

# AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS DETERIORADORES EM DIFERENTES ATMOSFERAS DE OXIGÊNIO

Renato Souza Cruz<sup>1</sup>  
Nilda de Fátima Ferreira Soares<sup>2</sup>  
Nélio José de Andrade<sup>2</sup>  
Danilo José Pereira da Silva<sup>2</sup>

## RESUMO

Fungos são os principais microrganismos deterioradores de produtos de panificação e, por serem aeróbios estritos, exigem uma quantidade mínima de oxigênio para se desenvolverem. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de absorvedores de oxigênio e de atmosfera modificada com N<sub>2</sub> na multiplicação dos fungos filamentosos *Aspergillus niger* e *Penicillium* isolados de massa de pizza comercial. Placas de Petri contendo meio BDA foram inoculadas com 1 mL de suspensão com aproximadamente 5 x 10<sup>2</sup> UFC/mL de cada fungo separadamente. As placas foram colocadas dentro de dessecadores com solução salina de NaCl, para obter umidade relativa de 75%, e incubadas em temperatura ambiente. Seis condições, com diferentes níveis de O<sub>2</sub>, foram obtidas dentro dos dessecadores. Três delas, contendo, 5, 2 e 1% de oxigênio remanescente, foram obtidas por meio de sachês absorvedores de O<sub>2</sub>, à base de ferro, modelo FT-300, da O-Buster. Uma quarta contendo aproximadamente 20,4, nível aproximado encontrado no ar atmosférico e outras duas por meio da modificação com nitrogênio, 0,6 a 0,7% e de 5 a 7% de O<sub>2</sub> remanescente. Observou-se que na faixa de concentração menor que 1% de O<sub>2</sub>, houve inibição significativa (p<0,05) do desenvolvimento dos fungos *Aspergillus niger* e *Penicillium* spp.

**Palavras-chave:** absorvedor de oxigênio, atmosfera modificada, multiplicação de microrganismo.

## ABSTRACT

### EVALUATION OF THE SPOILAGE MOLDS GROWTH IN OXYGEN DIFFERENT ATMOSPHERES

Molds are the main spoilage microorganisms of bakery products and they need a minimal oxygen concentration to grow, since they are strictly aerobic microorganisms. This work evaluated the oxygen absorbers and nitrogen modified atmosphere efficiency in the *Aspergillus niger* and *Penicillium* growth isolated from commercial pizza. One milliliter volumes of suspensions of molds with approximately 5,0x10<sup>2</sup> CFU.ml<sup>-1</sup> each were spread on PDA surfaces contained in Petri dish. The plates dishes were incubated in tightly closed desiccators with 20,4, 5-7 and 0-1% oxygen concentration, obtained by the nitrogen injection, and, 5, 2 or 1% of oxygen obtained by the iron based O<sub>2</sub> absorbent system in sachet form. The 1% oxygen concentration, regarding of the system used, was more efficient to retard the growth of both molds. On the other hand, the sachet showed higher oxygen absorption capacity than that nominated by the manufacturer. This overestimated sachet quantity necessary, carrying a larger cost.

**Key words:** oxygen absorbent, modified atmosphere, microbial growth

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana, BA. E-mail cruz.rs@gmail.com

<sup>2</sup>Departamento de Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG. E-mails: nfsoares@ufv.br; nandrade.ufv.br

## INTRODUÇÃO

A maior parte dos alimentos, de origem vegetal ou animal, deteriora-se com facilidade, perdendo em qualidade e diminuindo sua vida útil. Essa perda depende da composição, formulação, condição de estocagem e do tipo de embalagem usada (Abe & Kondoh, 1989).

A manutenção da qualidade de um produto e sua conservação é baseada, primordialmente, no retardamento, na inibição ou na prevenção do desenvolvimento microbiano. Dentre os fatores que afetam a multiplicação de microrganismo, incluem-se a composição química, a atividade de água (Aa), o teor de umidade, a temperatura de armazenamento e o potencial de oxirredução dos alimentos (Floros *et al.*, 1997; Vermeiren *et al.*, 1999). O potencial de oxirredução, medido em mV, é negativo ou positivo em função do equilíbrio entre as quantidades de substâncias oxidantes e redutoras. Este potencial é muito afetado pela quantidade de oxigênio disponível, pois o oxigênio favorece as condições oxidantes, permitindo o desenvolvimento dos microrganismos aeróbios. Sua ausência favorece a multiplicação de anaeróbios devido às condições redutoras (Sarantópoulos *et al.*, 2002)

