

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos**

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E ESTUDO DA
RESISTÊNCIA TÉRMICA DE FUNGOS FILAMENTOSOS
TERMORRESISTENTES EM PRODUTOS DE FRUTAS**

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos

BEATRIZ DE CÁSSIA MARTINS SALOMÃO

Orientadora: Profa. Dra. Gláucia M. F. Aragão

Co-orientadora: Profa. Dra. Pilar Rodriguez de Massaguer

Florianópolis, março de 2002

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos**

BEATRIZ DE CÁSSIA MARTINS SALOMÃO

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E ESTUDO DA
RESISTÊNCIA TÉRMICA DE FUNGOS FILAMENTOSOS
TERMORRESISTENTES EM PRODUTOS DE FRUTAS**

Florianópolis, março de 2002

*“O conhecimento real é saber a extensão da própria ignorância”
(Confúcio)*

*“Aguardar até saber o bastante para agir é condenar-se à imaturidade”
(Jean Rostand)*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas aquelas pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram na execução deste trabalho:

À minha orientadora: Professora Gláucia M. F. Aragão, a quem devo agradecer por ter sido muito mais que uma professora. Amiga compreensiva com quem eu aprendi, entre tantas coisas, a admirar os seres microscópicos e a enfrentar os desafios com otimismo.

À minha co-orientadora: Professora Pilar Rodriguez de Massaguer a quem agradeço a generosidade de ter compartilhado comigo seu conhecimento e ter me propiciado enormes oportunidades.

Aos membros da banca examinadora, Denise Delgado e Luiz Carlos Petros, pela minuciosa correção deste trabalho.

À minha irmã Laila, a quem agradeço a grande generosidade em me apoiar durante todo o período de execução do mestrado. Sem seu auxílio, seria impossível chegar à conclusão deste trabalho.

À minha mãe, Ana Maria, e ao meu irmão, Luiz Henrique, que me apoiaram de todas as maneiras que lhes foi possível.

Ao meu namorado Renato, por sempre ter me incentivado na realização de meus projetos.

À bolsista Cláudia, que me ajudou diretamente na execução da parte prática deste trabalho, sempre com muita disposição e inteligência.

À colega Vanessa, que me ajudou voluntariamente na identificação dos fungos isolados neste trabalho.

A todos os colegas do laboratório, pelo companheirismo e amizade: Denise, Roberta, Rogério, Ernandes, Leandro, Fátima, Alex, Cíntia, Sílvia, Francine, Cláudia, Thiago e João.

Ao Bruno A. M. Carciofi pelo grande auxílio que generosamente prestou neste trabalho.

Ao Dagoberto, a quem agradeço pela grande ajuda prestada.

*Dedico esta obra a Issa Miguel Salomão,
meu grande amigo, professor
e pai, que com muito entusiasmo
viu-me iniciar este trabalho e cuja
saudosa lembrança foi meu
alimento para sua finalização.*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
NOMENCLATURA.....	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vii
I – INTRODUÇÃO	1
II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
1. FUNGOS FILAMENTOSOS TERMORRESISTENTES DETERIORADORES DE ALIMENTOS	4
1.1 Características Gerais	4
1.2 Principais espécies de fungos termorresistentes.....	5
1.2.1 <i>Byssochlamys fulva</i> e <i>Byssochlamys nivea</i>	5
1.2.2 <i>Neosartorya fischeri</i>	5
1.2.3 <i>Talaromyces sp.</i>	6
1.2.4 <i>Eupenicillium sp.</i>	6
1.3 Distribuição e Fontes de Contaminação	6
1.4 Ocorrência	8

1.5 Metodologia para a detecção e enumeração de fungos termorresistentes em alimentos.....	11
1.6 Etapas da verificação da resistência térmica de fungos filamentosos termorresistentes.....	13
1.6.1 Produção e coleta de ascósporos	13
1.6.2 Ativação dos ascósporos.....	15
1.6.3 Determinação dos parâmetros de resistência térmica.....	17
1.6.4 Meio de recuperação dos ascósporos após ensaios de resistência térmica.....	18
1.7 Fatores que afetam a resistência térmica dos ascósporos.....	19
1.7.1 Variação de resistência entre as diferentes cepas de fungos termorresistentes	19
1.7.2 Influência do meio de aquecimento.....	19
1.7.2.1 pH	19

1.7.2.2 Ácidos Orgânicos	20
1.7.2.3 Sólidos Solúveis	22
1.7.2.4 Tipos de meios de aquecimento	23
1.7.2.5 Adição de conservantes	24
1.7.2.6 Tempo e temperatura de incubação	24
1.7.2.7 Características morfológicas e químicas dos fungos com a resistência térmica	25
1.8. Fatores que afetam o crescimento dos fungos	26
1.9 Efeitos da deterioração causada por fungos filamentosos termorresistentes em alimentos	28
1.10 Produção de Metabólitos	30
1.10.1 Produção de Enzimas	30
1.10.2 Produção de Micotoxinas	31
2. CINÉTICA DE INATIVAÇÃO TÉRMICA (MÉTODO DE LINEARIZAÇÃO DE ALDERTON & SNELL, 1970).....	32
2.1 Parâmetros de Resistência Térmica.....	34
III - MATERIAL E MÉTODOS	36
1 AMOSTRAGEM.....	36
1.1 Amostras do Processamento do Néctar de Maçã.....	36
1.2 Amostras das Polpas Comerciais de Morango e Uva Congeladas	38

1.3 Amostras de Sucos Pasteurizados e Preservados com Benzoato de Sódio e Sorbato de Potássio.....	38
2. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS TERMORRESISTENTES.....	39
2.1 Isolamento dos fungos filamentosos a partir de produtos de frutas	39
2.1.1 Amostras do processo produtivo de Néctar de Maçã	39
2.1.1.2 Amostras da matéria-prima (Maçã).....	40
2.1.2 Amostras de Polpas Comerciais Congeladas de Morango e Uva.....	40
2.1.3 Amostras de Suco de Morango e Uva Pasteurizados e Preservados	41
2.2. Identificação	41
3. ISOLAMENTO E ESTOCAGEM DAS CEPAS.....	42
3.1 Isolamento	42
3.2 Estocagem.....	42

4. SELEÇÃO DO ISOLADO MAIS TERMORRESISTENTE.....	43
4.1 Preparação das suspensões de fungos.....	43
4.1.1 Esporulação das cepas isoladas	43
4.1.2 Coleta dos ascósporos da Garrafa de Roux	43
4.2 Fabricação do suco de maçã	44
4.3 Determinação do tempo de subida da temperatura.....	44
4.4 Aplicação dos choques térmicos para a seleção do isolado mais termorresistente	44
5. ENSAIOS DE RESISTÊNCIA TÉRMICA COM A CEPA DE MAIOR IMPORTÂNCIA DENTRE AS MAIS TERMORRESISTENTES	45
5.1 Produção e coleta dos ascósporos do fungo termorresistente de maior importância comercial	45
5.2 Determinação das condições ótimas de ativação dos ascósporos.....	46
5.3 Determinação da resistência térmica	47
5.4 Avaliação da deterioração do suco de maçã causada pelo fungo mais importante dentre os mais termorresistentes.....	47
IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
1. OCORRÊNCIA DE FUNGOS FILAMENTOSOS A PARTIR DE PRODUTOS DE FRUTA	49
1.1 Ocorrência de fungos filamentosos nas diversas etapas do processamento de néctar de maçã.....	49

1.2 Ocorrência de fungos filamentosos em polpas comerciais congeladas de morango e uva	51
1.3 Ocorrência de fungos filamentosos em suco (morango e uva) pasteurizado e preservado com benzoato de sódio e sorbato de potássio	52
2. CARACTERÍSTICAS DAS ESPÉCIES ISOLADAS	54
3. SELEÇÃO DO FUNGO FILAMENTOSO MAIS TERMORRESISTENTE E DE MAIOR IMPORTÂNCIA COMERCIAL	56
4. AVALIAÇÃO DA DETERIORAÇÃO CAUSADA PELO FUNGO DE ALTA TERMORRESISTÊNCIA E DE GRANDE IMPORTÂNCIA COMERCIAL	60
5. ATIVAÇÃO ÓTIMA DOS ASCÓSPOROS DE <i>Neosartorya fischeri</i>	61
6. RESISTÊNCIA TÉRMICA DE <i>Neosartorya fischeri</i> 2PC	63

7. CÁLCULO DO VALOR DE ESTERILIZAÇÃO (F) PARA O CONCENTRADO DE MAÇÃ	72
V – CONCLUSÕES	75
VI - SUGESTÕES	77
VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
ANEXOS.....	87
ANEXO 1	88
ANEXO 2	90
1. Ágar Batata Dextrose (PDA, Merck)	90
2. Solução de Rosa de Bengala 5% (solução estoque)	90
3. Corante Lactofucsina para coloração dos esporos.....	90
4. Suspensão de Tween 80.....	90
5. Ágar Extrato de Malte (MEA).....	91
6. Ágar Czapek Extrato de Levedura (CYA)	91
7. Czapek Concentrado.....	92
8- Ágar Nitrato de Glicerol 25% (G25N).....	92
ANEXO 3	93
Imagem 1- Ascósporo de <i>Neosartorya fischeri</i> observados com objetiva de 100X.	93
Imagem 2- Asco e ascósporos de <i>Neosartorya fischeri</i> observados com objetiva de 100X.....	93

Imagem 3- Asco e ascósporos de <i>Byssochlamys fulva</i> observados com objetiva de 100X.....	94
Imagem 4- Ascósporos de <i>Byssochlamys fulva</i> observados com objetiva 40 X.....	94
Imagem 5- Cleistotécio, ascos e ascósporos de <i>Neosartorya fischeri</i> observados com objetiva de 40X.....	95
Imagem 6- Ascósporos de <i>Talaromyces</i> sp. observados com objetiva de 100X.....	96
Imagem 7- Gimnotécio de <i>Talaromyces</i> sp. observado com objetiva de 10X.....	96
Imagem 8- Cleistotécios de <i>Neosartorya fischeri</i> observados com objetiva de 10X.....	97
Imagem 9- Cleistotécios de <i>Neosartorya fischeri</i> observados com objetiva de 10X.....	97
Imagem 10- Cleistotécio de <i>Eupenicillium</i> sp. observado com objetiva de 10X.....	98
Imagem 11- Comparação entre o suco de maçã clarificado pela ação de enzimas pectinolíticas produzidas pelos ascósporos de <i>N. fischeri</i> 2PC (à esquerda), e outro suco sem inoculação (controle).....	99

LISTA DE FIGURAS

Figura III.1 – Fluxograma de elaboração do Néctar de Maça (Suco de Maçã Polposu).....	37
Figura IV.1 - Curvas de ativação dos ascósporos de <i>N. fischeri</i> 2PC quando aquecidos a 85°C em suco de maçã a 11,3°Brix com pH variável	62
Figura IV. 2 - Curvas de Inativação Térmica de ascósporos de <i>N. fischeri</i> 2PC nas temperaturas de 80°C, 85°C e 90°C em diferentes pHs do meio de aquecimento (suco de maçã, 11,3°Brix).....	64
Figura IV.3 - Curvas de Inativação Térmica de ascósporos de <i>N. fischeri</i> 2PC em suco de maçã (11,3°Brix), a diferentes pHs do meio de aquecimento (pH 2,5, pH 3,5 e pH 4,5) nas temperaturas de tratamento térmico.	65
Figura IV. 4 - Curvas linearizadas para a determinação do parâmetro “a” à temperatura de 80°C.....	67
Figura IV.5 – Curvas de linearização da inativação térmica de ascósporos de <i>N. fischeri</i> 2PC aquecidos a 80, 85 e 90°C em suco de maçã (11,3°Brix) com pH variável	69
Figura IV.6 - Determinação de Z^* para <i>N. fischeri</i> 2PC (Curva TDT - Equivalente)	71

LISTA DE TABELAS

Tabela II.1 – Parâmetros de resistência térmica de fungos filamentosos.....	34
Tabela III.1 - Descrição dos pontos do processo produtivo de néctar de maçã, de onde foram coletadas as amostras e seus respectivos códigos.....	38
Tabela III.2 – Binômios (Tempo/Temperatura) utilizados nos choques térmicos aplicados às cepas dos fungos isolados para a seleção da cepa de maior termorresistência	45
Tabela IV.1 – Número de Cepas identificadas do processo produtivo de Néctar de Maçã.....	49
Tabela IV.2 Cepas isoladas no processo produtivo de Néctar de maçã e seus respectivos códigos.....	50
Tabela IV.3 – Cepas isoladas de polpas comerciais congeladas de morango e de suco de morango pasteurizado e preservado com Sorbato de Potássio e Benzoato de Sódio (ambos utilizados na concentração de 70% do máximo permitido pela legislação).....	53
Tabela IV.4 – Diâmetro médio das colônias desenvolvidas pelas espécies isoladas após 7 dias de incubação nos meios e temperaturas de crescimento	55
Tabela IV.5- Espécies isoladas das diversas fases do processamento de néctar de maçã e seus limites de sobrevivência.	58
Tabela IV.6 – Limites de sobrevivência das espécies isoladas de polpas comerciais de morango e de suco de morango preservado e pasteurizado	59
Tabela IV.7 – Valores dos parâmetros “a” e seus coeficientes de correlação calculados à temperatura de 80°C nos diferentes pHs dos meios de aquecimento.....	67
Tabela IV.8 - Parâmetros da taxa de morte térmica (k e intercepto C) e os valores de resistência térmica (1/k) para ascósporos de <i>N. fischeri</i> 2PC em suco de maçã (11,3°Brix) a diferentes pHs.....	68
Tabela IV.9 - Valores de Z* para os ascósporos de <i>N. fischeri</i> 2PC e seus coeficientes de correlação (R ²) nos diferentes PHs do meio de aquecimento.....	71

Tabela 1 - Recuperação dos ascósporos de <i>N. fischeri</i> 2PC em suco de maçã (11,3°Brix) à temperatura de 85°C, nos diferentes pHs do meio de aquecimento	88
Tabela 2 - Contagem do número de ascósporos de <i>N. fischeri</i> 2PC que sobreviveram aos tratamentos térmicos a 80, 85 e 90°C em suco de maçã (11,3°Brix), a diferentes pHs do meio	89

NOMENCLATURA

CYA = Ágar Czapeck Extrato de Malte

D = Tempo necessário para reduzir em 90% a população inicial de microorganismos

G25N = Ágar Nitrato Glicerol 25%

MEA = Ágar Extrato de Malte

PDA = Ágar Batata Dextrose

rpm = Rotações por minutos

TDT = Tubos de morte térmica

Z = Intervalo de temperatura (°C) necessário para ocasionar uma variação de 10 vezes no valor de D

γ = Redução de ciclos logarítmicos ($\gamma = -\log N/N_0$)

RESUMO

Os fungos filamentosos termorresistentes têm sido freqüentemente implicados na deterioração de produtos alimentícios, devido à habilidade que possuem em sobreviver às temperaturas normalmente empregadas nos tratamentos de pasteurização, fornecidos a alimentos ácidos, como frutas e seus derivados. A resistência ao calor destes fungos varia de cepa para cepa e com a natureza do meio de aquecimento (pH, °Brix, tipo de meio, etc.). Os objetivos deste trabalho são: a) isolar e identificar fungos termorresistentes em três tipos de produtos (amostras retiradas durante o processo produtivo de néctar de maçã (pH 3,45, 11,6°Brix), polpas comerciais congeladas de morango (pH 3,9, 9,2°Brix) e uva (pH 3,6, 13°Brix) e sucos de morango (pH 2,9, 22°Brix) e uva (pH 2,9, 74,4°Brix) pasteurizados e preservados com benzoato de sódio e sorbato de potássio); b) selecionar o fungo mais termorresistente entre os isolados ; c) determinar sua resistência térmica em suco de maçã a pH 2,5, 3,5 e 4,5 e d) avaliar sua deterioração em suco de maçã. Foram isoladas 21 culturas de fungos após aplicação de um choque térmico de 2 horas a 70°C. Quinze destas cepas foram identificadas como termorresistentes, e as demais, confirmadas como termolábeis. As cepas termorresistentes encontradas foram: *N. fischeri*, *B. fulva*, *Talaromyces* sp. e *Eupenicillium* sp. Cinco isolados sobreviveram a 95°C/20 minutos, após aplicação de diferentes choques térmicos. Dentre estes, foi escolhida uma cepa de *N. fischeri* isolada do concentrado de maçã por ser este produto comercialmente utilizado na fabricação de diversos subprodutos (comidas para bebê, etc.), e ainda devido à extraordinária termorresistência de seus ascósporos e sua capacidade de produzir micotoxinas. As curvas de ativação a 85°C em suco de maçã (11,3°Brix) ajustado a pH 2,5, 3,5 e 4,5, mostraram tempo ótimo de 10 minutos em todos os pHs. A deterioração causada pelo fungo, em suco de maçã, evidenciou uma mudança em seu aspecto, que se tornou clarificado. Para a inativação térmica dos ascósporos, foram utilizados tubos TDT selados utilizando-se suco de maçã, a diferentes pHs, como meio de aquecimento. As curvas construídas a 80, 85 e 90°C mostraram um “ombro” inicial evidenciando um comportamento de morte não logarítmico. Para o cálculo dos parâmetros cinéticos, foi realizada uma linearização das curvas pelo método de ALDERTON & SNELL (1970). Os valores de “1/k” (parâmetro equivalente a “D”) obtidos em pH 2,5 foram 81,30,

15,92 e 0,94 minutos para 80, 85 e 90°C, respectivamente, em pH 3,5 foram de 153,85, 22,12 e 1,03 minutos e em pH 4,5 foram de 312,50, 38,61 e 2,20 minutos para as mesmas respectivas temperaturas. Os valores de Z^* (parâmetro equivalente ao coeficiente térmico Z) foram 5,16, 4,59 e 4,64 para os meios de aquecimento a pH 2,5, 3,5 e 4,5, respectivamente.

ABSTRACT

Heat resistant moulds have been implicated frequently on deterioration of foods due to their capacity to survive in the usually pasteurization treatments used for acid foods, like fruit and its products. The thermal resistance of these moulds varies from strain to strain and also with the composition of the heating medium (pH, °Brix, kind of medium, e.g.). The objectives of this work were: a) to isolate and to identify heat resistant moulds in three kind of products (samples of productive process of apple nectar (pH 3.45, 11.6°Brix), strawberry (pH 3.9, 9.2°Brix) and grape (pH 3.6, 13°Brix) freeze commercial pulps and strawberry (pH 2.9, 22°Brix) and grape (pH 2.9, 74.4°Brix) pasteurized juice with sodium benzoate and potassium sorbate); b) to select the most heat resistant mould; c) to determine its heat resistance in apple juice at pH 2.5, 3.5 and 4.5 and d) to evaluate its deterioration in apple juice. Twenty one (21) cultures of moulds were isolated after a heat shock of 2 hours at 70°C. Fifteen (15) of these strains were identified as heat resistant and the rest was confirm as heat labels moulds. Isolated heat resistant moulds strains were: *N. fischeri*, *B. fulva*, *Talaromyces* sp. and *Eupenicillium* sp. Five (5) isolated survived after a heat shock at 95°C/20 minutes after they were submitted to different heat shocks. Between this extremely heat resistant moulds, it was selected one of *N. fischeri* isolated from apple concentrate, because this product is used for making other products like baby foods, e.g., also due to extraordinary heat resistance its ascosporous and its ability to produce various mycotoxins. Activation curves at 85°C in apple juice (11,3°Brix) at pH 2.5, 3.5 and 4.5, showed that the optimal activation time was 10 minutes. Mould spoilage evaluation in apple juice showed a change in its aspect which clarified. For the ascosporous heat inactivation, was used closed TDT tubes, and apple juice as heating medium (at different pHs). The curves at 80, 85 and 90°C showed an initial “shoulder” due to non logarithmic death behavior. For the kinetic parameter calculation, linearization curves using the ALDERTON & SNELL (1970)'s method were prepared. The 1/k values (“D” equivalent parameter) obtained at pH 2.5 were 81.30, 15.92 and 0.94 minutes at 80, 85 and 90°C respectively; at pH 3.5 were 153.85, 22.12 and 1.03 minutes and at pH 4.5 were 312.50, 38.61 and 2.20 minutes for the same respective temperatures. The Z* values (equivalent parameter to the temperature coefficient “Z”) were 5.16, 4.59 and 4.64 for heading medium at pH 2.5, 3.5 and 4.5 respectively.

I – INTRODUÇÃO

A maioria dos fungos filamentosos possui limitada resistência térmica, sendo seus conídios destruídos facilmente pela aplicação de calor. Os fungos filamentosos termorresistentes são capazes de sobreviver à temperatura de pasteurização devido à característica que possuem de produzir ascósporos (HOCKING & PITT, 1984; TOURNAS & TRAXLER, 1994). A pasteurização normalmente aplicada a produtos de frutas, ativa os ascósporos dormentes, com posterior germinação e crescimento dos fungos termorresistentes, o que ocasiona deterioração no produto final (BEUCHAT, 1986, SPLITTSTOESSER et al., 1972).

As espécies de fungos filamentosos termorresistentes reportadas como deterioradoras de produtos a base de frutas são: *Byssochlamys fulva*, *B. nivea*, *Neosartorya fischeri*, *Talaromyces* sp. e *Eupenicillium* sp. (QUINTAVALLA & SPOTTI, 1993; SURESH et al., 1996; VAN DER SPUY et al., 1975; ENIGL et al., 1993). Os gêneros *N. fischeri* e *Byssochlamys* sp. são ainda implicados como produtores de micotoxinas. O primeiro é capaz de produzir fumitremorginas (A, B, C) e verruculogena e o segundo, é reportado como produtor de patulina, ácido byssoclâmico e byssotoxina A.

Problemas ocasionados por fungos termorresistentes foram primeiro relatados em morangos enlatados nos anos 30 na Inglaterra, cujo gênero implicado tratava-se de *B. fulva* (OLLIVER & RENDLE, 1934). Hoje é reconhecida a distribuição mundial de fungos termorresistentes e muitos trabalhos vêm sendo executados com o objetivo de elucidar suas fontes de contaminação, ocorrência, ativação, resistência térmica, crescimento, avaliação da deterioração e produção de metabólitos secundários (UGWUANYI & OBETA, 1991; RAJASHEKHARA, et al., 1998; YATES & MOONEY, 1968; SPLITTSTOESSER et al., 1972).

Várias são as frutas e seus produtos envolvidos em deteriorações por fungos termorresistentes: maçã, tomate, abacaxi, uva, morango, maracujá, manga, “grapefruit”, groselhas e outros (KOTZEKIDOU, 1997; SURESH et al., 1996; SPLITTSTOESSER et al., 1993; TOURNAS & TRAXLER, 1994; UGWUANYI & OBETA, 1991). Porém,

existem relatos que comprovam a existência destes microorganismos em leite e derivados (ENGEL & TEUBER, 1991).

Para a elaboração deste trabalho, foram escolhidos produtos à base de uva, morango e maçã, que estão entre as frutas susceptíveis à ação de espécies termorresistentes deterioradoras de alimentos. Os produtos utilizados para a realização deste trabalho foram: a) polpas comerciais congeladas de morango e uva, utilizadas como matéria-prima para a preparação rápida (mistura em liquidificador) de sucos em estabelecimentos comerciais como lanchonetes e restaurantes; b) sucos de uva e morango que passaram por um tratamento termoquímico de preservação e c) amostras retiradas nas diversas etapas do processamento asséptico de néctar de maçã.

O estudo realizado a partir das amostras do processamento de néctar de maçã, torna-se relevante uma vez que o estado de Santa Catarina é o maior produtor nacional desta fruta, sendo responsável por 52,5% de toda a produção brasileira. A maçã catarinense é vendida nos grandes centros consumidores do Brasil e exportada para diversos países (SALOMÃO, 2001). Parte desta produção é destinada à fabricação de subprodutos como sucos, purês, concentrados, comidas para bebê, entre outros produtos que utilizarão o processamento térmico na sua elaboração. Além disso, o suco de maçã possui uma tendência de crescimento e popularidade, devido ao grande interesse do consumidor por alimentos “saudáveis” e também pela maior disponibilidade de produtos assépticos no mercado. Frente a este aumento na demanda de consumo, podem ser considerados poucos os trabalhos conduzidos com suco de maçã.

Estudos a partir de polpas e sucos a base de morango e uva, também foram realizados neste trabalho. As polpas comerciais congeladas têm seu consumo progressivamente aumentado, pois são utilizadas na obtenção de sucos de uma forma muito prática e rápida. Já os estudos realizados com os sucos pasteurizados e adicionados de conservantes, são relevantes, pois servem de validação para os processos termoquímicos de preservação de produtos de frutas.

Este trabalho visa determinar a ocorrência de fungos filamentosos termorresistentes nos três produtos de fruta citados acima, e selecionar a cepa de maior termorresistência e de

grande interesse comercial para, a partir dela, determinar a resistência térmica em suco de maçã. É também objetivo do estudo, a avaliação da deterioração que este fungo poderia causar no suco de maçã.

II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. FUNGOS FILAMENTOSOS TERMORRESISTENTES DETERIORADORES DE ALIMENTOS

1.1 Características Gerais

A maioria dos fungos mostra-se bastante limitada em relação à resistência térmica. Os esporos sexuais (conídios) dos gêneros mais comuns como *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Fusarium*, entre outros, são mortos depois de aquecimento por 5 minutos a 60°C (TOURNAS, 1994).

Os fungos filamentosos termorresistentes mais comumente estudados, pertencem aos gêneros *Byssochlamys*, *Neosartorya*, *Talaromyces* e *Eupenicillium*. Estes têm sido reportados, devido suas habilidades em sobreviver a temperaturas normalmente empregadas nos tratamentos de pasteurização fornecidos a alimentos ácidos, como frutas e seus derivados (SPLITTSTOESSER et al., 1970; HOCKING & PITT, 1984). Devido a esta resistência, podem crescer e contaminar produtos durante a estocagem à temperatura ambiente, o que decorre em grandes perdas econômicas. Estes organismos são saprófitas, mais preferencialmente que parasitas, e usualmente contaminam frutas que são cultivadas próximas da terra (TOURNAS, 1994).

Uma característica destes fungos termorresistentes é a formação de ascósporos (esporos produzidos pelos representantes do sub-reino Ascomiceto) muito resistentes. O tamanho, a forma e ornamentação destes ascósporos variam com o tipo, espécie e linhagem de microorganismo, bem como, as condições dos meios sob os quais os esporos são formados. A principal característica destes fungos é a formação do asco, que é uma estrutura em forma de saco ou bolsa, no interior da qual são produzidos oito ascósporos de forma e cor variados para cada espécie. Quando amadurecem, os ascos sofrem uma ruptura por onde são liberados os ascósporos. Estes últimos possuem parede, e são geralmente ornamentados e refráteis. Os ascos de alguns destes fungos são recobertos por um grande corpo de frutificação que leva o nome geral de ascocarpo. As espécies termorresistentes, usualmente produzem dois tipos diferentes de ascocarpos: o cleistotécio (membrana rígida,

esférica, de parede lisa e completamente fechada) ou o gimnotécio (parede formada por um emaranhado de hifas) (PITT & HOCKING, 1985).

