori¹, Évelin Francine Wigmann¹, Angélica Bernardi Olivier¹, Maria de Jesus Alcano¹, 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.

Resumo

A prática de congelamento de alimentos é um dos principais processos empregados pela indústria de alimentos com o objetivo de prolongar a vida útil de alimentos. Seu uso tem se expandido em anos recentes em virtude do aumento do consumo de produtos de conveniência, muitos dos quais são comercializados na forma congelada. Esta prática vem selecionando, ao longo dos anos, espécies de micro-organismos capazes de se desenvolver em condições de baixas temperaturas, com destaque para os fungos filamentosos. Além das perdas econômicas do setor industrial devido ao retorno de produtos e à perda de confiança pelos consumidores, o desenvolvimento de fungos em alimentos representa um problema de saúde pública pela possibilidade de produção de micotoxinas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento à 5, 0, -5 e -18°C de duas espécies de fungos envolvidas com a deterioração de empanados congelados de frango (*Penicillium polonicum* e *Penicillium glabrum*) inoculadas tanto em meio de cultura quanto em duas marcas comerciais de empanados congelados de frango. Em paralelo, determinou-se semanalmente a temperatura encontrada nos balcões de congelamento de 6 supermercados da cidade de Santa Maria-RS em dois períodos do dia. Os resultados demonstraram que o fungo *P. polonicum*, é capaz de formar microcolônias em placas de Agar Batata em até 0°C e formar colônias visíveis na superfície dos empanados congelados de frango conservados à -5°C aos 120 dias, independente da marca. Para *P. glabrum* a temperatura de crescimento limitante foi 0°C, tanto em meio de cultura quanto nos empanados congelados de frango, independente da marca analisada. Todos os supermercados apresentaram, em pelo menos um dos momentos avaliados, temperatura superior a -5°C, sendo que 4/6 (66%) apresentaram pelo menos um pico de temperatura acima de 0°C, com um máximo de 9,8°C. Desta maneira destaca-se a necessidade de uma adequação da temperatura das gôndolas de comercialização de produtos congelados para que sejam atendidas as especificações do fabricante e assim haja uma maior garantia da qualidade microbiológica destes produtos.

PALAVRAS-CHAVES: *Penicillium*; conservação de alimentos; *shelf-life*; empanados cárneos congelados; deterioração de alimentos.

5.1 Introdução

A carne de frango é uma matriz rica em água, proteínas, lipídeos e vitaminas; assim, ao mesmo tempo em que atende as demandas energéticas e nutricionais dos consumidores, essa composição fornece um ambiente nutricionalmente adequado para a proliferação de micro-organismos deteriorantes e patógenos relacionados a alimentos (Jay et al., 2005).

Para prolongar a vida útil destes alimentos altamente perecíveis, um dos métodos mais eficazes e utilizados é o emprego de baixas temperaturas que retarda o desenvolvimento microbiano (Vitali & Quast, 2004). Isso ocorre porque todos os processos de crescimento são dependentes de reações químicas, as quais têm sua velocidade afetada pela temperatura (Jay, 2005). Quando a intenção de armazenagem do alimento for por períodos curtos, a refrigeração é o método de eleição, enquanto que o congelamento é empregado quando objetiva-se conservar o produto cárneo por um período prolongado (Archer, 2004). Segundo recomendações do *Codex Alimentarius* (1947), para o congelamento, as temperaturas de armazenamento do alimento devem ser inferiores a -18°C .

O congelamento tem um duplo efeito inibidor sobre os micro-organismos, afetando a velocidade do crescimento microbiano devido à aplicação de temperaturas inferiores ao mínimo necessário seu mínimo necessário para a multiplicação dos micro-organismos e à obtenção de baixas concentrações de água disponível no substrato, uma vez que a conversão de água em gelo durante o congelamento aumenta a concentração de solutos dissolvidos em água não congelada e assim reduz a atividade da água do alimento (Rizvi, 2002). Dessa forma, percebe-se que qualquer alimento parcialmente ou totalmente congelado é árido, em comparação com o mesmo alimento quando ele não está congelado. Portanto, a água disponível para os micro-organismos para a manutenção de seu metabolismo diminui à medida que os alimentos congelados e resfriados estão a temperaturas iniciais abaixo da temperatura de congelamento (Gill, 2011).

Todos os micro-organismos necessitam de água para o crescimento, mas alguns, referidos como xerotolerantes, podem suportar condições relativamente áridas. Devido a sua fisiologia e metabolismos diferenciados, algumas espécies fúngicas são adaptadas ao crescimento em condições de temperatura e atividade de água (a_w) baixas (Frisvad & Samson, 1991), parâmetros estes presentes em produtos congelados.

Várias espécies de *Penicillium* são descritas contaminando produtos mantidos sob baixa temperatura, entre elas *Penicillium polonicum* e *Penicillium glabrum*, as quais são

consideradas importantes deterioradoras deste grupo de alimentos. *P. glabrum* pode ser encontrado em uma variedade de produtos alimentares, incluindo queijo (Northolt et al., 1980) nozes (Freire et al., 2000), e água mineral engarrafada (Cabral & Fernandez Pinto, 2002). Sinigaglia et al (1998), em estudos com *P. glabrum*, verificaram que este fungo foi a espécie mais isolada de amostras de uva em decomposição. A espécie foi encontrada igualmente em cereais frescos e grãos armazenados, frutas congeladas e bebidas à base de frutas. Também foi isolado de morangos, uvas, frutas secas e castanhas. Além disso, poderia secretar patulina e palitantina (Domsch et al., 1980). *P. polonicum*, espécie intimamente relacionada a *P. aurantiogriseum*, também é considerado um importante fungo de alimento, membro do subgênero *Penicillium* da série *Viridicata*, todos os quais estão associados com a maior parte dos cereais (Frisvad & Samson, 1991).

Gill e Lowry (1982) destacam que apesar de haver pouco estudo sobre deterioração de produtos cárneos por bolores, é de conhecimento que fungos filamentosos são capazes de deteriorar a carne em condições de pH, a_w , e temperatura que seriam restritivas para as bactérias. Para Ingrain & Uackey (1978), as temperaturas mínimas de crescimento para fungos poderiam ocorrer entre -10 e -12°C, mas alguns autores (Leistner & Rodel, 1981) defendem a opinião de que o crescimento seria possível a temperaturas abaixo de -18°C.

Por outro lado, Hall (1960) comenta que durante o transporte e estocagem, os alimentos congelados estão sujeitos a flutuações de temperatura. E que o abuso mais comum sob os produtos, como períodos prolongados acima das temperaturas de estocagem recomendadas, ocorrem nas gôndolas dos supermercados. Um dos motivos para esse caso poderia estar relacionado às gôndolas dos supermercados que possuem abertura superior e permanente que comportariam um número de produtos superior ao projetado, de modo que os alimentos fiquem fora da área do compartimento que garantiria a temperatura correta de armazenamento (Hall, 1979).

Assim, a manutenção da cadeia de frio assume um papel crítico em alimentos que seriam facilmente deteriorados em temperatura ambiente, como é o caso dos produtos cárneos (Baptista & Linhares, 2005). Uma vez que os mercados representam os principais estabelecimentos de distribuição de alimentos, o correto controle da temperatura dos equipamentos da rede de frio destes comércios é fundamental para conservação de alimentos perecíveis, uma vez que a temperatura exerce influência sobre a multiplicação de microorganismos. Do contrário, a falta de controle das condições de conservação dos alimentos perecíveis pode acarretar, além de perdas econômicas por deterioração e alterações sensoriais dos alimentos, danos à saúde do consumidor (Vitali & Quast, 2004).