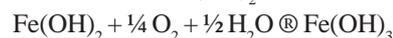
Segundo Rooney (1995), 0,1% de oxigênio ou menos é exigido para prevenir o desenvolvimento da maioria dos fungos. Esses microrganismos sempre causam problemas porque os esporos de algumas espécies são termorresistentes e capazes de se desenvolverem em baixa Aa, até em 0,60. Com relação ao pH, fungos toleram pH de 2,0 a 9,0, sendo 5,6 o nível ótimo. Alguns fungos filamentosos, como *Rhizopus*, *Alternaria*, *Cladosporium* spp., apresentam uma considerável taxa de multiplicação em ambientes com apenas 0,2% de O<sub>2</sub> (Abe, 1989; Nakamura & Hoshino, 1983). O uso de absorvedores de oxigênio pode prevenir o desenvolvimento da maioria dos fungos alteradores de alimentos, microrganismos aeróbios estritos, pois diminuem a quantidade de oxigênio a concentrações próximas de 0,01% (Vermeiren *et al.*, 1999; Nakamura & Hoshino, 1983).

Deve-se ressaltar, no entanto, que atmosferas livres de O<sub>2</sub> aliadas a uma atividade de água maior que 0,92, podem ser apropriadas para a multiplicação de alguns microrganismos patogênicos, incluindo *Clostridium*

*botulinum*. Assim, o uso de sachês absorvedores de O<sub>2</sub> deve ser combinado com outras técnicas de conservação, como baixas temperaturas, para a garantia da segurança alimentar.

Os absorvedores de O<sub>2</sub> comercialmente disponíveis estão em forma de pequenos sachês contendo agentes metálicos redutores, incluindo óxido de ferro em pó, carbonato ferroso e platina metálica. De forma geral, a tecnologia dos absorvedores baseia-se na oxidação de pó de ferro, ácido ascórbico ou na ação de polímero fotossensível, enzimas, entre outros (Floros *et al.*, 1997; Labuza & Breene, 1989; Rooney, 1995; Vermeiren *et al.*, 1999). Os absorvedores de constituição metálica utilizam o princípio da oxidação do ferro na presença de água (Smith, 1990). Segundo McKedy (2002) as partículas de ferro são prontamente combinadas com o O<sub>2</sub>, por isso são muito utilizadas. Porém, em ambiente seco é necessária adição de um composto absorvedor de umidade para produzir ação eletrolítica necessária para ativar o absorvedor de O<sub>2</sub>.

De acordo com Abe & Kondoh (1989), o mecanismo é muito complexo para ser expresso por uma fórmula simples, mas geralmente é representado como:



De acordo com Shorter (1982), se a taxa de oxidação do produto e a taxa de permeabilidade a O<sub>2</sub> da embalagem forem conhecidas, torna-se possível calcular a quantidade de ferro requerida para manter o nível de O<sub>2</sub> desejado durante o tempo de estocagem (Labuza & Breene, 1989). Vários autores (Labuza, 1987; Nakamura & Hoshino, 1983; Vermeiren *et al.*, 1999) relatam que 1g de ferro reagirá com 300 cm<sup>3</sup> de O<sub>2</sub>.

Nakamura e Hoshino (1983), com base na reação do ferro com o oxigênio, em pressão atmosférica com diferentes umidades relativas, observaram que, em geral, 1 g de ferro pode reagir com 0,0136 mol de oxigênio, que equivale a um consumo de 3,36 x 10<sup>-1</sup> L de oxigênio se o ferro estiver em solução e totalmente disponível.

Segundo Abbott (2002), as principais vantagens do uso dos absorvedores é a sua capacidade de reduzir os

níveis de O<sub>2</sub> para menos de 0,01%, que é menor do que os tipicamente encontrados (0,3-3%) nos sistemas tradicionais de atmosfera modificada, vácuo ou substituição da atmosfera interna por gás inerte. Assim, esse método tem despertado interesse como uma nova tecnologia de embalagem para preservar os alimentos, podendo substituir ou, principalmente, complementar as tecnologias empregadas para reduzir o nível de oxigênio no interior das embalagens (Abe & Kondoh, 1989; Nakamura & Hoshino, 1983).

