

IDENTIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA
TÉRMICA DE FUNGOS FILAMENTOSOS TERMO-RESISTENTES
ISOLADOS DE POLPA DE MORANGO

25/89

GLÁUCIA MARIA FALCÃO DE ARAGÃO
Engenheira de Alimentos

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

IDENTIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA TÉRMICA DE
FUNGOS FILAMENTOSOS TERMO-RESISTENTES ISOLADOS DE POLPA DE MORANGO

Parecer

Este exemplar corresponde
a redação final da tese
defendida por Gláucia Maria
Falcão de Aragão e aprovada
pela Comissão Julgadora
em 20.10.89.

GLÁUCIA MARIA FALCÃO DE ARAGÃO

Engenheira de Alimentos

Pilar Rodriguez de Massaguer
Presidente da Banca

PILAR RODRIGUEZ DE MASSAGUER

Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de
Alimentos para obtenção do título de Mestre
em Ciência de Alimentos

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Este trabalho é oferecido a diferentes formas de amor:

- Minha Mãe - amor presente

- Meu Pai - amor que queria estar presente

- João - amor companheiro

- Rosa - amor amigo

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Rosa Maria T. A. Tosello e Jaqueline Girnos pessoas incansáveis, cuja amizade e colaboração foram indispensáveis para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

- À Profa. Dra. Pilar Rodriguez de Massaguer pela orientação, apoio e incentivo.
- Aos professores do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco pelo auxílio na identificação dos fungos. Agradecimento especial à Profa. Maria José Santos Fernandes, cuja experiência e dedicação foram fundamentais à conclusão desta etapa do trabalho.
- Ao Prof. Dr. Adalberto Ivo Milanez e colaboradores, do Instituto de Botânica de São Paulo, pelo apoio no início da identificação dos fungos.
- À Indústria Milani pelo apoio prestado.
- À De Marchi pela polpa de morango.
- À Mariko Ueno pelos ensinamentos, apoio e companhia em todas as horas.

- À Neusely da Silva pelo apoio e sugestões na redação final da tese.
- À D. Terezinha, D. Olívia e D. Maria pela ajuda e limpeza do material.
- À Ilse, Luís e Sidney pelo apoio e ajuda no trabalho com os fungos.
- Ao pessoal da Secretaria do Departamento de Ciências de Alimentos, Cícera, Jardete e Francely, pela colaboração.
- Ao Marcos A. de Castro pela ajuda constante.
- À Eliana, Isabel e Lúcia pela amizade e incentivo.
- Às minhas irmãs Celina, Cecília e Ana pelo apoio e compreensão.
- À todas as pessoas que participaram comigo do dia-a-dia do Laboratório de Microbiologia.
- À CAPES e FAP pelo apoio financeiro.
- À ABIA pelas cópias xerox e capas da tese.
- À Deus por tudo.

ÍNDICE GERAL

PG.

ÍNDICE DE QUADROS

ÍNDICE DE FIGURAS

RESUMO

SUMMARY

I- INTRODUÇÃO 01

II- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1. O GÊNERO *Byssochlamys*

II.1.1. CARACTERÍSTICAS DAS ESPÉCIES PERTENCEN-
TES AO GÊNERO *Byssochlamys* 04

II.1.2. INCIDÊNCIA DE *Byssochlamys* spp. 05

II.1.3. FONTES DE CONTAMINAÇÃO POR *Byssochlamys*.. 06

II.1.4. RESISTÊNCIA TÉRMICA DE *Byssochlamys* spp.. 09

II.1.5. OUTROS FATORES DE RESISTÊNCIA..... 13

II.1.6. ATIVAÇÃO E GERMINAÇÃO DOS ASCOSPOROS DE
Byssochlamys..... 15

II.1.7. CONSEQUÊNCIAS DA CONTAMINAÇÃO CAUSADA POR
Byssochlamys spp..... 18

II.2. OUTROS FUNGOS TERMO-RESISTENTES..... 22

II.2.1. INCIDÊNCIA..... 22

II.2.2. ATIVAÇÃO TÉRMICA.....	24
II.2.3. RESISTÊNCIA TÉRMICA.....	26
II.2.4. PRODUÇÃO DE METABÓLITOS.....	29
II.3. CURVA DE SOBREVIVENTES	
II.3.1. CURVA DE SOBREVIVENTES NÃO LOGARÍTMICA...	31
II.3.2. MÉTODO DE LINEARIZAÇÃO DE ALDERTON & SNELL, 1970.....	34
II.4. PREVENÇÃO DA DETERIORAÇÃO DE PRODUTOS DE FRUTAS POR FUNGOS TERMO-RESISTENTES.....	37
II.4.1. SELEÇÃO DAS FRUTAS.....	37
II.4.2. TRATAMENTO QUÍMICO.....	38
II.4.3. TRATAMENTO TERMOQUÍMICO.....	41
III-MATERIAL E MÉTODOS	
III.1. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO	
III.1.1. MATÉRIA-PRIMA.....	44
III.1.2. CONTAGEM E ISOLAMENTO.....	44
III.1.3. IDENTIFICAÇÃO.....	45
III.2. SELEÇÃO DAS CULTURAS.....	46
III.3. PRODUÇÃO DE ASCOSPOROS.....	48
III.3.1. COLETA DOS ASCOSPOROS.....	49
III.3.2. ATIVAÇÃO DOS ASCOSPOROS.....	50
III.4. AVALIAÇÃO DA DETERIORAÇÃO DO SUÇO DE MORANGO PE- LAS CULTURAS SELECIONADAS	52
III.5. DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA TÉRMICA.....	53
III.5.1. MÉTODO DE TUBOS TDT.....	54
III.5.2. MÉTODO DO FRASCO DE TRÊS BOCAS.....	54

III.5.3. TRATAMENTO TERMOQUÍMICO.....	55
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
IV.1. CONTAGEM, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS TERMO-RESISTENTES.....	58
IV.1.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS QUE LEVARAM A IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS	
IV.1.1.1. <i>Byssoscllamys nivea</i> Westling....	63
IV.1.1.2. <i>Neosartorya fischeri</i> (Whemer) MALLOCH & CAIN	64
IV.1.1.3. <i>Talaromyces</i> sp.....	64
IV.1.1.4. <i>Talaromyces flavus</i> (Klocker) STOLK & SAMSON var. <i>flavus</i>	65
IV.1.1.5. <i>Talaromyces trachyspermus</i> (Shear) STOLK & SAMSON.....	65
IV.1.1.6. <i>Talaromyces wortmannii</i> C.R. Benjamin.....	66
IV.1.1.7. <i>Eupenicillium</i> spp.....	67
IV.1.1.8. <i>Eupenicillium javanivum</i> (Van Beyna) STOLK & SAMSON var. <i>javanicum</i>	67
IV.1.1.9. <i>Eupenicillium euglaucum</i> (Van Beyna) STOLK & SAMSON.....	68
IV.1.1.10. <i>Paecilomyces penicillatus</i> (Holmel) SAMSON.....	69
IV.1.1.11. <i>Paecilomyces varioti</i> (Bainier)	69
IV.1.1.12. <i>Paecilomyces lilacinus</i> (Thom) SAMSON	70
IV.1.1.13. <i>Aspergillus fumigatus</i> FRESENIUS	70

IV.1.1.14. <i>Penicillium chermesium</i> Biourge	71
IV.1.1.15. <i>Penicillium citrinum</i> Thom.....	72
IV.1.1.16. <i>Mycelia sterilia</i>	72
IV.2. ATIVAÇÃO TÉRMICA.....	73
IV.3. AVALIAÇÃO DA DETERMINAÇÃO DO SUCO DE MORANGO PELAS CULTURAS SELECIONADAS.....	77
IV.4. RESISTÊNCIA TÉRMICA DAS CEPAS SELECIONADAS	
IV.4.1. UTILIZAÇÃO DO MÉTODO DE TUBOS TDT.....	80
IV.4.2. UTILIZAÇÃO DO MÉTODO DO FRASCO DE TRÊS BOCAS.....	82
IV.4.3. TRATAMENTO TERMOQUÍMICO.....	113
V. CONCLUSÕES.....	118
VI. ANEXO 1- FORMULAÇÃO DOS MEIOS.....	121
ANEXO 2- ILUSTRAÇÕES.....	124
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	127

ÍNDICE DE QUADROS

QUADRO 1-	CULTURAS SELECIONADAS PARA O TESTE DE RESISTÊNCIA TÉRMICA.....	47
QUADRO 2-	CONDIÇÕES UTILIZADAS PARA A ESPORULAÇÃO DOS FUNGOS.....	48
QUADRO 3-	TEMPERATURAS E TEMPOS DE AQUECIMENTO UTILIZADOS NA DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA TÉRMICA DAS CEPAS SELECIONADAS.....	56
QUADRO 4-	CONCENTRAÇÕES FINAIS DE CONSERVANTES ADICIONADAS AO SUÇO NA AVALIAÇÃO DOS TRATAMENTOS TERMO-QUÍMICOS.....	57
QUADRO 5-	CONTAGEM DE FUNGOS TERMO-RESISTENTES NAS AMOSTRAS DE POLPA DE MORANGO EXAMINADAS.....	59
QUADRO 6-	IDENTIFICAÇÃO DAS CULTURAS DE FUNGOS PERFEITOS ISOLADOS DE POLPA DE MORANGO, APÓS TRATAMENTO TÉRMICO DE 70 C POR 2 HORAS.....	60
QUADRO 7-	IDENTIFICAÇÃO DE CULTURAS DE FUNGOS IMPERFEITOS ISOLADOS DE POLPA DE MORANGO, APÓS TRATAMENTO TÉRMICO DE 70 C POR 2 HORAS.....	61
QUADRO 8-	NÚMERO TOTAL DE CEPAS IDENTIFICADAS EM CADA	