1.2 Principais espécies de fungos termorresistentes

1.2.1 *Byssochlamys fulva* e *Byssochlamys nivea*

O primeiro fungo filamentoso termorresistente reconhecido como causador de deterioração em produtos engarrafados e enlatados a base de frutas, foi o *Byssochlamys fulva*, identificado por OLLIVER & RENDLE em 1934. Este gênero é caracterizado pela ausência de cleistotécio, gimnotécio ou quaisquer estruturas de proteção de seus ascos durante o desenvolvimento e maturação. Os ascos deste gênero são produzidos em cachos irregulares, abertos, contendo geralmente oito ascósporos em associação, mas não envolvidos, por fragmentos de hifas brancas. O estágio imperfeito (anamorfo) deste gênero é conhecido como *Paecilomyces*, sendo *Paecilomyces fulvus* e *Paecilomyces niveus* as fases imperfeitas do *B. fulva* e *B. nivea*, respectivamente. Para a distinção das duas espécies, existem características que podem ser verificadas: *B. nivea* geralmente forma colônias brancas em Ágar Extrato de Malte (MEA) ou Ágar Czapeck Extrato de Levedura (CYA), sendo seus ascos de dimensões menores que de *B. fulva*. As colônias deste último, por sua vez, são marrons amareladas nestes mesmos meios (BEUCHAT & RICE, 1979).

1.2.2 *Neosartorya fischeri*

Os ascos desta espécie estão recobertos por cleistotécios, causando uma aparência granular às colônias. Estes ascos podem sofrer ruptura instantânea de modo que só os ascósporos livres são observados. A única espécie deterioradora conhecida é *Neosartorya fischeri*, que possui variedades: *N. fischeri* var. *fischeri*, *N. fischeri* var. *glabra* e *N. fischeri* var. *spinosa*, sendo cada uma distinta na ornamentação de seus ascósporos. Apenas as variedades *glabra* e *spinosa* têm sido isoladas de produtos processados a base de frutas, enquanto que a *fischeri* é dominante no solo (NIELSEN, 1991; KAVANAGH et al., 1963; UGWUANYI & OBETA, 1991). Os ascos, extremamente resistentes, são biconvexos com divisão equatorial. Nas variedades *glabra* e *spinosa* as superfícies dos ascósporos apresentam-se lisas e espinhosas, respectivamente, enquanto que a variedade *fischeri* possui

ascósporos com superfície reticular (NIELSEN, 1991). As colônias em (MEA) são brancas-creme, e sua fase anamorfa é conhecida por *Aspergillus fischeri* (HOCKING & PITT, 1984).

1.2.3 *Talaromyces* sp.

É caracterizado pela produção de gimnotécios brancos ou amarelos em associação com um estado anamorfo característico de *Penicillium*, *Paeciloyces* ou *Geosmithia*. O gimnotécio é o ascocarpo, onde os ascos são produzidos, cujo corpo é formado por hifas finas entrelaçadas resultando em uma estrutura de tamanho mais ou menos indeterminado. *Talaromyces* é o gênero de aproximadamente 25 espécies, cuja maioria habita o solo (PITT & HOCKING, 1985). A espécie mais comumente isolada de alimentos ácidos termoprocessados é o *Talaromyces flavus*, que geralmente produz colônias amarelas em MEA devido à pigmentação tanto do micélio como dos gimnotécios, porém existem espécies que desenvolvem coloração avermelhada. Os ascósporos têm forma elipsoidal e paredes espinhosas, sendo seu estágio imperfeito conhecido com *Penicillium dangeardii*. A segunda espécie de interesse é o *T. bacillisporus*, um raro fungo com *Geosmithia* na fase anamorfa (PITT & HOCKING, 1985). A espécie *T. trachyspermus* também foi isolada de produtos de fruta e confirmada como termorresistente (ENIGL et al., 1993).

1.2.4 *Eupenicillium* sp.

Produz cleistotécio que, em muitos casos,, torna-se extremamente rígido e pode permanecer por semanas ou meses até finalmente amadurecer para assim produzir numerosos ascos com oitos ascósporos em seu interior. Os ascósporos são elipsoidais possuindo uma leve ruga longitudinal além de apresentar superfície áspera. Foram identificadas 37 espécies de *Eupenicillium*, sendo que as mais comumente isoladas de alimentos são: *E. brefeldianum*, *E. cinnamopurpureum*, *E. hirayamae* e *E. javanicum*. A fase anamorfa deste gênero é o *Penicillium* (PITT & HOCKING, 1985).

1.3 Distribuição e Fontes de Contaminação

A primeira citação sobre incidência de fungos termorresistentes vem da Inglaterra nos anos 30 (OLLIVER & RENDLE, 1934), cujo estudo foi direcionado às espécies do

gênero *Byssochlamys*, reconhecidas como termorresistentes desde então. Como resultado, constatou-se que campos e pomares eram fontes de contaminação inicial de frutas processadas, sendo *B. fulva* o agente contaminante.

O estudo da ocorrência de fungos termorresistentes em pomares e hortas de Nova York foi realizado por SPLITTSTOESSER et al.(1971). Os resultados mostraram que mais de 70% das amostras de frutas, vegetais e solo dos vinhedos e hortas estavam contaminados por fungos termorresistentes, sendo *Byssochlamys* o gênero mais freqüentemente encontrado. Em levantamento realizado por YATES (1974) no Canadá, foi detectada a presença de *Byssochlamys* sp. em amostras de solos de pomares e frutas colhidas no chão. BEUCHAT & RICE (1979), realizaram alguns testes em raízes de plantas com terra aderida a sua superfície e verificaram resultados positivos para a presença de *Byssochlamys*.

Estudos realizados com 42 amostras de solo coletadas de diferentes partes de Nsukka, sul da Nigéria, mostraram que aproximadamente 98% de todas as amostras de solo continham fungos termorresistentes. Dos isolados, sete foram identificados como *Neosartorya* spp. e dois como *Byssochlamys* e *Penicillium* spp. Três dos sete isolados descritos como *Neosartorya* spp., foram identificados como *N. fischeri* (Wehmer) Malloch e Cain, duas como *N. fischeri* var. *spinosa* (Raper e Fennell) Malloch e Cain, enquanto que as restantes foram descritas como *Aspergillus flavus* Link. Os dois isolados descritos como *Byssochlamys* e *Penicillium* spp. foram identificados como *Paecilomyces variotti* Bainier e *Penicillium citrinum* Thom, respectivamente. *Neosartorya* spp. foi o isolado predominante, estando presente em todas as amostras positivas (UGWUANYI & OBETA, 1991).

No Brasil, EIROA & AMSTALDEN (1985) verificaram a ocorrência de *Byssochlamys* em hortas, pomares e vinhedos da região de Campinas, SP. Duzentas e vinte amostras de folhas e frutos de laranjeira, tangerina, figueira, pessegueiro, videira e pepino, bem como, amostras de flores de frutos de morangueiro e amostras do solo foram examinadas. As espécies de *Byssochlamys* foram constatadas em 17,1% do total das amostras de solo e em 1,4% do total das amostras de folhas examinadas. Apesar de nenhum isolamento ter sido feito a partir dos frutos e flores, foi considerado que a presença de

Byssochlamys em solos de plantações representa um risco potencial para a indústria de produtos ácidos de origem vegetal.

1.4 Ocorrência

Nos últimos anos, ocorreu um aumento no volume e variedade de produtos a base de frutas no mercado. Novos processos de fabricação, embalagem e tecnologia de preservação, bem como, um aumento na demanda de consumo têm causado um incremento na quantidade e variedade de sucos de frutas e outros produtos de fruta no mercado. Os métodos mais freqüentes de preservação para estes produtos são a pasteurização e processos de ultra-alta temperatura (UHT), sendo pouco freqüente o uso de preservantes químicos. A contaminação por estes fungos termorresistentes geralmente ocorre na parte superior da embalagem de produtos enlatados ou cartonados, sejam eles polpas ou sucos de frutas, concentrados, ou preparados de frutas para comida de bebê. Os produtos mais comumente envolvidos são aqueles a base morango, ameixa, maçã, uva, abacaxi, mamão papaia, maracujá, tomate, entre outros (TOURNAS, 1994).

OLLIVER & RENDLE (1934) encontraram que *B. fulva* era abundante no solo e facilmente contaminaria frutas como morango, groselha, ameixa, maçãs entre outras, especialmente as colhidas junto ao solo. Na Austrália, contaminações atribuídas ao *Byssochlamys* ocorreram nos anos 60 também em morangos enlatados. Nos Estados Unidos, a contaminação por *Byssochlamys* foi reportada em 1967, sendo este isolado de bebida de fruta enlatada. Na Holanda, a contaminação em morangos inicialmente foi detectada por *B. fulva* e secundariamente por *B. nivea* (TOURNAS, 1994). Contaminação causada por espécies de *Byssochlamys*, como a estudada por MAUNDER (1969), envolveu sucos e bebidas de frutas a base de uva e maçã, concentrado de abacaxi, polpas de frutas, além de recheio para torta de amora e cereja e enlatados de amora e morango. *Paecilomyces* (forma anamorfa do gênero *Byssochlamys*) foi isolado de concentrado de uva, suco de maçã, figos enlatados e recheio de amora para torta. YATES (1974) isolou *Byssochlamys* sp. a partir da análise de uva e maçãs, bem como de suco de uva enlatado e concentrado de uva.

Outros gêneros de fungos filamentosos termorresistentes foram detectados posteriormente como causadores de deterioração de produtos vegetais ácidos, sendo *N. fischeri* inicialmente verificada em morangos enlatados por KAVANAGH et al. (1963). MAC EVOY & STUART (1970) reportaram que também latas de morangos na Irlanda tiveram problemas com *N. fischeri* entre 1958 e 1968. SPLITTSTOESSER & SPLITTSTOESSER (1977) estudaram o gênero *Neosartorya* (provavelmente *N. fischeri*) isolado de bebida de fruta contaminada. HOCKING & PITT (1984) reportaram que *N. fischeri* foi o agente contaminante em suco de maracujá na Austrália.

HOCKING & PITT (1984) isolaram espécies de *Eupenicillium* como contaminante de sucos de frutas em várias ocasiões. ANON (1967) isolou a espécie *Eupenicillium brefeldianum* de sucos de frutas na África do Sul.

Talaromyces sp. (*T. flavus* mais comumente) tem sido encontrado em várias frutas e produtos de frutas causando problemas (TOURNAS, 1994). *T. flavus* foi isolado de suco de frutas comerciais (SCOTT & BERNARD, 1987; KING & WHITEHAND, 1990) e de suco de abacaxi (KING & HALBROOK, 1987). A espécie *T. trachyspermus* foi isolada a partir de suco de abacaxi refrigerado e congelado (ENIGL et al., 1993).

Na Austrália, as matérias-primas cruas mais prováveis de contaminação com esporos de fungos termorresistentes são maracujá e morango. Sucos e polpas de abacaxi e manga podem também ser fonte de contaminação, mas laranja e outras frutas cítricas são menos implicadas. Existe uma particular suscetibilidade de contaminação do maracujá, justamente pelo fato deste ser usualmente colhido depois de cair no chão. Morangos e abacaxis são cultivados junto ao solo e podem ser contaminados através dos respingos de água durante as chuvas (HOCKING & PITT, 1984).

Relatos do isolamento de *Neosartorya fischeri* a partir de sucos comerciais foram feitos em 1987 por SCOTT & BERNARD. Na Índia, também foi verificada a ocorrência de *N. fischeri* isolada do mamão papaia (RAJASHEKHARA et al., 1996). TOURNAS & TRAXLER (1994) isolaram cepas de *N. fischeri* a partir de concentrado de abacaxi congelado. BAGLIONI (1998), estudando a ocorrência de fungos filamentosos termorresistentes durante o período de safra de tomate, encontrou o fungo *Penicillium*

implicatum (espécie tida como não termorresistente) e o fungo *N. fischeri* tido como o mais termorresistente encontrado.

Vinte amostras frescas de manga foram colhidas em Nsukka, na Nigéria, a fim de se verificar a presença de fungos termorresistentes. Das 20 amostras examinadas, três estavam contaminadas por fungos termorresistentes, sendo todos descritos como *Neosartorya* spp. (UGWUANYI & OBETA, 1991).

OBETA & UGWUANYI (1995) analisaram 60 sucos de frutas nigerianos termoprocessados consistindo de 15 embalagens de cada uma das seguintes frutas: manga, laranja, abacaxi e tomate. O resultado mostrou que 17% de todos os sucos de frutas e 27% dos de manga e de tomate continham fungos termorresistentes, sendo que somente no suco de abacaxi não houve crescimento. Foram identificados *P. variotti*, *Aspergillus tamarii*, *A. flavus* e *Aspergillus ochraceus*, sendo este último predominante.

ARAGÃO (1989) isolou 58 culturas de fungos filamentosos termorresistentes a partir de 15 amostras de polpa de morango, sendo que, dentre os gêneros isolados, foram encontrados: *B. nivea*, *N. fischeri*, *T. flavus* var. *flavus* e *Eupenicillium javanicum* var. *javanicum*.

Vinte culturas de fungos filamentosos termorresistentes foram isoladas de pasta de tomate enlatada, a fim de estimar a eficiência da pasteurização aplicada a produtos enlatados comerciais. Dentre as cepas isoladas, foram identificados *B. fulva*, *B. nivea* e *N. Fischeri* (KOTZEKIDOU, 1997).

Além de produtos de frutas, poucos são os relatos que denotam a presença de fungos filamentosos termorresistentes em outros produtos. Cepas de *Byssochlamys nivea* isoladas de queijos frescos, leite integral e leite cru, foram utilizadas por ENGEL & TEUBER (1991) para a verificação da resistência térmica destes ascósporos em leite e creme de leite.

1.5 Metodologia para a detecção e enumeração de fungos termorresistentes em alimentos

Todos os métodos para detecção e enumeração de fungos termorresistentes incluem um choque térmico para destruir as formas termosensíveis e ativar os ascósporos dormentes. Devido ao baixo número de fungos termorresistentes geralmente encontrados nos alimentos, é recomendável o uso de amostras grandes nas análises de detecção (TOURNAS, 1994).

SPLITTSTOESSER (1976) desenvolveu uma metodologia para enumeração de fungos termorresistentes, onde 100 ml das amostras de frutas são homogeneizadas com um mesmo volume de água estéril e aquecidas por 2 horas a 70°C. A primeira hora de tratamento térmico garante que a mistura alcance o equilíbrio da temperatura, e o tempo restante é, de fato, o tratamento térmico mínimo de destruição das formas termolábeis e ativação dos ascósporos dormentes. Após aquecimento, as amostras devem ser resfriadas em banho de gelo para cessar o tratamento térmico. O plaqueamento é executado pela distribuição de aproximadamente 10 ml das amostras em placas de Petri e adição de igual volume de meio Ágar Batata Dextrose (PDA) acidificado para pH 3,5 com 10% de ácido tartárico e acrescido com 3% de ágar para garantir adequada solidificação. A incubação é realizada a 32°C por 5 dias. Adaptações deste método foram utilizadas por ARAGÃO (1989) e EIROA & AMSTALDELM (1985).

MURDOCK & HATCHER (1978) desenvolveram um método para a detecção de fungos termorresistentes em sucos de frutas e concentrados. Por este método, 50 gramas da amostra são diluídos em igual volume de água destilada estéril, em uma garrafa medicinal (8 oz.) ou frasco de cultura de tecido (250 ml). O choque térmico é aplicado em um banho termostático à temperatura de 77°C por 30 minutos, sendo que se inicia a contagem do tempo quando a mistura atinge a temperatura de tratamento. Após o choque térmico, as amostras são resfriadas imediatamente em banho de gelo. O plaqueamento é executado pela distribuição de 30 a 40 ml das amostras entre 4 ou 5 placas de Petri e adição de ágar simples (2%). A incubação das placas e da garrafa contendo o restante do produto deve ser realizada a 30°C por 30 dias e o exame das mesmas, realizado semanalmente para se

verificar o crescimento de fungos. Para amostras com menos de 35°Brix deve-se omitir a etapa da diluição.

PITT & HOCKING (1985) adaptaram o método de isolamento de MURDOCK & HATCHER (1978), com as seguintes modificações: primeiramente deve-se diluir as amostras que possuem mais que 35°Brix com água peptonada 0,1% ou com um diluente similar. Para sucos muito ácidos, como maracujá (pH 2), deve-se ajustar o pH para 3,5 a 4,0 com NaOH. O procedimento segue, tomando-se duas amostras de 50 ml e colocando-as em tubos de 200 X 30 mm, que são em seguida aquecidos por 30 minutos à temperatura de 80°C (a contagem do tempo de aquecimento somente deve ocorrer após a amostra atingir a temperatura estipulada). Após aquecimento, cada amostra de 50 ml deve ser distribuída entre 4 placas de Petri de 150 mm e misturada com Ágar Batata Dextrose 1,5 vezes concentrado. Após solidificação, as placas devem ser envolvidas por um saco plástico para evitar o ressecamento e incubadas a 30°C por um período de até 30 dias, devendo ser examinadas semanalmente para verificar o crescimento.

O maior problema associado às técnicas de isolamento é a possibilidade de contaminação aérea das placas com esporos de fungos comuns que podem gerar falsos resultados. O aparecimento de colônias verdes de *Penicillium* ou colônias de espécies comuns de *Aspergillus* como *A. flavus* ou *A. niger* são evidências claras de contaminação. Este tipo de colônia deve ser ignorada quando for feita a enumeração. Para minimizar este problema, o plaqueamento deve ser realizado, preferencialmente, em câmara de fluxo laminar (PITT & HOCKING, 1985).

Caso o produto tenha um grande número de esporos bacterianos (como espécies de *Bacillus*), podem ser adicionados antibióticos ao Ágar Batata Dextrose ou outro ágar nutriente utilizado. A adição de 100 ppm de cloranfenicol é suficiente para evitar o crescimento destas bactérias. Como o cloranfenicol é estável a altas temperaturas, sua adição ao meio pode ser realizada antes da autoclavagem. A acidificação do meio não é recomendada uma vez que os ascósporos podem estar “estressados” pelo tratamento térmico (HOCKING et al., 1992).

Um método direto de detecção de fungos termorresistentes é indicado para polpas de frutas e outros materiais semi-sólidos, tendo a vantagem de evitar problemas de contaminação aérea. Frascos medicinais contendo aproximadamente 30 ml de polpa são aquecidos em banho termostático a 80°C por 30 minutos, resfriados e posteriormente incubados a 30°C (sem a adição de ágar) por 30 dias na posição horizontal, permitindo a formação de uma grande superfície para o crescimento dos fungos (HOCKING & PITT, 1984; PITT & HOCKING, 1985; GUMERATO, 1995).

1.6 Etapas da verificação da resistência térmica de fungos filamentosos termorresistentes

A verificação da resistência térmica de fungos termorresistentes envolve várias etapas. Primeiramente dá-se a produção de um lote de suspensão de ascósporos a partir do qual executam-se as etapas finais de ativação, aplicação de choques programados e inoculação em meio de recuperação.

1.6.1 Produção e coleta de ascósporos

É característica inerente a estes fungos, a produção de ascósporos termorresistentes. O tamanho, forma e ornamentação destes esporos varia com o tipo, espécie, cepa e condições do meio onde foram formados. A produção e ativação de ascósporos de fungos termorresistentes são dependentes tanto de fatores genéticos, como linhagem do microorganismo, quanto de fatores externos como tempo, temperatura, meio de crescimento ou aquecimento (TOUNAS, 1994).

SPLITTSTOESSER et al. (1969), estudando a esporulação de um isolado de *Byssochlamys* encontrado em bebida de fruta, reportou que este formou muito poucos ascósporos em laboratório. Entretanto, investigações dos fatores que afetaram a esporulação desta cepa, revelaram que a população máxima de ascos estava presente quando estes estavam crescendo em caldo de extrato de malte a 5%, pH 2,0 a 3,0 por um período de 4 a 14 dias a 30°C. Foram testados diferentes sucos de frutas e vegetais, utilizados como substratos para o crescimento destes fungos, os sucos de ameixa, uva e maçã propiciaram a maior produção de ascósporos seguidos pelos sucos de laranja, coquetel de vegetais e

tomate, enquanto que o suco de “cranberry”, quando usado como substrato, resultou em baixo rendimento de ascósporos.

Temperaturas de incubação entre 28 e 35°C são ótimas para o crescimento e produção de ascósporos de *Byssochlamys*, porém existem isolados que, se forem incubados abaixo de 30°C em um meio sintético, perdem irreversivelmente a capacidade de formar ascos (BEUCHAT & RICE, 1979). ENGEL E TEUBER (1991) testaram a influência da temperatura de incubação na produção de ascósporos de *B. nivea* em Ágar Extrato de Malte (MEA) por 21 dias. Encontraram que, nas temperaturas de 20°C e 37°C, a produção de ascósporos foi bem menor em relação à produção a 25°C e 30°C, obtendo-se em 30°C o maior número de ascósporos.

ARAGÃO (1989) produziu ascósporos de bolores termorresistentes em meio PDA e MEA, após 4 a 6 semanas de incubação a 30°C, em garrafas estocadas inclinadas. A coleta dos ascósporos da superfície foi realizada pela adição de pérolas de vidro e água estéril em cada garrafa, com agitação manual. Após filtração, centrifugação e lavagem da suspensão resultante, o precipitado foi ressuspensionado em água estéril para a obtenção de uma contagem final de 10^6 e 10^7 ascósporos/ml. Para todos os fungos estudados, a centrifugação foi suficiente para liberar os ascósporos dos ascos, exceto para *B. nivea*, que foi submetido a vários procedimentos, porém, sem sucesso. Tal fato demonstra a alta resistência da membrana que envolve os ascos deste fungo.

BAGLIONI (1998) utilizou o meio MEA para a produção, em garrafas de Roux, de ascósporos de bolores isolados no processamento asséptico de polpa de tomate. Para a coleta de esporos, utilizou uma bagueta de vidro estéril com a qual executou a raspagem do micélio formado. A suspensão resultante foi centrifugada três vezes para a limpeza a 10.000 rpm por 15 minutos a 5°C e ressuspensionada em água estéril para a obtenção de uma concentração de 10^6 e 10^7 ascósporos/ml.

RAJASHEKHARA et al. (1996) e SURESH et al. (1996), utilizaram meio PDA para a produção de ascósporos de *N. fischeri* isolados, respectivamente, de mamão e uva. A temperatura e o tempo de incubação utilizados nestes dois trabalhos foram de 30°C por 30 dias. Após a obtenção das suspensões de ascósporos, tais autores, congelaram-nas até

utilização posterior. SPLITTSTOESSER & SPLITTSTOESSER (1977), realizaram um estudo do efeito do congelamento sobre uma suspensão de ascósporos de *B. fulva*, e observaram que não houve alteração na contagem da suspensão, sendo de 190×10^6 ascósporos/ml antes e 200×10^6 ascósporos/ml após congelamento e descongelamento de 9 vezes em 25 dias. SPLITTSTOESSER et al., em 1972, já haviam estocado uma suspensão de ascos de *B. fulva* à temperatura de -23°C .

KING Jr. & WHITEHAND (1990) utilizaram meio MEA adicionado de 7,5 ppm de rosa de bengala e incubação a 25°C por 30 dias para produção de ascósporos de *Talaromyces flavus* var. *macrosporus*, isolado de sucos de frutas deteriorados. Para a quebra dos ascos utilizaram pressão (até 8000 Psig). O mesmo procedimento foi utilizado por KING Jr. & HALBROOK (1987) para a quebra dos ascos de *T. flavus* produzidos em Caldo Extrato de Malte, sob agitação constante.

1.6.2 Ativação dos ascósporos

Uma vez que os ascósporos de fungos termorresistentes são formados, estes desenvolvem com o tempo uma dormência (estado de baixa atividade metabólica) que pode ser quebrada por um tratamento sub-letal, usualmente um choque térmico, chamado ativação (estágio de alta atividade metabólica), que permite a germinação e crescimento em condições favoráveis (BEUCHAT & RICE, 1979; BEUCHAT 1986; SPLITTSTOESSER et al. 1993).

SPLITTSTOESSER et al.(1969) reportaram que um aquecimento a 70°C por 20 minutos fornecia completa ativação aos ascósporos de *B. fulva*, enquanto que KING et al. (1969) ativou ascósporos desta mesma espécie a 80°C por 4 minutos. KING & HALBROOK (1987) realizaram estudos utilizando três cepas de *T. flavus* e verificaram que uma das cepas apresentou ótima ativação a 80°C por 12-15 minutos, outra teve seus ascósporos ativados a 85°C por 6-8 minutos e a terceira a 90°C por 1-2 minutos.

Estudos de quebra de dormência de ascósporos de *B. fulva* mostraram uma interação entre a temperatura de choque térmico e o meio de aquecimento, quando aquecidos a 60°C .

A influência do meio de suspensão foi menor pronunciada quando os esporos foram aquecidos a temperaturas mais altas, de 70 a 80°C (SLITTSTOESSER et al., 1972).

O estudo da influência da natureza do meio de aquecimento sobre a taxa de ativação de ascósporos de *B. fulva* e *Aspergillus* sp. foi realizado por SPLITTSTOESSER & SPLITTSTOESSER (1977). Neste trabalho, os meios de aquecimento utilizados para ativação foram o suco de uva, a 5° BRIX, e água destilada. Os resultados mostraram uma ativação mais rápida com suco de uva, para ambos os fungos, sendo mais acentuada para o *Aspergillus* sp., porém, em água, uma alta porcentagem de esporos de *Aspergillus* sp. permaneceu dormente, mesmo quando ativados a 80°C por 90 minutos. Com *B. fulva* por outro lado, a 80°C a diferença entre as taxas de ativação na água e no suco de uva foram pouco perceptíveis. Testes posteriores com a mesma linhagem de *Aspergillus* sp. mostraram que o suco de maçã e suco de tomate apresentaram o mesmo efeito estimulante na ativação dos ascósporos. Da mesma forma, KOTZEKIDOU (1997) também encontrou que a ativação de ascósporos de *N. fischeri* é maior em suco de tomate (16% sólidos solúveis, pH 4.2) que em tampão fosfato (0.1 M, pH 7). SPLITTSTOESSER et al. (1993) também constataram uma taxa de ativação maior quando ascósporos de *N. fischeri* eram aquecidos em suco de uva, em comparação com água destilada.

KATAN (1985) estudou a ativação térmica de ascósporos de *T. flavus*, de diferentes linhagens, expostos às temperaturas de 50, 53, 70 e 80°C a diferentes tempos, em caldo de batata dextrose. Os resultados mostraram uma boa recuperação de ascósporos a 53°C com tempo variando de 15 minutos a 6 horas e 70°C durante 30 minutos a 1 hora de exposição. Sob a temperatura de 50°C, foi necessário um tempo mínimo de 3 horas para haver ativação. Para todas as linhagens estudadas, a exposição a 80°C por 20 minutos exerceu um efeito letal para os ascósporos.