Sabe-se que fungos filamentosos como *Aspergillus niger* e *Penicillium* spp são aeróbios estritos, exigindo uma quantidade mínima de oxigênio, para se desenvolverem. Além disso, são os principais microrganismos deterioradores de produtos de panificação, como pizza, macarrão tipo massa fresca, etc.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de absorvedores de oxigênio e atmosfera modificada com N<sub>2</sub> no desenvolvimento dos fungos *Aspergillus niger* e *Penicillium* spp.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para esse trabalho, foi utilizado sachê absorvedor de oxigênio à base de ferro, da marca O-Buster, modelo FT-300, desenvolvido para ser empregado em produtos com atividade de água máxima de 0,85, com capacidade de absorver até 300 mL de oxigênio (www.multisorb.com).

### Meio de cultura e inoculação dos fungos

Um mililitro de suspensão de esporos de *Aspergillus niger* e de *Penicillium* spp. contendo em torno de 5x10<sup>2</sup> UFC/mL, ambos isolados de massa de pizza, foi inoculado, separadamente, em placas de Petri contendo meio BDA. As placas inoculadas foram colocadas em dessecadores contendo solução saturada de NaCl, originando umidade relativa de 75%, em temperatura ambiente. Os dessecadores foram hermeticamente fechados e as atmosferas internas foram modificadas quanto ao teor de oxigênio.

### Atmosferas de O<sub>2</sub>

Foram usados seis níveis de oxigênio nos dessecadores: a) um foi composto pelo ar ambiente (20,4%); b) em outros dois, o ar interno foi substituído

por nitrogênio, até que fosse atingido os níveis entre 5 e 7% e 0 e 1% de O<sub>2</sub>; e c) em outros três foram adicionados sachês absorvedores de O<sub>2</sub> em quantidade suficiente para atingir concentrações de oxigênio remanescentes de aproximadamente 1, 2 e 5%. Alíquotas de 3 mL da atmosfera do interior dos dessecadores foram retiradas e injetadas no analisador de oxigênio (MOCON, HS 750) para quantificação do teor, em intervalo de 24 horas.

### Desenvolvimento dos fungos

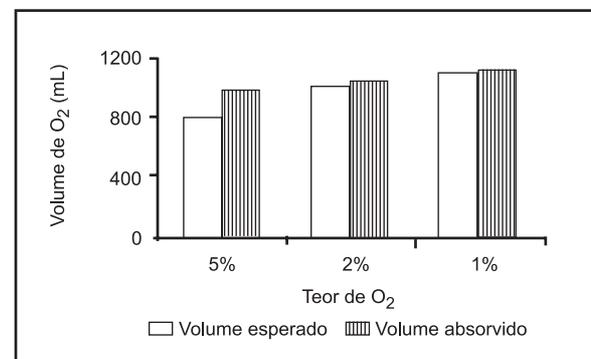
As placas foram avaliadas visualmente até o surgimento da primeira unidade formadora de colônia, que indicou o término do experimento, baseado em ANVISA-RDC n°12/MS (2001).

### Análise Estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 3 (três) repetições, sendo os resultados submetidos a análise de variância e quando pertinentes a teste de média utilizando o programa SAS, versão 8.0.

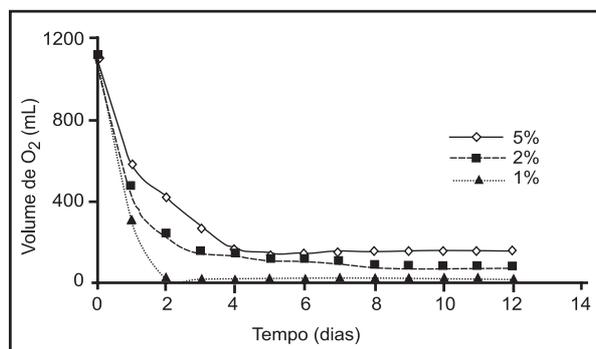
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os sachês apresentaram variação na capacidade de absorção do oxigênio, dependendo do número utilizado no experimento. Assim, à medida que se aumentou o número de sachês, a diferença entre o volume de oxigênio absorvido e o volume indicado pelo fabricante foi menor. Essa variação pode ter sido devida ao microambiente criado em torno do sachê (Figura 1).