GÊNERO E NÚMERO DE AMOSTRAS DE POLPA DE MORANGO DE ONDE FORAM ISOLADAS.....	62
QUADRO 9- TRATAMENTO TÉRMICO ÓTIMO PARA ATIVAÇÃO, EM SUCO DE MORANGO, DOS ESPOROS DAS ESPÉCIES SELECIONA- DAS E O INCREMENTO NA CONTAGEM INICIAL CAUSADO PELO CHOQUE TÉRMICO.....	76
QUADRO 10- ALTERAÇÕES CAUSADAS PELAS ESPÉCIES INOCULADAS EM SUCO DE MORANGO	78
QUADRO 11- VALORES DO EXPOENTE "a", CALCULADOS A 80 C, UTI- LIZADOS NA LINEARIZAÇÃO DAS CURVAS DE SOBREVI- VENTES DE <i>B. nivea</i> , <i>N. fischeri</i> E <i>E. javanicum</i>	90
QUADRO 12- VALORES DE k E C CALCULADOS PARA CADA TEMPERATU- RA DE TRABALHO COM <i>B. nivea</i> , <i>N. fischeri</i> E <i>E. javanicum</i>	95
QUADRO 13- CÁLCULO DO VALOR D, CONSIDERANDO-SE ORDEM LOGA- RÍTMICA DE MORTE E SEUS RESPECTIVOS COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO PARA <i>B. nivea</i> , <i>N. fischeri</i> E <i>E. javanicum</i>	96
QUADRO 14- COMPARAÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL REQUERIDO PARA CAUSAR UM DETERMINADO NÚMERO DE REDUÇÕES DECI- MAIS DE ASCOS DE <i>B. nivea</i> , COM OS TEMPOS CALCU- LADOS PELA EQUAÇÃO DE LINEARIZAÇÃO E OS TEMPOS CALCULADOS CONSIDERANDO ORDEM LOGARÍTMICA DE MORTE.....	98
QUADRO 15- COMPARAÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL REQUERIDO PARA CAUSAR UM DETERMINADO NÚMERO DE REDUÇÕES DECI- MAIS DOS ASCOSPOROS DE <i>N. fischeri</i> , COM OS TEM- POS CALCULADOS PELA EQUAÇÃO DE LINEARIZAÇÃO E OS	

TEMPOS CALCULADOS CONSIDERANDO ORDEM LOGARÍTMICA DE MORTE.....	99
QUADRO 16- COMPARAÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL REQUERIDO PARA CAUSAR UM DETERMINADO NÚMERO DE REDUÇÕES DECIMAIS DOS ASCOSPOROS DE <i>E.javanicum</i> , COM OS TEMPOS CALCULADOS PELA EQUAÇÃO DE LINEARIZAÇÃO E OS TEMPOS CALCULADOS CONSIDERANDO ORDEM LOGARÍTMICA DE MORTE	100
QUADRO 17- CÁLCULO DO VALOR D E SEUS RESPECTIVOS COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO PARA <i>T. flavus</i> , ÀS TEMPERATURAS DE 75, 80, 85 e 90 C.....	103
QUADRO 18- COMPARAÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL REQUERIDO PARA CAUSAR UM DETERMINADO NÚMERO DE REDUÇÕES DECIMAIS DOS ASCOSPOROS DE <i>T. flavus</i> , COM OS TEMPOS CALCULADOS PELA EQUAÇÃO DE LINEARIZAÇÃO E OS TEMPOS CALCULADOS CONSIDERANDO ORDEM LOGARÍTMICA DE MORTE.....	104
QUADRO 19- VALORES DE k E C PARA <i>T. flavus</i> ÀS TEMPERATURAS DE 75, 80, 85 e 90 C, E SEUS RESPECTIVOS COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO.....	107
QUADRO 20- COMPARAÇÃO DOS TEMPOS CALCULADOS PARA INATIVAÇÃO DE 10^4 ESPOROS/ML DE SUCO E VALORES DE Z* E ENERGIA DE ATIVAÇÃO (E_a) PARA AS ESPÉCIES ESTUDADAS.	111
QUADRO 21- TEMPO DE AQUECIMENTO A 85 C, REQUERIDO PARA OBTENÇÃO DE 2 E 4 REDUÇÕES DECIMAIS NO NÚMERO INICIAL DE ASCOS DE <i>B. nivea</i> , AQUECIDOS EM SUCO DE MORANGO COM E SEM CONSERVANTES.....	115

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1-	CURVA DE ATIVAÇÃO DE ASCOS DE <i>B. nivea</i> AQUECIDOS A 80°C EM SUCO DE MORANGO.....	74
FIGURA 2-	CURVA DE ATIVAÇÃO DE ASCOSPOROS DE <i>N. fischeri</i> AQUECIDOS A 80 C EM SUCO DE MORANGO.....	74
FIGURA 3-	CURVA DE ATIVAÇÃO DE ASCOSPOROS DE <i>T. flavus</i> AQUECIDOS A 80 C EM SUCO DE MORANGO.....	75
FIGURA 4-	CURVA DE ATIVAÇÃO DE ASCOSPOROS DE <i>E. javanicum</i> AQUECIDOS A 70 C EM SUCO DE MORANGO.....	75
FIGURA 5-	CURVAS DE SOBREVIVENTES DE ASCOSPOROS DE <i>N. fischeri</i> AQUECIDOS A 85 C EM SUCO DE MORANGO PELO MÉTODO TDT.....	81
FIGURA 6-	CURVAS DE SOBREVIVENTES DE ASCOS DE <i>B. nivea</i> AQUECIDOS A 80 C EM SUCO DE MORANGO PELO MÉTODO DE TUBOS TDT.....	81
FIGURA 7-	CURVAS DE SOBREVIVENTES DE ASCOS DE <i>B. nivea</i> AQUECIDOS A 80, 85, 90 E 93 C EM SUCO DE MORANGO PELO MÉTODO DO FRASCO DE TRÊS BOCAS.....	83
FIGURA 8-	CURVAS DE SOBREVIVENTES DOS ASCOS DE <i>N. fischeri</i> AQUECIDOS A 80, 85, 90 E 93 C EM SUCO DE MORANGO PELO MÉTODO DO FRASCO DE TRÊS BOCAS.....	84

FIGURA 9- CURVAS DE SOBREVIVENTES DE ASCOSPOROS DE E. javanicum AQUECIDOS A 80, 85 E 90 C EM SUCO DE MORANGO PELO MÉTODO DO FRASCO DE TRÊS BOCAS....	85
FIGURA 10- DETERMINAÇÃO DO EXPOENTE "a" PARA B. nivea A 80 C.....	87
FIGURA 11- DETERMINAÇÃO DO EXPOENTE "a" PARA N. fischeri A 80 C.....	88
FIGURA 12- DETERMINAÇÃO DO EXPOENTE "a" PARA E. javanicum A 80 C.....	89
FIGURA 13- CURVAS DE SOBREVIVENTES DOS ASCOS DE B. nivea LINEARIZADAS PELA FÓRMULA $(\text{LOG } N - \text{LOG } N)^a = kt + C$	92
FIGURA 14- CURVAS DE SOBREVIVENTES DE ASCOSPOROS DE N. fischeri LINEARIZADAS PELA FÓRMULA $(\text{LOG } N - \text{LOG } N)^a = kt + C$	93
FIGURA 15- CURVAS DE SOBREVIVENTES DE ASCOSPOROS DE E. javanicum LINEARIZADAS PELA FÓRMULA $(\text{LOG } N - \text{LOG } N)^a = kt + C$	94
FIGURA 16- CURVAS DE SOBREVIVENTES DE ASCOSPOROS DE T. flavus AQUECIDOS A 75, 80, 85 E 90 C EM SUCO DE MORANGO PELO MÉTODO DO FRASCO DE TRÊS BOCAS.....	102
FIGURA 17- CURVAS SOBREVIVENTES DE ASCOSPOROS DE T. flavus LINEARIZADAS POR REGRESSÃO LINEAR.....	102
FIGURA 18- DETERMINAÇÃO DO EXPOENTE "a" PARA T. flavus A 75 C.....	105
FIGURA 19- CURVAS DE SOBREVIVENTES DE ASCOSPOROS DE T. flavus LINEARIZADAS PELA FÓRMULA	

$(\text{LOG } N_0 - \text{LOG } N) = kt + C$	106
FIGURA 20- DETERMINAÇÃO DO VALOR Z* PARA <i>B. nivea</i>	109
FIGURA 21- DETERMINAÇÃO DO VALOR Z* PARA <i>N. fischeri</i>	109
FIGURA 22- DETERMINAÇÃO DO VALOR Z* PARA <i>E. javanicum</i>	110
FIGURA 23- DETERMINAÇÃO DO VALOR Z* PARA <i>T. flavus</i>	110
FIGURA 24- CURVAS DE SOBREVIVENTES DE ASCOS DE <i>B. nivea</i> AQUECIDOS A 85C EM SUCO DE MORANGO COM E SEM OS CONSERVANTES BENZOATO DE SÓDIO E SORBATO DE POTÁSSIO.....	114

RESUMO

Foram isoladas 58 culturas de fungos filamentosos termo-resistentes à partir de 15 amostras de polpa de morango que haviam sofrido um choque térmico de 2 horas a 70 °C. Após a identificação, quatro cepas de fungos perfeitos foram selecionadas para o teste de resistência térmica, utilizando suco de morango (15 Brix; pH 3.0) como meio de aquecimento para os esporos. As cepas selecionadas foram: *Byssochlamys nivea*, *Neosartorya fischeri*, *Talaromces flavus* var. *flavus* e *Eupenicillium javanicum* var. *javanicum*.