Em experimento executado por BEUCHAT (1986), foi determinada a ótima ativação dos ascósporos de *Byssochlamys*, *Neosartorya* e *Talaromyces* em um meio específico de aquecimento. No experimento, foram testadas três linhagens de *T. flavus*, três linhagens de *N. fischeri*, duas de *B. nivea* e uma de *B. fulva*. O tratamento térmico ocorreu nas temperaturas de 70, 75, 80 e 85°C, utilizando como meio de aquecimento o tampão

fosfato (0,1 M, pH 7,0). A cada 15 minutos, foram retiradas amostras do meio de aquecimento até o tempo final de exposição, que foi de 120 minutos. Cada amostra retirada foi diluída em tampão fosfato e plaqueada em superfície no meio Plate Count Ágar contendo corante rosa de bengala (25 µg/ml) e o antibiótico cloranfenicol (100 µg/ml). As placas foram incubadas a 30°C por 4 dias e as colônias contadas e calculadas por ml de tampão fosfato (UFC/ml). A partir destes resultados foram construídas curvas plotando-se o log dos sobreviventes (UFC/ml) pelo tempo de aquecimento. Verificou-se que o tempo e temperatura ótimos para ativação variam com a linhagem do microorganismo, sendo então, particular para cada cepa testada. As cepas mais termorresistentes de *T. flavus* e *N. fischeri* apresentaram ativação ótima em 85°C/15-30 minutos e 85°C/15 minutos, respectivamente. As linhagens de *B. fulva* e *B. nivea* testadas exibiram menor termorresistência que cepas de *N. fischeri* e *T. flavus*, que necessitaram de 70 a 75°C por 30 minutos para ativação, não sobrevivendo aos primeiros 15 minutos a 85°C.

O binômio tempo-temperatura encontrado por RAJASHEKHARA et al. (1996) para a ativação de *N. fischeri* após testar tratamentos a 70, 75, 80, 85 e 90°C foi de 80°C por 30 minutos. O meio de aquecimento utilizado foi tampão fosfato (0,1M, pH 7) e PDA o meio de recuperação dos ascósporos. SURESH et al. (1996) encontraram que o tempo de ativação foi de 15 a 60 minutos na temperatura de 75°C e 15 minutos a 80°C. Ambos autores utilizaram frasco de 3 bocas.

DELGADO (2001) realizou ensaios com o objetivo de verificar os tempos ótimos de ativação para ascósporos de *N. fischeri*, com diferentes idades, utilizando água destilada como meio de aquecimento. Para aqueles com 1 mês de idade, o tempo ótimo encontrado foi de 5 minutos a 80°C e para os de 4 meses de idade, a melhor recuperação ocorreu a 85°C por 20 minutos.

1.6.3 Determinação dos parâmetros de resistência térmica

ARAGÃO (1989) utilizou o método do frasco de três bocas para a determinação da resistência térmica, bem como, RAJASHEKHARA et al. (1996) e SURESH et al. (1996). Além deste método, ARAGÃO (1989) testou o método de tubos TDT, porém, sem obter resultados reprodutíveis devido à aglomeração ocorrida no meio de aquecimento.

BAGLIONI (1998) determinou os parâmetros de resistência térmica para *N. fischeri* em polpa de tomate (8°Brix) utilizando o método de tubos TDT selados. O mesmo método utilizou KING Jr. & HALBROOK (1987), KOTZEKIDOU (1997) e KING Jr. & WHITEHAND (1990).

SPLITTSTOESSER & SPLITTSTOESSER (1977) realizaram ensaios de resistência térmica para *Byssochlamys* utilizando tubos de rosca 16 x 150 mm.

1.6.4 Meio de recuperação dos ascósporos após ensaios de resistência térmica

ARAGÃO (1989) utilizou suco de morango como meio de aquecimento para as suspensões de ascósporos de *B. nivea*, *N. fischeri*, *E. javanicum* e *T. flavus*. As amostras retiradas do experimento, em tempos definidos, foram resfriadas e plaqueadas em PDA com 1% de rosa de bengala e incubadas a 30°C. Também BEUCHAT (1992), BAYNE & MICHENER (1979) e SPLITTSTOESSER & SPLITTSTOESSER (1977) utilizaram o meio PDA para a recuperação de ascósporos que foram submetidos a tratamento térmico.

O meio MEA foi utilizado por GUMERATO (1995) que executou plaqueamento por profundidade para a determinação do número de sobreviventes de *N. fischeri* em suco de maçã, após tratamento térmico a 85, 88, 90 e 93°C. BAGLIONI (1998), que trabalhou com este mesmo fungo em polpa de tomate (8°Brix), também recuperou os ascósporos em meio MEA.

SPLITTSTOESSER et al. (1993) realizaram estudo sobre a recuperação de ascósporos de *N. fischeri* após tratamento a 85°C por 25 minutos. Como resultados, observaram que a recuperação dos ascósporos foi melhor em caldo com 3% de extrato de malte, utilizando o método de número mais provável (NMP) para a contagem das colônias, que quando plaqueados em PDA. Entretanto, os valores de D encontrados foram similares para os dois meios.

TOURNAS & TRAXLER (1994) recuperaram os ascósporos de *N. fischeri*, que sofreram tratamentos térmicos de 85, 88, 90, 95 e 100°C por 1 hora, em meio Ágar Czapek. O mesmo meio foi utilizado para o crescimento e esporulação dos ascósporos.

1.7 Fatores que afetam a resistência térmica dos ascósporos

1.7.1 Variação de resistência entre as diferentes cepas de fungos termorresistentes

BEUCHAT (1986) verificou que *T. flavus* se mostrou mais resistente que *N. Fischeri*, *B. fulva* e *B. nivea* em cinco produtos de frutas testados como meio de aquecimento.

KOTZEKIDOU (1997), estudando a resistência térmica de *B. nivea* (2 linhagens), *B. fulva* (3 linhagens) e *N. fischeri* (4 linhagens), não estabeleceu qual foi a mais termorresistente, porém, constatou que a resistência térmica pode variar muito com a linhagem do fungo.

SCOTT & BERNARD (1987) compararam a resistência térmica de uma linhagem de *N. fischeri* e uma linhagem de *T. flavus*, constatando ser a última, a mais termorresistente.

ARAGÃO (1989), comparando a resistência térmica de *B. nivea*, *N. fischeri*, *T. flavus* e *E. javanicum* em suco de morango, encontrou que *B. nivea* era a espécie mais termorresistente.

QUINTAVALLA & SPOTTI (1993) compararam a resistência térmica de *T. flavus*, *N. fischeri* e *B. nivea* em suco de uva. Os ascósporos de *N. fischeri* provaram ser mais termoresistentes que as demais cepas, sendo os ascósporos de *B. nivea*, os menos termorresistentes.

1.7.2 Influência do meio de aquecimento

1.7.2.1 pH

KING Jr. & WHITEHAND (1990) realizaram ensaios de resistência térmica com *T. flavus* utilizando meios sintéticos de aquecimento (glucose 16°Brix/ ácido tartárico 0,033M) ajustados para pH 3,6, 5,0 e 6,6. Foi observado um aumento na resistência térmica com o aumento do pH do meio de aquecimento.

BAYNE & MICHENER (1979) verificaram que os ascósporos de cinco linhagens de *B. fulva*, suspensos em meio padrão ajustado em pH 5,0, se mostraram mais resistentes que no mesmo meio em pH 3,6. No mesmo trabalho, foi testada a resistência térmica de uma linhagem de *B. fulva* em meio com pH próximo da neutralidade, constatando uma rápida inativação.

SPLITTSTOESSER & SPLITTSTOESSER (1977) realizaram estudo sobre o efeito do pH na resistência térmica de *B. fulva* e *Aspergillus* sp. utilizando suco de uva como meio de aquecimento, e hidróxido de sódio e ácido tartárico como ajustadores do pH. Como resultado, obtiveram que em pH 2,5, ambos os fungos apresentaram baixa resistência. *B. fulva*, demonstrou ter máxima resistência térmica na faixa de pH entre 3,0 e 4,0, porém acima de 4, mostrou-se sensível ao calor. *Aspergillus* sp., não variou significativamente sua resistência térmica entre pH 3,0 a 5,5.

O efeito do pH do meio de aquecimento na produção de ascósporos de *B. fulva*, foi verificado por SPLITTSTOESSER et al. (1969). Quando o meio de aquecimento foi ajustado em pH menor que 3,0, um ótimo valor foi encontrado. Já, com valores de pH entre 4 e 8, as produções de ascósporos foram menores, porém, similares entre si.

Estudando o efeito do pH do meio de aquecimento na letalidade dos ascósporos de *T. flavus*, BEUCHAT (1988) verificou uma potencialização deste efeito à medida que o pH do meio foi reduzido de 5,0 para 2,5.

O estudo do efeito do pH do meio de aquecimento na porcentagem de germinação de *B. nivea* foi alvo do trabalho realizado por YATES & WOODBINE (1967). Os esporos do fungo foram suspensos em meios ajustados a pHs variando de 3 a 5,5. Após choque térmico de 75°C por 5 minutos, verificou-se uma maior germinação na faixa de pH compreendida entre 4,0 e 4,5, porém, a partir do pH 5,0 a porcentagem de germinação começou a decair.

1.7.2.2 Ácidos Orgânicos

O efeito dos ácidos orgânicos sobre a resistência térmica dos ascósporos de *B. fulva* foi estudado por SPLITTSTOESSER & SPLITTSTOESSER, em 1977. Verificou-se uma

maior resistência ao calor (após tratamento a 85°C por 120 minutos) quando se utilizaram soluções de pH 3,0 contendo ácido málico e tartárico, sendo o último aquele que propiciou melhor porcentagem de sobrevivência. Já, quando os esporos foram aquecidos em soluções (ao mesmo pH) de ácido acético, láctico, fumárico e succínico, a resistência térmica dos esporos foi diminuída. Para *Aspergillus* sp., a adição de ácidos orgânicos não exerceu nenhuma influência na termorresistência.

KING & WHITEHAND (1990) estudaram o efeito causado na resistência térmica de *T. flavus*, pela adição isolada de diferentes ácidos orgânicos no meio de aquecimento (pH 5,0 e 16°Brix). Os resultados mostraram não haver influência estatisticamente significativa dos tipos de ácidos (cítrico, láctico, málico e tartárico) sobre a resistência térmica deste fungo.

RAJASHEKHARA et al. (1998) estudaram a resistência térmica de *N. fischeri* ATCC200957, isolada de mamão papaia em suco de manga adicionado individualmente de ácidos orgânicos (ácido láctico, málico, cítrico e tartárico). Foi verificado que a máxima destruição dos ascósporos, após tratamento térmico a 85°C, ocorreu quando o meio de aquecimento continha ácido cítrico e a menor foi alcançada utilizando o ácido tartárico. Estes autores (RAJASHEKHARA et al.) no ano de 2000, realizaram semelhante experimento utilizando uma cepa de *N. fischeri* isolada de uvas. O meio de aquecimento foi o suco de manga adicionado com os mesmos ácidos do trabalho anterior. Como resultado, observaram uma pequena diferença na inativação dos ascósporos quando o meio foi adicionado dos ácidos cítrico, málico e láctico e com a adição de ácido tartárico, verificou-se a maior inativação térmica destes ascósporos.

BEUCHAT (1988) investigou a tolerância dos ascósporos de três cepas de *T. flavus* aos ácidos orgânicos após exposição a elevadas temperaturas. Os ácidos fumárico, sórbico e benzóico foram mais letais que o acético, málico, cítrico e tartárico.

CONNER & BEUCHAT (1987) verificaram um aumento na taxa de inativação térmica dos ascósporos de *N. fischeri* quando os meios de aquecimento foram adicionados de ácido fumárico (1 e 2%) a pH 2,5, 3,0 e 3,5. Em contrapartida, os ácidos acético, cítrico

e tartárico, nas mesmas concentrações e pH, resultaram apenas em um moderado aumento nas taxas de inativação.

1.7.2.3 Sólidos Solúveis

A influência da concentração de glicose na resistência térmica de *B. fulva* e *Aspergillus* sp. foi estudada por SPLITTSTOESSER & SPLITTSTOESSER (1977). As concentrações de sólidos solúveis em suco de uva foram ajustadas para 5, 26 e 54°Brix. Foi verificada uma grande proteção sobre os ascósporos, de ambos os fungos, à medida que se elevava a concentração da solução de glicose, após tratamento térmico de 85°C por 75 minutos e 85°C por 1 hora para *B. fulva* e *Aspergillus* sp., respectivamente.

Foi verificado por BEUCHAT & TOLEDO (1977) que os ascósporos de *B. nivea* eram protegidos da inativação pelo calor quando o meio de aquecimento (suco de uva) era suplementado com sacarose. Esta proteção apresentava-se maior com o aumento da quantidade de sacarose adicionada ao meio. De acordo com estes autores, a razão para essa proteção não é bem explicada, porém o diferencial de pressão osmótica entre o meio de aquecimento e os ascósporos pode vir a favorecer a resistência térmica.

KING & WHITEHAND (1990) estudaram a influência da composição do meio de aquecimento sobre a inativação térmica de *T. flavus* a 90°C, e verificaram um aumento na resistência térmica dos ascósporos à medida que se aumentava o teor de sólidos solúveis do meio.

TOUNAS & TRAXLER (1994) verificaram uma maior resistência térmica dos ascósporos de *N. fischeri* quando aquecidos em concentrado de abacaxi (42,7°Brix) em comparação com suco de abacaxi (12,6°Brix). Tal fato indica um efeito protetor oferecido pelo produto concentrado devido à maior quantidade de sólidos solúveis. Resultado semelhante foi relatado por RAJASHEKHARA et al. (1996) quando aqueceram ascósporos de *N. fischeri* em sucos de manga e uva contendo diferentes teores de sólidos solúveis (10°Brix, suco diluído, e 45°Brix, suco concentrado), ambos em pH 4. Os sucos concentrados forneceram maior termorresistência ao fungo.

1.7.2.4 Tipos de meios de aquecimento

SPLITTSTOESSER & SPLITTSTOESSER (1977) estudaram a influência de diferentes meios de aquecimento sobre a resistência térmica de ascósporos de *B. fulva* e *Aspergillus* sp. em tratamento térmico realizado a 85°C por 1 hora. Os meios de aquecimento utilizados foram: suco de uva Concorde (5°Brix, pH 3,5), suco de maçã (11°Brix, pH 3,4), suco de tomate (6,6°Brix, pH 4,1) e água destilada (controle). As porcentagens de ascósporos de *B. fulva* recuperados nestes meios foram de 8,4%, 5,7%, 9,2% e 0,06 %, respectivamente. A recuperação de *Aspergillus* sp. nos referidos meios ficou na ordem de 14%, 11%, 12% e 0,61%, respectivamente.

RAJASHEKHARA et al. (1996) verificou que os ascósporos de *N. fischeri* apresentavam melhor sobrevivência ao tratamento térmico (85°C) quando suspensos em sucos de frutas, que quando foram aquecidos em tampão fosfato (pH 7).

KOTZEDIDOU (1997) estudou a resistência térmica de diferentes linhagens de *N. fischeri*, *B. nivea* e *B. fulva* em suco de tomate (16% de sólidos solúveis, pH 4,2) e tampão fosfato (0,1M, pH 7) a 85 e 90°C. O último meio apresentou uma inativação térmica mais rápida dos ascósporos do que o suco de tomate, principalmente a 90°C.

Ascósporos de *T. flavus*, *N. fischeri*, *B. fulva* e *B. nivea*, sendo três linhagens de cada cepa, tiveram sua resistência térmica analisada em cinco sucos diferentes (“blueberry”, cereja, pêssigo, framboesa e morango). Os resultados não mostraram substancial diferença das taxas de inativação nos diferentes meios, apesar dos valores de resistência térmica apresentados em “blueberry” serem ligeiramente inferiores (BEUCHAT, 1986).

CONNER & BEUCHAT (1987) testaram três cepas de *N. fischeri* em três diferentes meios de aquecimento: suco de maçã (12,3°Brix, pH 3,8), suco de uva Concorde (16,6°Brix, pH 3,4) e tampão fosfato (0,1M, pH 7,0). A taxa de inativação térmica dos ascósporos mostrou-se menor em suco de maçã que nos demais meios de aquecimento.

1.7.2.5 Adição de conservantes

BEUCHAT (1988) analisou o efeito de benzoato de sódio e sorbato de potássio na inativação térmica de duas cepas de *T. flavus*, utilizando como meio de aquecimento um produto a base de “blueberry” contendo açúcar, água, goma lacusta, pectina e cloreto de cálcio (pH 3,46, 27,8% p/v de sólidos solúveis). Para a linhagem menos termorresistente, observou-se que a adição de 0,05% de sorbato ou 0,02% de benzoato em um tratamento térmico a 75°C por 1 hora produz semelhante efeito de inativação. Para a mesma cepa, a adição de 0,10% de benzoato gera uma inativação quase total dos ascósporos, quando expostos ao mesmo tratamento térmico. A outra linhagem, não foi afetada pela presença de sorbato ou benzoato em tratamento de 85°C por 1 hora.

RAJASHEKHARA et al. (2000) avaliaram os resultados de resistência térmica de *N. fischeri* em suco de manga e uva que continham sorbato de potássio (0,1%) ou benzoato de sódio (0,1%) ou uma combinação de ambos (0,05% de cada) na sua formulação. Após tratamento térmico à temperatura de 85°C, a maior inativação térmica dos ascósporos foi verificada com a adição da combinação benzoato-sorbato no suco de manga. Para o suco de uva, não houve diferença significativa entre o efeito da letalidade conferido pela adição de benzoato de sódio (0,1%) e pela adição de benzoato-sorbato (0,05% de cada), sendo estas duas formulações, as que apresentaram o maior efeito de inativação.

KING et al. (1969) adicionaram várias concentrações de benzoato de sódio e sorbato de potássio ao suco de uva e verificaram que o crescimento de fungos foi prevenido com a adição de 250 ppm de benzoato de sódio ou sorbato de potássio, por até 16 dias, a temperatura ambiente. Neste mesmo trabalho, os autores ainda avaliaram o efeito fungistático do dióxido de enxofre (SO₂), concluindo ser este o conservante mais eficiente na prevenção do crescimento de ascósporos de *B. fulva*.

1.7.2.6 Tempo e temperatura de incubação

ENGEL & TEUBER (1991) estudaram a influência da temperatura de incubação na resistência térmica de ascósporos de *B. nivea*, e verificaram que os ascósporos produzidos a 30°C, em ágar extrato de malte por um período de 21 dias, apresentaram-se mais

termorresistentes que aqueles produzidos, nas mesmas condições, a temperaturas de 20, 25, e 37°C.

TOUNAS & TRAXLER (1994) estudaram a influência da idade dos ascósporos de *N. fischeri* sobre a resistência térmica do fungo. Os ascósporos incubados por 6 meses se mostraram mais termorresistentes que aqueles com 1 mês de idade.

CONNER & BEUCHAT (1987) realizaram estudo de resistência de *N. fischeri* usando como meio de crescimento o ágar suco de uva e temperaturas de incubação de 18, 21, 25 e 30°C. Para cada uma destas temperaturas, os ascósporos foram coletados em vários intervalos de tempo até um total de 114 dias. Nas temperaturas de 25 e 30°C, foi observado um tempo menor para a maturação dos esporos (13 dias), além de uma maior resistência térmica ao longo do período de incubação. Foram verificados um desenvolvimento de dormência e um aumento de resistência térmica com o aumento do tempo de incubação, sendo estes fenômenos, observados em um tempo de incubação mais curto quando as temperaturas foram as mais altas (25 e 30°C), seguido de 21°C e por último aqueles incubados a 18°C. Os ascósporos mais velhos (114 dias) que foram incubados nas temperaturas de 21, 25 e 30°C não foram inativados mesmo no tratamento mais severo (85°C/1 hora).

1.7.2.7 Características morfológicas e químicas dos fungos com a resistência térmica

BANNER et al. (1979) conduziram um estudo para determinar a diferença da composição química dos ascósporos de duas linhagens de *B. fulva* que apresentaram resistências térmicas diferentes. A linhagem mais termorresistente apresentou uma quantidade superior de ácidos graxos com mais de 20 carbonos. Os autores consideraram que presença destes ácidos graxos de cadeia longa pode explicar, em parte, a alta termorresistência dos ascósporos de *Byssochlamys*, uma vez que tais compostos não foram anteriormente detectados em esporos de fungos comuns.

PITT & HOCKING (1985) verificaram que os ascósporos de *T. flavus* com dimensões relativamente pequenas, podem ser considerados de menor termorresistência. Desta forma, *T. flavus* var. *macrosporus*, que produz ascósporos maiores que 5,0 µm, foram

considerados mais termorresistente que a variedade *flavus* que possui ascósporos de tamanho variando entre 3,5 e 5,0 μm .

1.8. Fatores que afetam o crescimento dos fungos

O tratamento térmico dado a um produto deve ser adequado para a destruição da maioria dos fungos termorresistentes, sem contudo, diminuir a qualidade do produto processado. Caso isto não seja possível, medidas alternativas, com a finalidade de prevenir o desenvolvimento destes microorganismos e a deterioração provocada por eles, devem ser aplicadas. Dentre os fatores que afetam o crescimento destes organismos pode-se citar a atividade de água (a_w), a tensão de oxigênio na embalagem e a temperatura de estocagem dos produtos (TOURNAS, 1994).

A influência da atividade de água sobre o crescimento de *B. nivea*, em sucos e néctares de frutas suplementados com diferentes concentrações de sacarose, foi estudada por BEUCHAT & TOLEDO (1977). A menor atividade de água para crescimento de *B. nivea* foi de 0,90 em néctar de pêssego e suco de ameixa seca adicionado de 40% de sacarose. Neste trabalho, um dos testes realizados procedeu-se adicionando sacarose em ágar suco de uva nas concentrações de 0 (controle), 10, 20, 30, 40, 50 e 60% e distribuindo o meio resultante em placas de Petri. Após solidificação, foi adicionado 0,1 ml da suspensão dos ascósporos na superfície da placa que foi incubada a 30°C em plásticos fechados. Verificou-se que, nos meios com até 30% de adição de sacarose, o número de colônias obtidas manteve-se praticamente o mesmo até o fim do período de incubação. Com 40% de sacarose, uma redução de 80% na formação das colônias foi verificada e com 60%, não foi detectado nenhum crescimento de colônia até o final do período de incubação. No mesmo trabalho, ainda foi verificado o número de dias necessários para o aparecimento das colônias de *B. nivea*, após a inoculação de seus ascósporos nos sucos adicionados de diferentes quantidades de sacarose e estocados nas temperaturas de -30, 7, 21 e 30°C. Verificou-se que a germinação dos ascósporos ocorreu bem mais rápido em 30°C que em 21°C e que para -30°C e 7°C, nenhum crescimento foi observado em um período de 12 semanas (tempo total do teste de incubação).

BEUCHAT (1992) estudou a sobrevivência de ascósporos de *N. fischeri* e *T. flavus* em frutas em pó (maçã, “blueberry”, uva, abacaxi e morango) com aw de 0,23. O fungo adicionado ao produto seco permaneceu incubado à temperatura de 25°C em local lacrado por um período de até 8, 17 e 30 dias. Após cada período de estocagem, as amostras foram submetidas a tratamento térmico de 75°C por 15 e 30 minutos e o número de viáveis contado. O resultado mostrou que ambos os fungos mantiveram alta viabilidade mesmo após 30 dias de estocagem. Os ascósporos *N. fischeri* permaneceram ativados pelo tratamento de secagem, usado para a preparação do inóculo e, quando estocado nas frutas secas, não requereram ativação térmica para a germinação. De outra forma, os ascósporos de *T. flavus*, similarmente preparados e estocados, necessitaram de ativação térmica para uma contagem máxima das colônias, o que indica que seus ascósporos permaneceram em estado de dormência durante a estocagem.

OBETA & UGWUANYI (1997) estudaram o crescimento de *Neosartorya* spp. em sucos de frutas nigerianos (ágar suco de manga, ágar suco de laranja, e ágar suco de abacaxi) contendo vários níveis de açúcar adicionado. A adição de sacarose nas concentrações de 10% para o suco de abacaxi, 11,5% para o suco de laranja e 9% para suco de manga aumentou o número das colônias, enquanto que, concentrações de sacarose iguais ou acima de 30% em suco de abacaxi, 31,5% em suco de laranja e 29% em suco de manga decresceram o número de colônias produzidas.

BEUCHAT (1986) estudou a vida de prateleira de recheios de frutas inoculados com suspensões de *T. flavus* e *N. fischeri*. Colônias de ambos os fungos se desenvolveram em todos os produtos estocados a 25°C por 3 dias. Visíveis colônias de *T. flavus* apareceram nos recheios de frutas entre 28 e 32 dias de incubação a 10°C. Já os produtos inoculados de suspensões de *N. fischeri*, estocados a 10°C, mostraram visível crescimento do fungo somente após 65 dias.

A seleção de uma temperatura de refrigeração para controle da deterioração causada por estes microorganismos depende de alguns fatores como vida de prateleira requerida para o produto e custos referentes à estocagem nesta temperatura (BEUCHAT, 1986).

YATES et al. (1967) concluiu que *B. nivea* tinha uma não usual habilidade para crescer em atmosferas com elevadas concentrações de CO₂. O aumento nas concentrações de CO₂ causou uma redução linear do crescimento do micélio. A 100% de CO₂, *B. nivea* apresentou 4% do seu crescimento normal na presença de ar. Em uma atmosfera com 80% de CO₂ e 20% de O₂, 85% do crescimento normal foi obtido, mas quando 80 % de CO₂ foi combinado com 20% de ar, apenas 16% do crescimento foi produzido. Desta forma, a redução do crescimento, quando as concentrações de CO₂ foram aumentadas, foi mais provavelmente devido à redução de O₂.

KING et al. (1969) reportaram que *B. fulva* cresceu em meio sintético e em uma atmosfera de ar/nitrogênio com menos de 0,27% de O₂, porém não houve crescimento em condições estritas de anaerobiose.

Uma certa quantidade de oxigênio na lata é importante para o rompimento e surgimento dos ascósporos e dependerá do tamanho do “headspace” e do tipo de produto. Se houver crescimento, a composição de gás do “headspace” mudará. Em frutas infectadas com *B. fulva*, ocorreu um aumento de 52% de CO₂ nos gases do “headspace” em menos de 2 semanas, enquanto que o O₂ decresceu gradualmente (TOURNAS, 1994).

KING Jr. & WHITEHAND (1990), comparando a habilidade de *B. fulva*, *N. fischeri* e *T. flavus* em crescer sob baixas tensões de oxigênio, demonstraram que o último é menos tolerante a baixos níveis de O₂ que *B. fulva* e *N. fischeri*. Quando se realizou o teste em uma câmara de gás nitrogênio fluente (com presença 250 ppm de O₂ a 25°C) não houve crescimento de *T. flavus* após 56 dias, enquanto que *B. fulva* e *N. fischeri* apresentaram crescimento nestas mesmas condições.

1.9 Efeitos da deterioração causada por fungos filamentosos termorresistentes em alimentos

OLLIVER E RENDLE (1934) realizaram estudos sobre os efeitos da contaminação de alimentos causada por fungos termorresistentes. Foram examinadas polpas e conservas de frutas infectadas por *B. fulva* e o sinal mais evidente da deterioração por este fungo foi o amolecimento da fruta com posterior desintegração. Verificou-se que as conservas de frutas

alteradas tinham uma aparência que sugeria um superprocessamento (cozimento excessivo) ou utilização de frutas muito maduras como matéria-prima, sendo detectado odores desagradáveis e leve acidificação dos produtos. A constatação da alteração de frutas processadas só pode ser feita com a abertura das embalagens, uma vez que a eventual produção de gás não estufou as mesmas.