Grande progresso tem sido feito no estudo de aspectos bacteriológicos de deterioração dos alimentos, mas o papel de fungos e leveduras não tem sido estudado com igual rigor. Embora os fungos psicrotróficos definitivamente sejam um problema em alimentos conservados em baixas temperaturas, pequeno é o número de pesquisas relacionadas a este tema (Gill & Lowry, 1982; Geiges, 1996; Gill, 2011). Diante deste cenário, este estudo propôs-se a investigar a capacidade das duas principais espécies de *Penicillium* deteriorantes de empanados congelados de frango em se desenvolver sob condições de baixas temperaturas. Complementarmente, determinou-se a temperatura presente em balcões onde estes produtos são expostos à venda, em diferentes supermercados de Santa Maria-RS, de modo se verificar a ocorrência temperaturas permissivas ao crescimento das espécies de *Penicillium* de deterioração destes produtos sob condições reais de armazenagem.

5.2 Materiais e Métodos

5.2.1 Avaliação do crescimento de *Penicillium* spp. sob baixas temperaturas

Os fungos *Penicillium glabrum* e *Penicillium polonicum* utilizados neste estudo foram isolados a partir de amostras de empanados congelados de frango visualmente deteriorados por fungos. Estas amostras eram oriundas da devolução por consumidores insatisfeitos com a qualidade do produto.

As amostras de empanados congelados de frango utilizadas para a inoculação dos fungos pertenciam a duas marcas comerciais distintas adquiridas em suas próprias unidades de produção, localizadas no estado de Santa Catarina. As amostras de cada marca pertenciam cada qual a um mesmo lote e foram utilizadas as denominações “Nugget I” e “Nugget II” para diferenciá-las.

5.2.2 Preparação do inóculo

Para a preparação do inóculo foram utilizados tubos de Czapeck Extrato de Levedura (CYA) contendo cultivos de 7 dias de *P. polonicum* e *P. glabrum*.

Em cada tubo de cultivo foi adicionado 10mL de solução estéril de trabalho (0,0425g de fosfato de potássio e 3 gotas de tween/L, sendo pH corrigido para 7,2) e padronizado as suspensões contendo o inóculo em 10^5 conídios/mL.

5.2.3 Inoculação dos fungos em amostras de nuggets

Um total de 100 μ L da suspensão de conídios foi inoculado em gotas de 5 μ L distribuídas na superfície dos empanados congelados de frango das marcas “Nugget I” e “Nugget II”, perfazendo aproximadamente 5×10^2 conídios/g de empanado congelado de frango. Paralelamente foram utilizadas amostras para controle negativo inoculadas com 100 μ L da solução estéril de trabalho.

Ao final da inoculação, foram retiradas amostras de ambas as marcas representando os diferentes fungos e controles negativo para análise no tempo zero (T_0). As demais amostras foram agrupadas em embalagens, aleatoriamente identificadas e distribuídas em quatro temperaturas: -18°C (em freezer comercial), -5°C, 0°C e 5°C (em estufa de incubação).

5.2.4 Análise das amostras

As unidades das amostras a serem analisadas foram descongeladas e processadas de maneira asséptica. Foram pesadas porções de 10 gramas do produto, seguindo de adição de 90mL de água peptonada a 0,1% e homogeneização em aparelho *Bagmixer* (*Interscience*, France) durante 1 minuto. Foram realizadas diluições seriadas seguidas de plaqueamento em meio Ágar Batata Dextrose (PDA) suplementado com cloranfenicol, incubando a 25 °C por 7 dias em triplicata. Decorrido o período de incubação procedeu-se a contagem das colônias, com os resultados expressos em unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL).

As análises foram repetidas semanalmente até os 120 dias de incubação ou até o momento que fosse observado o surgimento de colônias visíveis na superfície dos empanados congelados de frango.

5.2.5 Inoculação dos fungos em meio de cultivo

A partir do tubo inicial de cultivo de *P. glabrum* e *P. polonicum*, foi realizada uma inoculação no centro de placas de Petri com meio PDA, suplementado com cloranfenicol. As placas inoculadas, juntamente com um controle negativo sem fungo, foram incubadas juntamente com os empanados congelados de frango nas temperaturas de -18°C (em freezer comercial) -5°C, 0°C, 5°C (em estufas de incubação) com observação semanal do crescimento, avaliando o diâmetro das colônias fúngicas. Este experimento foi realizado em quintuplicata.

5.2.6 Verificação das temperaturas nos estabelecimentos alimentícios

Esta etapa foi realizada em seis supermercados da cidade de Santa Maria. Três supermercados de tamanho grande (SA, SB, SC) e os demais de tamanho compacto (SN, SZ, SR) de acordo com a classificação da ABRAS (2013).

As temperaturas da rede de frios foram avaliadas, nas gôndolas que armazenavam empanados congelados de frango. As leituras foram obtidas do mês de fevereiro a maio de 2013, onde eram feitas duas verificações diárias, uma no período matutino e outra no período vespertino, através de um Termômetro Digital tipo espeto (*Incoterm*, China).

As leituras dos estabelecimentos alimentícios foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de confiança, a partir do programa estatístico Statistica® 7.0 for Windows.

5.3 Resultados

5.3.1 Avaliação das espécies *P. polonicum* e *P. glabrum*

A temperatura mínima em que o fungo *P. polonicum* foi capaz de se desenvolver formando microcolônias em 2/5 (40%) das placas de PDA incubadas foi de 0°C, enquanto que nos empanados cárneos congelados, a espécie foi capaz de formar colônias visíveis à -5°C a 17 semanas. Para *P. glabrum* a temperatura de crescimento limitante foi 0°C, tanto em meio de cultura quanto nos empanados congelados de frango, em ambas as marcas analisadas. A mesma espécie fúngica comportou-se de maneira similar independente da marca de empanado congelado de frango avaliada sob uma mesma temperatura.

Os resultados referentes ao crescimento das espécies inoculadas nos empanados congelados são demonstrados nas figuras 1a e 1b.

Analisando os gráficos das figuras, percebe-se que a 5°C, tanto as colônias de *P. polonicum*, como *P. glabrum*, tornaram-se visíveis na 3ª semana de armazenamento, em ambas as marcas de empanados congelados.

A 0°C, colônias de *P. polonicum* tornaram-se visíveis na 5ª semana de armazenamento, em ambas as marcas, (Figura 1a) Já para *P. glabrum* foram necessários 9 semanas de incubação para o surgimento de colônias nos produtos das duas marcas a 0°C (Figura 1b).

Na temperatura de -5°C houve o aparecimento de colônias visíveis de *P. polonicum* na 17ª semana de armazenamento, em ambas as marcas. Enquanto que, durante o período avaliado *P. glabrum* não apresentou formação de colônias visíveis a -5°C.

Aos -18°C não houve aparecimento de colônia fúngica visível em nenhuma das espécies. A observação visual destas amostras seguiu-se até o sétimo mês de armazenamento, e da mesma forma, não houve aparecimento de colônias fúngicas nesta temperatura.

5.3.2 Avaliação das temperaturas nos estabelecimentos alimentícios

As temperaturas das gôndolas de alimentos congelados dos estabelecimentos alimentícios avaliados estão representadas nas Figuras 2a e 2b, correspondentes respectivamente às leituras das temperaturas realizadas no período matutino e vespertino dos estabelecimentos SA, SB, SC, SN, SZ e SR.