O resultado da determinação da resistência térmica mostrou que as curvas de sobreviventes dos fungos selecionados não eram lineares, não apresentando, portanto, comportamento logarítmico. Foi, então, utilizado o método de linearização das curvas de sobreviventes estabelecido por ALDERTON & SNELL, 1970. Este método fornece os parâmetros de resistência térmica k e Z^* , equivalentes a D e Z no modelo de Bigelow. Os tempos de aquecimento, à temperatura constante, para causar um determinado número de reduções decimais, calculados pelo método de linearização, resultaram mais próximos aos experimentais do que a consideração de ordem logarítmica de morte, que também foi utilizada para comparação.

SUMMARY

Fifty eight (58) cultures of heat-resistant molds were isolated from fifteen (15) samples of strawberry pulp after a heat shock of 2 hours at 70°C. Followed identification, four cultures were selected to determine their heat resistance using strawberry juice (15 Brix, pH 3.0) as heating medium of the spores. Selected cultures were: *Byssoschlamys nivea*, *Neosartorya fischeri*, *Talaromyces flavus* var. *flavus* e *Eupenicillium javanicum* var. *javanicum*.

Non linear, non-logarithmic behavior was observed during heat destruction of the selectes cultures. Therefore, the method for linearization of ALBERTON & SNELL (1970) was used to determine heat resistance parameters K and Z^* , which are equivalent to D and Z of the Bigelow model. Heating times, at constant temperature, required to cause an established number of decimal reductions of the population, were calculated by the linearization method and were closer to experimental reduction times than those calculated assuming logarithmic order of death.

Byssoschlamys nivea ($k_{90} = 0.2928 \text{ min}^{-1}$; $Z = 15^\circ\text{C}$; $E_a = 97.0 \text{ Kcal/mol}$) was the most heat-resistant culture tested, followed by *Neosartorya fischeri*, *Eupenicillium javanicum* and *Talaromyces flavus*.

Due to the high heat resistance found for the selected cultures, the effect of spore sensibilization caused by sodium benzoate (SB) (1000ppm), potassium sorbate (PS) (1000ppm) and combinations of benzoate and sorbate (500ppm SB plus 500ppm PS: 800ppm SB plus 200ppm PS) added to strawberry juice prior heating to 85 C, was tested for *B. nivea* asci. Highest sensibilization was found with the addition of 1000ppm of sodium benzoate, but only after 30 minutes of heating.

Inoculation "in vitro" of the selected cultures to strawberry juice, incubated for 6 weeks at 30 C showed growth of all cultures in aerobic conditions while only *B. nivea* grew in low oxygen tension. PH variation was not observed. Color changes of the juice were observed for *Byssosclamyces nivea* e *Talaromyces flavus*.

I- INTRODUÇÃO

A ocorrência de fungos termo-resistentes em alimentos tem sido objeto de estudos sistemáticos nos últimos anos, devido à observação de diversos danos que podem causar às frutas e derivados de frutas processadas. Estes fungos não só resistem às temperaturas normalmente empregadas no processamento térmico destes alimentos (BEUCHAT, 1976; MURDOCK & HATCHER, 1978; SPLITTSTOESSER, 1971), como também são ativados por este tratamento (BEUCHAT, 1986), com consequente germinação e crescimento no produto final (MURDOCK & HATCHER, 1978).

O nosso interesse por este assunto surgiu a partir de problemas ocorridos em uma indústria da região de Campinas, S.P., após o processamento de suco de morango. A ocorrência de crescimento visível de fungos durante o armazenamento do produto levantou a suspeita da presença de cepas de fungos termo-resistentes, dado ao fato do produto haver sido pasteurizado antes do engarrafamento. Este caso despertou o interesse sobre a possível origem e grau de resistência térmica destes fungos pois, ocorrendo em uma fruta de alta termo-sensibilidade como o morango, onde a intensificação do tratamento térmico poderá causar perdas na qualidade do produto, sua eliminação certamente mostrar-se-á problemática. Adicionalmente, o morango é uma fruta

que tem-se mostrado altamente susceptível à contaminação por estes fungos, conforme demonstraram pesquisas realizadas por KAVANAGH et alii (1963) e EIRDA & AMSTALDEN (1985).

Os estudos iniciais sobre termo-resistência de fungos foram direcionados particularmente às espécies do gênero *Byssoschlamys*, desde a identificação de *B. fulva* por OLLIVER & SMITH (1933). Entretanto, outros fungos termo-resistentes como aqueles pertencentes aos gêneros *Talaromyces*, *Necosartorya* e *Eupenicillium*, também capazes de sobreviver ao processamento térmico de pasteurização de frutas e seus derivados, só começaram a ser estudados mais recentemente (KATAN, 1985; KAVANAGH et alii, 1963; KING & HALBROOK, 1987; SCOTT & BERNARD, 1987; SPLITTSTOESSER & SPLITTSTOESSER, 1977; VAN DER SPUY et alii, 1975), o que demonstra haver ainda muito a ser pesquisado neste campo.

O presente trabalho teve por objetivo estudar os fungos termo-resistentes isolados da polpa de morango utilizada como matéria-prima para o preparo do suco. O estudo visou englobar a identificação das cepas isoladas e o cálculo da resistência térmica de algumas culturas selecionadas, através da construção de curvas de sobreviventes. Na determinação da resistência térmica foi utilizado suco de morango como meio de suspensão para aquecimento dos esporos. O comportamento linear ou não das curvas de destruição térmica foi analisado, observando-se a necessidade ou não da linearização destas curvas, visando a melhor aproximação dos dados às condições reais. Associado aos testes de resistência térmica, foi observada a influência do tratamento termoquímico, com adição de sorbato de potássio e

benzoato de sódio ao suco sob aquecimento, sobre a sensibilização dos ascósporos do fungo mais resistente, entre os testados.

II- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1. O GÊNERO *Byssochlamys*

II.1.1. CARACTERÍSTICAS DAS ESPÉCIES PERTENCENTES AO GÊNERO *Byssochlamys*

O primeiro fungo filamentoso termo-resistente reconhecido como causador de deterioração em produtos de frutas foi o *Byssochlamys fulva*, identificado por OLLIVER & SMITH (1933), à partir de produtos de frutas engarrafados e enlatados. O gênero *Byssochlamys* foi estabelecido por Westling em 1909, tendo inicialmente *Byssochlamys nivea* como sua única espécie (BROWN & SMITH, 1957). Por muitos anos, estudou-se somente o *B. fulva*, considerado mais resistente e de ocorrência mais frequente que *B. nivea*. PUT (1964), entretanto, demonstrou que os ascosporos de *B. nivea* tinham praticamente a mesma resistência térmica que os de *B. fulva*, estando, em alguns casos, presentes em maior número.

O gênero *Byssochlamys* pertence ao grupo dos ascomicetos com produção de ascos sem ascocarpo. Os ascos são constituídos por oito ascosporos, sendo os ascosporos a base da sua resistência térmica (OLLIVER & SMITH, 1933; BROWN & SMITH, 1957;

YATES & FERGUSON, 1963).

O mecanismo de termo-resistência dos ascosporos é pouco conhecido. Estudos sobre a composição química de ascosporos de várias linhagens de *B. fulva* que apresentavam diferenças na resistência térmica, evidenciaram que a diferença mais significativa encontrava-se na quantidade de ácidos graxos saturados, com cadeias de mais de 20 carbonos, presentes em maior número nos esporos com características de maior resistência. A presença destes ácidos graxos, não detectados anteriormente em esporos de outros fungos, levou à hipótese deste fato estar associado à alta resistência dos esporos de *Byssoschlamys* (BANNER et alii 1979).

II.1.2. INCIDÊNCIA DE *Byssoschlamys* spp.

Os fungos termo-resistentes pertencentes ao gênero *Byssoschlamys* podem desenvolver-se tanto na polpa quanto na calda de frutas processadas e, desde a sua identificação, vários casos de contaminação por estes fungos têm sido relatados (OLLIVER & RENDLE, 1934; PUT & KRUISWIJK, 1964; MAUNDER, 1969).

O morango, particularmente, é uma das frutas mais atingidas por *Byssoschlamys* spp. OLLIVER & RENDLE (1934), detectaram *B. fulva* em morango cozido; PUT & KRUISWIJK (1964), observaram a presença de *B. nivea* em latas de morango deteriorados e BEUCHAT & RICE (1979), citam vários casos ressaltando o morango, entre outras frutas, como uma das

principais envolvidas em deterioração por este tipo de fungo. Há ainda a incidência de *B. fulva* em outras frutas processadas como ameixas, framboesa, maçã, laranja e groselha (OLLIVER & RENDLE, 1934). Contaminação de sucos de frutas por *Byssochlamys* spp. também tem sido relatada, como é o caso de suco de uva (KING et alii, 1969; MAUNDER, 1969; YATES, 1974; MURDOCK & HATCHER, 1978); maçã (SWANSON et alii, 1985; VAN DER RIET & VAN DER WALT, 1985), amora e abacaxi (MAUNDER, 1969), pêssago e damasco (DRAGONI & COMI, 1985) e maracujá (CARTWRIGHT & HOCKING, 1984). Há ainda relatos de sucos de uva e maçã contaminados por *Paecilomyces* (fase anamorfa do *Byssochlamys*) (MAUNDER, 1969).