Em produtos solidificados, como géis de frutas, os fungos termorresistentes causam deterioração pelo crescimento na superfície do produto e pela solubilização da pectina ou amido do substrato. Mas, em algumas situações, a quantidade de crescimento fúngico é tão limitada que colônias ou mesmo fragmentos miceliais não podem ser detectados. Por exemplo, em um caso de deterioração provocada por *Byssochlamys* em recheio de torta de limão, houve a solubilização do gel de amido, mas nenhum micélio tinha sido encontrado (HOCHING & PITT 1984).

Em embalagens contendo baixos níveis de oxigênio atmosférico, também ocorre o amolecimento extensivo das frutas processadas pela ação de *Byssochlamys*, embora haja a formação de pequena quantidade de micélio (OLLIVER & RENDLE, 1934). Os produtos líquidos infectados com este fungo, sob baixas tensões de oxigênio, apresentam fermentação com produção de CO₂ (estufamento nas embalagens) e visível deterioração (HOCKING & PITT, 1984).

ARAGÃO (1989) avaliou a deterioração em suco de morango causada por *B. nivea*, *N. fischeri*, *T. flavus* e *E. javanicum*. Para a realização do teste, tubos de ensaio contendo suco de morango foram inoculados com ascósporos ativados destes fungos, em duplicata. Dois dos tubos continham uma camada de vaspar estéril e outros dois sem a adição de vaspar para cada espécie de fungo. Em condições de aerobiose (tubos abertos), foi observado o crescimento de micélio em 3 dias de incubação. A única espécie que apresentou crescimento em tubo selado e produção de gás foi *B. nivea*. Nenhuma das espécies produziu alterações de pH no suco, e a modificação de sua cor, só foi constatada para *B. nivea* e *T. flavus*.

BAGLIONI (1998), estudando a deterioração causada por uma cepa de *N. fischeri* em polpa de tomate (8° Brix), observou, após 1 mês de incubação a 30°C, as seguintes

alterações: escurecimento devido à produção de pigmento escuro pelo fungo; separação de fases (soro/polpa); diminuição na viscosidade do produto indicando a produção de enzimas pectinolíticas; alcalinização da polpa (o pH inicial subiu de 4,3 para 8,99) e liberação de odor levemente amoniacal.

1.10 Produção de Metabólitos

1.10.1 Produção de Enzimas

Várias enzimas são produzidas pelos fungos filamentosos temorroresistentes, sendo pectinases, amilases e proteinases as mais abundantes (TOURNAS, 1994).

A primeira produção de enzimas pectinolíticas por *Byssochlamys* foi relatada por OLLIVER & RENDLE (1934).

RICE et al. (1977) estudaram o crescimento de *B. fulva* em pêssegos enlatados e verificaram que enzimas pécticas foram excretadas, por estes fungos, após 16 dias de incubação a 30°C. Inicialmente, ocorreu um aumento da pectina solúvel em água seguido por um decréscimo da mesma. Pouco crescimento foi observado durante a primeira fase de mudança na concentração da pectina, enquanto que as mudanças na textura já puderam ser notadas rapidamente. O grau de maturidade e variedade da fruta influenciou a alteração provocada por *B. fulva*; sendo o crescimento mais rápido em frutas maduras com baixa acidez e alto teor de sólidos solúveis.

YATES & MOONEY (1968) estudaram as condições requeridas para a produção de várias enzimas pécticas por *B. nivea*. A produção máxima de enzimas foi obtida em meio contendo glicose e pectina após 5 dias de incubação a 35°C. Foi verificado ainda, que um aumento na produção da enzima gerou uma diminuição na concentração de pectina.

UGWUANYI & OBETA (1999) reportaram a atividade de enzimas pectinolíticas e celulolíticas produzidas por *Neosartorya* spp., *B. nivea* e *Paecilomyces varioti* em dois meios artificiais (um contendo pectina e outro tecido de manga). Além disso, avaliaram o efeito de desintegração, causado por estas enzimas, em meios artificiais contendo tecidos de manga. Todos os isolados produziram consideráveis atividades de hidrolase, liase e

pectinase nos meios artificiais. Para *B. nivea*, verificou-se uma grande atividade de celulase. Foi observado que cada isolado causou considerável desintegração dos meios. O trabalho sugere ainda que possa haver uma possível cooperação entre a pectinase e a celulase na desintegração dos tecidos de frutas estudados.

1.10.2 Produção de Micotoxinas

Certas linhagens de *N. fischeri* são capazes de produzir toxinas como as fumitremorginas (A, B, C) e verruculogena, compostos estes capazes atuar no sistema nervoso central e causar tremores, convulsões e morte em animais, sendo a verruculogena o composto de maior toxicidade (TOURNAS, 1994).

NIELSEN et al. (1988) estudaram a produção dessas micotoxinas por *N. fischeri*, em vários meios, e observaram que a adição de glicose, frutose ou sacarose aumentava a produção de fumitremorgina. A verruculogena foi produzida em todos os meios testados, em maior quantidade que as demais, seguida de fumitremorgina A e C.

A patulina é uma micotoxina produzida por espécies do gênero *Aspergillus* (*A. clavatus*, *A. terreus*), *Penicillium* (*P. urticae*, *P. expansum*) e *Byssochlamys* (*B. fulva* e *B. nivea*), sendo que estes últimos têm demonstrado alto potencial para a produção desta micotoxina (RICE et al., 1977; TOURNAS, 1994).

SILHA & ASKAR (1999), que revisaram estudos sobre a ação da patulina em suco de maçã e comida para bebê, relatam que esta micotoxina tem revelado grande espectro de atividade e pode agir como agente carcinogênico e de mutação. A patulina é um contaminante comum de maçãs maduras que são utilizadas na fabricação dos sucos e concentrados, sendo encontradas naturalmente em maçãs apodrecidas que podem conter níveis entre 1120-6235 ng/g (SYDENHAM et al., 1997). Quando as maçãs sãs e podres são processadas juntas, a toxina pode ser transferida para o suco ou concentrado, através de solubilização em água. Devido à essência ácida do meio, a patulina não pode ser degradada pelo processamento térmico. PRIETA et al. (1994) analisaram a presença de patulina em 100 amostras de suco de maçã comercial. O resultado mostrou que esta toxina está presente em 82% das amostras, sendo que 75% delas continham uma concentração de patulina

inferior a 10 µg/l. A máxima concentração de patulina encontrada foi de 170 µg/l. O limite máximo permitido para patulina, na maioria dos países, é de 50 ppb, e em alguns países, existe um especial limite para dietéticos e “baby-foods” de 10 ppb.

BURDA (1992) analisou a presença de patulina em 328 maçãs, pêras e produtos com misturas de frutas incluindo sucos, molhos, purês, geléias, e polpas de maçã de 38 produtores australianos. Em 75 das 258 amostras de sucos e concentrados foi detectada patulina entre 5 a 50 µg/l e em 73 amostras foi verificada uma concentração da toxina entre 51 a 1130 µg/l. De 70 amostras, que não são sucos, houve detecção de patulina em 18, sendo que os níveis detectados se mostraram menores que 50 µg/kg. LOPEZ-DIAZ et al. (1996), analisaram 4 amostras de suco de maçã, produzido na Espanha, e verificaram a presença de patulina abaixo dos valores recomendados, com exceção de uma que continha 184 µg/kg.

O gênero *Byssochlamys* spp. é ainda capaz de produzir outras toxinas como o ácido byssoclâmico, a byssotoxina A, a assimetrina e a variotina (TOURNAS, 1994).

2. CINÉTICA DE INATIVAÇÃO TÉRMICA (MÉTODO DE LINEARIZAÇÃO DE ALDERTON & SNELL, 1970)

Grande parte dos microorganismos apresenta uma taxa de inativação térmica logarítmica, ou seja, quando se grafica o logaritmo do número de sobreviventes *versus* tempo de aquecimento, a uma dada temperatura, obtém-se uma linha reta (KING Jr. et al., 1979). Quando são graficados estes valores para os fungos termorresistentes, observa-se que a curva de inativação não é logarítmica, apresentando um “ombro” no início, seguido de uma taxa de morte acelerada (parte logarítmica da curva). À medida que a temperatura de inativação aumenta, a fase “lag” ou “ombro” vai diminuindo, ficando a curva semelhante a uma reta (KING Jr. et al., 1979; BAYNE & MICHENER, 1979; ARAGÃO, 1985; KING & HALBROOK, 1987; KING Jr. & WHITEHAND 1990; KOTZEKIDOU 1997; BAGLIONI 1998).

O cálculo da resistência térmica de microorganismos, que seguem uma taxa de morte logarítmica, é realizado a partir da determinação dos parâmetros “D” (tempo

requerido, a uma dada temperatura, para destruir 90% da população de microorganismos em um meio de aquecimento definido) e “Z” (graus de temperatura necessários para ocasionar uma variação de 10 vezes no valor de D).

Para a linearização da curva de sobreviventes pelo método de ALDERTON & SNELL (1970), utiliza-se a seguinte equação:

$$(\log N_0 - \log N)^a = kt + C \Rightarrow \text{Equação 1}$$

onde:

N_0 = Número inicial de ascósporos/ml;

N = Número de sobreviventes após um tempo t de tratamento térmico a uma dada temperatura (ascósporos/ml);

a = Expoente para linearização;

k = Constante de taxa de morte (coeficiente angular da curva linearizada) (min^{-1});

C = Constante e intercepto da curva linearizada;

t = tempo de aquecimento (min).

Considerando $C=0$, a equação 1 pode ser rearranjada da seguinte maneira:

$$(\log N_0 - \log N)^a = kt$$

$$a \log (\log N_0 - \log N) = \log K + \log t$$

$$\log (\log N_0 - \log N) = 1/a \log K + 1/a \log t$$

Assim, o valor de “a” pode ser obtido pelo inverso da inclinação do gráfico: $\log (\log N_0 - \log N)$ versus $\log t$.

Este valor de “a” é calculado à menor temperatura de tratamento térmico e pode ser aplicado na linearização das curvas obtidas de tratamentos mais severos. Assim, se a taxa de morte seguir a equação 1 e não houver erros experimentais ($C=0$) o valor de $1/k$ é derivado da equação 2:

$$1/k = t / (\log N_0 - \log N)^a \Rightarrow \text{Equação 2}$$

A equação 2 é similar à equação da curva logarítmica (equação 3) quando $a = 1$:

$$D = t / (\log N_0 - \log N) \Rightarrow \text{Equação 3}$$

Por analogia entre as equações 2 e 3, “1/k” é um parâmetro equivalente a “D”. O parâmetro equivalente a “Z” (Z*) pode ser obtido pelo negativo do inverso do coeficiente angular da curva $-(\log k)$ versus Temperatura (°C).

2.1 Parâmetros de Resistência Térmica

Muitos estudos têm sido realizados com a finalidade de determinar os parâmetros de resistência térmica dos fungos filamentosos termorresistentes em produtos de frutas ou outros meios utilizados como substrato. Um resumo de alguns destes valores é apresentado na tabela II.1.

Tabela II.1 – Parâmetros de resistência térmica de fungos filamentosos

Autor	Fungo	Tempo (minutos) necessário para alcançar uma redução decimal (1/k ou D)	Valor de Z ou Z* (°C)	Método e Meio utilizado
Aragão (1989)	<i>B. nivea</i>	1/K ₈₀ = 500 1/K ₈₅ = 60,6 1/K ₉₀ = 13,3 1/K ₉₃ = 3,41	6,17	Frasco de três bocas Meio: Suco de morango (15°Brix, pH 3,0)
	<i>N. fischeri</i>	1/K ₈₀ = 200 1/k ₈₅ = 41,84 1/K ₉₀ = 5,51 1/K ₉₃ = 1,61	6,15	
	<i>E. javanicum</i>	1/K ₈₀ = 2,71 1/K ₈₅ = 5,03 1/K ₉₀ = 1,41	7,79	
	<i>T. flavus</i>	D ₇₅ = 53,9 D ₈₀ = 17,9 D ₈₅ = 3,3 D ₉₀ = 0,9	9,25	
Baglioni (1998)	<i>N. fischeri</i> (1 mês de idade)	1/K ₉₀ = 6,14 1/K ₉₂ = 4,72 1/K ₉₄ = 2,62	10,8	Tubos TDT selados com maçarico Meio: Polpa de tomate (8°Brix)
	<i>N. fischeri</i> (3 meses de idade)	1/K ₉₀ = 10,2 1/K ₉₂ = 6,31 1/K ₉₄ = 4,59	11,6	

Kotzekidou (1997)	<i>B. nivea</i> 102	$1/K_{85} = 19,8$	*	Tubos de rosca (8x100mm) Meio: Pasta de tomate (pH 4,2, 16% de sólidos solúveis a 21°C)	
	<i>B. fulva</i> 193	$1/K_{85} = 24,1$	*		
	<i>N. fischeri</i> 101	$1/K_{85} = 13,0$	*		
	<i>B. nivea</i> 102	$1/K_{85} = 8,8$	*	Tubos de rosca (8x100mm) Meio: Tampão fosfato 0,1M, pH 7,0)	
	<i>B. fulva</i> 193	$1/K_{85} = 8,1$	*		
	<i>N. fischeri</i> 101	$1/K_{85} = 8,5$	*		
King & Whitehand (1990)	<i>T. flavus</i>	$1/K_{90} = 5,2$	*	Tubos TDT selados com maçarico. Meio: Solução de glicose 16°Brix	pH 3,6
		$1/K_{90} = 6,4$	*		pH 5,0
		$1/K_{90} = 7,1$	*		pH 6,6
Gumerato (1995)	<i>N. fischeri</i>	$D_{85} = 15,11$	5,28	Tubos TDT fechados com tampão de algodão Meio: Suco de maçã (15,5°Brix, pH 3,0)	
		$D_{88} = 4,70$			
		$D_{90} = 2,63$			
		$D_{93} = 0,43$			
Delgado (2001)	<i>N. fischeri</i> (4 meses)	$1/k_{90} = 3,11$	*	Tubos TDT fechados com tampão de algodão Meio: Água destilada	

*Trabalhos onde o valor de Z não foi determinado

III - MATERIAL E MÉTODOS

1 AMOSTRAGEM

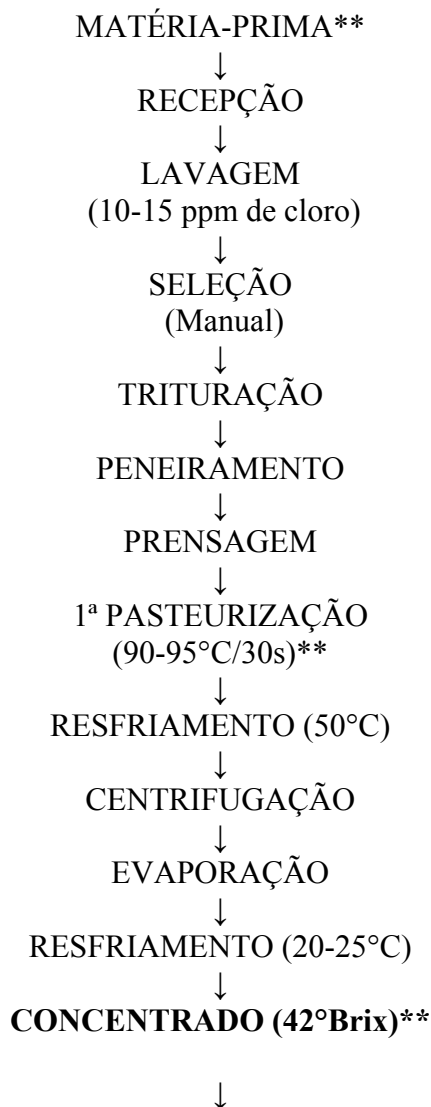
A amostragem foi realizada em duas fases. Na primeira foram retiradas amostras da linha de processamento de néctar de maçã e na segunda utilizou-se polpas comerciais congeladas de morango e uva, bem como, suco de morango e uva pasteurizados e preservados com conservantes.

1.1 Amostras do Processamento do Néctar de Maçã

Para a obtenção das amostras, acompanhou-se pessoalmente a fabricação do néctar de maçã (suco de maçã polposo) na linha de processamento de uma empresa localizada no estado do Rio Grande do Sul. O fluxograma de fabricação é apresentado na figura III.1. A produção do néctar de maçã foi realizada em duas etapas distintas: Na primeira, fabricou-se o concentrado de maçã (42° Brix) na planta I, e na planta II, obteve-se “produto pronto para beber” (11,6°Brix) a partir do concentrado que fora transportado, sob refrigeração, de uma planta a outra. Foram utilizadas maçãs das variedades Fuji e Gala. A quantidade coletada foi de aproximadamente 200 ml de produto por ponto de amostra, sendo estas mantidas sob refrigeração (exceto o produto final) até o momento de análise. Para as amostras retiradas da planta I, o tempo decorrido até o momento da análise foi de 48 horas e para aquelas provenientes da planta II, 24 horas.

FLUXOGRAMA DE SUCO DE MAÇÃ POLPOSO (NÉCTAR)

Planta I - Fabricação do Concentrado



ENVASE EM TAMBORES
(200 Litros)

 ↓
 TRANSPORTE REFRIGERADO DOS
 TAMBORES
 (Planta I → Planta II)

Planta II - Fabricação do Néctar de Maçã

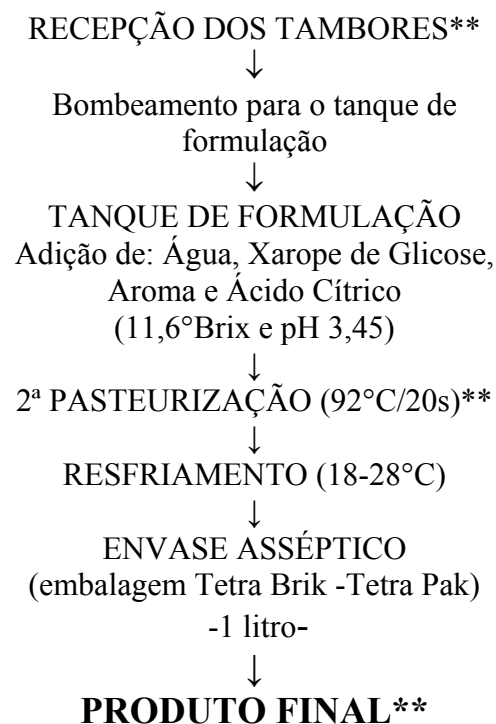


Figura III.1 – Fluxograma de elaboração do Néctar de Maçã (Suco de Maçã Polposos)

** Pontos de coleta do processo

Tabela III.1 - Descrição dos pontos de coleta das amostras retiradas do processo produtivo de néctar de maçã e seus respectivos códigos. (Obs.: coletadas amostras de 200 ml por ponto, em duplicata).

Descrição dos pontos de coleta no processo	Código
Matéria-Prima	MP
Produto antes da 1ª pasteurização	PA1
Produto depois da 1ª pasteurização	PP1
Produto depois do concentrador (Concentrado de maçã)	PC
Produto resfriado	PR
Produto antes da 2ª pasteurização	PA2
Produto depois da 2ª pasteurização	PP2
Produto final	PF

1.2 Amostras das Polpas Comerciais de Morango e Uva Congeladas

As polpas comerciais congeladas são produtos utilizados em lanchonetes para a elaboração de sucos de frutas. O produto é comercializado em sacos plásticos de 1 Kg contendo 10 embalagens plásticas individuais de 100 gramas. A polpa de morango possui pH 3,9 e 9,2°Brix e a de uva pH de 3,6 e 13° Brix. Todos os testes de detecção, nas polpas comerciais, foram realizados em duplicata.

1.3 Amostras de Sucos Pasteurizados e Preservados com Benzoato de Sódio e Sorbato de Potássio

Estes produtos são comercializados em embalagens institucionais, acondicionados em tambores plásticos de 5 Kg, sob refrigeração. Nos estabelecimentos comerciais, o suco é diluído conforme recomendações do fabricante. A amostra trazida para análise continha um

volume de aproximadamente 300 ml e foi retirada da empresa produtora. Todo o conteúdo da amostra foi utilizado para as análises. Os sucos de morango e uva têm pH de 2,9 e o teor de sólidos solúveis para o de morango é de 22 °Brix e para o de uva é de 74,4 °Brix.

2. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS TERMORRESISTENTES

2.1 Isolamento dos fungos filamentosos a partir de produtos de frutas

Foi utilizado o método de detecção baseado em SPLITTISTOESSER (1976), que sugere, para grandes quantidades de amostras, um choque térmico inicial a 70°C por 2 horas para assegurar, que na primeira hora, a temperatura atinja o equilíbrio em todo o produto e o tempo restante seja utilizado para o tratamento térmico. ARAGÃO (1989) obteve ótimos resultados utilizando este método para detecção e enumeração de fungos termorresistentes. Este choque inicial tem como objetivo destruir as formas termolábeis e ativar os esporos dormentes. Todo o procedimento de tratamento térmico foi realizado em banho de água termostático sob agitação (Microquímica).

2.1.1 Amostras do processo produtivo de Néctar de Maçã

As amostras foram submetidas a um choque térmico em frascos de vidro contendo aproximadamente 200 ml de produto. Foi utilizado banho de água termostático regulado à 70°C por 2 horas. Para a análise do produto final (néctar de maçã – embalagem Tetra Brik), 100 ml do produto foram assepticamente transferidos para um Erlenmeyer de 250 ml antes de ser levado ao aquecimento. O nível de água do banho foi mantido a não menos que 2,5 cm acima do nível do conteúdo dos frascos e estes foram homogeneizados em intervalos aproximados de 5-10 minutos. Terminado o aquecimento, o recipiente foi imediatamente resfriado em banho de gelo, por aproximadamente 1 minuto. A seguir, 10 ml da amostra e 10 ml das diluições decimais sucessivas preparadas (10^{-1} e 10^{-2}), foram plaqueadas por profundidade (triplicata) em meio Ágar Batata Dextrose (pH 5,6, MERCK) preparado com 3% de ágar e adicionado com 50 mg/l de rosa de bengala para evitar o espalhamento das colônias e inibir outras formas microbianas (BAGLIONI, 1998). Após solidificação, as placas foram envolvidas por um filme plástico (para evitar ressecamento) e levadas invertidas para a incubação.

Para a análise do produto final (néctar de maçã), além do plaqueamento das diluições decimais, também foi realizado plaqueamento direto, onde a amostra resfriada (100 ml) foi transferida para um Erlenmeyer contendo 100 ml de meio PDA e o conteúdo final foi distribuído em placas de Petri. A incubação de todas estas amostras ocorreu a 30°C durante 7 a 10 dias. Transcorrido este período, observou-se o desenvolvimento de colônias que foram então isoladas.

2.1.1.2 Amostras da matéria-prima (Maçã)

Aproximadamente 100 gramas da fruta foram triturados em liquidificador estéril (esterilizado com solução de 200 ppm de Hipoclorito de Cálcio por 15 minutos). Antes da trituração, no liquidificador foram adicionados, juntamente com a fruta picada, 100 gramas de meio PDA (adaptado de EIROA & AMSTALDEN, 1985). A amostra triturada foi colocada em Erlenmeyer estéril de 250 ml e levada ao banho para o choque térmico a 70°C por 2 horas. Após resfriamento em banho de gelo, o conteúdo do recipiente foi distribuído em placas de Petri, as quais foram levadas a incubação por 7 a 10 dias a 30°C, invertidas e envolvidas por filme plástico.

2.1.2 Amostras de Polpas Comerciais Congeladas de Morango e Uva

O conteúdo de um pacote individual (100 ml) foi colocado para descongelar em geladeira (por aproximadamente 14 horas) e o produto líquido resultante foi assepticamente despejado em um Erlenmeyer de 250ml contendo 100 ml de água destilada estéril formando uma solução de 200 ml. Após aquecimento por 2 horas a 70°C, a amostra foi imediatamente resfriada e, a partir dela, preparadas diluições sucessivas (10^{-1} e 10^{-2}) em água estéril. Dez mililitros da amostra e 10 mililitros das diluições, foram plaqueadas por profundidade (duplicata) em meio PDA preparado da maneira descrita anteriormente. As placas foram incubadas a 30°C por 7 a 10 dias.

Esta metodologia foi executada para duas amostras, porém, visando a obtenção de melhores resultados, para a terceira optou-se pelo plaqueamento direto onde somente 100 ml da amostra foram levados para aquecimento no banho termostático. Transcorrido o tempo de choque térmico, a amostra foi resfriada em banho de gelo e transferida para um Erlenmeyer contendo 100 ml de meio PDA. O conteúdo final, após homogeneização, foi

distribuído em placas de Petri e incubado da maneira anteriormente descrita. Todo o procedimento foi realizado em duplicata.

2.1.3 Amostras de Suco de Morango e Uva Pasteurizados e Preservados

Cento e cinquenta mililitros de amostra, enviada pela empresa, foram assepticamente transferidos para um Erlenmeyer estéril de 250 ml (em duplicata) e submetidos a choque térmico de 70°C por 2 horas. Finalizado o tratamento, uma amostra foi resfriada, submetida a diluições, plaqueada por profundidade e incubada da forma descrita anteriormente. A duplicata recebeu plaqueamento direto, sendo transferida para Erlenmeyer contendo 150 ml de meio PDA e o conteúdo final distribuído em placas de Petri e incubado a 30°C por 7 a 10 dias.

2.2. Identificação

A identificação foi realizada a partir das observações macroscópicas e microscópicas dos fungos filamentosos isolados. A análise macroscópica foi baseada nas descrições das colônias nos meios Ágar Czapeck Extrato de levedura (CYA), Ágar Extrato de Malte (MEA), Ágar Glicerol Nitrato 25% (G25N) formulados de acordo com PITT & HOCKING, 1985. Após inoculação do fungo nas placas contendo os meios, estas foram incubadas, envolvidas por um saco plástico, em três diferentes temperaturas. Aqueles inoculados em CYA e G25N, tiveram sua incubação realizada nas temperaturas de 5°C (geladeira), 25°C e 37°C e os colocados para crescer em MEA, somente foram incubados a 25°C. Também foram realizadas incubações adicionais, em meios PDA e MEA, a 30°C.

Após incubação por 7 dias, foram executadas as análises micro e macroscópicas das colônias formadas. A metodologia microscópica para a avaliação morfológica do fungo em lâmina procedeu-se da seguinte maneira: primeiramente foi depositada uma gota de álcool sobre a lâmina; em seguida, com o auxílio de agulhas – montadas de forma a ficarem fixas em uma das extremidades de palitos de madeira – um pedaço do fungo foi colocado sobre o álcool e suas estruturas foram abertas pela manipulação das agulhas. Após isto, procedeu-se a fixação do fungo flambando a lâmina em bico de bunsen. A coloração foi realizada pingando uma gota de corante lactofucsina (formulado de acordo com PITT & HOCKING, 1985).

Pela microscopia, foram observadas tanto a presença dos ascocarpos, ascos e ascósporos, como suas características. Além disso, foi identificada a fase anamorfa (assexuada). Todo o processo baseou-se na chave de identificação e nas características dos fungos apresentadas por PITT & HOCKING (1985).