Todos os supermercados apresentaram, em pelo menos um dos momentos avaliados, temperatura superior a -5°C, sendo que 4/6 (66%) apresentaram pelo menos um pico de temperatura acima de 0°C, com um máximo de 9,8°C.

Considerando a temperatura -18°C ou inferior recomendada pelo *Codex Alimentarius* (1976) para o correto armazenamento de alimentos congelados, percebe-se que o estabelecimento SR, apresentou em todas as verificações temperaturas superiores ao esperado. Além disso, apesar da embalagem do produto recomendar armazenamento a -12°C ou inferior, apenas 12,5% das leituras realizadas neste estabelecimento respeitariam a temperatura recomendada na embalagem do produto.

Da mesma forma, o estabelecimento SC, apresentou, em todas as avaliações, produtos expostos a temperaturas superiores a -18°C . Somado a isso, apenas 20,8% das vezes a temperatura esteve de acordo com as recomendações dos fabricantes de empanados congelados. De maneira ainda mais preocupante, em três momentos, das 24 avaliações, os produtos encontravam-se expostos sob temperaturas positivas. No estabelecimento SN, em 5 das 24 avaliações, a temperatura estava acima dos -12°C . Considerando -18°C , com tolerância de variação de 1°C (Ordóñez, 2005), 70,8% das vezes os produtos estavam acima deste ideal.

O estabelecimento SB, foi o que apresentou as temperaturas mais apropriadas. Na maior parte das verificações (54,5%) os produtos encontraram-se em temperaturas de $-18^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (Ordóñez, 2005) recomendada pelo *Codex alimentarius* (1976), para alimentos congelados. Enquanto que em 90,9 % das vezes, os produtos estavam armazenados de acordo com as recomendações do fabricante, -12°C ou menos. Apenas 2 leituras, de um total de 24, apresentaram temperaturas superiores ($-11,7^{\circ}\text{C}$ e $4,8^{\circ}\text{C}$)

O supermercado SZ apresentou as leituras das temperaturas pouco oscilantes, nenhuma atindindo $-18^{\circ}\text{C} (\pm 1^{\circ}\text{C})$. Já no estabelecimento SA, 4 verificações de temperaturas, das 24 realizadas, encontravam-se a $-18^{\circ}\text{C} (\pm 1^{\circ}\text{C})$.

De acordo com a Tabela 1, percebe-se que não houve diferença significativa entre as medições das temperaturas realizadas no período da manhã com o período da tarde nas gôndolas dos supermercados. Porém houve diferença significativa entre as temperaturas dos estabelecimentos avaliados.

5.4 Discussão

5.4.1 Avaliação do crescimento das espécies predominantes

Os fungos *P. polonicum* e *P. glabrum*, estudados em nosso trabalho, são agentes potenciais na deterioração de alimentos conservados sob baixas temperaturas conseguindo se desenvolver em um período relativamente curto de tempo em temperaturas próximas a 0°C. Na literatura, as pesquisas com espécies psicrotróficas são raras e se restringem a temperaturas um pouco acima de zero, mas o crescimento geralmente é descrito em temperaturas ligeiramente inferiores a 0°C (Geiges, 1996).

Os resultados deste estudo indicam que a temperatura mínima para crescimento de *P. polonicum* se encontra entre -5 e -18°C, enquanto que para *P. glabrum* estas mínimas são maiores, entre 0 e -5°C. Embora, o comportamento dessas espécies pode variar dependendo do substrato em que se desenvolvem.

Penicillium glabrum é frequentemente encontrado nas indústrias de alimentos processados, devido a sua ubíqua presença no ambiente, como solos, plantas, frutas, legumes e madeira e sua capacidade de dispersar um grande número de esporos no ar (Pitt & Hocking, 1997; Carlite & Watkinson, 1994). Overy et al., (2003) relataram em seus estudos que a frequência de *P. glabrum* em diversos substratos pode ser maior devido a capacidade de crescimento em temperaturas de refrigeração.

P. polonicum também foi relatado em diversos alimentos. Sonjak et al., (2011), isolaram e identificaram *P. polonicum* na superfície de produtos cárneos curados. Esta espécie é comum em ambientes fechados e pode ser descrito como halotolerante (Frisvad & Samson, 2004; Samson et al., 2002). Não obstante, a presença de *P. polonicum* como um fungo contaminante dominante foi avaliado durante o armazenamento a longo prazo de pós-colheita de frutas e vegetais, e é considerado um dos agentes causais do chamado mofo azul (Xiaofang et al., 2007).

Durante a avaliação do comportamento das espécies *P. polonicum* e *P. glabrum* nas diferentes temperaturas evidenciou-se que a 5°C *P. polonicum* necessitou de duas semanas de armazenamento para seu crescimento formar colônias visíveis na superfície dos empanados congelados de frango, com uma contagem de 10⁵ UFC/g. Enquanto que sob temperaturas mais baixas, a 0°C, necessitou de um período maior de tempo (cinco semanas) para a formação de colônias fúngicas. Além disso, a 0°C, as colônias tornaram-se visíveis quando a contagem atingiu 10⁶ UFC/g. Na temperatura de -5°C o período de tempo necessário para o desenvolvimento do fungo e surgimento de colônias visíveis foi consideravelmente maior, levando 17 semanas para os esporos se desenvolverem e formarem colônias visíveis na superfície do produto cárneo.

Assim como ocorreu com *P. polonicum*, a 5°C a espécie *P. glabrum* foi capaz de formar colônias visíveis na segunda semana de armazenamento, porém com uma contagem ligeiramente menor que a espécie *P. polonicum*. E diferentemente desta última que a 0°C formou colônias visíveis na quinta semana, o fungo *P. glabrum* necessitou de maior tempo, um período de nove semanas em contagem de 10⁵ UFC/g. Não foram encontrados trabalhos relatando as contagens fúngicas relacionadas ao surgimento de colônias na superfície de produtos cárneos conservados sob baixas temperaturas.

Neste trabalho, para estas espécies já era esperado que a 5°C ocorresse o surgimento de colônia fúngicas, por serem espécies psicrotróficas. Porém a magnitude do problema é bem maior, visto que houve desenvolvimento de colônias visíveis de *P. polonicum* em temperaturas tão baixas quanto -5°C. Destaca-se também o fato de que, mesmo que não tenha havido desenvolvimento de colônias a -18°C para ambas espécies e a -5°C para *P. glabrum*, os esporos inoculados permaneceram viáveis em ambas as temperaturas durante todo o período avaliado em níveis similares aos inoculados no início do experimento. Ou seja, mesmo que o abuso de temperatura ocorresse após um extenso período de conservação correta, uma vez presente o agente deteriorante, haveria o perigo potencial de seu desenvolvimento no produto. Assim, se em certos momentos, durante o transporte, distribuição ou armazenamento dos empanados congelados de frango nos locais de venda, o produto sofrer um abuso de temperatura, seu tempo útil se tornará reduzido. Mesmo que não seja por tempo contínuo, mas repetidos períodos de elevação da temperatura permitem que as espécies se desenvolvam, podendo comprometer a qualidade microbiológica e conseqüentemente as características físicas, químicas e sensoriais do produto alimentício.

É de conhecimento que o congelamento é um método eficiente para a conservação dos alimentos garantindo a estabilidade do produto frente a deterioração microbiana pela inibição da sua multiplicação (Adams & Moss, 2000; Jay et al.,2005). Contudo, vale ressaltar que tanto a refrigeração quanto o congelamento não vão tornar um produto inseguro em um produto seguro, porque a sua letalidade microbiológica é limitada e as toxinas pré-formadas persistirão (Adams & Moss, 2000).