Além de frutas e sucos de frutas, espécies de *Byssochlamys* já foram isoladas de outros produtos como pudim de fruta; *Paecilomyces* sp. foi isolado de recheio de torta de amora (MAUNDER, 1969) e *B. nivea* foi isolado de salmoura de pepino enlatado (YATES & FERGUSON, 1963). A incidência de fungos termo-resistentes, portanto, não se restringe à produtos de frutas, como destacam YATES & FERGUSON (1963).

II.1.3. FONTES DE CONTAMINAÇÃO POR *Byssochlamys*

Pesquisas demonstram que os campos e os pomares são as principais fontes de contaminação de frutas processadas (OLLIVER & RENDLE, 1934; YATES & FERGUSON, 1963). Vários estudos têm sido desenvolvidos em diversas partes do mundo, para a avaliação do grau de contaminação do solo, folhas e frutos de pomares e vinhedos por *Byssochlamys*. HULL (1939) estudando folhas e frutos

de plantações de morango, detectou a presença de *B. fulva* em 33% das amostras examinadas. Observou que o solo servia como reservatório de ascosporos e as frutas, em contato com este, tornavam-se particularmente susceptíveis à contaminação pelo fungo. A predominância deste fungo em pomares e vinhedos foi confirmada no estudo realizado em 1971 por SPLITTSTOESSER et alii, no estado de Nova York. Verificaram que mais de 70% das amostras de frutas, vegetação e solo examinadas encontravam-se contaminadas por fungos termo-resistentes, com predominância de *B. fulva*. Verificaram ainda que, embora predominante, a concentração de *B. fulva*, de maneira geral, era baixa, da ordem de 1 UFC/g.

Em pesquisas realizadas recentemente no Brasil por EIROA & AMSTALDEN (1985), foi também isolado maior número de *B. fulva* do que de *B. nivea* em amostras de folhas, frutos e solo de hortas, pomares e vinhedos da região de Campinas, S.P. Os resultados demonstraram a presença do gênero *Byssochlamys* em 5.9% das amostras examinadas, sendo a maior parte das amostras contaminadas encontradas em solo de cultivo de morango. Do total de amostras de solo de cultivo de morango examinadas, metade estava contaminada com *Byssochlamys* spp., sendo 60% com *B. fulva* e 40% com *B. nivea*. *Byssochlamys* foi ainda isolado de 40% das amostras de pomar de pessegueiros, de 10% das amostras de pomar de laranjeiras, e de 10% de amostras de vinhedos e hortas de pepino.

PUT (1964) estudou 200 amostras de solo, coletadas de oito campos de cultivo de morango na Holanda, obtendo resultados

diferentes dos anteriormente descritos, com a predominância de *B. nivea* em lugar de *B. fulva*. Dentre 27 cepas coletadas, 25 eram de *B. nivea* e apenas 2 de *B. fulva*. Observou ainda que a concentração de ascosporos no solo era baixa, com 100 ascosporos de *B. nivea*/g de solo, e menos de 1 ascosporo de *B. fulva*/g de solo.

PUT & KRUISWIJK (1964) realizando análises microbiológicas de morango durante as safras de 1961 e 1963, observaram a presença de ascosporos de *Byssochlamys* spp. em 12% das amostras da safra de 1961 e 41% das amostras da safra de 1963. Após a lavagem das frutas, estes números foram reduzidos para 8 e 20%, respectivamente.

YATES (1974) em pesquisa feita na região de Ontário, Canadá, examinou amostras de solo e frutos, obtendo um grande número de *Byssochlamys* spp. isolados de uvas (32% das amostras examinadas), mas nenhuma cepa foi isolada do solo. Dos demais frutos, apenas uma amostra de maçã estava contaminada com *Byssochlamys* sp., embora outras 6 contivessem cepas de *Paecilomyces* spp.. O autor considerou a possibilidade de que estas pudessem ser cepas de *Byssochlamys* sp. que perderam a capacidade de produzir ascos.

PERCEBOIS et alii (1975) isolaram várias linhagens de *B. nivea* à partir de morangos, morangueiros e solo e consideraram que tal fungo era comum a este ambiente, pois foram isoladas quatro cepas de *B. nivea* a partir de morangos aparentemente saudáveis, além de outras três isoladas do solo.

II.1.4. RESISTÊNCIA TÉRMICA DE *Byssoschlamys* spp.

As temperaturas e tempos de tratamento térmico para destruição de *B. fulva* foram estudados por vários autores. OLLIVER & SMITH (1933), observaram que os esporos de *B. fulva* podem sobreviver por 30 minutos a 87-88 °C, o que explica a sua sobrevivência em produtos pasteurizados. Em 1964, foram realizados os primeiros experimentos que demonstravam também a alta resistência de *B. nivea* ao calor. A avaliação da resistência térmica de seus ascosporos em suco de morango, mostrou uma capacidade de sobreviver por 10 minutos a 87 °C e a destruição de 10⁵ ascosporos/ml em 10 minutos a 90 °C (PUT & KRUISWIJK, 1964).

MAUNDER (1969) observou que o meio de suspensão para aquecimento dos esporos interfere na resistência térmica de *B. fulva*, sendo que o tempo para destruição de 10³ ascosp/ml, a 90 °C, variava de 5 minutos em suco de fruta a 15 minutos em pudim de fruta, para a mesma linhagem. KING et alii (1969) comprovaram a influência do meio sobre a resistência térmica de *B. fulva*, em suco de uva. Os resultados mostraram que o tempo para destruição de 1.5 X 10⁴ ascosp/ml a 92.2 °C, quando aquecidos em suco diluído, era de 13.7 minutos, enquanto que em suco concentrado era de 22.6 minutos, considerando a mesma linhagem. SPLITTSTOESSER & SPLITTSTOESSER (1977) testaram também a resistência de ascosporos de *B. fulva* em vários sucos de fruta, obtendo, para a mesma linhagem aquecida a 85 °C por 60 minutos em diferentes sucos, uma porcentagem de sobreviventes que variou entre 0.06 e 8.4%, confirmando o efeito do meio de suspensão na resistência térmica.

A resistência de *B. fulva* também pode variar entre as linhagens da mesma espécie, conforme demonstra a pesquisa feita por KING et alii (1969). Estes autores compararam o valor de D (tempo, em minutos, necessário para reduzir a população a um décimo do seu valor inicial, a uma temperatura constante (SANDHOLZER & KATSIN, 1942, citado por RAHN, 1945)) de várias linhagens, sob as mesmas condições de aquecimento a 87.8 °C, obtendo valores que variavam entre 8.5 e 11.3 minutos.

A mesma variação entre as linhagens foi observada por BAYNE & MICHENER (1979). Trabalhando com 24 linhagens de *B. fulva* e 1 linhagem de *B. nivea*, os autores selecionaram as mais resistentes, através do emprego de tratamentos térmicos progressivos, chegando até 20 minutos de aquecimento a 93.8 °C, observando que 7 linhagens resistiram a este tratamento. As mais resistentes foram então, submetidas a um novo período de aquecimento de 25 minutos a 90 °C, em meio sintético a base de ácido tartárico e glicose 16 Brix, pH 3.6. Os resultados mostraram uma porcentagem de sobrevivência que variava entre 0.04 a 1.3%. Um outro fator de alteração da resistência, observado por estes autores, foi a variação de pH. Submetendo as mesmas linhagens ao mesmo tratamento térmico, sob as mesmas condições, sendo apenas alterado o pH do meio para 5.0, os autores observaram uma maior resistência de 5 linhagens neste pH. A porcentagem de sobrevivência apresentada neste novo pH variava entre 6.8 a 30.8% e duas linhagens não apresentaram variação de resistência. Ainda neste trabalho, foi feito um teste de resistência de uma das linhagens, cuja porcentagem de

sobreviventes variava muito com o pH (1.3% a pH 3.6 e 30.8% a pH 5.0), variando o pH para 6.6, sob as mesmas condições anteriores. Os resultados mostraram a destruição total dos ascosporos, indicando haver uma faixa ótima de pH para sobrevivência, pelo menos no caso desta linhagem.

O fato da resistência térmica variar com as linhagens, pode ser a explicação para os resultados obtidos por BEUCHAT (1986). Contrariando os resultados de alta termo-resistência de *Byssochlamys* spp., publicado por outros autores, obteve fácil inativação térmica de algumas linhagens estudadas, com rápida destruição a 80 °C e ativação a 70 e 75 °C em 30 minutos.

Outro fator que pode influenciar a resistência térmica de *Byssochlamys* spp. é a idade da cultura. YATES & FERGUSON (1963) realizando um experimento com culturas de *B.* níveis de 4 e 14 dias de incubação, obteve a destruição das culturas de 4 dias com um tratamento de 20 minutos a 84 °C, enquanto que as culturas de 14 dias suportaram um tratamento de 45 minutos a 88 °C. Os autores consideraram que esta diferença devia-se à presença de ascosporos na cultura mais velha.