A microscopia que permitiu a identificação das cepas isoladas, foi realizada em microscópio da marca Quimis com as seguintes características: Modelo Q-106F2, cabeça triangular e oculares reguladas para o aumento de 16 vezes.

O registro fotográfico das estruturas destas cepas foi realizado em um microscópio Olympus, modelo CH 40 e oculares reguladas para o aumento de 10 vezes. A lâmina foi corada com Lactofucsina e as espécies tinham diferentes idades e estiveram incubadas em meio PDA.

3. ISOLAMENTO E ESTOCAGEM DAS CEPAS

3.1 Isolamento

Cada colônia de fungo que se desenvolveu nas placas foi isolada em outras contendo meio PDA (pH 5,6, MERCK). A transferência ocorreu retirando-se um fragmento da colônia original, com o auxílio de uma alça de platina, e inoculando-o o centro da placa com o meio de isolamento, em duplicata.

Para a identificação das culturas isoladas do processo produtivo de suco de maçã, cada cepa recebeu um código de acordo com a origem da amostra e a seqüência de isolamento. Por exemplo, o segundo fungo isolado do produto concentrado de maçã, recebeu o código 2PC. Já as cepas isoladas das polpas e do suco de morango, foram codificadas de acordo com a seqüência de isolamento e acrescidas das siglas PM (polpa de morango) e SM (suco de morango). Por exemplo, a primeira cepa isolada da polpa de morango recebeu a codificação 1PM.

3.2 Estocagem

As cepas isoladas foram estocadas em tubos inclinados contendo meio PDA ou meio MEA. Cada colônia que se desenvolveu nas placas originais foi transferida, com o

auxílio de alça de platina, para o tubo inclinado por estriamento. Os tubos de estoque permaneceram sob refrigeração a 5°C, em geladeira.

4. SELEÇÃO DO ISOLADO MAIS TERMORRESISTENTE

4.1 Preparação das suspensões de fungos

4.1.1 Esporulação das cepas isoladas

Garrafas de Roux contendo aproximadamente 180 ml de Ágar Extrato de Malte (MEA, pH 5,4, formulado conforme PITT & HOCKING, 1985), foram inoculadas com 0,5 ml da suspensão previamente preparada de cada cepa de fungo isolado. Para a prévia preparação da suspensão, transferiu-se, com o auxílio de uma alça estéril, um fragmento da colônia do fungo para o tubo com tampa rosqueável de 16X100 mm contendo 0,5 ml de solução 0,05% de Tween 80 (para dispersar os esporos). A inoculação da suspensão do fungo em garrafa de Roux, foi feita entornando o conteúdo do tubo na boca da garrafa, após flambagem do mesmo. Este procedimento foi realizado em duplicata para cada uma das cepas isoladas, e a incubação procedeu-se a 30°C por 30 dias, para permitir a esporulação e desenvolvimento das estruturas de resistência dos fungos produtores de ascósporos e ascos.

4.1.2 Coleta dos ascósporos da Garrafa de Roux

Transcorrido o período de 1 mês para o amadurecimento dos esporos, vinte e cinco mililitros de água destilada estéril foram transferidos para cada garrafa contendo os fungos, e a superfície foi raspada levemente com o auxílio de pérolas de vidro e uma bagueta de vidro estéril. A suspensão resultante foi filtrada através de camadas de gaze estéril, para remover os fragmentos de hifas e centrifugada a 4000 rpm por 30 minutos sob uma temperatura de 5°C. Posteriormente, foi realizada a lavagem do precipitado com mais uma centrifugação em água estéril e verificada (microscopicamente) a obtenção de ascósporos livres, ascos e a ausência de hifas. A suspensão final foi preparada ressuspendendo o precipitado em um volume de água suficiente para se obter uma suspensão bastante concentrada (na ordem de 10^4 a 10^5 ascósporos/ml para os fungos produtores de ascos). A suspensão foi estocada sob refrigeração em recipientes contendo pérolas de vidro (para facilitar a homogeneização antes do uso).

4.2 Fabricação do suco de maçã

Para a realização das análises de resistência térmica e seleção dos fungos mais termorresistentes, foi utilizado suco de maçã polposo comercializado em embalagens Tetra Brik (retirados da empresa de onde foram coletadas as amostras). Para a correção do pH do suco, originalmente ao pH 3,45, utilizaram-se soluções de NaOH 20% e ácido cítrico 18%. Após correção com as respectivas soluções, os pHs foram ajustados para 2,5, 3,5 e 4,5. O teor de sólidos solúveis das amostras já padronizadas firmou-se em 11,3°Brix. As amostras de suco, em seus respectivos pHs, foram colocadas em recipientes lacrados, com capacidade para 50 ml, e levadas para autoclavagem a 121°C por 15 minutos. O suco, assim tratado, foi estocado sob refrigeração em diversos frascos até uso.

4.3 Determinação do tempo de subida da temperatura

Os tubos TDT -Thermal Death Time- (8 X 124 mm) foram preenchidos com 2 ml de suco de maçã, que foi utilizado como meio de aquecimento. Um termopar, de cobre-constantan, previamente calibrado, ligado a um multímetro (Hewlett Packard 34401A) foi introduzido no tubo de modo a permanecer centrado em seu interior durante o ensaio. Após esta montagem, o tubo contendo o termopar, foi colocado no banho previamente ajustado nas temperaturas em que seriam realizadas as análises (80°C, 85°C, 90°C, 92°C, 95°C e 97°C), e o cronômetro foi acionado. Quando a amostra atingiu a temperatura selecionada (leitura em milivolts através do multímetro e transformação para “graus Célsius (°C)” pela equação obtida na calibração), registrou-se o tempo marcado pelo cronômetro (tempo de subida). O retardo térmico foi determinado por média de 5 medidas de tempo.

4.4 Aplicação dos choques térmicos para a seleção do isolado mais termorresistente

A fim de realizar ensaios de destruição térmica com o fungo mais termorresistente, as suspensões de esporos preparadas anteriormente, foram submetidas a diferentes choques, variando de 80°C/20 minutos a 97°C/15 minutos, se necessário (BAGLIONI, 1998). A tabela III.2 mostra os choques térmicos aplicados.

Tabela III.2– Binômios (Tempo/Temperatura) utilizados nos choques térmicos aplicados às cepas dos fungos isolados para a seleção da cepa de maior termorresistência.

TEMPERATURA (°C)	TEMPO (minutos)
80	20
85	15
92	10
95	10
	20
97	15

Para cada fungo, foram utilizados tubos TDT (8 X 124 mm) com 1,8 ml de suco de maçã (11,3°Brix, pH 3,5) e inoculados com 0,2 ml das suspensões preparadas (item 4.1), seguido de homogeneização em vortex. Os tubos TDT foram selados em maçarico O₂/GLP e submersos em banho termostático de água sob agitação (Microquímica) para a aplicação dos choques térmicos de acordo com o binômio tempo/temperatura especificado, sendo o início do choque dado após o tempo de subida em cada temperatura definida (item 4.3). Terminado o choque térmico os tubos foram resfriados imediatamente em banho de gelo por um tempo não superior a 1 minuto.

Após a abertura dos tubos (com o auxílio de um diamante cortador de vidro), sob condições assépticas, todo o seu conteúdo foi transferido para placas de Petri com o auxílio de uma pipeta Pasteur, e coberto com meio PDA seguido de homogeneização. As placas foram incubadas a 30°C por até 15 dias. O crescimento do fungo após este período foi um indicativo de resistência ao choque térmico.

5. ENSAIOS DE RESISTÊNCIA TÉRMICA COM A CEPA DE MAIOR IMPORTÂNCIA DENTRE AS MAIS TERMORRESISTENTES

5.1 Produção e coleta dos ascósporos do fungo termorresistente de maior importância comercial

A cepa do fungo selecionada foi inoculada (como no item 4.1.1) em 18 garrafas de Roux contendo aproximadamente 180 ml de meio MEA e incubada a 30°C por 1 mês.

Para a coleta dos ascósporos, 25 ml de água destilada estéril foram transferidos para cada garrafa e a superfície raspada levemente com o auxílio de pérolas de vidro e uma bagueta estéril. A suspensão, recém preparada, foi filtrada e centrifugada conforme descrito no item 4.1.2 e ressuspendida em volume de água estéril suficiente para que a concentração de ascósporos estivesse na ordem de 10^5 ascósporos/ml. A suspensão final foi estocada sob refrigeração em frasco contendo pérolas de vidro até o momento de sua utilização.

5.2 Determinação das condições ótimas de ativação dos ascósporos

Para a determinação das condições ótimas de ativação dos ascósporos, foi utilizada a temperatura de 85°C (BEUCHAT, 1986; GUMERATO, 1995 e BAGLIONI, 1998) durante os tempos 0 (controle), 5, 10, 15 e 20 minutos. Para o ensaio, foi utilizado suco de maçã (11,3°Brix), como meio de aquecimento, a três diferentes pHs (pH 2,5, pH 3,5 e pH 4,5).

Em cada tubo TDT, foram adicionados 0,2 ml da suspensão de ascósporos em 1,8 ml de suco de maçã previamente autoclavado e ajustado nos pHs. Após homogeneização, utilizando um vortex, os tubos foram selados em maçarico O₂/GLP e submetidos ao calor do banho de água termostático (Microquímica), que já estava ajustado à temperatura de 85°C. O tempo de subida até a temperatura desejada foi determinado previamente conforme item 4.3. Transcorridos os tempos de aquecimento definidos, os tubos foram retirados do banho quente e resfriados imediatamente em um banho de gelo por um tempo não superior a 1 minuto.

Para a determinação do número de ascósporos ativados, os tubos foram abertos assepticamente (com o auxílio de um diamante cortador de vidro) e em seguida feitas diluições seriais em água destilada autoclavada. A partir de diluições sucessivas, foram realizados plaqueamentos em profundidade com meio MEA (formulado conforme PITT & HOCKING, 1985) acrescido de 50 mg/l de rosa de bengala. Apenas 1 ml de diluição foi colocado por placa (em duplicata). A temperatura de incubação foi de 30°C e a leitura do número de colônias formadas foi realizada a partir do terceiro dia. A contagem foi expressa em UFC/ml.

5.3 Determinação da resistência térmica

Com a finalidade de estudar o efeito do pH na resistência térmica do fungo, os ensaios foram realizados sob três diferentes pHs do meio de aquecimento (2,5, 3,5 e 4,5) para as temperaturas de 80°C, 85°C e 90°C. O método utilizado foi o de tubos TDT selados com maçarico. Os tubos foram preparados pela adição de 0,2 ml da suspensão de ascósporos a 1,8 ml de suco de maçã, conforme descrito anteriormente. Após ajustagem da temperatura do banho termostático, os tubos foram submersos na água aquecida a temperaturas definidas. Transcorrido cada tempo de aquecimento mais o atraso térmico, os tubos foram retirados do banho e resfriados imediatamente. Para todas as temperaturas, houve uma amostra referente ao tempo 0, a qual foi submetida apenas ao tratamento ótimo de ativação (85°C/ 10 minutos mais atraso térmico). Para a colocação dos tubos no banho termostático, estes foram amarrados com barbante, cuja ponta ficou para fora da água quente de forma a facilitar sua retirada.

Conforme está descrito no item 5.2, foram realizadas as diluições em série e o plaqueamento de 1 ml em meio MEA por profundidade (duplicata) para cada tempo específico em cada temperatura. As placas foram incubadas a 30°C e, as leituras do número de colônias formadas, expressas em UFC/ml, realizadas a partir do terceiro dia de incubação. Com o número de sobreviventes encontrado em cada tempo de aquecimento, foram construídas as curvas de sobrevivência para cada temperatura. Como estas curvas não apresentaram comportamento logarítmico, foi utilizado o método de linearização de ALDERTON & SNELL (1970) que fornece dados para o cálculo de parâmetros de esterilização equivalentes a D (1/k) e Z (Z*) – conforme descrito no item 2 da revisão bibliográfica.

5.4 Avaliação da deterioração do suco de maçã causada pelo fungo mais importante dentre os mais termorresistentes

Para se avaliar a deterioração causada pela cepa termorresistente no produto, procedeu-se à inoculação da suspensão do fungo em suco de maçã (11,3°Brix, pH 3,5).

A partir da suspensão do fungo anteriormente preparada (10^5 ascósporos/ml), foi realizada uma ativação em tubo TDT. Para tanto, foram adicionados ao tubo, 1,8 ml do suco de maçã (11,3 °Brix, pH 3,5) e 0,2 ml da suspensão de ascósporos. Após

homogeneização e selagem em maçarico O₂/GLP, o tubo foi submetido à ativação ótima (85°C/10 minutos) em banho de água (conforme descrito no item 5.2) seguido de resfriamento. A mistura ativada foi adicionada a 150 ml de suco de maçã (11,3, pH 3,5) previamente autoclavado em recipiente de vidro e tampado com algodão e gaze. O suco contendo o inóculo foi incubado a 30°C por 30 dias. Durante este período, foram observadas as alterações ocorridas na cor, odor, pH e consistência do suco. Este teste foi realizado em duplicata, e para uma melhor visualização das transformações ocorridas no suco, foi preparado um recipiente controle ao qual somente foi adicionado o suco sem a suspensão de esporos.

IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. OCORRÊNCIA DE FUNGOS FILAMENTOSOS A PARTIR DE PRODUTOS DE FRUTA

1.1 Ocorrência de fungos filamentosos nas diversas etapas do processamento de néctar de maçã

A ocorrência de fungos filamentosos foi verificada durante isolamento realizado nas amostras coletadas de um lote do processo produtivo de néctar de maçã. Um total de 11 culturas foram isoladas, sendo identificadas da seguinte forma:

Tabela IV.1 Número de cepas identificadas do processo produtivo de Néctar de Maçã

Identificação	Nº de Cepas
<i>Neosartorya fischeri</i>	3
<i>Byssochlamys fulva</i>	1
<i>Eupenicillium</i> sp.	1
<i>Aspergillus</i> spp.	1
Não identificadas	5
TOTAL	11

A cepa identificada como *Aspergillus* spp. somente apresentou fase imperfeita e as 5 espécies não identificadas foram aquelas onde não se verificou a produção de ascos, concluindo-se que não se tratam de fungos termorresistentes. A tabela IV.2 apresenta os fungos isolados e sua origem no processo.

Tabela IV.2 Cepas isoladas no processo produtivo de Néctar de maçã e seus respectivos códigos.

Origem	Isolado	Código do fungo*
MP	<i>Neosartorya fischeri</i>	1MP
	<i>Byssochlamys fulva</i>	2MP
PA1	(não identificado)	1PA1
PP1	<i>Eupenicillium</i> sp.	1PP1
	(não identificado)	2PP1
PC	<i>Neosartorya fischeri</i>	1PC
	<i>Neosartorya fischeri</i>	2PC
PR	(não identificado)	PR
PA2	(não identificado)	1PA2
PP2
PF	<i>Aspergillus</i> spp.	1PF
	(não identificado)	2PF

*O número que antecede as letras do código do fungo, se refere à ordem em que foram isolados no produto. Por exemplo: 1PC (primeiro fungo isolado no produto concentrado). Os códigos referentes a origem do processo estão descritos na tabela III.1

Verifica-se pela análise dos resultados, que *N. fischeri* foi o fungo de maior incidência dentre os isolados termorresistentes. GUMERO (1995) também isolou esta espécie em trabalho realizado com purê de maçãs. A espécie *N. fischeri* foi isolada na matéria-prima e no concentrado de maçã, sendo importante salientar que este último produto sofreu os efeitos térmicos da pasteurização e da concentração, o que demonstra sua grande termorresistência. Com relação ao concentrado de maçã, torna-se relevante o fato

de, assim como o produto pronto para beber, este também é comercializado pela empresa, e assim sendo, é utilizado por outras para a fabricação de diversos produtos como sucos, néctares, comidas para bebê, entre outros. Além disso, o fungo *N. fischeri* é um potencial produtor de micotoxinas como as fumitremorginas (A, B, C) e a verruculogena (TOURNAS, 1994; NIELSEN et al., 1988).

Com exceção da etapa referente ao produto após a segunda pasteurização (PP2), em todas as demais fases do processo foram isoladas culturas de fungos filamentosos. Na matéria-prima, foram encontradas as duas espécies reportadas pela literatura como as mais termorresistentes (*N. fischeri* e *B. fulva*), o que de certa forma, já era esperado uma vez que a maçã *in natura* está no início da linha de processo, não passando por nenhum tratamento térmico. Entretanto, seria esperada uma melhor qualidade das frutas empregadas no processamento a fim de se obter uma baixa contagem microbiana inicial, que pudesse ser satisfatoriamente reduzida durante os tratamentos térmicos subseqüentes. Além disso, o gênero *Byssochlamys* é um potencial produtor de patulina, a qual trata-se de um contaminante comum em maçãs maduras utilizadas na fabricação dos sucos e concentrados e que pode ser transferida para o produto através da solubilização em água. Devido à essência ácida do meio, esta micotoxina pode não ser degradada pelo tratamento térmico e vir a causar problemas de saúde aos consumidores, uma vez que a patulina tem revelado grande espectro de atividade e pode agir como agente carcinogênico e de mutação (SILHA & ASKAR, 1999).

As espécies termorresistentes foram verificadas no processamento até a obtenção do produto concentrado (PC), sendo que após este, apenas culturas confirmadas como não termorresistentes foram isoladas. Estas culturas termolábeis também foram isoladas no produto final, o que sugere uma recontaminação por via aérea, por equipamentos ou através das embalagens.

1.2 Ocorrência de fungos filamentosos em polpas comerciais congeladas de morango e uva

Os fungos isolados de polpas comerciais de morango estão mostrados na tabela IV.3. Das 9 culturas isoladas, 3 foram identificadas como *N. fischeri*, 5 como *Talaromyces* sp., e uma como *Eupenicillium* sp.

Todas as espécies que foram encontradas em polpa de morango são conhecidas como termorresistentes e deterioradoras de produtos de frutas. O gênero mais prevalente dentre os encontrados foi *Talaromyces* sp. Foi esta espécie, o segundo gênero mais freqüente dentre os encontrados por ARAGÃO (1989) em seu trabalho realizado com polpas de morango. O resultado do grau de incidência deste fungo confirma os relatos de FRAVEL & ADAMS (1986) que observaram estar o gênero *Talaromyces flavus* amplamente distribuído na natureza.

A partir das polpas de uva não foram isoladas quaisquer culturas.

1.3 Ocorrência de fungos filamentosos em suco (morango e uva) pasteurizado e preservado com benzoato de sódio e sorbato de potássio.

Através de isolamento realizado em amostra de suco de morango encontrou-se uma cepa de *B. fulva* (tabela IV.3). Por este resultado, se constata a extrema resistência dos ascos deste fungo, que sobreviveram ao processamento do suco de morango, mesmo tendo este passado por tratamento termoquímico onde houve um efeito sinérgico do calor e da ação conjunta de sorbato e benzoato.

A partir do suco de uva não se isolou nenhuma espécie de fungo. Tal resultado está relacionado ao fato deste produto apresentar uma baixa atividade de água devido ao teor de sólidos solúveis muito elevado (74,4 °Brix). Junta-se a isto fato do suco ter, na sua formulação, a adição de uma combinação de conservantes.

Tabela IV.3. Cepas isoladas de polpas comerciais congeladas de morango e de suco de morango pasteurizado e preservado com Sorbato de Potássio e Benzoato de Sódio (ambos utilizados na concentração de 70% do máximo permitido pela legislação que é de 0,10g/100g)

Código*	Identificação
1PM	<i>N. fischeri</i>
2PM	<i>Eupenicillium</i> sp.
3PM	<i>N. fischeri</i>
4PM	<i>N. fischeri</i>
5PM	<i>Talaromyces</i> sp.
6PM	<i>Talaromyces</i> sp.
7PM	<i>Talaromyces</i> sp.
8PM	<i>Talaromyces</i> sp.
9PM	<i>Talaromyces</i> sp.
1SM	<i>B. fulva</i>
Total de espécies isoladas	10

*PM = polpa comercial de morango.

*SM = suco de morango.

Obs. Os números que antecedem as siglas se referem à ordem de isolamento da referida cepa. Por exemplo: 1PM (primeiro fungo isolado da polpa de morango).

2. CARACTERÍSTICAS DAS ESPÉCIES ISOLADAS

Todas as espécies isoladas apresentaram como característica principal a presença de ascos contendo oito ascósporos no interior. Uma breve descrição dos principais gêneros isolados é apresentada a seguir.

Neosartorya fischeri (wehmer) Malloch & Cain

Em MEA apresentam colônias brancas a creme pálidas muito granulosas. Em CYA as colônias brancas a creme pálidas apresentaram-se muito flocosas, sendo que, nas duas temperaturas de incubação deste meio (25°C e 37°C), algumas colônias mostraram-se sulcadas. Em G25N as colônias desenvolvidas mostraram micélio branco e reverso amarelo pálido. Como características microscópicas verificou-se a presença de cleistotécio, destacando-se a presença de ascósporos fortemente ornamentados por duas rugas equatoriais. Esta espécie apresentou como forma anamorfa o gênero *Aspergillus* spp. (Imagens 1, 2, 5, 8 e 9 – ANEXO 3).

Byssochlamys fulva Oliver & G. Smith

Colônias em MEA e CYA apresentaram coloração amarelo oliva e aspecto flocoso, sendo o reverso em cores similares. Em G25N as colônias se mostraram brancas com reverso amarelo oliva. Microscopicamente, apresentou grande quantidade de ascos de formato esférico e rearranjados de forma irregular. Os ascósporos eram elipsoidais e de parede lisa. A maior característica desta espécie é a presença de ascos nus, ou seja, sem qualquer tipo de ascocarpo que os envolvesse.

(Imagens 3 e 4 – ANEXO 3).

Talaromyces sp.

Os fungos pertencentes a este gênero, foram diferenciados das demais fases teleomorfas de *Penicillium* por apresentarem ascocarpo não muito rígido, formado pelo entrelaçamento de hifas que é conhecido como gimnotécio. As colônias em MEA apresentaram coloração que vai do creme ao salmão, aspecto flocoso com reverso alaranjado. Em G25N, na maioria dos casos não houve crescimento, e quando ocorreu, as microcolônias se mostraram brancas, compactas e com reverso oliva pálido. Os ascósporos pertinentes a este gênero apresentaram-se elipsoidais e espinhosos.

(Imagens 6 e 7 – ANEXO 3).

***Eupenicillium* sp.**

Este gênero foi diferenciado das demais fases imperfeitas de *Penicillium* por possuir ascocarpo (cleistotécio) bem definido composto por paredes rígidas e muito densas que não possibilitaram a perfeita visualização dos ascos. Em MEA e CYA as colônias apresentaram coloração que vai do branco ao amarelo pálido com aspecto denso, rugoso e presença de exudado. Em G25N as colônias se mostraram muito compactas, de coloração creme pálida e reverso oliva.

(Imagem 10 – ANEXO 3).

Nenhuma das cepas incubadas a 5°C apresentou crescimento. Tal resultado concorda com o observado por PITT & HOCKING (1985).

A medida do diâmetro das colônias destes fungos nos referidos meios e temperaturas pode ser observada pela tabela IV.4.

Tabela IV.4 – Diâmetro médio das colônias desenvolvidas pelas espécies isoladas, após 7 dias de incubação nos meios e temperaturas de crescimento.

Espécie	Meio	Temperatura (°C)	Média do diâmetro das colônias (mm)	Diâmetros (mm) encontrados por Pitt & Hocking (1985)
<i>B. fulva</i>	CYA	25	60-70	A partir de 60 mm, podendo cobrir toda a placa
	CYA	37	40 - 70	
	G25N	25	10 – 20	5-10
	G25N	37	40 - 80	Usualmente cobrem toda a placa
	MEA	25	cobre toda a placa	A partir de 60 mm, podendo cobrir toda a placa
<i>N. fischeri</i>	CYA	25	Mínimo 40 mm podendo cobrir toda a placa	A partir de 50-60 mm, podendo cobrir toda a placa
	CYA	37	cobre toda a placa	
	G25N	25	8-25	8-12
	G25N	37	50 – 80	Usualmente cobrem toda a placa
	MEA	25	cobre toda a placa	60 mm ou mais

...continuação da tabela IV.4

Espécie	Meio	Temperatura (°C)	Média do diâmetro das colônias (mm)	Diâmetros (mm) encontrados por Pitt & Hocking (1985)
<i>Talaromyces</i> sp.	CYA	25	25 – 35	*18-25
	CYA	37	25 – 40	*18-45
	G25N	25	A maioria não apresentou crescimento, quando houve, o diâmetro foi inferior a 3 mm	* Quando ocorre crescimento, as colônias não ultrapassam 3mm
	G25N	37		
	MEA	25	18 - 30	*18-25
<i>Eupenicillium</i> sp.	CYA	25	32	**30-45
	CYA	37	30	**25-50
	G25N	25	Ausência de crescimento ou colônia de 18mm	**9-14
	G25N	37	5 - 9	**9-14
	MEA	25	30	**30-50

* Resultados de diâmetros de colônias referentes ao gênero *Talaromyces bacillisporus*.

**Resultados de diâmetros de colônias referentes ao gênero *Eupenicillium javanicum*

3. SELEÇÃO DO FUNGO FILAMENTOSO MAIS TERMORRESISTENTE E DE MAIOR IMPORTÂNCIA COMERCIAL

A partir de três produtos de frutas diferentes: néctar de maçã (amostras retiradas das diferentes etapas do processamento), polpas congeladas de morango e suco de morango pasteurizado e preservado, foram isoladas 21 cepas de fungos. Dentre estas, 11 foram retiradas das diversas etapas do processamento asséptico de néctar de maçã, 9 extraídas de polpa de morango e uma de suco de morango. Do total de cepas isoladas, 15 foram devidamente identificadas (espécies que produziram ascos), sendo que todas se tratavam de espécies reportadas pela literatura como termorresistentes e deterioradoras de produtos de frutas (*B. fulva*, *N. fischeri*, *Talaromyces* sp. *Eupenicillium* sp.). Das 6 culturas restantes,

uma foi identificada como *Aspergillus* spp. e as demais (não produtoras de ascos), não foram identificadas.

Todas as culturas passaram pelo processo de esporulação em garrafa de Roux por um mês, de onde se obteve uma suspensão que foi submetida a diferentes choques térmicos que variaram de 80°C/20 minutos a 97°C/15 minutos, quando necessário, para selecionar as mais termorresistentes. Todos os choques foram realizados utilizando suco de maçã (11,3°Brix, pH 3,5), como meio de aquecimento, por se tratar de um produto de grande comercialização em embalagens assépticas, e por ser de interesse para o estado de Santa Catarina, que é o maior produtor brasileiro desta fruta.

Na tabela IV.5 estão apresentados os fungos isolados do processo produtivo de suco de maçã e seus limites de sobrevivência aos choques térmicos. Por esta tabela pode-se verificar que todas aquelas espécies identificadas como fungos termorresistentes confirmaram esta característica sobrevivendo ao choque inicial de 80°C/20 minutos (BAGLIONI, 1998). As demais, não foram consideradas termorresistentes, como era esperado, porém, o fato de terem sido isoladas durante a fabricação de néctar de maçã, sugere uma contaminação pós-processo que permitiria a entrada destes fungos.