Além disso, apesar de não haver relatos específicos para estas espécies em relação à produção de micotoxinas nas temperaturas estudadas em nosso trabalho, é importante informar que no caso *P. polonicum*, por ser uma espécie potencial produtora de metabólitos tóxicos (Samson & Frisvad, 2004), o produto quando exposto a uma temperatura acima do recomendado, pode colocar em perigo a saúde do consumidor.

Outras pesquisas, semelhantes a nossa também estudaram a prevalência e comportamento de espécies fúngicas a temperaturas próximas a 0°C, porém em meios de cultura. Um desses estudos foi conduzido por Kuehn & Maillard (1962), que encontraram, além de outras, 31 espécies de *Penicillium* contaminando amostras congeladas de frutas, e relataram que destas, 25 foram capazes de se desenvolver a 5°C, e uma espécie desconhecida de *Penicillium* conseguiu de se desenvolver a 0°C em até 25 dias de incubação. Já Wyatt & Parish (1995), isolaram fungos a partir de sucos concentrados congelados de laranja e relataram que *P. italicum* germinou a 0°C. Nosso estudo demonstrou que a temperatura mínima de crescimento dos fungos pode ser consideravelmente diferente dependendo do substrato no qual a espécie se desenvolve, com temperaturas permissivas inferiores quando crescendo em um alimento se comparado a um meio de cultura convencional.

Isto provavelmente se deve ao fato de que alimentos que apresentam uma viscosidade mais elevada e que contêm proteínas, carboidratos e gorduras em sua composição oferecem uma certa proteção às células microbianas durante o período em que o produto estiver congelado (Geiges, 1996). Essas substâncias denominadas crioprotetores podem atuar penetrando na célula e sendo acumuladas por organismos xerotolerantes em resposta ao estresse osmótico (Brown, 1990), ou como ocorre com os compostos de elevado peso molecular, que agem provavelmente inibindo a nucleação e crescimento de cristais de gelo no meio extracelular (Gill, 2011).

Ainda que não tenha ocorrido o surgimento de colônias visíveis de *P. glabrum* a -5°C, é possível perceber oscilações na contagem de colônias durante praticamente todo o período de armazenamento avaliado, de ambas as marcas Nugget I e Nugget II (fig.1a e fig.1b).

Essas oscilações, nas quais ocorrem uma ligeira diminuição no número de microorganismos capazes de reprodução podem ser frequentemente observadas na fase de latência, especialmente nos intervalos de temperatura mais baixas (Geiges, 1996). Porém, os efeitos letais são difíceis de quantificar em fungos filamentosos, de modo que os efeitos do congelamento que causam danos às células vegetativas são muito variáveis de acordo com a fase de crescimento das células, as condições sob as quais são cultivadas, exposição a outros tipos de estresse antes do congelamento e a presença ou ausência de crioprotetores no meio (Gill, 2011).

Assim, tendo em vista o comportamento das espécies avaliadas em nosso estudo, concordamos com Lowry & Gill (1984b), onde relatam que na prática, a temperatura mínima para o crescimento de fungos parece ser de cerca de -5°C, e nesta temperatura, as taxas de crescimento dos fungos são lentas.

5.4.2 Avaliação das temperaturas nos estabelecimentos alimentícios

O correto armazenamento de produtos alimentícios congelados é imprescindível para estender sua vida útil. A manipulação e elaboração de alimentos podem ser realizadas seguindo as técnicas e critérios mais rigorosos, porém se os produtos não forem armazenados sob temperaturas adequadas no varejo poderá haver um comprometimento de sua qualidade e assim a diminuição do seu tempo útil em razão da estocagem inadequada (Germano & Germano, 2001).

Como observado em nossas análises, a temperatura muitas vezes não é constante durante as várias etapas de distribuição de produtos e um abuso de temperatura muitas vezes pode ser experimentado (Zardetto, 2005).

Zardetto (2004), afirma que o aumento da temperatura durante as fases de distribuição e de comercialização durante o gerenciamento de produtos é um fenômeno variável em pequenos estabelecimentos e supermercados.

Assim como nós observamos temperaturas de abuso em supermercados de Santa Maria – RS, Mürmam et al (2004), também haviam verificado anteriormente que nos estabelecimentos desta cidade os equipamentos responsáveis pelo congelamento dos alimentos apresentaram alto índice de desacordo (86,1%) quanto à temperatura recomendada pelo *Codex alimentarius* (1976), que é de -18°C . Além disso, o mesmo estudo constatou que em 9,1% dos estabelecimentos foi encontrado pelo menos um tipo de alimento perecível mantido na temperatura ambiente. O trabalho deste grupo foi realizado há certa de 10 anos, o que demonstra que este segue sendo um problema dos estabelecimentos que comercializam produtos alimentícios congelados.

Em vistorias realizadas a 39 estabelecimentos varejistas de São Paulo/SP, Pavanelli et al (2003) encontraram também altos índices de inadequação em 89,1% dos equipamento de congelamento. Mais grave foram as observações de Cardoso & Araújo (2001), durante uma pesquisa realizada em 68 padarias do Distrito Federal, reportaram que apenas 1% dos alimentos expostos encontravam-se na temperatura adequada.

O elevado número de inconformidades no que se refere as temperaturas nos balcões de congelamento dos supermercados avaliados em nosso trabalho e em outras pesquisas

semelhantes pode ser explicado por observações feitas por Geiges (1996). Este autor relata que na indústria processadora tende a haver um controle mais rigoroso na manutenção de temperaturas, enquanto que no varejo, sobretudo em função do gasto energético e consequentes tentativas de economia pelo proprietário do estabelecimento, a temperatura de armazenamento não recebe adequada atenção, acarretando uma possível deterioração precoce dos alimentos. As observações da Tabela 1 sugerem que os supermercados analisados neste estudo não estariam controlando de forma diferente um período específico para economia de energia já que não houve diferença estatística quanto ao período das leituras da manhã e da tarde em todos os estabelecimentos avaliados.

Embora tenham havido avanços nas práticas higiênicas adotadas durante a elaboração do produto alimentício e nas tecnologias empregadas nos equipamentos, a refrigeração e o congelamento continuam a ser uma fonte de preocupação no que se refere à conservação de alimentos, sobretudo devido ao armazenamento no varejo sob temperaturas superiores ao recomendado pelo fabricante (Laguere et al., 2002).

Para evitar estas perdas e aumentar a qualidade do alimento comercializado, torna-se fundamental que a temperatura mantenha-se estável durante todo o armazenamento e que estas condições se estendam durante o transporte, comercialização e inclusive aos domicílios antes de seu uso final (Ordóñez, 2005), o que também influencia a segurança alimentar do consumidor depende do controle da temperatura ao longo de todas as fases da cadeia de frio. Assim, é imprescindível o uso correto dos equipamentos de congelamento que reduzirão significativamente deterioração dos alimentos e os riscos à saúde do consumidor (Hobbs and Roberts, 1999).

As espécies *P. glabrum* e *P. polonicum*, estudadas em nosso trabalho se mostraram capazes de se desenvolver e formar colônias visíveis na superfície dos empanados congelados de frango quanto estes permaneceram armazenados a temperatura de 0°C (*P. glabrum*) e -5°C (*P. polonicum*) ou mais. Além disso, durante todo o período avaliado, as células de ambos os micro-organismos permaneceram viáveis quando as temperaturas de congelamento estavam abaixo da mínima para seu crescimento. Estas observações são de extrema relevância, visto que, conforme o avaliado neste estudo, em vários momentos as temperaturas dos supermercados que comercializam empanados congelados de frango alcançaram temperaturas superiores a este mínimo e inclusive positivas, o que poderia permitir o desenvolvimento de colônias fúngicas visíveis e consequentemente comprometer a qualidade do produto.