Para os cálculos de tratamentos térmicos aplicados a alimentos com pH abaixo de 4.0 a temperatura de referência recomendada é de 65.5 °C (STUMBO, 1973). HERSON & HULLAND (1980) observaram, entretanto, que, havendo suspeita da presença de espécies do gênero *Byssochlamys*, esta temperatura deve ser reajustada para evitar alterações por este fungo.

A alta resistência térmica de *Byssochlamys* spp. pode ser avaliada observando-se os tratamentos térmicos sugeridos para pasteurização de diversos produtos. Para o suco de morango são

recomendados tratamentos como 40 segundos a 91 C (GOLDONI et alii, 1981) e 30 segundos a 92-95 C (baseado em dados empíricos). PUT & KRUISWIJK (1964), entretanto, asseguraram que os tratamentos comerciais de morango não devem alcançar temperaturas iguais ou acima de 90 C, pois um aumento na temperatura de pasteurização causa um super-cozimento do produto. A temperatura e tempo de pasteurização rotineiramente utilizada para frutas e seus derivados é de 90 C por 3 minutos, segundo BEUCHAT, (1986). No caso de matéria prima a ser adicionada em iogurte, o tratamento térmico sugerido é de 20 minutos a 65-70 C, para frutas com boa qualidade microbiológica, aumentando para 20 minutos a 80-85 C, no caso de frutas com alto grau de contaminação (KURMAN & RASIC, 1978). Os autores, entretanto, não definem quantitativamente o significado de alto grau de deterioração da fruta.

A resistência térmica dos ascosporos de *Dysoschlamys* também é afetada pelo efeito de proteção de altas concentrações de sacarose, conforme observado por BEUCHAT & TOLEDO (1977), em relação aos ascosporos *B. nivea*. Adicionando várias concentrações de sacarose (0 a 60 g/100 ml) ao suco de uva previamente inoculado com suspensão com 10^5 ascos/ml, os autores observaram que, após sete horas de aquecimento a 75 C, nenhum ascosporo viável foi detectado em suco sem adição de açúcar, sendo o valor D, nessas condições, de aproximadamente uma hora. Para o suco com 60g de sacarose/100ml, entretanto, o número de ascosporos foi reduzido em apenas 70%, após aquecimento a 75 C por oito horas. Os autores consideram pouco clara a razão deste efeito de

proteção, embora sugeriram que a diferença de pressão osmótica entre o meio de suspensão e os ascosporos possa favorecer sua resistência à inativação. BEUCHAT (1981a) também estudou este fator em relação ao *B. nivea*, variando a concentração da sacarose de 0 a 60%, com um decréscimo da atividade de água (a_w) de 0,99 a 0,89 respectivamente. Observaram, como resultado da redução de a_w , uma elevação na resistência térmica dos ascosporos de *B. nivea*.

A contagem das placas com ascosporos de *B. fulva* livres deveria ser oito vezes superior a dos ascos íntegros, devido ao fato de cada asco conter oito ascosporos. MICHENER & KING (1974) entretanto, verificaram que a diferença está em torno de quatro vezes e que isto se devia ao fato dos oito ascosporos não germinarem simultaneamente. Adicionalmente, em testes de resistência térmica realizado com *B. fulva* utilizando ascos inteiros e ascosporos livres, os autores obtiveram curvas de sobreviventes com praticamente a mesma inclinação.

II.1.5. OUTROS FATORES DE RESISTÊNCIA

Além da alta resistência térmica, os fungos do gênero *Byssochlamys* spp. podem apresentar resistência a vários outros tipos de influências normalmente letais aos demais fungos. BROWN & SMITH (1957) destacam o fato de espécies deste gênero serem capazes de desenvolver-se a baixas tensões de oxigênio, crescendo em produtos de frutas enlatadas e engarrafadas.

YATES & FERGUSON (1963) isolaram *B. nivea* da superfície de

salmoura de pepino contendo 47% de dióxido de carbono e 3% de oxigênio, considerando esta atmosfera, associada à porcentagem de sal (6%) e ao pH (4.0), indicação de uma resistência pouco usual. YATES et alii (1967) confirmaram este fato, estudando a influência da atmosfera de CO₂ sobre o crescimento de *B. nivea*. Observaram que, em presença de 100% de CO₂, o fungo apresentava ainda 4% do crescimento que apresentaria sob condições atmosféricas. A resistência a baixas tensões de O₂ foi também estudada por PERCEBOIS et alii (1975) observando que *B. nivea* pode crescer em xarope de morango pasteurizado, sob anaerobiose relativa, embora mais lentamente do que em aerobiose. KING et alii (1969) estudando o efeito do oxigênio sobre o crescimento de *B. fulva*, confirmaram que, como *B. nivea*, este fungo pode crescer em quantidades de oxigênio muito baixas, embora não se desenvolva sob anaerobiose estrita. BEUCHAT & RICE (1979) consideraram que a taxa de crescimento micelial de *Byssoschlamys* em produtos enlatados, depende da quantidade original de oxigênio presente. Esta quantidade está relacionada com o tamanho do espaço livre da lata ("head-space"), tipo da fruta e temperatura de enchimento da lata.

MURDOCK & HATCHER (1978) citam ainda vários fatores de resistência pouco usual apresentado por *Byssoschlamys*, destacando-se entre eles a capacidade de crescimento a baixas temperaturas (em torno de 1.7 °C). ITO et alii (1972) observaram que *B. fulva* pode resistir a altas concentrações de cloro, pois obtiveram apenas 3 reduções decimais na população, após exposição a 1000ppm de cloro por 30 minutos.

II.1.6. ATIVAÇÃO E GERMINAÇÃO DOS ASCOSPOROS DE *Byssoschlamys*

Para o cálculo da resistência térmica de *Byssoschlamys*, é necessário promover a ativação térmica dos ascosporos, pois estas estruturas podem apresentar-se em estado de dormência que pode ser rompida com o calor (HULL, 1939).

Para melhor conhecimento deste fenômeno, SPLITTSTOESSER et alii (1972) estudaram vários fatores que afetam a ativação dos ascosporos de *B. fulva*. Observaram que, a 60 °C, o meio de suspensão para aquecimento interfere muito sobre a ativação; a 70 e 80 °C, por outro lado, o mesmo não ocorre, sendo rápida a ativação em todos os meios por eles testados, inclusive água. O trabalho de SPLITTSTOESSER & SPLITTSTOESSER (1977) confirma o fato de que, a menos que sejam ativados por aquecimento, apenas uma pequena porcentagem de ascosporos de *B. fulva* germina e produz colônias. Ainda neste trabalho, o meio de suspensão para aquecimento dos esporos também demonstrou afetar a ativação a 70 °C, apresentando-se o suco de uva como o mais eficiente dentre os meios testados.

Testes preliminares de ativação de *B. fulva* efetuados por BAYNE & MICHENER (1979) indicaram que um choque térmico por 30 minutos a 80 °C seria ideal para a ativação dos ascosporos deste fungo. Variando as linhagens, entretanto, os autores observaram que os melhores tratamentos de ativação também variaram.

Vários tratamentos térmicos para ativação de *Byssoschlamys* spp. encontram-se citados na literatura. Dentre eles encontra-se

o aquecimento por 4 minutos a 80 °C (KING et alii, 1969); 20 minutos a 80 °C (KING et alii, 1979); 15 minutos a 80 °C (HATCHER et alii, 1979) para *B. fulva* e 70 °C por 10 minutos (PUT & KRUISWIJK, 1964) e 70 °C por 1 hora (BEUCHAT & TOLEDO, 1977) para *B. nivea*.

YATES (1973) avaliando a eficiência do choque térmico sobre a germinação de ascosporos de *B. nivea*, concluiu que a necessidade deste tratamento para germinação, sugere um envolvimento da membrana do esporo no fenômeno de ativação, com ênfase na alteração que o tratamento pode provocar sobre a permeabilidade e sobre o mecanismo de transporte de compostos para dentro e fora da célula.

YATES et alii (1968) testaram o efeito de diferentes temperaturas e pH sobre a germinação dos ascosporos de *B. nivea*, observando que a maior taxa de ativação ocorria entre pH 3.5 e 4.0, com um choque térmico de 5 minutos a 75 °C. Observaram ainda que a taxa de germinação aumentava em presença de acetato. Avaliando o efeito da presença de outros compostos do ciclo do ácido tricarboxílico, observaram que piruvato e fumarato não atuavam como estimulantes e que a presença de citrato a 0.01M, inibia a germinação.

A germinação dos ascosporos de *B. fulva* foi avaliada em vários sucos de frutas por KING et alii (1969), demonstrando que, estando presentes como contaminantes naturais ou quando artificialmente inoculados, estes ascosporos podem germinar em vários sucos de frutas, como maçã, uva, ameixa, néctar de pera e pêssgo, vários refrescos, incluindo combinações de maçã/uva e

também em refresco artificial de laranja. Os ascos deste fungo germinaram também, tanto em suco de uva diluído, quanto em suco de uva concentrado.

BEUCHAT & TOLEDO (1977) avaliando o efeito da sacarose na germinação de *B. nivea*, inocularam suspensões de ascos (concentração de 2×10^3 UFC/ml de produto), em produtos de frutas com várias concentrações de sacarose. Estes ascos haviam sido previamente ativados por 1 hora a 70°C . Observaram que a menor atividade de água (a_w) em que ocorreu a germinação foi 0.90, o que equivale, aproximadamente, à adição de 40g de sacarose/ 100ml de sucos de frutas como maçã, ameixa, pêssago, uva, laranja, abacaxi, e pera, que apresentaram inicialmente porcentagem de sólidos solúveis (Brix) variando entre 11.2 e 15.7.