Dentre as espécies isoladas de todas os produtos, as que sobreviveram ao choque térmico mais severo representam 23,8% do total, ou seja, 5 cepas entre 21 (Tabelas IV.5 e IV.6). Tal fato torna-se relevante uma vez que um tratamento a 95°C por 20 minutos é bastante superior àqueles aplicados na pasteurização de produtos de frutas, mostrando desta forma, a alta possibilidade de sobrevivência destes bolores.

Tabela IV.5- Espécies isoladas das diversas fases do processamento de néctar de maçã e seus limites de sobrevivência.

Origem no processo	Código	Identificação	Sobrevivência até
Matéria-prima (MP)	1MP	<i>N. fischeri</i>	92°C/ 10 minutos
	2MP	<i>B. fulva</i>	95°C/ 20 minutos
Produto antes da pasteurização 1 (PA1)	1PA1	(não identificado)	< 80°C/ 20 minutos
Produto depois da pasteurização 1 (PP1)	1PP1	<i>Eupenicillium</i> sp.	85°C/ 15 minutos
	2PP1	(não identificado)	< 80°C/ 20 minutos
Produto depois do concentrador (PC)	1PC	<i>N. fischeri</i>	95°C/ 20 minutos
	2PC	<i>N. fischeri</i>	95°C/ 20 minutos
Produto resfriado (PR)	PR	(não identificado)	< 80°C/ 20 minutos
Produto antes da pasteurização 2 (PA2)	1PA2	(não identificado)	< 80°C/ 20 minutos
Produto final (PF)	1PF	<i>Aspergillus</i> spp.	< 80°C/ 20 minutos
	2PF	(não identificado)	< 80°C/ 20 minutos

Na tabela IV.6, os resultados para os fungos isolados de polpa e suco de morango estão apresentados.

Tabela IV.6 - Limites de sobrevivência das espécies isoladas de polpas comerciais de morango e de suco de morango preservado e pasteurizado.

Código	Identificação	Sobrevivência até
1PM	<i>N. fischeri</i>	80°C/ 20 minutos
2PM	<i>Eupenicillium</i> sp.	85°C/ 15 minutos
3PM	<i>N. fischeri</i>	95°C/ 20 minutos
4PM	<i>N. fischeri</i>	85°C/ 15 minutos
5PM	<i>Talaromyces</i> sp.	80°C/ 20 minutos
6PM	<i>Talaromyces</i> sp.	80°C/ 20 minutos
7PM	<i>Talaromyces</i> sp.	80°C/ 20 minutos
8PM	<i>Talaromyces</i> sp.	80°C/ 20 minutos
9PM	<i>Talaromyces</i> sp.	85°C/ 15 minutos
1SM	<i>B. fulva</i>	95°C/ 20 minutos

Todas as cepas que sobreviveram ao tratamento mais intenso passaram por um outro (97°C/15 minutos) a fim de se verificar uma maior resistência térmica, porém, nenhuma delas sobreviveu.

Dentre as 5 cepas que sobreviveram ao choque térmico de 95°C/20 minutos, uma foi retirada de polpa de morango (*N. fischeri*), outra do suco de morango preservado e pasteurizado (*B. fulva*) e as 3 restantes originárias da linha de processamento de néctar de maçã. Destas últimas, uma provém da maçã *in natura* (*B. fulva*) e as outras duas do concentrado de maçã (*N. fischeri*). De acordo com BAGLIONI (1998), ascósporos de *N.*

fischeri sobreviveram ao choque térmico de 100°C/25 minutos utilizando polpa de tomate (8°Brix) como meio de aquecimento. Tal fato confirma que esta espécie de fungo é altamente resistente ao calor.

Considerando-se a necessidade de escolher uma destas 5 cepas para posterior estudo de resistência térmica, pode-se afirmar que aquelas mais importantes dentre as mais termorresistentes seriam, sem dúvida, as cepas de *N. fischeri* isoladas do concentrado de maçã, pois este é, juntamente com o néctar de maçã, um produto comercializado pela empresa (de onde as amostras foram retiradas) e que pode vir a ser utilizado industrialmente na produção de diversos outros produtos como sucos, néctares, comida para bebê, etc. Como as duas cepas de *N. fischeri* (1PC e 2PC), isoladas do concentrado, coincidiram macro e micromorfológicamente, pode-se concluir que se tratam do mesmo fungo. Desta forma, o fungo selecionado para as análises de resistência térmica foi 2PC.

4. AVALIAÇÃO DA DETERIORAÇÃO CAUSADA PELO FUNGO DE ALTA TERMORRESISTÊNCIA E DE GRANDE IMPORTÂNCIA COMERCIAL

A avaliação da deterioração causada pelo fungo escolhido (*N. fischeri* 2PC), foi verificada ao longo da incubação do suco de maçã inoculado com a referida cepa. Uma amostra controle, contendo apenas suco de maçã, foi incubada ao mesmo tempo a fim de fornecer uma comparação entre as amostras. Esta comparação pode ser visualizada pela Imagem 11 – ANEXO 3). Pela foto, se verifica o crescimento do fungo, bem como, a mudança no aspecto do suco, que se clarificou. Esta clarificação supostamente ocorreu pela ação de enzimas pectinolíticas desenvolvidas pelo fungo inoculado. Tal evidência para *N. fischeri* é citada por TOURNAS (1994) e confirmada por BAGLIONI (1998). A colônia de *N. fischeri* que cresceu no suco de maçã, é semelhante a que cresce na placa de Petri possuindo coloração que vai do branco ao creme, e aspecto granuloso com raro desenvolvimento mais cotonoso. O desenvolvimento da colônia ocorreu na parte superior do suco, se aproveitando do oxigênio disponível neste local. A colônia desenvolvida tornou-se visível após três dias de inoculação. Este resultado confirma aqueles verificados por ARAGÃO (1989), onde cepas de *N. fischeri*, *B. nivea*, *E. javanicum* e *T. flavus*, foram inoculadas em polpa de morango (15°Brix, pH 3,0). O mesmo foi ainda constatado por

BAGLIONI (1998), que utilizou polpa de tomate (8°Brix) como meio de inoculação para cepas de *N. fischeri*.

Após 1 mês de incubação, a variação de pH foi praticamente insignificante, pois apenas houve uma elevação do pH 3,5 para pH 3,86. As amostras analisadas não liberaram odores diferentes após 1 mês de incubação, o que está de acordo com ARAGÃO (1989) para a cepa de *N. fischeri*.

5. ATIVAÇÃO ÓTIMA DOS ASCÓSPOROS DE *Neosartorya fischeri* 2PC

Todo o trabalho de resistência térmica que se seguiu, foi executado a partir da cepa de *N. fischeri* 2PC, isolada do processo produtivo de néctar de maçã. A escolha desta cepa para o estudo é justificada, entre outros fatores, pela extraordinária termorresistência de seus ascósporos que os torna capazes de sobreviver aos tratamentos de pasteurização rotineiramente aplicados a produtos de frutas. Além disso, *N. fischeri* é um potencial produtor de micotoxinas. Dentre os autores que realizaram estudos com este fungo, podemos citar: BEUCHAT (1986), CONNER & BEUCHAT (1987), SPLITTSTOESSER et al. (1993), QUINTAVALLA & SPOTTI (1993), NIELSEN (1991), BEUCHAT (1992), RAJASHEKHARA et al. (1996), RAJASHEKHARA et al. (2000), SURESH et al. (1996), OBETA & UGWUANYI (1997), KOTZEKIDOU (1997) e TOURNAS & TRAXLER (1994).

Para o cálculo da resistência térmica do fungo escolhido, primeiramente foi necessário saber a ativação ótima de seus ascósporos. Esta ativação térmica tem por finalidade interromper o estado de dormência pela aplicação de um tratamento térmico subletal.

As curvas de ativação ótima dos ascósporos de *N. fischeri* 2PC, a 85°C, estão exibidas na figura IV.1. Para o ensaio de ativação térmica, utilizou-se suco de maçã (11,3°Brix) como meio de aquecimento a pH 2,5, pH 3,5 e pH 4,5. O tempo e temperatura de ativação térmica, onde se obteve a maior porcentagem de ascósporos ativados a 85°C, foi de 10 minutos nos três diferentes pHs do meio de aquecimento, constatando que não houve influência do pH do meio de suspensão para a recuperação destas cepas. A

contagem do número de ascósporos de *N. fischeri* 2PC recuperados durante os ensaios de ativação térmica podem ser verificados na tabela 1 (ANEXO 1).

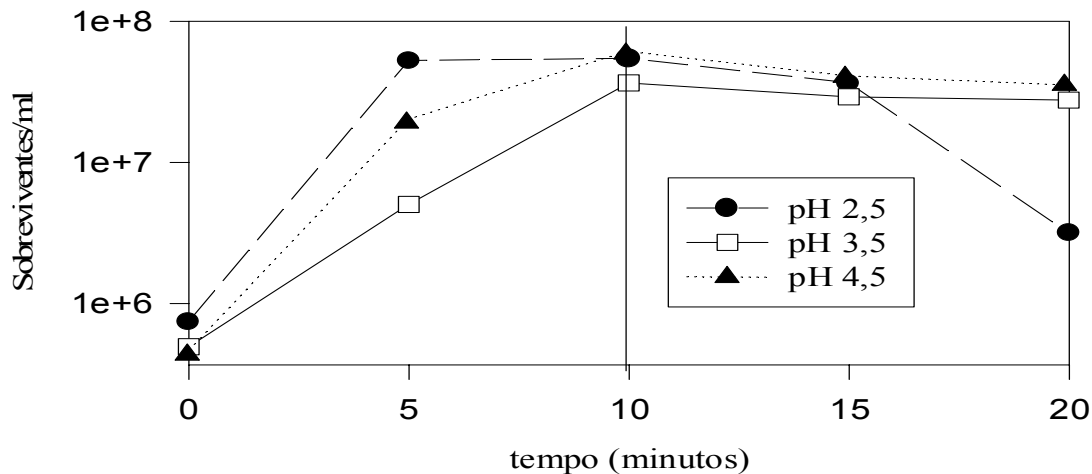


Figura IV.1 - Curvas de ativação dos ascósporos de *N. fischeri* 2PC quando aquecidos a 85°C em suco de maçã a 11,3°Brix com pH variável.

BEUCHAT (1986) construiu curvas de ativação a 85°C, utilizando tampão fosfato (0,1 M pH 7) como meio de aquecimento para três linhagens diferentes de *N. fischeri* (ascósporos com 64 dias). Nas três linhagens, foi observada similar ativação, sendo que, a faixa de tempo ótima para recuperação foi de 15 minutos. ARAGÃO (1989) obteve como tempo ótimo de ativação para ascósporos de *N. fischeri* em suco de morango (15°Brix, pH 3,0), de 10 minutos a 80°C. BAGLIONI (1998), em ensaio realizado com polpa de tomate (8°Brix) obteve como resultado ótimo para ativação de ascósporos de *N. fischeri* com 1 e 3 meses de idade, a 85°C, 10 e 20 minutos, respectivamente.

GUMERATO (1995), obteve que a ativação ótima a 85°C para *N. Fischeri* foi de 5 minutos. Este tempo foi menor que o encontrado no atual trabalho, pois este autor utilizou água destilada como meio de aquecimento, e o presente estudo utilizou suco de maçã a 11,3°Brix que forneceu proteção aos ascósporos devido à presença de açúcares na sua composição. Este efeito protetor dos açúcares sobre os ascósporos foi observado por BEUCHAT & TOLEDO (1977), KING Jr. & WHITEHAND (1990) e SPLITTSTOESSER & SPLITTSTOESSER (1977), que constataram um aumento de resistência térmica dos

ascósporos à medida que se elevava o teor de sólidos solúveis dos meios de aquecimento. De acordo com estes resultados, pode-se afirmar que o tempo de 10 minutos encontrado para ativação ótima a 85°C está dentro da faixa reportada em trabalhos anteriores.

6. RESISTÊNCIA TÉRMICA DE *Neosartorya fischeri* 2PC

Foram realizadas as determinações de resistência térmica dos ascósporos de *N. fischeri* 2PC em três diferentes pHs (pH 2,5, pH 3,5 e pH 4,5) do meio de aquecimento (suco de maçã 11,3°Brix).

A figura IV.2 mostra as curvas de sobreviventes de *N. fischeri* 2PC a 80, 85 e 90°C, respectivamente, em todos os pHs testados para o meio de aquecimento. Observa-se por estas curvas, que a inativação dos ascósporos em pH 4,5 foi a que necessitou de maior tempo de aquecimento em todas as temperaturas aplicadas. Para pH 3,5 e pH 4,5, observa-se uma proximidade entre as curvas nas temperaturas de 80°C e 85°C, sendo que nesta última temperatura pode-se notar, por determinado período, uma resistência relativamente maior a pH 3,5 que pH 4,5. O mesmo não é observado a 90°C, onde as curvas a pH 3,5 e pH 4,5 se distanciam evidenciando o efeito sinérgico existente entre abaixamento de pH e incremento de temperatura. Já para pH 2,5 a inativação térmica foi a mais acentuada em todas as temperaturas de tratamento. As contagens do número de sobreviventes de *N. fischeri* 2PC, nestas referidas temperaturas e pHs do meio de aquecimento, podem ser verificadas na tabela 2 – ANEXO 1.

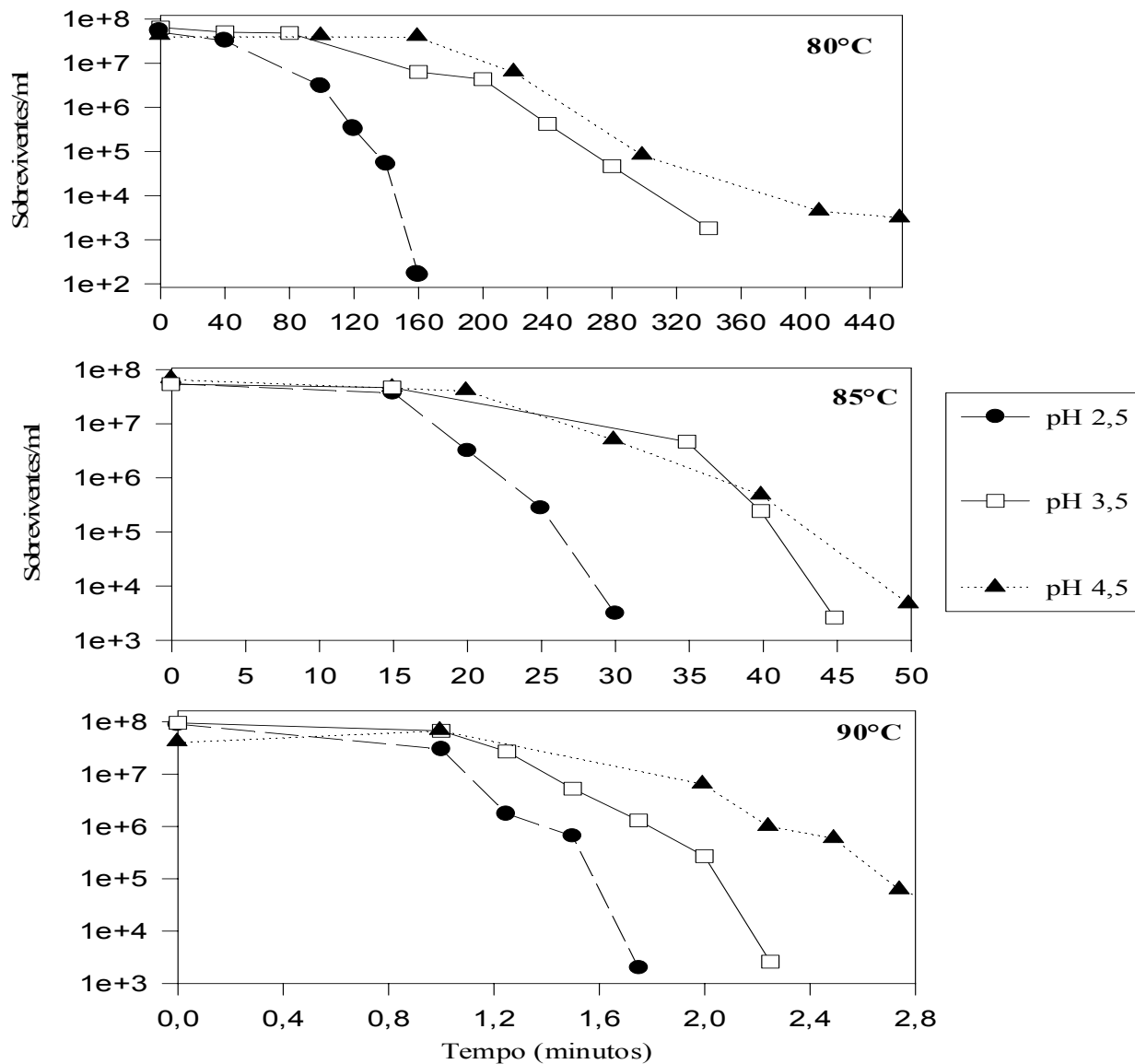


Figura IV.2 - Curvas de Inativação Térmica de ascósporos de *N. fischeri* 2PC nas temperaturas de 80°C, 85°C e 90°C em diferentes pHs do meio de aquecimento (suco de maçã, 11,3°Brix).

Quando o gráfico de inativação térmica é plotado de forma a apresentar todas as curvas, ao mesmo pH, nas diferentes temperaturas (figura IV.3), observa-se uma não linearidade nas menores temperaturas (80 e 85°C). Com o aumento da temperatura (90°C), as curvas tornam-se praticamente lineares. KING et al. (1979) também observaram este

fenômeno e constataram que as altas temperaturas mascaram a não linearidade das curvas, sendo necessário a utilização de temperaturas mais baixas para evidenciar este fenômeno. O mesmo resultado foi alcançado por KING & HALBROOK (1987), ARAGÃO (1989), KING & WHITEHAND (1990) e BAGLIONI (1998).

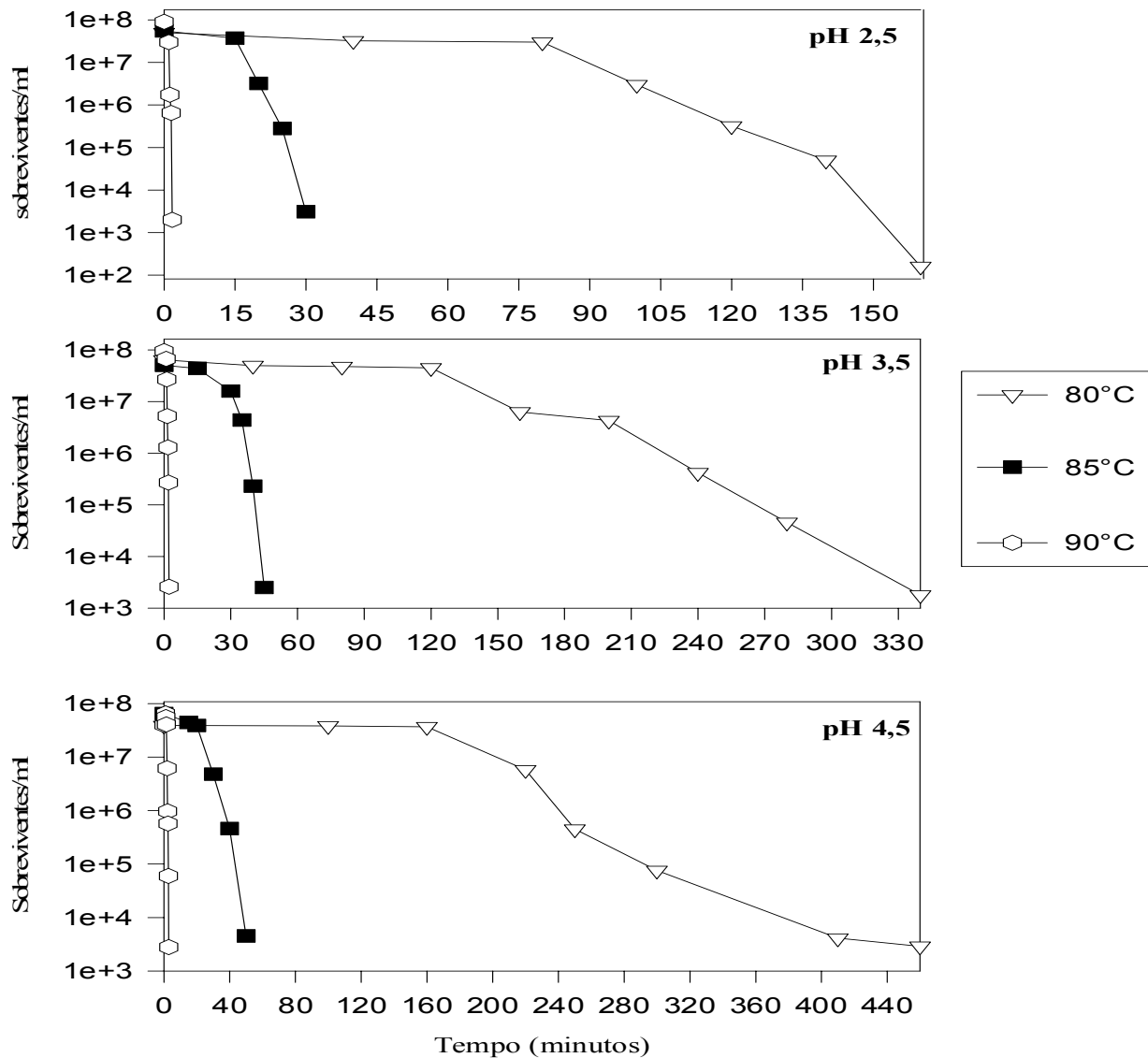


Figura IV.3 - Curvas de Inativação Térmica de ascósporos de *N. fischeri* 2PC em suco de maçã (11,3°Brix, pH 2,5, pH 3,5 e pH 4,5) nas diferentes temperaturas de tratamento térmico.

O gráfico (sobreviventes/ml *versus* tempo) a pH 4,5 e temperatura de 80°C (figura IV.3), fornece uma visão bem clara do ombro causado pela dormência dos esporos. Nota-se ainda, pelos resultados gráficos, a grande extensão dos tratamentos a 80°C frente aos realizados a temperaturas maiores, pois os tratamentos térmicos menos severos necessitam de maior tempo para a inativação dos ascósporos.

Por estes gráficos, pode se notar claramente que o aumento do pH do meio de aquecimento gera uma elevação do tempo necessário para a inativação dos ascósporos, pois estes se tornam mais resistentes.

Para possibilitar o cálculo dos parâmetros cinéticos equivalentes a D e Z, foi aplicado o método de linearização de curvas de sobreviventes de acordo com ALDERTON & SNELL (1970), que fora comprovado por KING & HALBROOK (1987), KING Jr. & WHITEHAND (1990), KOTZEKIDOU (1997), BAGLIONI (1998), RAJASHEKHARA et al. (1998) e RAJASHEKHARA et al. (2000) como adequado para o cálculo destes parâmetros.

Para a linearização da curva de sobreviventes é utilizada a expressão:

$$(\log N_0 - \log N)^a = kt + C \quad \Rightarrow \text{Equação 1 (item 2- Cap.II)}$$

onde:

k = Constante de taxa de morte (coeficiente angular da curva linearizada) (min^{-1});

C = Constante e intercepto da curva linearizada.

O primeiro procedimento para a linearização das curvas de sobreviventes é o cálculo do valor do parâmetro “a”, que é obtido pelo inverso da inclinação da curva extraída do gráfico $\log(\log N_0 - \log N)$ *versus* $(\log t)$ (figura IV. 4). O valor de “a” foi obtido através do tratamento menos severo (à temperatura de 80°C) e a partir do valor encontrado procedeu-se a linearização das curvas dos tratamentos mais severos. Isto se deve ao fato da curva de sobreviventes, a 80°C, apresentar o maior ombro dentre todas as demais.

Os valores do expoente “a”, calculados a 80°C para os três pHs do meio de aquecimento, e seus respectivos coeficientes de correlação (R^2), estão representados na tabela IV.7.

Tabela IV.7 – Valores dos parâmetros “a” e seus coeficientes de correlação calculados à temperatura de 80°C nos diferentes pHs dos meio de aquecimento.

Temperatura de 80°C		
pH	a	R ²
2,5	0,433	0,9846
3,5	0,525	0,9408
4,5	0,212	0,9142

R²= Coeficiente de correlação das curvas $\log(\log N_0 - \log N)$ versus $(\log t)$ a 80°C

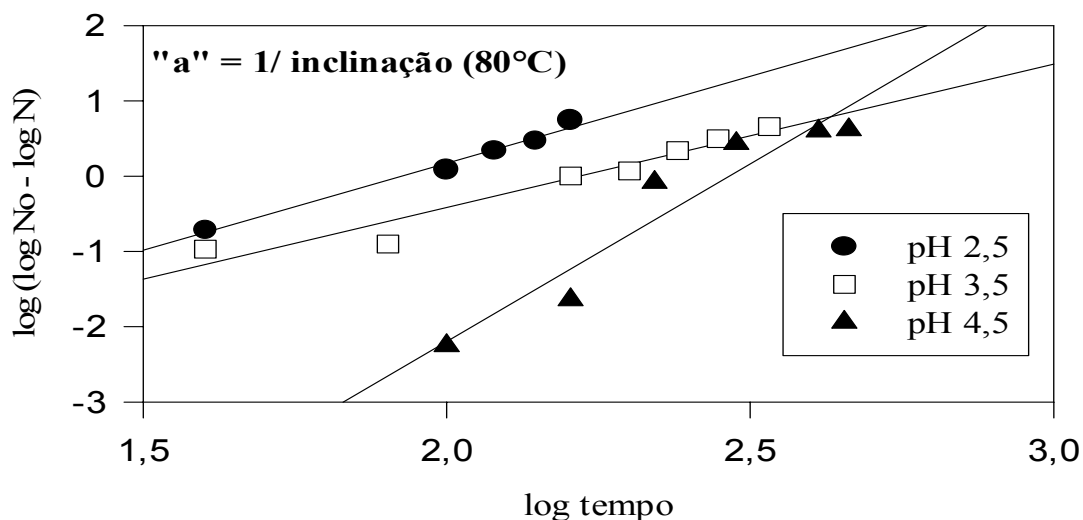


Figura IV. 4 - Curvas linearizadas para a determinação do parâmetro “a” à temperatura de 80°C.

Os parâmetros da taxa de morte térmica (k e intercepto C), seus coeficientes de correlação (R^2) e os valores de resistência térmica ($1/k$) – equivalente a “D” - para ascósporos de *N. fischeri* 2PC foram calculados a partir das equações das curvas linearizadas e são apresentados na tabela IV.8. Estes valores são provenientes das equações

das curvas linearizadas do gráfico $(\log N_0 - \log N)^a$ versus (tempo), sendo o valor de $1/k$ calculado pelo inverso da inclinação destas curvas. A figura IV.5 apresenta os gráficos de linearização das curvas de sobreviventes nos três pHs do meio de aquecimento.

Tabela IV.8 - Parâmetros da taxa de morte térmica (k e intercepto C) e os valores de resistência térmica ($1/k$) para ascósporos de *N. fischeri* 2PC em suco de maçã (11,3°Brix) a diferentes pHs.