**Figura 1.** Volumes (mL) esperado e real de O<sub>2</sub> absorvidos nos dessecadores sob umidade relativa de 75% e temperatura de 25±2°C.

Foi observado que o volume de O<sub>2</sub> absorvido pelo sachê diminuiu assintoticamente, ao longo do tempo, devido à reação irreversível do ferro com o O<sub>2</sub> (Figura 2).



**Figura 2.** Quantidade de O<sub>2</sub> remanescente dentro dos dessecadores sob umidade relativa de 75% e temperatura de 25 ± 2 °C.

Essas informações foram importantes para entender os resultados encontrados para o crescimento de *Penicillium spp* e *Aspergillus niger*.

Verificou-se que esses fungos por serem aeróbios estritos, foram controlados somente em atmosferas com teor de O<sub>2</sub> menor do que 1%. Nas atmosferas testadas, o aparecimento de unidades formadoras de colônias de *Aspergillus niger* e *Penicillium spp.* foi observado em períodos diferentes, de acordo com a concentração de O<sub>2</sub> em estudo (Tabela 1).

Pela substituição do ar no interior da embalagem por nitrogênio, ou pela ação dos absorvedores, aumenta-se o tempo necessário para o aparecimento das unidades formadoras de colônias dos fungos. Dentre as seis concentrações de oxigênio utilizadas, notou-se que, no teor abaixo de 1%, ocorreu maior inibição (p<0,05) da multiplicação dos fungos testados, que necessitou de 14 e 15 dias, para crescimento do *Aspergillus niger* e *Penicillium spp.*, respectivamente.

Quando a concentração de O<sub>2</sub> diminuiu para valores abaixo de 1%, utilizando nitrogênio, observou-se que o tempo necessário para o aparecimento da primeira unidade formadora de colônia foi aumentado em 225 e 250%, respectivamente, para *Aspergillus niger* e *Penicillium spp.* Com o uso do sachê, esse aumento foi de 280 e 300%, respectivamente. A multiplicação mais rápida dos fungos nos dessecadores com N<sub>2</sub> provavelmente deveu-se à melhor e mais rápida adaptação dos fungos à atmosfera restrita de O<sub>2</sub>, tendo em vista que a pressão atmosférica interna não foi alterada. Nos dessecadores contendo sachês absorvedores de oxigênio, a redução da concentração ou da pressão parcial de O<sub>2</sub> deu-se por sua absorção, reduzindo o volume interno do gás. Esta redução de volume, conseqüentemente, promoveu a diminuição da pressão atmosférica (atmosfera hipobárica) dentro dos dessecadores, o que pode representar um fator adicional na redução do desenvolvimento dos fungos.

Smith *et al.* (1986) relatam que os sachês absorvedores reduzem o teor de O<sub>2</sub> do espaço livre de embalagens impermeáveis em valores menores que 0,05%. Esses pesquisadores também concluíram que não ocorreu o desenvolvimento de fungos em produtos alimentícios acondicionados contendo teores de oxigênio de 0,4% no espaço livre das embalagens. Neste experimento, foram detectados teores menores que 1%, limite de detecção do analisador de oxigênio, quando foram utilizados três sachês no interior do dessecador (5L) com umidade relativa de 75%. Smith *et al.* (1990), usando *Aspergillus niger* e esporos de *Penicillium spp.*, mostraram que os sachês absorvedores de O<sub>2</sub> são uma alternativa mais eficiente para estender a vida de prateleira dos produtos de panificação sem o aparecimento de fungos, em comparação com a

**Tabela 1.** Tempo de aparecimento das unidades formadoras de colônias de *Aspergillus niger* e *Penicillium spp.* nas diferentes atmosferas de oxigênio, obtidas pela injeção de nitrogênio ou ação química do sachê absorvedor de O<sub>2</sub>

Ambiente	Oxigênio (%)	<i>Aspergillus niger</i> *	<i>Penicillium spp</i> *
		(dias)	(dias)
Nitrogênio	20,4	3 <sup>d</sup>	4 <sup>c</sup>
	5 a 7	4 <sup>c,d</sup>	4 <sup>c</sup>
	<1	9 <sup>b</sup>	10 <sup>b</sup>
Absorvedor	5	4 <sup>c,d</sup>	5 <sup>c</sup>
	2	5 <sup>c</sup>	5 <sup>c</sup>
	<1	14 <sup>a</sup>	15 <sup>a</sup>

\* Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05).

atmosfera de nitrogênio. O estudo demonstrou que nos produtos embalados com ar ocorreu a multiplicação visível de fungos em 5 a 6 dias, com a substituição do ar por nitrogênio, em 9 a 11 dias, e com a substituição do ar com CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> (60:40) de 16 a 18 dias. Ao utilizar essas mesmas atmosferas modificadas juntamente com o sachê absorvedor de O<sub>2</sub>, o desenvolvimento de fungos não foi visível até 60 dias de estocagem a 25 °C. A embalagem utilizada foi um laminado de nylon e polietileno com permeabilidade média de 40 cm<sup>3</sup>.m<sup>-2</sup>.dia<sup>-1</sup> para O<sub>2</sub>, 14 cm<sup>3</sup>.m<sup>-2</sup>.dia<sup>-1</sup> para N<sub>2</sub> e 155 cm<sup>3</sup>.m<sup>-2</sup>.dia<sup>-1</sup> para CO<sub>2</sub>, a 25°C e com 100% de umidade relativa. Este experimento foi realizado em um sistema com dessecadores, que atuaram como barreira à penetração de oxigênio, no entanto utilizou-se meio de cultura para avaliar o desenvolvimento dos fungos, o que contribuiu para o crescimento deles em tempo mais curto.

O conhecimento do teor mínimo de O<sub>2</sub> exigido pelos fungos para multiplicação é de fundamental importância para adequação da embalagem ao produto e, conseqüentemente, à quantidade de absorvedor necessária para atingir essa concentração mínima. Neste estudo, observou-se que, na faixa de concentração menor que 1%, houve um retardamento significativo (p<0,05) do desenvolvimento dos fungos *Aspergillus niger* e *Penicillium* spp.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem apoio financeiro da CAPES, CNPq, FAPEMIG e FINEP

## REFERÊNCIAS

Abbott R (2002) Intelligent paper packaging of unwrapped. Disponível em: <<http://www.pirapackaging.com>>. Acesso em: 16 de outubro de 2002.

Abe Y & Kondoh Y (1989) Oxygen absorbers in: CA/MA Vacuum Packaging of Foods. Trumbull, Westport, CT: Food and Nutrition. p.149-158.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (2001) – RDC n° 12 – Ministério da Saúde.

Floros JD, Dock LL & Han JH (1997) Active packaging

technologies and applications. Food Cosmetics and Drug Packaging 20:10-17.

- Labuza TP (1987) Oxygen scavenger sachets. Food Research 32:276-277.
- Labuza TP & Breene WM (1989) Applications of “active packaging” for improvement of shelf-life and nutritional quality of fresh and extended shelf-life foods. Journal of Food Processing and Preservation 13:1-69.
- Mckedy GE (2002) Oxygen absorber Patente n° US 6,436,872 B2.
- Nakamura H & Hoshino J (1983) Technique for the preservation of food by employment of oxygen absorbers. Technical information Mitsubishi Gas Chemical Co., Tokyo Ageless Division. p. 1-45.
- Rooney ML (1995) Active Food Packaging. London: Blackie Academic and Profession.
- Sarantópoulos CIGL, Oliveira LM & Canavesi E (2001) Requisitos de conservação de alimentos em embalagens flexíveis. CETEA/ITAL. 213 p.
- Shorter AJ (1982) Evaluation of rapid methods for scavenging oxygen in flexible pouches. Lebens. Wiss u. Technol. n.15. p.380-381.
- Smith JP, Hoshino J & Abe Y (1995) Interactive packaging involving sachet technology. In: Rooney, ML Active food packaging. Glasgow: Blackie Academic and Profession. p.143-173.
- Smith JP, Oraikul B, Koersen WJ, Jackson ED & Lawrence RA (1986) Novel approach to oxygen control in modified atmosphere packaging of bakery products. Food Microbiology 3:315-320.
- Smith JP, Ramaswamy HS & Simpson BK (1990) Development in food packaging technology, part 2: storage aspects. Trends in Food Science and Technology 11:111-118.
- Vermeiren, L., Devlieghere, F., Van Besst, M., Kruijf, N., & Debevere, J. (1999). Developments in the active packaging of foods. *Trends in Food Science and Technology* 10, 77–86.