5.5 Referências Bibliográficas

- ABRAS. Associação brasileira de supermercados. Disponível em <<http://www.abras.com.br/>> Acesso em 13 mai 2013.
- Adams, M. R.; Moss, M. O. 2000. Food Microbiology. Second ed. The Royal Society of Chemistry. Londres, Reino Unido. 479 p
- Archer, D. L. 2004. Freezing: an underutilized food safety technology? *International Journal of Food Microbiology* 90, 127-138.
- Baptista, P., Linhares, M. 2005. Higiene e Segurança Alimentar na Restauração. Vol. I, first ed. Forvisão - Consultadoria em Formação Integrada. Guimarães, Portugal.
- Brown, A. D. 1990. Compatible solutes. In: *Microbial water stress physiology: principles and perspective*. Chichester, UK: Wiley, pp. 241 – 279.
- Cabral, D., Fernandez Pinto, V.E. 2002. Fungal spoilage of bottled mineral water. *International Journal of Food Microbiology* 72, 73 – 76.
- Cardoso, L., Araújo, W.M.C. 2001. Perfil higiênico-sanitário das panificadoras do Distrito Federal. *Higiene Alimentar* 15, 32-43.
- Carlite, M., Watkinson, S. 1994. *Saprotrophs and Ecosystems*. Academic Press Limited, New York.
- Codex Alimentarius. 1976. Recommended International Code of Practice for the Processing and Handling of Quick Frozen Foods. CAC/RCP 8. pp. 1-19.
- Domsch, K. H., Gams, W, Anderson, T. H. 1980: *Compendium of soil fungi* . Vol. 1. Domsch, K. H., Gams, W, Anderson, T.H. (Eds). Academic Press, London.
- Fischer, G., Muller, T., Schwalbe, R., Ostrowski, R., Dott, W. 2000. Species-specific profiles of mycotoxins produced in cultures and associated with conidia of airborne fungi derived from biowaste. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 203, 105–116.
- Frisvad, J.C.; Samson, R.A. 1991. Filamentous fungi in foods and feeds: ecology, spoilage and mycotoxin production. In Arora, D. K.; Mukerji, K. G.; Marth, E. H. (Eds.), *Handbook of applied mycology, Foods and Feeds*, New York: Marcel Dekker, vol. 3, pp. 31-68.
- Geiges, O. 1996. Microbial processes in frozen food. *Advances in Space Research* 18, 109-118
- Germano P.M.L., Germano M.I.S. 2001. Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos. São Paulo: Varela, pp. 629.
- Gill, C. O. 2011. Microbiology of food frozen. In: Da-Wen Sun (Ed.) *Handbook of Frozen Food Processing and Packaging*, second ed. CRC Press, pp. 83-93.

- Gill, C. O., Lowry, P.D. 1982. Grow at sub-zero temperatures of black spot fungi from meat. *Journal of Applied Bacteriology* 52, 245-250.
- Hall, L. P. 1979. Quality aspects of frozen foods in distribution. *Proceedings - Institute of Food Science and Technology* 12, 139-140.
- Hall, L. P. 1970. A bacteriological survey of British produced frozen vegetable. In *Technical bulletin*. N. 18. Chipping Campden, Glos. UK. Campden Food Preservation Research Association.
- Hobbs, B.C., Roberts, D. 1999. *Toxinfeções e controle higiênico sanitário de alimentos*. fourth. ed., São Paulo: Varela., pp. 376.
- Laguerre, O., Derens, E., Palagos, B. 2002. Study of domestic refrigerator temperature and analysis of factors affecting temperature: a French survey. *International Journal of Refrigeration* 25, 653-659.
- Leistner, L., Rodel, W., Krispien, K. 1981 *Water activity: influences on food quality*, Academic, London. pp. 855-916.
- Lowry, P.D., Gill, C.O. 1984a. Development of a Yeast Microflora on Frozen Lamb stored at -5°C. *Journal of Food Protection* 47, 309-311.
- Lowry, P.D; Gill, C. O. 1984b. Mould growth on meat at freezing temperatures. *Revue Internationale du Froid* 7, 133-136.
- Ingrain, M., Uackey, B. M. 1976. *Inhibition and inactivation of vegetative microbes*, Academic, London, pp. 111-151.
- Jay, J.M., Loessner, M. J., Golden, D.A. 2005. *Modern Food Microbiology*. Springer Science and Bussiness Media, Inc. USA.
- Kuehn, H., Maillard, G. F. 1962. Psychrophilic and mesophilic fungi in fruit-filled pastries. *Applied Microbiology* 10, 354-358.
- Mürmann, L., Mallmann, C. A., Dilkin, P. 2004. Temperaturas de conservadores a frio em estabelecimentos que comercializam alimentos na cidade de Santa Maria, RS. *Revista Higiene Alimentar* 18, 30-34.
- Northolt, M.D., van Egmond, H.P., Soontoro, P. Dcijll, E. 1980. Fungal growth and the presence of sterigmatocystin in hard cheese. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 63, 115-119.
- Ordóñez, J.A. 2005. *Tecnologia de alimentos: alimentos de origem animal*. First ed., Porto Alegre: Editora Artmed, pp. 293.
- Overy, D. P., Seifert, K.A., Savard, M. E., Frisvad, J.C. 2003. Spoilage fungi and their mycotoxins in commercially marketed chestnuts. *International Journal of Food Microbiology* 88, 69– 77.

- Pavanelli, L.C., Villela, V.H., Souza, S.S., Clemente, R.M., Leal, R.M., Azevedo, J.S. 2003. Diagnóstico das condições de equipamentos de frio em estabelecimentos comerciais varejistas do município de São Paulo. In: Congresso latino americano de higienistas de alimentos, 1, Belo Horizonte. Anais. São Paulo: Higiene Alimentar, vol. 17, n. 104-105, p. 148.
- Pitt, J. I., & Hocking, A.D., 1997. *Penicillium* and related genera. In Fungi and food spoilage. ed. London, Blackie Academic & Professional. pp. 281–284
- Rizvi, S. 2002. Food Processing and Preservation Technologies. Department of Food Science. Cornell University. E.U.A
- Samson, R. A., Frisvad, J. C. 2004. *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes, mycotoxins and other extrolites. Studies in Mycology 49, 1-251.
- Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C., Filtenborg, O. 2002. Introduction to Food- and Airborne Fungi, sixth ed. Utrecht, Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Sinigaglia, M., Corbo, M. R., Ciccarone, C., 1998. Influence of temperature, pH and water activity on "in vitro" inhibition of *Penicillium glabrum* (Wehmer) Westling by yeasts. Microbiological Research 153, 137-143.
- Sonjak, S., Ličen, M., Frisvad, J. C., Gunde-Cimerman, N. 2011. The mycobiota of three dry-cured meat products from Slovenia. Food Microbiology 28, 373-376.
- Vitali, A. A. e Quast, D. G. 2004. Vida útil de alimentos. Reações de Transformação e Vida útil de Alimentos Processados, Third ed. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos. pp. 57.
- Zardetto, S. 2005. Effect of modified atmosphere packaging at abuse temperature on the growth of *Penicillium aurantiogriseum* isolated from fresh filled pasta. Food Microbiology 22, 367–371.
- Zardetto, S. 2004. Effect of temperature and modified atmosphere on the growth of *Penicillium aurantiogriseum* isolated from fresh filled pasta. Tecnica Molitoria 1, 1–9.
- Xiaofang M, Boxun D, Lifeng C, Hui Y. 2007. Molecular identification of *Penicillium* species causing post-harvest diseases of Citrus fruits. Guoshu Xuebao 24, 653–656.
- Wyatt, M. K.; Parish, M. E. 1995. Spore germination of citrus juice-related fungi at low temperatures. Food Microbiology 12, 237-243.