HATCHER et alii (1979) realizaram experimentos para determinar o efeito do Brix e da temperatura na germinação e crescimento pós-germinativo de ascosporos de *B. fulva*, após tratamento térmico de 15 minutos a 80°C . Os resultados mostraram que, após 48 horas, foi possível detectar a presença de colônias no suco a 15 Brix incubado a 30°C , enquanto 96 horas foram requeridas para o desenvolvimento de colônias, no mesmo suco incubado a 20°C . No suco a 30 Brix, nenhum crescimento foi detectado após 110 dias de incubação a 20°C e 30°C .

II.1.7. CONSEQUÊNCIAS DA CONTAMINAÇÃO CAUSADA POR

Byssoschlamys spp.

Em frutas contaminadas por espécies de *Byssoschlamys*, o primeiro sinal de deterioração é um leve amolecimento (YATES, 1974), progredindo até a total desintegração da polpa por enzimas pectinolíticas produzidas pelo fungo (OLLIVER & RENDLE, 1934; PUT & KRUISWIJK, 1964). As principais enzimas pectinolíticas produzidas são a endopoligalacturonase (endo P.G.), a endopolimetilgalacturonase (endo P.M.G.) (CHU, 1969; YATES & MOONEY, 1968) e a pectina transeliminase (CHU, 1969).

BEUCHAT & RICE (1979) relatam que nos primeiros isolamentos de *B. fulva*, feitos em 1934 por OLLIVER & RENDLE a partir de frutas enlatadas, não se percebia qualquer alteração externa que evidenciasse a contaminação antes da abertura da lata. No interior das latas, nenhum odor ou flavor anormais e nenhuma alteração de cor foram observadas, havendo somente a desintegração da fruta e a produção de uma pequena quantidade de micélios na superfície do produto.

Estudando morangos termicamente processados e contaminados por *B. nivea*, PUT & KRUISWIJK (1964) observaram que, além do amolecimento causado pelas enzimas produzidas por este fungo, ocorria uma pequena queda no vácuo da lata, não havendo alteração significativa no valor do pH. No caso de sucos contaminados e acondicionados em embalagens longa vida, CARTWRIGHT & HOCKING

(1984) observaram que as embalagens apresentavam-se inchadas, e o suco clarificado na parte superior, com crescimento visível de micélio, sendo este fungo posteriormente identificado como *B. fulva*.

Estudos adicionais detectaram a produção de outras enzimas por *B. fulva*. CHANDER & KLOSTERMEYER (1983) detectaram a lipase e CHU et alii (1973) detectaram a produção de uma enzima muito parecida com a renina, que denominaram byssochlamyopeptidase A. Estes fatos, entretanto, não foram considerados como indesejáveis, mas sim como possíveis fatores de aproveitamento industrial do fungo.

Além dos problemas enzimáticos, existe ainda a possibilidade de produção de micotoxinas por algumas linhagens de *Byssochlamys*, o que implica em riscos à saúde pública. Dentre estes metabólitos tóxicos destacam-se a patulina, o ácido bissoclâmico e a bissotoxina A. A patulina é uma micotoxina altamente tóxica, teratogênica para embriões de galinha (CIEGLER et alii, 1976) e carcinogênica, podendo inibir as células e a divisão celular (CIEGLER et alii, 1971). LOVETT & PEELER (1973) demonstraram que a patulina é resistente ao tratamento a temperaturas superiores a 125 °C, dentro de uma faixa de pH que varia de 3.5 a 5.5. O tempo necessário para a destruição aumenta com o decréscimo do pH, sendo sua estabilidade maior a pH mais ácidos.

PERCEBOIS et alii (1975) testaram a capacidade de produção de patulina por quatro linhagens de *B. nivea* isoladas de morango, observando que duas apresentaram-se produtoras da toxina. De três linhagens isoladas de morangueiro, duas apresentaram-se positivas

para produção do metabólito. A patulina produzida mostrou-se estável em suco de morango, levando os autores a considerarem sua ocorrência em sucos como fato do interesse das autoridades sanitárias. RICE et alii (1977) verificando a capacidade de produção de patulina por espécies de *Byssochlamys*, observaram sua produção por 3 de 10 linhagens de *B. fulva* e por 3 linhagens de *B. nivea*, todas testadas em uma grande variedade de sucos de frutas, nas condições normalmente encontradas em latas e garrafas. VALLETRISCO et alii (1982) destacam vários trabalhos de pesquisa da ocorrência de patulina em maçãs e sucos de maçã, onde foi detectada, algumas vezes em quantidades elevadas, embora o produto estivesse, aparentemente, em bom estado de conservação.

O ácido bissoclâmico foi extensivamente estudado por KING, et alii (1972) e os resultados indicaram que trata-se de um metabólito altamente tóxico para ratos. Extrapolando os dados para o homem, entretanto, determinaram que, com grande margem de segurança, um indivíduo poderia ingerir, sem problemas, até 50 litros de suco contaminado por dia, considerando-se apenas as consequências da presença da micotoxina. Os mesmos autores observaram ainda que não havia produção de ácido bissoclâmico em latas seladas, considerando pequena a possibilidade de sua ocorrência em latas contaminadas por *B. fulva*. Tais estudos não abordaram, entretanto, as possíveis consequências de exposição do homem ao ácido bissoclâmico por tempo prolongado.

KRAMER et alii (1976) isolaram a byssotoxina A a partir de extratos de *B. fulva* e observaram que a micotoxina mostrava-se moderadamente tóxica à vários sistemas biológicos, incluindo

camarão, embrião de galinha e ratos.

BEUCHAT (1976) considera o fato de espécies de *Byssochlamys* serem micotoxigênicas como um fator adicional de interesse no conhecimento de sua ocorrência e seu crescimento em produtos de frutas.

II.2. OUTROS FUNGOS TERMO-RESISTENTES

Além de espécies de *Byssochlamys*, outros fungos termo-resistentes têm sido incriminados como causadores de deterioração de frutas e seus produtos. Os principais envolvidos são cepas pertencentes aos gêneros *Neosartorya*, *Talaromyces* e *Eupenicillium*. São fungos perfeitos, ou seja, apresentam reprodução sexuada produzindo ascos com oito ascosporos. Os ascos desenvolvem-se no interior de ascocarpos que podem apresentar formas variadas. Uma dessas formas é o cleistotécio, uma membrana rígida que se apresenta envolvendo vários ascos, desenvolvido por *Neosartorya* e *Eupenicillium*. No gênero *Talaromyces*, o ascocarpo apresenta-se na forma de gimnotécio, um emaranhado frouxo de hifas, onde se localizam os ascos. Estes fungos apresentam diferentes gêneros como fase anamorfa, dentre eles destacam-se *Aspergillus* (*Neosartorya*), *Penicillium* (*Eupenicillium* e *Talaromyces*) e *Paecilomyces* (*Talaromyces*) (HOCHING & PITT, 1984).

II.2.1. INCIDÊNCIA

KING et alii (1969) destacam a presença de várias espécies

de fungos termo-resistentes, pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Pullularia*, isolados de suco de uva. Foram também isoladas espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* por MENDOZA et alii (1982), a partir de sucos comerciais pasteurizados. Uma delas foi identificada como *Penicillium citrinum*, também isolado por SWANSON et alii (1985), a partir de amostras retiradas de uma linha de processamento de maçã e sidra. DRAGONI & COMI (1985) isolaram fungos termo-resistentes de sucos de frutas, detectando, além de *Byssochlamys* spp., a presença de *Aspergillus fumigatus* e *Penicillium expansum*.

KAVANAGH et alii (1963) isolaram uma cepa de *Aspergillus* a partir de morango enlatado, tratado a 100 C por 12 minutos, posteriormente identificada como *A. malignus*, em sinonímia com *A. fischeri* var. *spinosus* e *Neosartorya fischeri* var. *spinosa*. CARTWRIGHT & HOCKING (1984) estudando métodos de prevenção de fungos termo-resistentes, detectaram, além de *Byssochlamys* spp., a presença de fungos pertencentes aos gêneros *Eupenicillium*, *Neosartorya* e *Talaromyces*. Há ainda o relato de isolamento de *Neosartorya fischeri* a partir de sucos comerciais (SCOTT & BERNARD, 1987). VAN DER SPUY et alii (1975) isolaram *Penicillium brefeldianum* (em sinonímia com *Eupenicillium javanicum* (STOLK & SAMSON, 1983)) e *Penicillium vermiculatum* (em sinonímia com *Talaromyces flavus* (PITT, 1979)), a partir de suco de maçã pasteurizado por 3 minutos a 88 C. *Talaromyces flavus* foi também isolado de suco de frutas comerciais (SCOTT & BERNARD, 1987) e de suco de abacaxi (KING & HALBROOK, 1987).

SPLITTSTOESSER et alii (1971) num levantamento de fungos termo-resistentes presentes em pomares e vinhedos do estado de

Nova York, isolaram, além de espécies de *Byssochlamys*, espécies de *Penicillium*, como *P. vermiculatum* e *P. ochro-chloron*, espécies de *Aspergillus*, como *A. fischeri* (em sinonímia com *Neosartorya fischeri* (MALLOCH & CAIN, 1972)), *A. fischeri* var. *spinosus* (em sinonímia com *Neosartorya fischeri* var. *spinosa*) e *A. fumigatus* (fase anamorfa de *Neosartorya fischeri* (MALLOCH & CAIN, 1972)) e ainda *Paecilomyces varioti* (fase anamorfa de *Byssochlamys* spp.). Os autores observaram que, considerando a relativa termo-resistência das linhagens de *Aspergillus fumigatus* isoladas, poderia tratar-se de linhagens de *Neosartorya fischeri* que haviam perdido a capacidade de produzir ascos.