Temperatura 80°C				
pH	C	k (min⁻¹)	R²₂	1/k (min)
2,5	-0,0342	0,0123	0,9843	81,30
3,5	-0,0547	0,0065	0,9854	153,85
4,5	0,0636	0,0032	0,9221	312,50
Temperatura 85°C				
pH	C	k (min⁻¹)	R²₂	1/k (min)
2,5	-0,1567	0,0628	0,9342	15,92
3,5	-0,2243	0,0452	0,8995	22,12
4,5	0,1579	0,0259	0,9439	38,61
Temperatura 90°C				
pH	C	k (min⁻¹)	R²₂	1/k (min)
2,5	-0,1031	1,0618	0,9481	0,94
3,5	-0,2858	0,9709	0,9068	1,03
4,5	0,20	0,454	0,9941	2,20

R^2_2 = Coeficiente de correlação das curvas $(\log N_0 - \log N)^a$ versus tempo para a determinação de k e C .

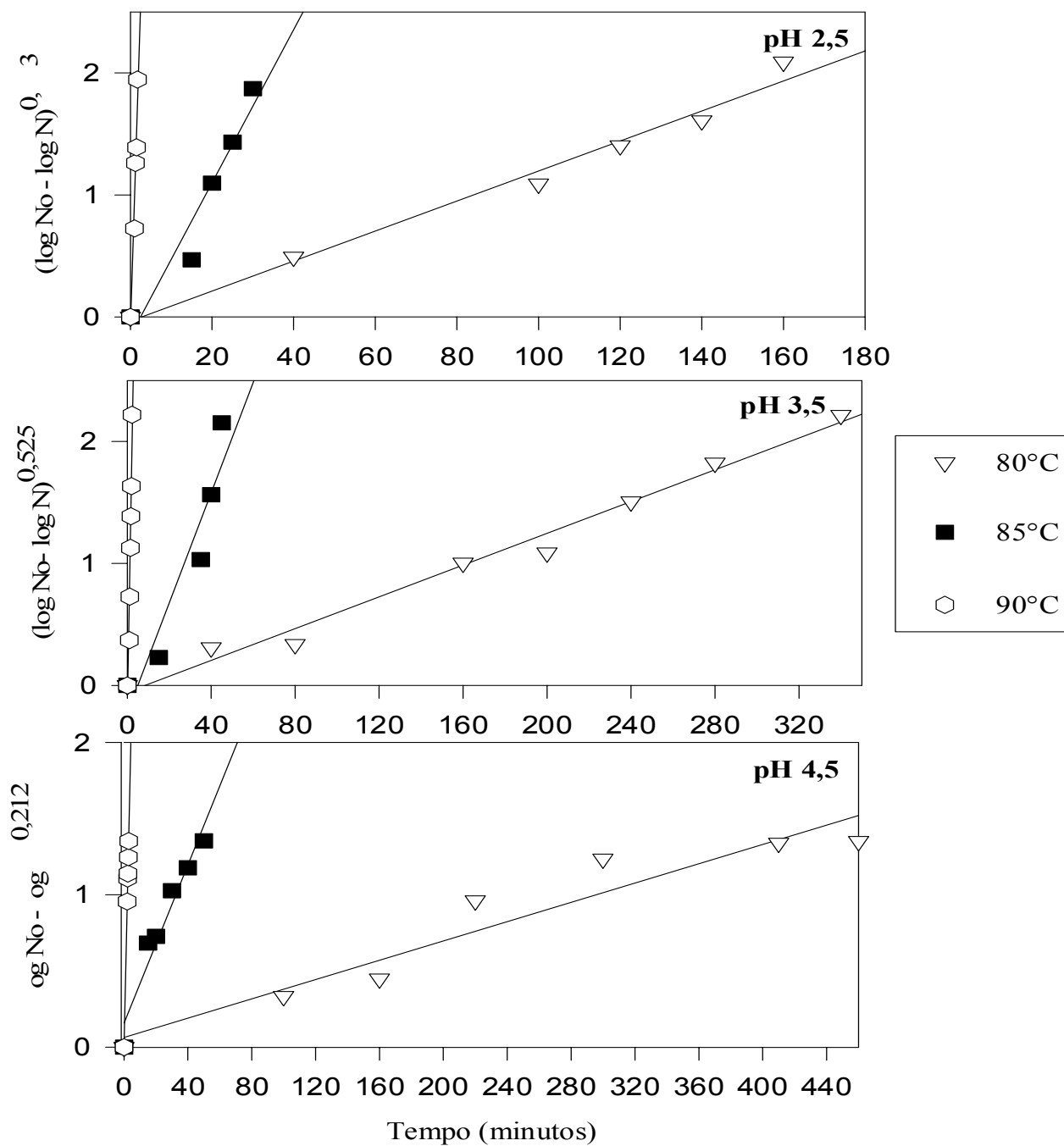


Figura IV.5 – Curvas de linearização da inativação térmica de ascósporos de *N. fischeri* 2PC aquecidos a 80, 85 e 90°C em suco de maçã (11,3°Brix) com pH variável.

Pela análise destes resultados observa-se que existe grande diferença no parâmetro $1/k$ para os três pHs do meio de aquecimento, sendo que a pH 4,5, o tempo necessário para uma redução logarítmica foi superior ao obtido nos demais pHs para todas as temperaturas de tratamento. KING Jr. & WHITEHAND (1990), executando testes de resistência térmica com *T. flavus*, em meios de aquecimento sintéticos (glucose 16°Brix/ ácido tartárico 0,033M) ajustado a pH 3,6, 5,0 e 6,6, também verificaram um aumento na resistência térmica com o aumento do pH.

O maior valor encontrado para $1/k$ foi de 312,50 minutos para temperatura de 80°C e pH 4,5 do suco de maçã. Para a mesma temperatura, em pH 2,5, o valor de $1/k$ cai para 81,30 minutos, mostrando assim a influência do pH do meio de aquecimento sobre a resistência dos ascósporos. SPLITTSTOESSER & SPLITTSTOESSER (1977), estudaram o efeito do pH na resistência térmica de *B. fulva* e *Aspergillus* sp. em suco de uva, e verificaram que em pH 2,5, ambos os fungos, apresentaram baixa resistência térmica.

Os menores valores de $1/k$ foram encontrados à temperatura de 90°C. Neste caso, independente do pH, os tempos requeridos para 1 redução logarítmica ($1/k$) são semelhantes, indicando pouca influência do pH na inativação dos ascósporos, sob altas temperaturas de aquecimento.

O valor $1/k$ obtido para *N. fischeri* 2PC a 80°C em pH 3,5 foi de 153,85 minutos. Nesta mesma temperatura e para a mesma espécie, ARAGÃO (1989) encontrou um valor de $1/k$ igual a 200 minutos utilizando, como meio de aquecimento, suco de morango à concentração de sólidos solúveis (15°Brix) superior a deste trabalho.

No tratamento a 85°C e pH 3,5, o valor de $1/k$ obtido foi de 22,12 minutos. GUMERATO (1995), que também realizou testes de resistência térmica utilizando suco de maçã com concentração de sólidos solúveis (15,5°Brix) superior a deste trabalho, encontrou valor de $1/k$ igual a 36,49 minutos para pH 3,6.

Na temperatura de 85°C e pH 4,5, o valor de $1/k$ encontrado foi de 38,61 minutos. KOTZEKIDOU (1997), testando resistência térmica cepas *N. fischeri* em pasta de tomate a pH 4,2 e 16% de sólidos solúveis a 21°C, encontrou os seguintes valores de $1/k$ a 85°C para as quatro cepas estudadas: 14,5, 13,0, 18,9 e 15,8 minutos.

Na figura IV.6 são apresentados os gráficos de $(-\log K)$ versus Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) em todos os pHs estudados. A partir do resultado negativo da inclinação das equações das retas, se obtêm os valores equivalentes a Z , que são chamados de Z^* , e estão apresentados na tabela IV.9.

Tabela IV.9 - Valores de Z^* para os ascósporos de *N. fischeri* 2PC e seus coeficientes de correlação (R^2) nos diferentes pHs do meio de aquecimento.

pH	Z^* ($^{\circ}\text{C}$)	R^2_3
2,5	5,16	0,9765
3,5	4,59	0,9834
4,5	4,64	0,9920

R^2_3 = coeficiente de correlação para as curvas $(-\log K)$ versus Temperatura para a determinação de Z^*

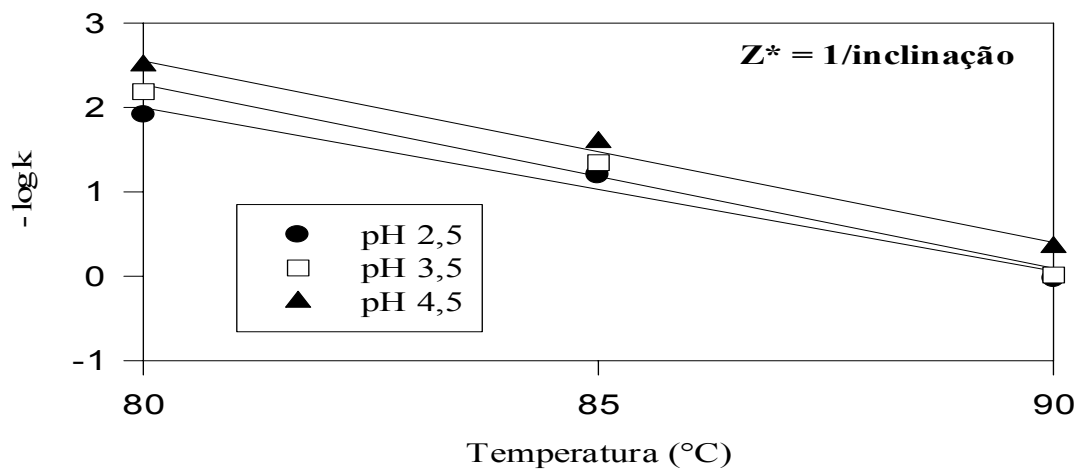


Figura IV.6 - Determinação de Z^* para *N. fischeri* 2PC (Curva TDT- Equivalente).

Os valores de Z^* encontrados neste trabalho apresentaram resultados muito próximos para todos os valores de pH do meio de aquecimento ($Z^*=5,16, 4,59$ e $4,64$ °C para os pHs de 2,5, 3,5 e 4,5 respectivamente). Tais valores foram semelhantes aos encontrados por BEUCHAT (1986) que variaram entre 3,2 e 5,0°C para *N. Fischeri*. ARAGÃO (1989), encontrou $Z^*= 6,17$ °C para *N. fischeri* utilizando suco de morango como meio de aquecimento (15°Brix, pH 3,0). GUMERATO (1995) encontrou $Z^*= 5,28$ °C trabalhando com *N. fischeri* em suco de maçã (pH 3,6 e 15,5°Brix).

7. CÁLCULO DO VALOR DE ESTERILIZAÇÃO (F) PARA O CONCENTRADO DE MAÇÃ

Com o objetivo de verificar se o tratamento térmico comercial aplicado ao concentrado de maçã é suficiente para destruir os ascósporos dos fungos de *N. fischeri* 2PC, realizou-se o cálculo do valor de esterilização do produto (F) a partir dos valores de “1/k” (equivalentes a “D”). O tratamento térmico geralmente aplicado à polpa de maçã é de 95°C/30 segundos. Como os valores de “1/k”, obtidos neste trabalho, somente foram calculados para 80, 85 e 90°C, faz-se necessária a obtenção do valor de “1/k” para 95°C utilizando-se a equação da curva fantasma (curva TDT- Equivalente).

Pelos gráficos da curva fantasma (figura IV.6), foram obtidas as seguintes equações nos diferentes pHs:

$$\text{pH } 2,5: - (\log k) = 17,4858 - 0,1936 T$$

$$\text{pH } 3,5: - (\log k) = 19,6628 - 0,2174 T$$

$$\text{pH } 4,5: - (\log k) = 19,7660 - 0,2151 T$$

Substituindo o valor de T (temperatura) das equações por 95°C, encontramos novos valores para k e 1/k:

$$\text{pH } 2,5: k = 8,0575 (\text{min}^{-1}) \quad \rightarrow \quad 1/k = 0,124 \text{ min} \equiv 7,44 \text{ segundos}$$

$$\text{pH } 3,5: k = 9,7768 (\text{min}^{-1}) \quad \rightarrow \quad 1/k = 0,102 \text{ min} \equiv 6,13 \text{ segundos}$$

$$\text{pH } 4,5: k = 4,6612 (\text{min}^{-1}) \quad \rightarrow \quad 1/k = 0,214 \text{ min} \equiv 12,84 \text{ segundos}$$

Para o cálculo do valor de esterilização (F) a 95°C, ainda é necessário se fazer duas considerações:

- 1) População inicial de *N. fischeri* 2PC (No) = 10⁻² ascósporos/ml, conforme encontrou BAGLIONI (1998), investigando a ocorrência deste fungo em pasta de tomate. Considerando que a embalagem utilizada para o néctar de maçã foi de litro, temos: No = 10 ascósporos/embalagem.
- 2) Considerando a probabilidade de sobrevivência de 1 ascósporo de *N. fischeri* 2PC em 1000 (10³) embalagens, temos que o número de reduções decimais (γ) necessárias é 4, ou seja, ($\gamma = 4$).

Seja F definido como: **F = γ D**.

$$F_{95^{\circ}\text{C}} = 4D_{95^{\circ}\text{C}}$$

$$F_{95^{\circ}\text{C (pH 2,5)}} = 4 * 7,44 \text{ s} = 29,76 \text{ segundos}$$

$$F_{95^{\circ}\text{C (pH 3,5)}} = 4 * 6,13 \text{ s} = 24,52 \text{ segundos}$$

$$F_{95^{\circ}\text{C (pH 4,5)}} = 4 * 12,84 \text{ s} = 51,36 \text{ segundos}$$

Levando-se em consideração que somente existam ascósporos livres de *N. fischeri* 2PC, 30 segundos a 95°C seriam suficientes para se obter a redução decimal esperada nos pHs de 2,5 e 3,5, apesar de se apresentarem muito próximos do tempo total de aquecimento. O mesmo não ocorreria a pH 4,5, uma vez que seriam necessários 51,36 segundos para a destruição dos ascósporos neste caso. Porém, deve ser considerado que no concentrado de maçã, podem existir tanto ascósporos livres quanto ascos. Como neste experimento foram utilizadas suspensões que continham somente ascósporos livres (devido ao processo de esporulação realizado – item 5.1 do capítulo III) e também pelo fato deste fungo (*N. fischeri* 2PC) ter suportado um choque térmico de 95°C/20 minutos, acredita-se que os tratamentos aplicados podem não ser suficientes para a esterilização do produto. Deve-se levar ainda em conta, que os ascósporos e ascos dos fungos que ocorrem na natureza podem ser mais resistentes em comparação com os mesmos obtidos *in vitro*.

No caso de considerarmos um grau de segurança maior, como por exemplo, a probabilidade de sobrevivência de 1 ascósporo de *N. fischeri* 2PC em 10^6 (um milhão) embalagens, teremos $\gamma = 7$.

Assim,

$$F_{95^{\circ}\text{C}} = 7D_{95^{\circ}\text{C}}$$

$$F_{95^{\circ}\text{C (pH 2,5)}} = 7 * 7,44 \text{ s} = 52,08 \text{ segundos}$$

$$F_{95^{\circ}\text{C (pH 3,5)}} = 7 * 6,13 \text{ s} = 42,91 \text{ segundos}$$

$$F_{95^{\circ}\text{C (pH 4,5)}} = 7 * 12,84 \text{ s} = 89,88 \text{ segundos}$$

Neste caso pode-se concluir que o tratamento aplicado ($95^{\circ}\text{C}/30\text{s}$) não seria suficiente para garantir este grau de segurança pois todos os valores de esterilização (F) são superiores a 30 segundos em todos os pHs do meio de aquecimento.

V - CONCLUSÕES

Das amostras de polpas comerciais congeladas de morango foram isoladas nove cepas de fungos, confirmados como termorresistentes, estando dentre eles, três diferentes gêneros bastante reportados pela literatura como deterioradores de produtos de frutas: *Neosartorya fischeri*, *Talaromyces* sp. e *Eupenicillium* sp.

A partir da amostra de suco de morango pasteurizado e preservado com benzoato de sódio e sorbato de potássio, foi isolada uma linhagem de *B. fulva*. Tal fato recai na constatação da extraordinária resistência desta espécie que foi encontrada em um meio preservado pela ação combinada de conservantes químicos e alta temperatura.

Não foi verificada a incidência de fungos termorresistentes nas amostras de polpas comerciais de uva e suco de uva pasteurizado e preservado. No caso do suco de uva, pode-se concluir que a alta concentração de sólidos solúveis (74,4°Brix), associada a ação de preservantes químicos, impediu o desenvolvimento dos fungos.

A partir do processo produtivo de néctar de maçã, foram isoladas três cepas de *N. fischeri*, uma de *B. fulva* e uma de *Eupenicillium* sp.

A incidência das espécies termorresistentes no processo de fabricação de néctar de maçã foi evidenciada até a etapa de produção do concentrado, sendo que após esta, somente espécies não termorresistentes foram isoladas. Com base nestes resultados, constatou-se que houve uma recontaminação nas etapas posteriores, já que tais espécies de fungos são termolábeis e possivelmente entraram no processo por via aérea, equipamentos ou através das embalagens.

N. fischeri foi o gênero de maior incidência dentre todos os isolados.

Nos ensaios realizados para a seleção do fungo filamentoso mais termorresistente, cinco espécies sobreviveram ao tratamento de 95°C/20 minutos. Dentre estas, três foram isoladas do processo produtivo de néctar de maçã, o que sugere a probabilidade de sobrevivência das mesmas aos tratamentos térmicos convencionalmente aplicados aos sucos de frutas, pois estes são inferiores a 95°C/ 20 minutos.

A deterioração do suco adicionado de ascósporos de *N. fischeri* 2PC evidenciou uma grande mudança na textura em sua textura, que ficou clarificado pela ação de enzimas pectinolíticas produzidas por este fungo. Tal fato pode implicar em grande rejeição do produto no mercado quando da contaminação por bolores termorresistentes. Deve ainda ser considerada a possibilidade de produção de micotoxinas por este fungo.

O suco de maçã em pH 4,5 foi o meio de aquecimento que propiciou a inativação mais lenta para *N. fischeri* 2PC ($1/k_{80}= 312,50$ minutos, $1/k_{85}= 38,61$ minutos, $1/k_{90}= 2,20$ minutos). Já com a diminuição do pH do meio para 2,5, pode-se verificar uma maior inativação térmica do mesmo fungo ($1/k_{80}= 81,30$ minutos, $1/k_{85}= 15,92$ minutos, $1/k_{90}= 0,94$ minutos). Tal resultado, evidência a ocorrência de um aumento da resistência térmica do fungo com o aumento do pH do meio.

Considerando-se que o tratamento geralmente aplicado à polpa de maçã é de $95^{\circ}\text{C}/30\text{s}$ e que a população inicialmente existente é de 10 ascósporos/embalagem, pode-se concluir que os valores de esterilização ($F_{95^{\circ}\text{C}}$) nos pHs 2,5 e 3,5 ($F_{95^{\circ}\text{C}}(\text{pH } 2,5) = 29,76$ s e $F_{95^{\circ}\text{C}}(\text{pH } 3,5) = 24,52$ s) são suficientes para se atingir a probabilidade de 1 ascósporo de *N. fischeri* 2PC em cada 1000 embalagens, porém em pH 4,5 o mesmo não ocorreria pois seriam necessários 51,36 segundos para se obter a referida redução.

No caso de se considerar um grau de segurança maior, como por exemplo, a probabilidade de sobrevivência de 1 ascósporo de *N. fischeri* 2PC em cada um milhão de embalagens, o tratamento aplicado ($95^{\circ}\text{C}/30\text{s}$) não seria suficiente para garantir tal redução pois todos os valores de esterilização (F) são superiores a 30 segundos em todos os meios de aquecimento ($F_{95^{\circ}\text{C}}(\text{pH } 2,5) = 52,10$ s, $F_{95^{\circ}\text{C}}(\text{pH } 3,5) = 42,9$ s e $F_{95^{\circ}\text{C}}(\text{pH } 4,5) = 89,9$ s).

VI – SUGESTÕES

É indispensável que sejam utilizadas matérias-primas de boa qualidade, pois a redução logarítmica dos fungos termorresistentes está diretamente relacionada à população inicialmente existente na maçã *in natura*. Quanto menor for este número, menor poderá ser a severidade do tratamento térmico aplicado, o que acarretará em melhoria da qualidade sensorial do produto processado e em ganhos energéticos.

Com relação à utilização de matéria-prima em bom estado de conservação, deve ser considerado ainda o fato de que a patulina é um contaminante comum de maçãs maduras e apodrecidas. Quando estas maçãs podres e sãs são processadas juntas, a toxina pode se transferir para o suco ou concentrado através da solubilização em água. Tal fato torna-se um risco à saúde do consumidor, principalmente, no caso dos concentrados de maçã que são utilizados no processamento de comidas para bebê.

Deve-se realizar uma adequada seleção, lavagem e sanitização de matérias-primas, bem como, primar pela melhoria das condições assépticas do ambiente, equipamentos e embalagens para assim diminuir a incidência, na planta de processamento, tanto de fungos termorresistentes, quanto de fungos comuns.

Com relação ao tratamento térmico aplicado ao suco de maçã para a obtenção do concentrado (95°C/30s), recomenda-se que este vise, pelo menos, a probabilidade de sobrevivência de 1 ascósporo a cada 100.000 embalagens, perfazendo um total de 6 reduções decimais, o que além de garantir maior segurança, não decorreria em perdas de qualidade no produto. Para tanto, o tempo de tratamento a 95°C no suco a pH 3,5 não poderia ser inferior a 36,8 segundos e para pH 2,5 e 4,5 a extensão do tratamento deveria ser maior que 44,6 e 77,0 segundos, respectivamente.

Neste trabalho, para o isolamento dos fungos termorresistentes, foi utilizado um choque térmico inicial de 70°C/2 horas. Tal tratamento pode permitir a sobrevivência de microorganismos termolábeis, ou aqueles que sejam um pouco mais resistentes que os fungos comuns. Para evitar tais problemas, sugere-se que este tratamento inicial tenha maior intensidade e menor extensão, como o utilizado por BAGLIONI (1998), que tratou suas amostras a 85°C/30-35 minutos.

Ainda com relação ao isolamento dos fungos termorresistentes, sugere-se que o plaqueamento das amostras seja realizado pelo método direto, uma vez que este método apresentou melhores resultados que o método utilizando diluição serial até 10^{-2} . Para tanto, após a aplicação do choque térmico inicial, deve-se diluir toda a amostra tratada em igual quantidade de meio e, a partir da solução obtida, realizar o plaqueamento direto.

A estocagem das cepas isoladas em tubos inclinados é um método que não apresenta eficiência por um longo período de tempo. Para se obter maior segurança na estocagem dos isolados, recomenda-se a utilização de uma metodologia mais adequada.

VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDERTON, J. & SNELL, N. Chemical states of bacterial spores: heat resistance and its kinetics at intermediate water activity. **Applied Microbiology**, v.19, p.565-572, 1970.

ANON. Unusual heat resistance mould in apple juice. *Food Ind.*, v.19, p.55-56, 1967. Apud HOCKING, A.D. & PITT, J.I. Food spoilage fungi. II. Heat Resistant Fungi. **CSIRO Division of Food Research**, v.44, n.4, p.73-82, 1984.

ARAGÃO, G.M.F. Identificação e determinação da resistência térmica de fungos filamentosos termorresistentes isolados da polpa de morango. Campinas, 1989, 139p. Tese de Mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

BAGLIONI, F. Estudo da ocorrência de fungos filamentosos termorresistentes em polpa de tomate envasada assepticamente. Campinas, 1998, 94p. Tese de Mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

BANNER, M.J.; MATTICK, L.R. & SPLITTSTOESSER, D.F. Chemical composition of the ascospores of *Byssochlamys fulva*. **Journal of Food Science**, v.44, n.2, p.545-548, 1979.

BAYNE, H.G. & MICHENER, H.D. Heat resistance of *Byssochlamys* ascospores. **Applied Environmental Microbiology**, v.37, n.3, p.449-453, 1979.

BEUCHAT, L.R. Extraordinary heat resistance of *Talaromyces flavus* and *Neosartorya fischeri* ascospores in fruit products. **Journal of Food Science**, v.51, n.6, p.1506-1510, 1986.

_____. Thermal tolerance of *Talaromyces flavus* ascospores as affected by growth medium, age and sugar content in the inactivation. **Transactions of British Mycological Society**, v.90, n.3, p.359-364, 1988.

_____. Survival of *Neosartorya fischeri* and *Talaromyces flavus* ascospores in fruit powders. **Letters of Applied Microbiology**, v.14, p.238-240, 1992.

_____. & RICE, S.L. *Byssochlamys* spp. and their importance in processed fruits. **Advances in Food Research**, v.25, p.237-289, 1979.

_____. & TOLEDO, R.T. Behavior of *Byssochlamys nivea* ascospores in fruit syrups. **Transactions of British Mycological Society**, v.68, n.1, p.65-71, 1977.

BURDA, K. Incidence of patulin in apple, pear, and mixed fruit products marketes in New South Wales. Apud SILIHA, H.; ASKAR, A. Patulin in apple juice and children's apple food-II. Technological and Analytical Aspects. **Fruit Processing**. V.5, p. 164-167, 1999.

CONNER, D. E. & BEUCHAT, L.R. Heat resistance of ascospores of *Neosartorya fischeri* as affected by sporulation and heating medium. **International Journal of Food Microbiology**, v.4, p.303-312, 1987.

DELGADO, D. A. Ação do peróxido de hidrogênio sobre bolores isolados de laminado para embalagens assépticas. Campinas, 2001, 221p. Tese de Doutorado – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

EIROA, M. N. U. & AMSTALDEN, V.C. Ocorrência de espécies de *Byssochlamys* em hortas, pomares e vinhedos da região de Campinas, **Coletânea ITAL**, Campinas, v.15, p.61-70, 1985.

ENGEL, G. & TEUBER, M. Heat resistance of *Byssochlamys nivea* in milk and cream. **International Journal of Food Microbiology**, v.12, p.225-234, 1991.

ENIGL, D. C.; KING, J. R. & TÖRÖK, T. *Talaromyces trachyspermus*, a heat-resistant mold isolated from fruit juice. **Journal of Food Protection**, v. 56, n. 12, p. 1039-1042, 1993.

FRAVEL, D. R.; ADAMS, P. B. Estimation of United States and world Distribution of *Talaromyces flavus*. **Micology**, v.78, n.4, p.684-686, 1986.

GUMERATO, H.F. Desenvolvimento de um programa de computador para identificação de alguns fungos comuns em alimentos e determinação da resistência térmica de *Neosartorya fischeri* isolado de maçãs. Campinas, 1995, 106p. Tese de Mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

HOCKING, A.D.; PITT, J.I.; SAMSON, R. A. & KING, A. D. Recommendations from the closing session of SMMEF II. In: SAMSON, R. A.; HOCKING, A. D.; PITT, J. I. & KING, A. D. (Eds.) **Modern Methods in Food Mycology**. Amsterdam: Elsevier, cap.1, p. 359-364, 1992.