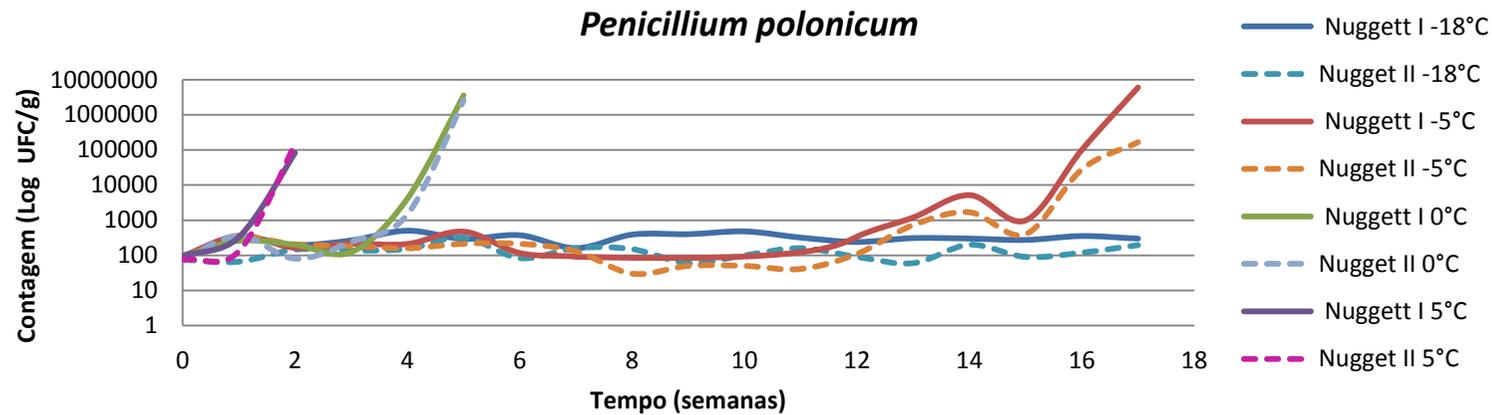


Figura 1a – Relação entre o tempo (em semanas) e UFC/g (log) da espécie *Penicillium polonicum* em empanado congelado de frango Nugget I e Nugget II

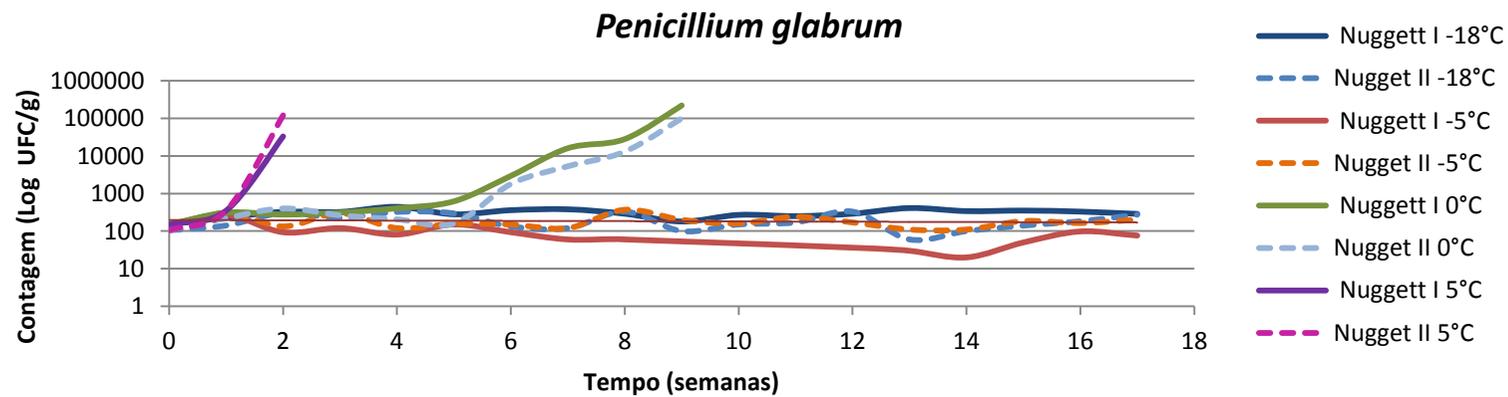


Figura 1b – Relação entre o tempo (em semanas) e UFC/g (log) da espécie *Penicillium glabrum* em empanado congelado de frango Nugget I e Nugget II

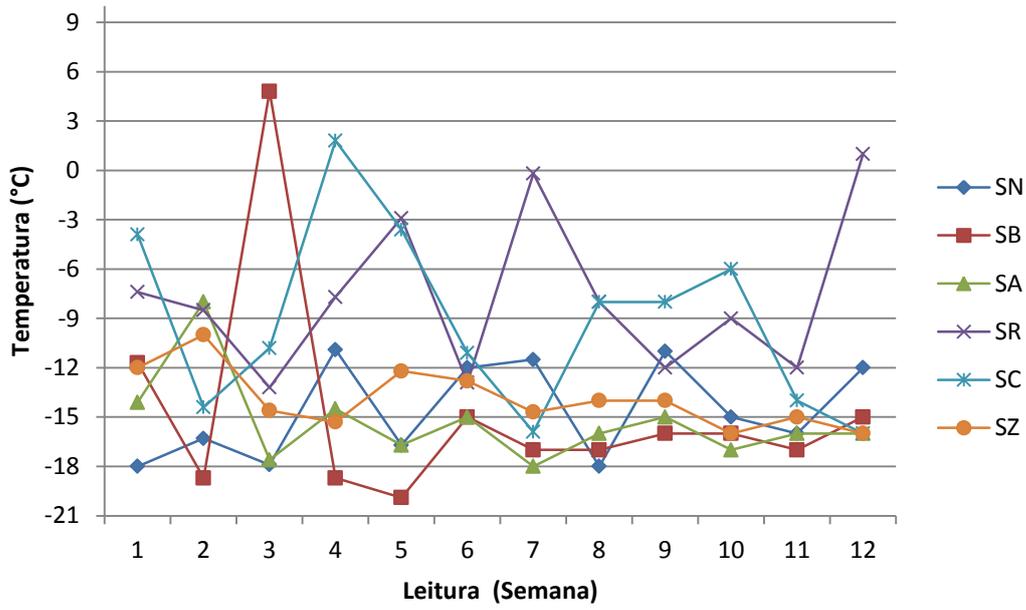


Figura 2a – Avaliação da temperatura no período da manhã dos estabelecimentos da cidade de Santa Maria-RS