FRAVEL & ADAMS (1986) relatam o fato de *Talaromyces flavus* ser usado como antagonista de espécies de *Verticillium* em plantações de batata. Fazendo um levantamento de sua ocorrência, observaram que *T. flavus* parece estar amplamente distribuído na natureza, principalmente em áreas temperadas e sub-tropicais.

II.2.2. ATIVAÇÃO TÉRMICA

SPLITTSTOESSER & SPLITTSTOESSER (1977) estudando ascosporos de *Aspergillus* (*Neosartorya*), observaram que, assim como os ascosporos de *Byssochlamys*, apresentam baixa porcentagem de germinação e produção de colônias, a menos que sejam ativados pelo calor. Em seus estudos, praticamente 99% dos ascosporos encontravam-se dormentes antes da ativação. A seleção do meio de

cultura, utilizado para suspensão de esporos na ativação, foi um fator especialmente importante no caso de *Aspergillus*. A melhor ativação ocorreu em sucó de tomate e de uva, enquanto que grande porcentagem dos ascosporos permaneceu dormente em água, mesmo quando aquecidos por mais de 90 minutos a 80 °C. Os autores concluíram, com base em seus resultados que, a detecção de ascosporos de fungos termo-resistentes em alimentos, quando em pequeno número, pode não ser bem sucedida, caso o material não seja aquecido em um meio que forneça a ativação destes ascosporos.

A ativação térmica também demonstrou-se eficiente para *Talaromyces flavus*, em estudos realizados por KATAN (1985). Os melhores tempos de tratamento encontravam-se entre 15 minutos e 6 horas, com temperaturas ótimas variando entre 53 e 70 °C. O tratamento ótimo foi de 15 minutos a 53 °C, em meio líquido de batata-dextrose, observando-se também que a ativação não interferiu na germinação dos ascosporos não dormentes. Os resultados apresentados por KING & HALBROOK (1987) confirmam a necessidade de ativação dos ascosporos desse fungo, embora os tratamentos indicados nesse caso sejam mais severos, variando de 12 a 15 minutos a 80 °C; 6 a 8 minutos a 85 °C e 1 a 2 minutos a 90 °C.

BEUCHAT (1986) estudou a ativação térmica dos ascosporos de *Talaromyces flavus* e *Neosartorya fischeri* em tampão fosfato (0.1M; pH7.0), observando que, para ambos os fungos, o tratamento requerido variava muito com a linhagem. Encontrou que, para *T. flavus*, os melhores tratamentos de ativação foram 15-30 minutos a 85 °C ou 45-120 minutos a 80 °C. Para *N. fischeri*, a eficiência da

ativação foi a mesma para duas linhagens, quando aquecidas a 70, 75, 80 e 85 °C por 15 minutos. Para uma terceira linhagem, entretanto, houve grande variação entre os resultados a várias temperaturas, sendo considerado ótimo o tratamento de 15 minutos a 85 °C.

Estudando a resistência térmica de linhagens de *Neosartorya fischeri*, em suco de maçã 12.3 Brix, pH 3.8, CONNER & BEUCHAT (1987) observaram que tratamentos de 30 e 60 minutos a 84 °C, ativavam os ascósporos, resultando em um aumento de 10 vezes na população inicial, comparando-se com os ascósporos não aquecidos.

II.2.3. RESISTÊNCIA TÉRMICA

VAN DER SPUY et alii (1975) estudaram a resistência térmica de *Penicillium vermiculatum* e *Penicillium brefeldianum*, em suco de maçã, observando que o tempo para destruição de 10⁶ ascósporos/ml do primeiro foi de 40 minutos a 80 °C, e do segundo foi de 25 minutos à mesma temperatura. Com base nestes dados, concluíram que tais tratamentos seriam suficientes para produzir sabor de cozido ao suco, tornando-o inaceitável ao consumo. No trabalho foi efetuada também uma comparação entre a resistência térmica de cleistotécios íntegros e de ascósporos livres, observando que o valor D a 90 °C para os ascósporos livres de *P. vermiculatum* era de 2 minutos, enquanto que para os cleistotécios íntegros chegava a 200 minutos. No caso de *P.*

brefeldianum, os dados de resistência apresentam uma diferença ainda maior, sendo o valor D a 90°C de 1 minuto para os ascósporos, e de 800 minutos para os cleistotécios. KATAN (1985), entretanto, em pesquisas realizadas com *Talaromyces flavus*, observaram uma rápida destruição de 9 linhagens deste fungo, com inativação de 10⁶ ascósporos em 20 minutos de aquecimento a 80°C.

Os primeiros estudos voltados para a comparação de outros fungos com *Byssosclamyces* spp., considerado o mais resistente, foram realizados por SPLITTSTOESSER & SPLITTSTOESSER (1977) que compararam a resistência térmica de ascósporos de *B. fulva* com ascósporos de *Aspergillus* sp., encontrando vários fatores similares nos dois casos, como a necessidade de choque térmico para ativação dos esporos dormentes, curva de sobreviventes não logarítmica e aumento na resistência térmica em soluções de concentrações crescentes de açúcar. A resistência térmica do *Aspergillus* demonstrou-se comparável à de *Byssosclamyces*, mostrando-se mesmo, em determinadas condições, mais resistente.

BEUCHAT (1986) trabalhando com *Talaromyces flavus*, *Neosartorya fischeri* e *Byssosclamyces* sp., ressaltou que, nos últimos tempos, as deteriorações causadas pelos dois primeiros vêm crescendo na América do Norte, Europa e Austrália. O autor avaliou a resistência térmica desses fungos em tampão fosfato 0.1M e pH 7.0 e em vários produtos de frutas, observando que, de três linhagens de *T. flavus* testadas, duas foram mais resistentes que os demais fungos, tanto em tampão fosfato quanto nos produtos de fruta. Determinou valores D a 91°C, para as duas linhagens mais resistentes de *Talaromyces flavus*, que variaram de 2.9 a 11.7 minutos, sendo que a linhagem menos resistente apresentou

um valor D máximo igual a 2.2 minutos a 79 °C. As linhagens de *N. fischeri* apresentaram entre si, praticamente a mesma resistência, com valor D a 91 °C menor que 2.0 minutos. *Byssoschlamys* spp. não se mostraram muito resistentes, apresentando valores D superiores a 2.0 minutos somente em temperaturas abaixo de 77 °C. Em produtos de morango, o D para *T. flavus* a 91 °C variou de 3.9 a 11.7 minutos e para *N. fischeri* foi menor que 2 minutos, à mesma temperatura.

A maior resistência térmica de *Talaromyces flavus*, em relação à *Neosartorya fischeri*, foi também comprovada por SCOTT & BERNARD (1987) trabalhando com suco de maçã. Observaram que a resistência térmica desses fungos eram comparável a de *B. fulva*, obtendo para *T. flavus* um D igual a 200 minutos a 80 °C, enquanto para *N. fischeri* o valor D encontrado foi de aproximadamente 4.6 minutos a 85 °C.

Em pesquisas realizadas recentemente com *Talaromyces flavus*, KING & HALBROOK (1987) verificaram que o tempo para redução de 3 ciclos logarítmicos na população inicial deste fungo, em meio sintético pH 5.0, variava entre 97 e 236 minutos a 80 °C; 32 a 36 minutos a 85 °C e 5 a 12 minutos a 90 °C. Comparando esses resultados com aqueles obtidos para *B. fulva* por BAYNE & MICHENER (1979), usando o mesmo meio sintético de suspensão para aquecimento dos ascosporos, concluíram que *T. flavus* apresenta-se, de maneira geral, menos resistente que o *B. fulva*, embora resista às temperaturas normalmente aplicadas no processamento térmico do suco, podendo vir a causar deterioração.

CONNER & BEUCHAT (1987) trabalhando com *Neosartorya*

fischeri, observaram que o tipo de meio de cultura utilizado para esporulação não afetava a termo-resistência dos ascosporos. O meio de suspensão para aquecimento dos ascosporos, entretanto, demonstrou interferir na resistência térmica destes ascosporos. Quando uma suspensão com 10^6 ascosporos/ml foi inoculada ao suco de maçã a 12.3 Brix, em pH 3.8, houve sobrevivência após aquecimento de 30 minutos a 90°C , entretanto esta sobrevivência não foi observada quando os ascosporos foram aquecidos em suco de uva a 16.6 Brix, em pH 3.4. Os autores consideraram que este fato indicava que o pH, conteúdo de sólidos solúveis e conteúdo de ácidos orgânicos poderiam influenciar na resistência dos ascosporos a altas temperaturas. Este resultado confirma dados anteriores de BEUCHAT & TOLEDO (1977) trabalhando com *B. nivea*.

CONNER et alii (1987) examinaram duas culturas de *Neosartorya fischeri* var. *glaber* com diferentes idades (11 e 25 dias de incubação), observando que a de 11 dias foi inativada em tampão fosfato 0.1M pH 7.0, com 60 minutos a 82°C , enquanto a de 25 dias foi, na realidade, ativada por esse mesmo tratamento. Feita uma análise química dos ascosporos das duas linhagens, a diferença mais significativa encontrada foi uma variação na composição das proteínas de cada uma, não ocorrendo variações nos tipos de ácidos graxos.