_____. Food spoilage fungi. II. Heat Resistant Fungi. **CSIRO Division of Food Research**, North Ryde, N.S.W., 2113, v.44, n.4, p.73-82, 1984.

KATAN, T. Heat activation of dormant ascospores of *Talaromyces flavus*. **Transactions of British Mycological Society**, v.84, p.748-750, 1985.

KAVANAGH, J.; LARCHET, N. & STUART, M. Occurrence of heat resistance species of *Aspergillus* in canned strawberries. **Nature**, v.198, p.1322, 1963.

KING, A.D. & HALBROOK, W.U. Ascospore heat resistance and control measures for *Talaromyces flavus* isolated from fruit juice concentrate. **Journal of Food Science**, v.52, p.1252-1254/1266, 1987.

KING Jr., A.D.; BAYNE, H.G. & ALDERTON, G. Nonlogarithmic death rate calculations for *Byssochlamys fulva* and other microorganisms. **Applied Environmental Microbiology**, v.37, n.3, p.596-600, 1979.

_____.; MICHENER, H.D.; ITO, K.A. Control of *Byssochlamys* and related heat-resistant fungi in grape products. **Applied Microbiology**, v.18, n.2, p.166-173, 1969.

_____.; WHITEHAND, L.C. Alterations of *Talaromyces flavus* heat resistance by growth conditions and heat medium composition. **Journal of Food Science**, v.55, n.3, p.830-832/836, 1990.

KOTZEKIDOU, P. Heat resistance of *Byssochlamys nivea*, *Byssochlamys fulva* and *Neosartorya fischeri* isolated from canned tomato paste. **Journal of Food Science**, v.62, n.2, p.410-412/437, 1997.

LOPEZ-DIAZ, T. M.; ROMAN-BLANCO, C.; GARCIA-ARIAS, M.T.; GARCIA-FERNANDEZ, M. C. & GARCIA-LOPEZ, M. L. Mycotoxins in two Spanish cheese varieties. *Int. J. Food Microbiology*, v. 39, n. 3, p. 391-395, 1996. Apud SILIHA, H.; ASKAR, A. Patulin in apple juice and children's apple food-II. Technological and Analytical Aspects. **Fruit Processing**. V.5, p. 164-167, 1999.

MAC EVOY, I. J. & STUART, M. R. Temperature tolerance of *Aspergillus fischeri* var. *glaber* in canned strawberries. *Irish Agric. Res.*, v. 9, p. 59, 1970. Apud TOURNAS, V. Heat Resistant Fungi of importance to the food and beverage industry. **Critical Review Microbiology**, v.20, n.4, p.243-263, 1994.

MAUNDER, D.T. Summary of work on spoilage problems caused by molds of the *Byssochlamys-Paecilomyces* group, in *Byssochlamys* Seminar Abstract, *Res. Circ.* 20, 12, 1969. Apud TOURNAS, V. Heat Resistant Fungi of importance to the food and beverage industry. **Critical Review Microbiology**, v.20, n.4, p.243-263, 1994.

MURDOCK, D.I.; HATCHER, W.S. A simple method to screen fruit juices and concentrates for heat resistance mold. **Journal of Food Protection**, v.41, p.254-256, 1978.

NIELSEN, P.V. Preservative and temperature effect on growth of three varieties of the heat resistant mold, *Neosartorya fischeri*, as measured by an impedimetric method. **Journal of Food Science**, v.56, n.6, p.1735, 1991.

_____.; BEUCHAT, L.R. & FRISVAD, J.C. Growth and fumitremorgin production by *Neosartorya fischeri* as affected by temperature, light and water activity. **Applied Environmental Microbiology**, v.54, n.6, p.1504-1510, 1988.

OBETA, J.A.N & UGWUANYI, J.O. Heat-resistant fungi in Nigerian heat-processed fruit juices. **International Journal of Food Science and Technology** v.30, p.587-590, 1995.

_____. Shelf life study of some Nigerian fruit juices inoculated with of *Neosartorya* spp. *Plant Foods for Human Nutrition* 50: p.325-331, 1997.

OLLIVER, M. & RENDLE, T. A new problem in fruit preservation. Studies on *Byssochlamys fulva* and its effect on the tissues of processed fruit. *Journal of Society Chem. Ind.*, v.53, p.166T, 1934. Apud BEUCHAT, L. R. & RICE, S.L. *Byssochlamys* spp. and their importance in processed fruits. **Advances in Food Research**, v.25, p.237-289, 1979.

PITT, J. I. & HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. Sydney: Academic Press, 1985, 413 p.

PRIETA, J.; MORENO, M. A.; BAYO, J.; DIAS, S.; SUAREZ, G.; DOMINGUEZ, L.; CANELA, R. & SANCHIS, V. Survey of patulin in apple juice and children's apple food by the diphasic membrane procedure. *J. Agric. Food Chem*, v.42, n.8, p. 1701-1703, 1994. Apud SILIHA, H.; ASKAR, A. Patulin in apple juice and children's apple food-II. Technological and Analytical Aspects. **Fruit Processing**. V.5, p. 164-167, 1999.

QUINTAVALLA, S.; SPOTTI, E. Heat resistance of *Talaromyces flavus*, *Neosartorya fischeri* and *Byssochlamys nivea* isolated from fresh fruits. **Microbiologie.Aliments.Nutrition**, v.11, p.335-341, 1993.

RAJASHEKHARA, E.; SURESH, E.R. & ETHIRAJ, S. Influence of different heating media on thermal resistance of *Neosartorya fischeri* isolated from papaya fruit. **Journal of Applied Bacteriology**, v.81, p.337-340, 1996.

_____. Thermal death rate of ascospores of *Neosartorya fischeri* ATCC 200957 in presence of organic acids and preservatives in fruits juice. **Journal of Food Protection**, v.61, n.10, p.1358-1362, 1998.

_____. Modulation of thermal resistance of ascospores of *Neosartorya fischeri* by acidulants and preservatives in mango and grape juice. **Food Microbiology**, v.17, p. 269-275, 2000.

RICE, S.L.; BEUCHAT, L.R. & HEATON, E.K. Changes in the composition and texture of canned peach halves infected with *Byssochlamys fulva*. **Journal of Food Science**, v.42, p.1562-1565, 1977.

SALOMÃO, R. J. **Retratos de Santa Catarina**. Florianópolis, 4^a ed, 2001, 182p.

SCOTT, V.N. & BERNARD, D.T. Heat resistance of *Talaromyces flavus* and *Neosartorya fischeri* isolates from commercial fruit juices. **Journal of Food Protection**, v.50, n.1, p.18-20, 1987.

SILIHA, H.; ASKAR, A. Patulin in apple juice and children's apple food-II. Technological and Analytical Aspects. **Fruit Processing**. V.5, p. 164-167, 1999.

SPLITTSTOESSER, D.F. Enumeration of heat resistant mold (*Byssochlamys*). In: **Compendium of methods for the Microbiology. Exam. of Foods. Am. Public. Health Assoc**, p. 230-234, 1976.

_____.; CADWELL, M.C. & MARTIN, M. Ascospore production by *Byssochlamys fulva*. **Journal of Food Science**, v.34, p.248-250, 1969.

_____.; NIELSEN, P.V. & CHUREY, J.J. Detection of viable ascospores of *Neosartorya*. **Journal of Food Protection**, v.56, p.599-603, 1993.

_____ . ; SPLITTSTOESSER, C.M. Ascospores of *Byssochlamys* compared with those of heat resistant *Aspergillus*. **Journal of Food Science**, v.42, n.3, p.685-688, 1977.

_____ . ; WILKISON, M. & HARRISON, V. Heat activation of *Byssochlamys fulva* ascospores. **Milk Food Technology**, v. 35, n. 7, p. 399-401, 1972.

_____ . ; KUSS, F.R.; HARRISON, W. Enumeration of *Byssochlamys* and other heat-resistant molds. **Applied Microbiology**, v. 20, p. 393-397, 1970.

_____ . & PREST, D.B. Incidence of heat resistant molds in Eastern Orchards and Vineyards. **Applied Microbiology**, v.21, n.2, p.335-337, 1971.

SURESH, E.R., S. ETHIRAJ & JAYARAM. Heat resistance of *Neosartorya fischeri* isolated from grapes. **Journal of Food Science Technology**, v.33, n.1, p.76-77, 1996.

SYDENHAM, E. W.; VISMER, H. F.; MARASAS, W. F., BROWN, N. L.; SCHLECTER, M. & RHEEDER, J. P. The influence of deck storage and initial processing on patulin levels in apple juice. *Food Addit. Contam.* v. 45, n.5, p. 429-434, 1997. Apud SILIHA, H.; ASKAR, A. Patulin in apple juice and children's apple food-II. Technological and Analytical Aspects. **Fruit Processing**. V.5, p. 164-167, 1999.

TOURNAS, V. Heat Resistant Fungi of importance to the food and beverage industry. **Critical Review Microbiology**, v.20, n.4, p.243-263, 1994.

_____ . & TRAXLER, R.W. Heat resistance of a *Neosartorya fischeri* strain isolated from pineapple juice frozen concentrate. **Journal of Food Protection**, v.57, n.9, p.814-816, 1994.

UGWUANYI, J.O. & OBETA, J.A.N. Incidence of heat resistant fungi in Nsukka, Southern Nigeria. **International Journal of Food Microbiology**, v.13, p.157-164, 1991.

_____. Pectinolytic and cellulolytic activities of heat resistant fungi and their macerating effects on mango and African mango. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.79, p. 1054-1059, 1999.

VAN DER SPUY, J. E., MATTHEE, F. N. & CRAFFORD, D. J. A. The heat resistance of moulds *Penicillium vermiculatum* dangeard and *Penicillium brefeldianum* dodge in apple juice. **Phytophylactica**, v. 7, p. 105-108, 1975

YATES, A.R. The occurrence of *Byssochlamys* sp. Moulds in Ontario. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, v.7, n.2, p.148-150, 1974.

_____. & FERGUSON, W.E. Observation on *Byssochlamys nivea* isolated from cucumber brine. **Canadian Journal of Botany**, v.41, p. 1599-1601, 1963.

_____. & MOONEY, D.B. Production of pectic enzymes by *Byssochlamys nivea*. **Journal Institute Canadian Technology and Aliment**, v.1, n.3, p. 106-109, 1968.

_____. & SEAMAN, A.; WOODBINE, M. Growth of *Byssochlamys nivea* in various carbon dioxide atmospheres. **Canadian Journal of Microbiology**, v.13, p.1120-1123, 1967.

ANEXOS

ANEXO 1

Tabela 1 - Recuperação dos ascósporos de *N. fischeri* 2PC em suco de maçã (11,3°Brix) à temperatura de 85°C, nos diferentes pHs do meio de aquecimento

Tempo	pH 2,5	pH 3,5	pH 4,5
	Ascósporos/ml	Ascósporos/ml	Ascósporos/ml
0	7,50E+05	5,00E+05	4,70E+05
5	5,30E+07	5,10E+06	2,10E+07
10	5,50E+07	3,70E+07	6,50E+07
15	3,70E+07	2,95E+07	4,45E+07
20	3,20E+06	2,80E+07	3,90E+07

Tabela 2 - Contagem do número de ascósporos de *N. fischeri* 2PC que sobreviveram aos tratamentos térmicos a 80, 85 e 90°C em suco de maçã (11,3°Brix), a diferentes pHs do meio

PH 2,5		pH 3,5		pH 4,5	
Tempo (min)	80° C	Tempo (min)	80°C	Tempo (min)	80°C
0	5,00E+07	0	6,40E+07	0	3,90E+07
40	3,20E+07	40	5,00E+07	100	3,85E+07
100	3,00E+06	80	4,80E+07	160	3,70E+07
120	3,20E+05	160	6,30E+06	220	5,80E+06
140	5,00E+04	200	4,30E+06	300	7,60E+04
160	1,60E+02	240	4,20E+05	410	4,10E+03
		280	4,60E+04	460	2,90E+03
		340	1,80E+03		
Tempo (min)	85°C			Tempo (min)	85°C
0	5,50E+07			0	6,50E+07
15	3,70E+07	Tempo (min)	85°C	15	4,45E+07
20	3,20E+06	0	5,05E+07	20	3,90E+07
25	2,80E+05	15	4,40E+07	30	4,80E+06
30	3,10E+03	35	4,40E+06	40	4,60E+05
		40	2,30E+05	50	4,50E+03
Tempo (min)	90°C			Tempo (min)	90°C
0	9,00E+07	45	2,50E+03		
1	3,00E+07			0	4,00E+07
1,25	1,75E+06	Tempo (min)	90°C		

1,5	6,50E+05	0	9,50E+07	1	6,60E+07
1,75	2,00E+03	1	6,70E+07	2	6,20E+06
		1,25	2,70E+07	2,25	9,70E+05
		1,5	5,25E+06	2,5	5,70E+05
		1,75	1,30E+06	2,75	6,00E+04
		2	2,70E+05	3	2,80E+03
		2,25	2,60E+03		

ANEXO 2

Formulação e preparo dos meios e soluções utilizadas neste trabalho.

1. Ágar Batata Dextrose (PDA, Merck)

Infusão de batatas 200 g

Dextrose 20 g

Ágar 30 g

Água destilada 1 litro

PH final 5,6. Esterilizar a 121°C/15 minutos

2. Solução de Rosa de Bengala 5% (solução estoque)

Rosa de bengala 0,5 g

Água 10 g

Esterilizar a 121°C/10 minutos. Estocar sob refrigeração, fora do alcance da luz.

3. Corante Lactofucsina para coloração dos esporos

0,1% de ácido fucsínico em ácido láctico de 85% de pureza ou mais

4. Suspensão de Tween 80

Tween 0,05 ml

Água 100 ml

5. Ágar Extrato de Malte (MEA)

Extrato de Malte	20 g
Peptona	1,0 g
Glicose	20 g
Ágar	20 g
Água destilada	1 litro

pH final = 5,4. Esterilizar a 121°C/15 minutos

6. Ágar Czapek Extrato de Levedura (CYA)

K ₂ HPO ₄	1,0 g
Czapek concentrado	10 ml
Extrato de Levedura em pó	5 g
Sacarose	30 g
Ágar	15 g
Água destilada	1 litro

Esterilizar a 121°C/15 minutos

7. Czapek Concentrado

NaNO ₃	30 g
KCl	5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g
Água	100 ml

O Czapek concentrado se manterá indefinidamente sem esterilização. O precipitado de Fe (OH)₃ que se forma com o tempo pode ser ressuspendido pela agitação antes do uso.

8- Ágar Nitrato de Glicerol 25% (G25N)

K ₂ HPO ₄	0,75 g
Czapek concentrado	7,5 ml
Extrato de Levedura	3,7 g
Glicerol (grau analítico)	250 g
Ágar	12 g
Água destilada	750 ml

Esterilizar a 121°C/15 minutos

ANEXO 3

Imagens das estruturas microscópicas dos fungos filamentosos observadas em microscópio Olympus modelo CH 40, ocular de 10X e coloração com Lactofucsina.



Imagem 1- Ascósporo de *Neosartorya fischeri* observados com objetiva de 100X.

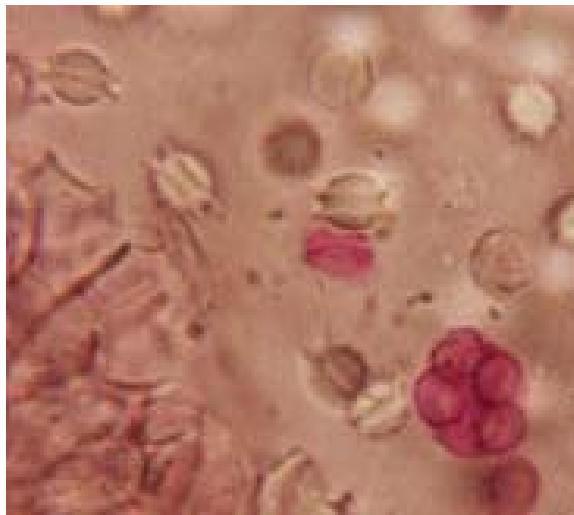


Imagem 2- Asco e ascósporos de *Neosartorya fischeri* observados com objetiva de 100X

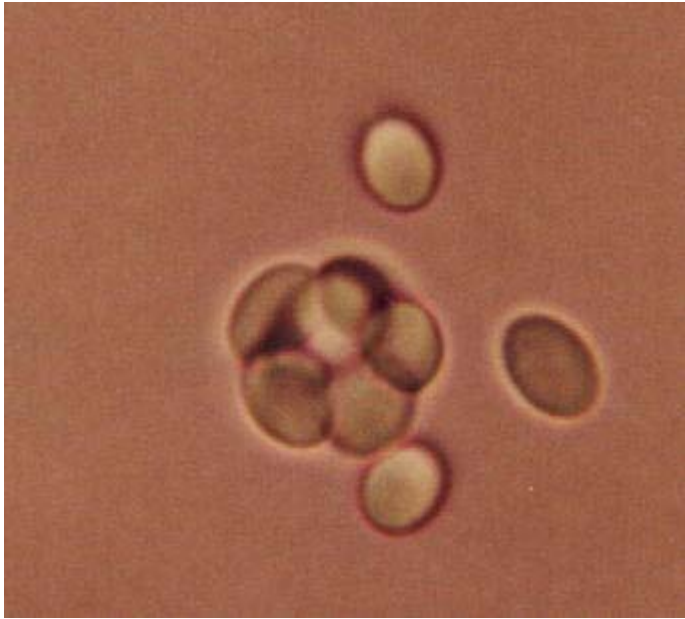


Imagem 3- Asco e ascósporos de *Byssochlamys fulva* observados com objetiva de 100X

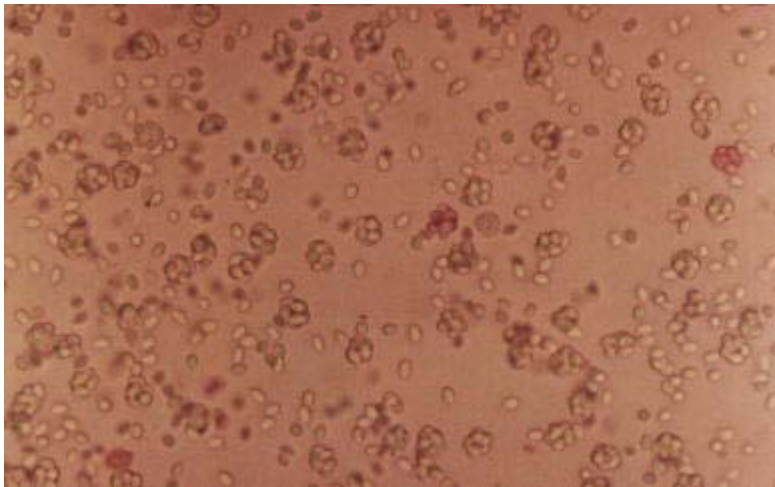


Imagem 4- Ascos e ascósporos de *Byssochlamys fulva* observados com objetiva 40 X

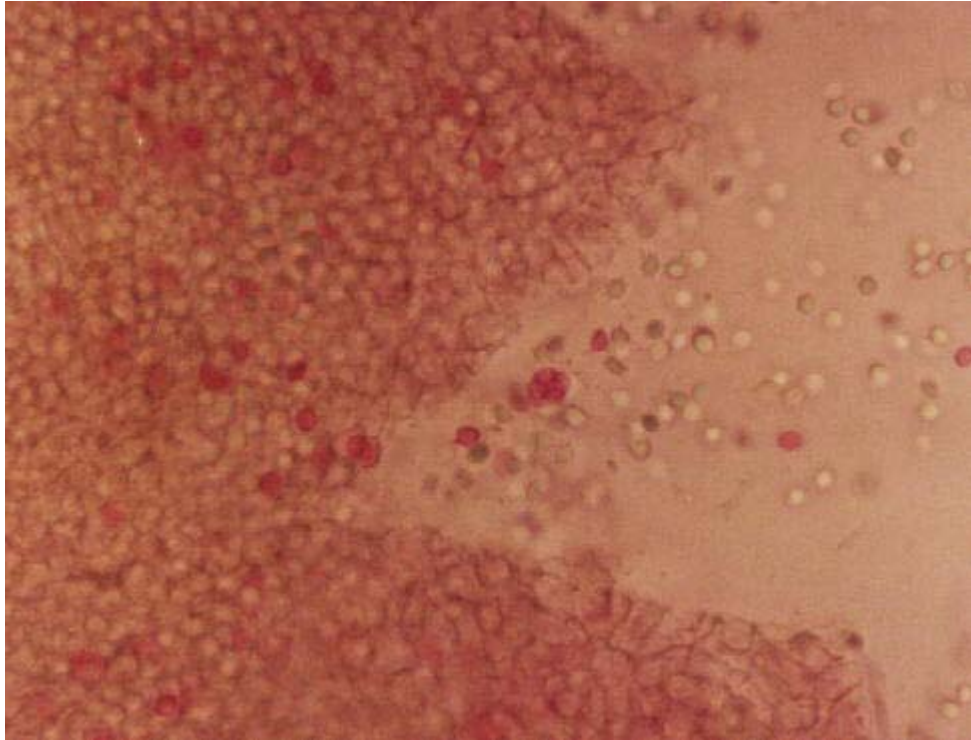


Imagem 5- Cleistotécio, ascos e ascósporos de *Neosartorya fischeri* observados com objetiva de 40X

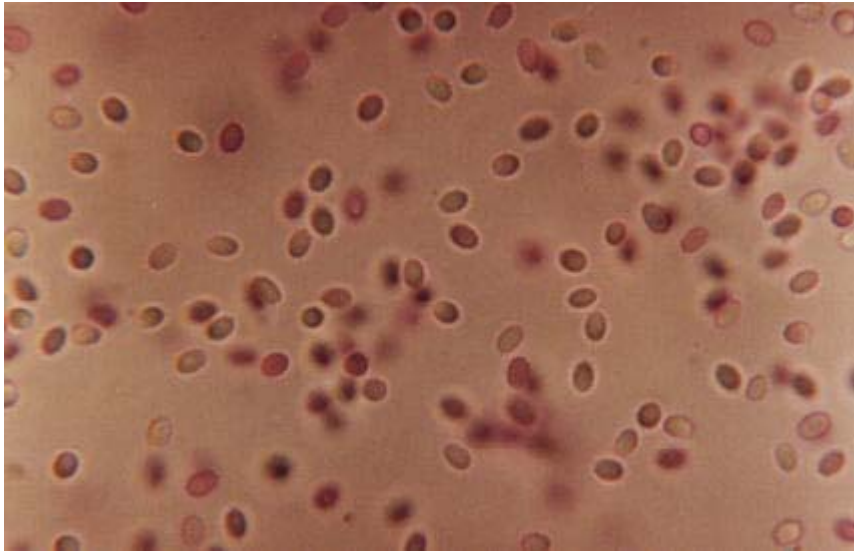


Imagem 6- Ascósporos de *Talaromyces* sp. observados com objetiva de 100X

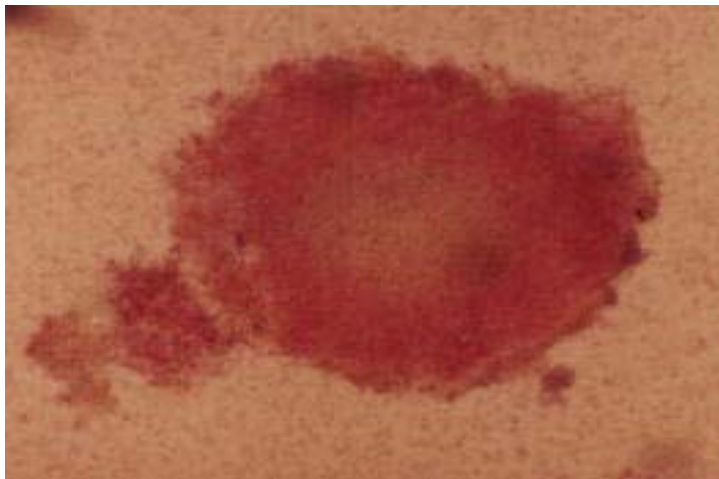


Imagem 7- Gimnotécio de *Talaromyces* sp observado com objetiva de 10X

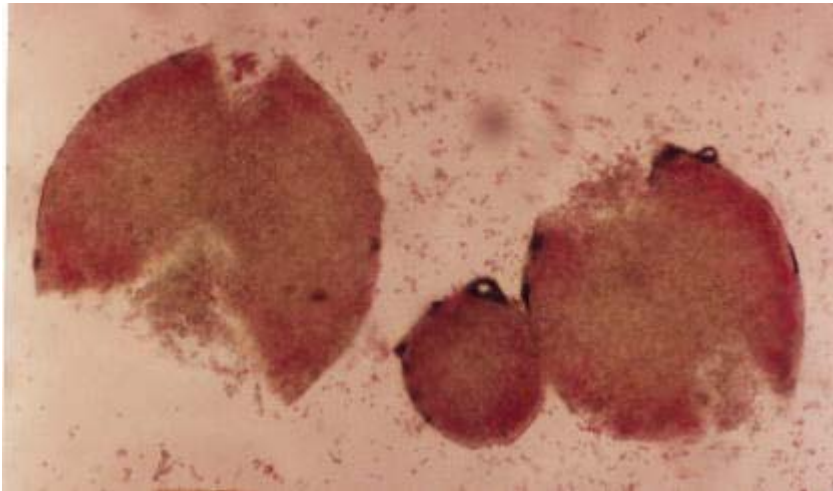


Imagem 8- Cleistotécios de *Neosartorya fischeri* observados com objetiva de 10X

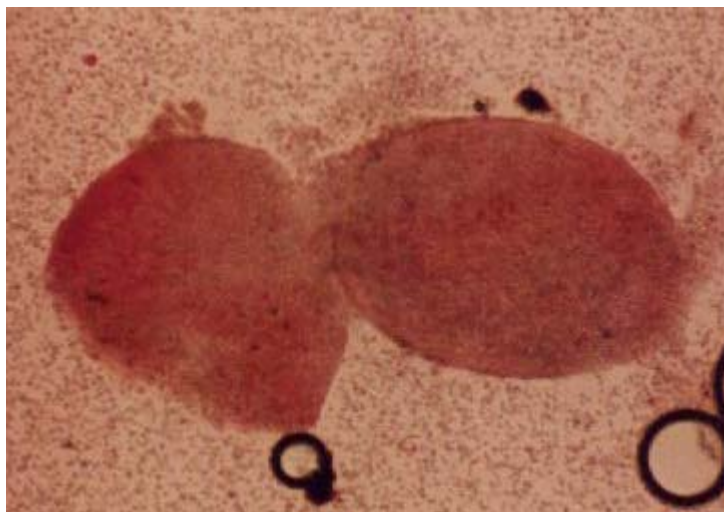


Imagem 9- Cleistotécios de *Neosartorya fischeri* observados com objetiva de 10X



Imagem 10- Cleistotécio de *Eupenicillium* sp. observado com objetiva de 10X



Imagem 11 - Comparação entre o suco de maçã clarificado pela ação de enzimas pectinolíticas produzidas pelos ascósporos de *N. fischeri* 2PC (à esquerda), e outro suco sem inoculação (controle)