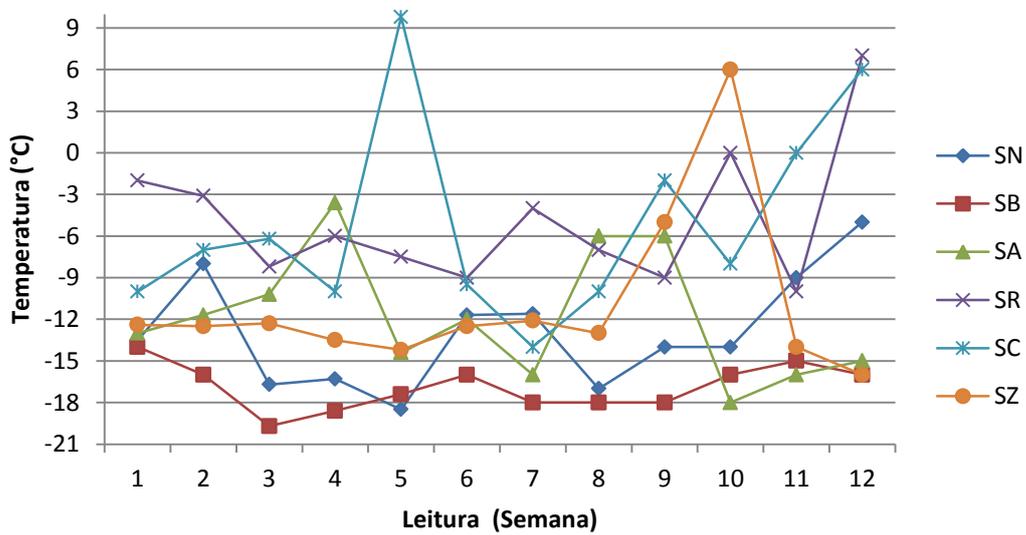


Figura 2b – Avaliação da temperatura no período da tarde dos estabelecimentos da cidade de Santa Maria-RS

Tabela 1 – Avaliação da temperatura nas gôndolas de comercialização de empanados congelados de frango em estabelecimentos comerciais da cidade de Santa Maria – RS.

| Supermercado | Período avaliado | | | |
|--------------|-----------------------------|---------|------------------------------|---------|
| | Manhã | | Tarde | |
| | Temperatura (°C) | T° Máx. | Temperatura (°C) | T° Máx. |
| SB | -14,77±6,52 ^{a*} | 4,8 | -16,89 ± 1,64 ^a | -14 |
| SA | -15,32±2,60 ^a | -8 | -11,82 ± 4,56 ^{a b} | -3,6 |
| SC | -9,15 ± 5,56 ^{bc} | 1,8 | -5,07 ± 7,16 ^d | 9,8 |
| SN | -14,6 ± 2,9 ^a | -11 | -12,09 ± 4,06 ^{a b} | -5 |
| SR | -7,73 ± 4,78 ^c | 1 | -6,07 ± 3,12 ^{cd} | 0 |
| SZ | -13,88 ± 1,81 ^{ab} | -10 | -10,9 ± 5,54 ^{bc} | 6 |

^a Médias na mesma coluna com letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05).

*Médias ± desvio padrão das leituras de temperaturas em °C dos estabelecimentos avaliados

6 CONCLUSÕES

- Os principais fungos envolvidos na deterioração de empanados congelados de frango foram *Penicillium glabrum*, *Penicillium polonicum*, *Penicillium manginii*, *Penicillium solitum* e *Penicillium crustosum*. Embora um total de 15 espécies tenha sido isolado, *Penicillium polonicum* e *Penicillium glabrum* foram as espécies predominantes em 28,6 e 42,8%, respectivamente, das amostras deterioradas.
- As micotoxinas produzidas pelas espécies avaliadas neste estudo foram: ácido ciclopiazônico, citreoviridina, roquefortina C, penitrem A e verrucosidina;
- Dentre as temperaturas avaliadas neste estudo (-18°C, -5°C, 0°C e 5°C), *Penicillium polonicum* e *Penicillium glabrum* apresentaram, respectivamente, -5°C e 0°C como a temperatura mínima na qual houve desenvolvimento de colônias visíveis na superfície dos empanados congelados de frango.
- Das avaliações de temperatura realizadas nas gôndolas onde os empanados congelados de frango eram armazenados nos seis estabelecimentos comerciais de Santa Maria-RS avaliados neste estudo, apenas 9,65% apresentavam temperaturas iguais ou inferiores a -18°C. Por outro lado, 7% apresentavam temperatura igual ou superior à 0°C, com um máximo de 9,8°C. Se for considerada a temperatura de armazenamento recomendada pelos fabricantes de empanados congelados de frango de -12°C ou inferior, 36% das leituras realizadas encontravam-se acima deste valor.

7 BIBLIOGRAFIA

ABRAS. **Associação brasileira de supermercados.** Disponível em: <http://www.abras.com.br/>. Acesso em 13 mai. 2013.

ADAMS, M. R.; MOSS, M.O. **Food Microbiology.** Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1995. 398 p.

ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. **Food Microbiology.** 2 ed. The Royal Society of Chemistry. Londres, Reino Unido. 2000. 479 p.

ANDERSEN, B., THRANE, U. Food-borne fungi in fruit and cereals and their production of mycotoxins. In: _____ **Advances in Food Mycology.** Hocking, A.D., Pitt, J.I., Samson, R.A., Thrane, U. (Eds.), Springer, New York, 2006. p. 137–152.

ARCHER, D. L. Freezing: an underutilized food safety technology? **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, p. 127-138. 2004.

ÁVILA, C. P. Formados In: _____ **O mundo do frango: cadeia produtiva da carne de frango.** OLIVO, R. Criciúma. Ed. do autor, 2006. 481p

AYMERICK, T., PICOUET, P.A., MONFORT, J.M.; Decontamination technologies for meat products. **Meat Science**, v.78, p. 114-129, 2008.

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

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

BEHM, C., FÖLLMANN, W., DEGEN, G. H. Cytotoxic potency of mycotoxins in cul-tures of V79 lung fibroblast cells, **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 75 p. 1226–1231. 2012.

BERG, T. How to establish international limits for mycotoxins in food and feed. **Food Control**, Guildford, v. 14, p. 219-224, 2003.

BORGES, L.R.; PIMENTEL, I.C.; BEUX, M.R.; TALAMINI, A. Contagem de fungos no controle de qualidade da erva-mate (*Ilexparaguariensis*St.-Hill) e isolamento de gêneros potencialmente micotoxigênicos. **Bol CPPA**, Curitiba, v. 20, n. 1, p. 103-10, jan./jun. 2002.

BORTOLUZZI, R. C.; Empanados In: _____ **O mundo do frango: cadeia produtiva da carne de frango**. OLIVO, R. Criciúma. Ed. do autor, 2006. 680 p.

BRASIL. Portaria n.º 710 de 10 de junho de 1999. **Dispõe sobre a Política Nacional de Alimentação e Nutrição**. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/portaria/1999.htm>. Acesso em: 12 jun 2012.

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

DELAZARI, I. Microbiologia de carnes. **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v 52, p. 25-60, 1977.

DIAS, M. A. Congelação de Alimentos em Restaurantes. Alicontrol – Tecnologia e Controlo de Alimentos, Lda. **Segurança e Qualidade Alimentar**, v. 2, p. 40-41. 2007.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2002. 196 p.

FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A., Filamentous fungi in foods and feeds: ecology, spoilage and mycotoxin production. In: _____ **Handbook of applied mycology**. Arora, D. K.; Mukerji, K. G.; Marth, E. H. (Eds.), Foods and Feeds, New York: Marcel Dekker, 1991. v. 3, p. 31-68.

GARBUTT, J. **Essentials of Food Microbiology**. Arnold. Londres, Reino Unido. 1997. 251 p.

GIBSON, A.M.; HOCKING, A.D. Advances in predictive modelling of fungal growth in food. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, p. 353– 358. 1997.

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.

HAWKINS, D. I.; MOTHERSBAUGH, D. L.; BEST, R. J. **Comportamento do consumidor – construindo a estratégia de marketing**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

HARRIGAN, W. F. **Laboratory methods in food microbiology**. 3 ed. London: Academic Press, 1998. 531 p.

HARTEL, R. W.; HELDMAN, D. R. **Principles of Food Processing**, New York. 1997. 288 p.

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, Amsterdam, v. 167, p. 101-134. 2001.

KRSKA, R. Mycotoxins. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, p. 1203–1204. 2009

WHITE, C. A.; HALL, L. P. The effect of temperature abuse on *Staphylococcus aureus* and *Salmonellae* in raw beef and chicken substrates during frozen storage. **Food Microbiology**, v. 1, p. 29-38. 1984.

WHITE, M. K.; PARISH, M. E. Spore germination of citrus juice-related fungi at low temperatures. **Food Microbiology**, v. 12 ,p. 237-243. 1995

HUISIN'T VELD, J. H. J. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, p. 1-18, 1996.

IARC. International Agency for Research on Cancer, 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, 571 p. 1993.

INGRAIN, M., UACKEY, B. M. **Inhibition and inactivation of vegetative microbes**. Academic, London. p. 111-151. 1978

JAY, J.M.; LOESSNER, M. J.;GOLDEN D.A., **Modern Food Microbiology**. Springer Science and Bussiness Media, Inc. USA. 2005. 790 p.

KUEHN, H. & MAILLARD, G. F. Psychrophilic and mesophilic fungi in fruit-filled pastries. **Applied Microbiology**, v. 10, p. 354-358. 1962.

LEISTNER, L., RODEL, W., KRISPIEN, K. **Water activity: influences on food quality**. Academic, London, 1981. p. 855-916.

LEITÃO, M. F. F.; HAGLER, L. C. S. M.; HAGLER, A. N.; MENEZES, T. J. B. **Tratado de microbiologia: microbiologia de alimentos, sanitária e industrial**. São Paulo: Manole, 1988. v.1, 181 p.

LOWRY, P. D; GILL, C. O.; Mould growth on meat at freezing temperatures. **Revue Internationale du Froid**, v.7, n.2, p. 133-136, 1984.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2012. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/mercado-interno>>. Acesso em 10 mar. 2012.

MARAGOS, C. M. Recent advances in the development of novel materials for mycotoxin analysis. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 395, p. 1205–1213. 2009.

MCMEEKIN, T. A.; OLLEY, J. N.; RATKOWSKY, D.A., ROSS, T. Predictive microbiology: towards the interface and beyond. **International Journal of Food Microbiology**, v.73, p.395– 407. 2002.

MILLER, S. A., Novel foods: safety and nutrition. **Food Technology**, v.46, n.3, p.114-117. 1992.

MÜRMAN, L.; MALLMANN, C. A.; DILKIN, P. Temperaturas de conservadores a frio em estabelecimentos que comercializam alimentos na cidade de Santa Maria, RS. **Revista Higiene Alimentar**. São Paulo, v.18, n.24, p.30-34, set. 2004

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de alimentos: alimentos de origem animal**. 1 ed., Porto Alegre: Editora Artmed, 2005. 293 p.

PAIS, E. **Higiene e Segurança Alimentar numa Pizzeria: Controlo Estatístico da Temperatura**. 2007

PITT, J. I.; HOCKING, A.D. Penicillium and related genera. In: _____ **Fungi and food spoilage**. ed. London, Blackie Academic & Professional. 1997. p. 281–284.

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

RIZVI, S. **Food Processing and Preservation Technologies**. Department of Food Science. Cornell University. E.U.A. 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 in *Aspergillus* section *Nigri*. **Studies in Mycology**, v. 50, p. 45-61. 2004.

SCHOLTE, R.P.M., SAMSON, R.A., DIJKSTERHUIS, J. Spoilage fungi in the industrial processing of food. In: _____ **Introduction to Food- and Airborne Fungi**, Samsons, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C., Filtenborg, O. (Eds.), 6 ed. Centaalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, 2002.

SINIGAGLIA, M., CORBO, M. R., CICCARONE, C., Influence of temperature, pH and water activity on "in vitro" inhibition of *Penicillium glabrum* (Wehmer) Westling by yeasts. **Microbiology Research**, v. 153, p. 137-143, 1998.

SILVA JUNIOR, Ê. A. **Manual de controle higiênico sanitário em alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2002.

SONJAK, S., LI_CEN, M., FRISVAD, J. C., GUNDE-CIMERMAN, N. The mycobiota of three dry-cured meat products from Slovenia. **Food Microbiology**, v. 28, p. 373-376. 2011.

SOTO, F. R. M., *et al.*, Proposta e análise crítica de um protocolo de inspeção e de condições sanitárias em supermercados do município de Ibiúna- SP. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 9, n. 2, p. 235-41. 2006.

VAAMONDE, G.; PATRIARCA, A.; PINTO, V.F.; COMERIA, R.; DEGROSSI, C., Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* Section *Flavi* from different substrates in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p. 79–84, 2003.

VARNAM, A.H.; SUTHERLAND, J. P. **Meat and Meat Products: Technology, chemistry and microbiology**. London: Chapman & Hall. 1995. 430 p.

VITALI, A. A.; QUAST, D. G. **Vida útil de alimentos. Reações de transformação e vida útil de alimentos processados**. 3 ed. Campinas: ITAL, 2004. cap 3, p. 49 – 57.

ZEUTHEN, P.; BOGH-SORENSEN, L. **Food preservation techniques**. Editora Woodhead Publishing. 2003. 400 p.

THORNTON, H.; GRACEY, J. F. **Textbook of meat hygiene**. Bailliere Tinda II, London, p. 475-478. 1974.

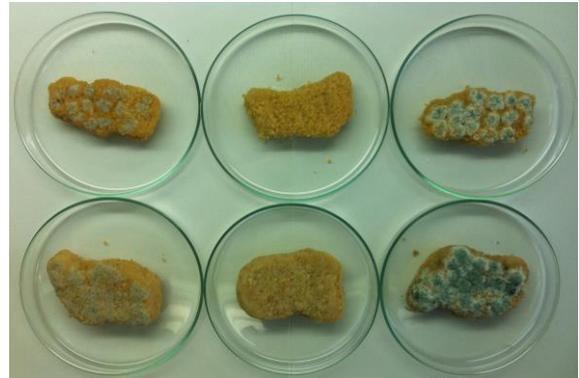
WILLIAMS, A.P.; NEAVESP., Other type of spoilage moulds. In: _____ **Food Spoilage Microorganisms**, C. W. Blackburn, CRC Press, Woodhead, UK, 2006. v. 122, cap. 4, p. 488-503.

WILLIAMS, S. R. **Fundamentos de Nutrição e Dietoterapia**. 6. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.

ANEXOS



Inoculação de esporos fúngicos das espécies *Penicillium polonicum* e *Penicillium glabrum*



Aos 14 dias a 5°C Colônias fúngicas visíveis de *Penicillium glabrum* à esquerda e *Penicillium polonicum* à direita, em contraste com amostras controle ao centro. (Nuggets I: placas inferiores; Nuggets II: Placas superiores.)



Colônias fúngicas de *P. polonicum* em Nuggets I aos 14 dias de armazenamento a 5°C.



Colônias fúngicas de *P. polonicum* em Nuggets II aos 14 dias de armazenamento a 5°C.



Colônias fúngicas de *P. glabrum* em Nuggets I aos 14 dias de armazenamento a 5°C.



Colônias fúngicas de *P. glabrum* em Nuggets II aos 14 dias de armazenamento a 5°C.