II.2.4. PRODUÇÃO DE METABÓLITOS

NIELSEN et alii (1988) revisaram trabalhos nos quais foram detectadas linhagens de *Neosartorya fischeri* capazes de produzir

micotoxinas como terreína, fumitremorginas A e B e verruculogena. Esses metabólitos fazem parte do grupo de fumitremorginas que agem no sistema nervoso central, causando tremores, convulsões e morte em animais, sendo verruculogena a mais tóxica dentre elas. Os autores, estudando a produção dessas micotoxinas pelo mesmo fungo, em vários meios, 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 do que as demais, seguida de fumitremorgina A e C.

JONES & WILSON (1987) observaram a produção do antibiótico vermiculina por uma cultura de *Talaromyces wortmannii*, iniciando uma avaliação da possibilidade de usar esse fungo e seus metabólitos como antagonistas de *Verticillium albo-atrum*, no solo de plantações.

II.3 CURVA DE SOBREVIVENTES

II.3.1. CURVA DE SOBREVIVENTES NÃO LOGARÍTMICA

A determinação dos parâmetros D e Z é de grande importância em tratamentos térmicos, pois fornecem a base de cálculo para o estabelecimento do tempo e temperatura de aquecimento requeridos para a conservação de produtos processados. O valor Z é o número de graus (°C ou °F) necessários para reduzir o valor de D a 10% do seu valor inicial, e fornece a resistência relativa de microrganismos a diferentes temperaturas (STUMBO, 1973). Esses valores, entretanto, só podem ser calculados no caso da taxa de morte dos microrganismos visados ser constante, ou seja, seguir uma ordem logarítmica de destruição. Nesse caso, quando graficamos o logaritmo do número de sobreviventes/ml ou o logaritmo da % de sobreviventes contra o tempo de aquecimento, o resultado é uma reta (RAHN, 1945).

As curvas apresentadas pelos fungos termo-resistentes, mostram nos estágios iniciais um "ombro" caracterizado pela lenta diminuição do número de sobreviventes, e finalmente um declínio (KING & HALBROOK, 1987). RAHN (1945) relata um trabalho de Smith (1921) em que o autor observou serem as curvas de sobreviventes de esporos de fungos côncavas para baixo, quando a morte é

causada por calor ou desinfetantes. Observou ainda que no caso de *Staphylococcus*, cujas células são dispostas na forma de cachos, a destruição não é uniforme, e só é detectada quando a última célula do cacho é destruída. Assim a destruição deste microrganismo assemelha-se ao comportamento de microrganismos multicelulares, e sua curva de sobreviventes pode ser côncava para baixo.

SPLITTSTOESSER & SPLITTSTOESSER (1977) estudando a resistência térmica de *B. fulva* e *Aspergillus fischeri*, observaram que a curva de sobreviventes não apresentava um comportamento logarítmico, demonstrando ainda que o desvio da linearidade não era devido aos aglomerados de ascosporos nem à ativação de esporos dormentes. Testando o efeito do meio de suspensão para aquecimento dos ascosporos sobre as curvas desenvolvidas, observaram que, sob quaisquer condições utilizadas, não eram curvas logarítmicas.

Devido à impossibilidade do cálculo de D e Z nas condições de não linearidade apresentadas pelas curvas de sobreviventes, KING et alii (1979) estudaram a possibilidade de linearização destas curvas para o caso do *B. fulva*, utilizando o método de ALDERTON & SNELL (1970) que apresenta parâmetros cinéticos de inativação comparáveis a D e Z . Concluíram que os resultados calculados por este método aproximavam-se muito dos dados experimentais obtidos nas temperaturas usadas. O desvio percentual entre o tempo experimental e o tempo calculado pelo método de linearização foi da ordem de -12.5 a 1.1%, sendo o sinal negativo utilizado para indicar quando os tempos calculados

pelo método eram menores que o tempo experimental. Ressaltaram que, a altas temperaturas (87,8 e 90 °C), as curvas parecem lineares por encobrir desvios que são evidenciados a baixas temperaturas.

BAYNE & MICHENER (1979) utilizaram a mesma técnica de linearização trabalhando com várias linhagens de *B. fulva*. Calculando o tempo de aquecimento necessário para redução de 3 ciclos logarítmicos no número inicial de sobreviventes, a 90 °C, obtiveram valores entre 2 e 41 minutos; o tempo experimental nas mesmas condições variava entre 4 e 45 minutos sendo a diferença percentual entre o tempo experimental e o tempo calculado entre -16,7 e 17,9%, apresentando apenas uma linhagem cuja variação atingiu -50,0%. Os autores estimaram valores para 3D a 90 °C, considerando ordem logarítmica de morte, e obtiveram tempos de aquecimento que variavam entre 4 e 36 minutos. Comparando estes valores aos dados experimentais, observaram um desvio percentual de -48,8 a 3,5%, e concluíram que, caso o processo térmico aplicado a um alimento seja calculado com base no valor D, considerando a curva linear, pode-se levar a um erro no dimensionamento do tratamento térmico, com subprocessamento do produto.

KING & HALBROOK (1987) trabalhando com *Talaromyces flavus* que também não apresentava comportamento logarítmico, utilizaram o mesmo método de linearização, concluindo que, assim como ocorre para *B. fulva* e *B. nivea* (KING et alii, 1979; BAYNE & MICHENER, 1979) o método fornece dados de resistência próximos aos experimentais.

II.3.2. MÉTODO DE LINEARIZAÇÃO DE ALDERTON & SNELL (1970)

Para a linearização da curva de sobreviventes, em que o logaritmo do número de sobreviventes (N) é representado contra o tempo de aquecimento (t), é utilizada a seguinte expressão:

$$\left(\log N_0 - \log N \right)^a = kt + C \quad (\text{eq. 1})$$

onde:

N_0 = concentração inicial de ascosporos

N = concentração de sobreviventes (após um tratamento térmico de t minutos).

k = constante de taxa de morte = coeficiente angular da curva linearizada.

C = coeficiente linear da curva linearizada

a = expoente para linearização

Considerando-se que a taxa de destruição segue exatamente esta expressão e que não haja erros experimentais, o valor de C deve ser zero. Deste modo, para o cálculo do expoente "a" a expressão acima é rearranjada da seguinte forma:

$$\begin{aligned} \log \left(\left(\log N_0 - \log N \right)^a \right) &= \log (kt) \\ a \log \left(\log N_0 - \log N \right) &= \log k + \log t \end{aligned}$$

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

Assim, o valor de "a" pode ser obtido pelo inverso da inclinação do gráfico

$$\log (\log N_0 - \log N) \text{ versus } (\log t)$$

Quando são estabelecidas curvas de sobreviventes a diferentes temperaturas, o expoente "a" é calculado com os dados do tratamento à menor temperatura. O valor de "a", obtido através do tratamento menos severo, poderá ser utilizado para a linearização das curvas dos tratamentos mais severos.

Esse método fornece parâmetros comparáveis aos valores D e Z, obtidos através de curvas logarítmicas. Da equação 1, considerando-se $C = 0$, podemos comparar as equações de k e D, com o seguinte resultado:

$$\frac{1}{k} = \frac{t}{(\log N_0 - \log N)^a} \quad (\text{eq.2})$$

A partir da equação da curva de sobreviventes linear, tem-se:

$$D = \frac{t}{(\log N_0 - \log N)} \quad (\text{eq.3})$$

O valor de $-(\log k)$, representado contra temperatura,

pode fornecer um parâmetro comparável a Z^* , denominado Z^* , calculado pelo negativo do inverso da inclinação desta curva. A curva de linearização com $a=1$ é uma curva logarítmica a partir da qual o valor D pode ser calculado (KING et alii, 1979).

II.4. PREVENÇÃO DA DETERIORAÇÃO DE PRODUTOS DE FRUTAS POR FUNGOS TERMO-RESISTENTES

Considerando-se as qualidades sensoriais e nutricionais requeridas pelos produtos de frutas e a alta resistência térmica dos ascosporos de fungos termo-resistentes, que podem estar presentes na matéria-prima utilizada no processamento desses produtos, não é viável a utilização exclusiva de processos térmicos na eliminação dos ascosporos. É necessário que se faça um trabalho de prevenção da contaminação (BEUCHAT, 1986), prevenção do desenvolvimento ou ainda da destruição dos ascosporos com ajuda de técnicas que propiciem a sensibilização destes ao calor (BEUCHAT, 1976).

II.4.1. SELEÇÃO DAS FRUTAS

A prevenção da contaminação por ascosporos de fungos termo-resistentes implica em um rigoroso processo de seleção das frutas desde a colheita até o processamento (PUT et alii, 1968; CARTWRIGHT & HOCKING, 1984; HOCKING & PITT, 1984; BEUCHAT, 1986). O problema da aplicação deste método nas indústrias que processam

suco de morango é que a polpa, utilizada como matéria prima, é, normalmente, comercializada congelada, sendo que os fabricantes não têm controle sobre o procedimento das frutas.

II.4.2. TRATAMENTO QUÍMICO

O efeito fungistático dos conservantes dióxido de enxofre (SO_2), benzoato de sódio e sorbato de potássio têm sido estudado como forma de prevenir o desenvolvimento dos esporos de fungos termo-resistentes presentes nos produtos de frutas. O uso de conservantes, entretanto, é limitado pelas alterações que podem causar no sabor, pelo preço e, principalmente, pela toxidez quando empregados em alimentos.

O SO_2 foi considerado o conservante mais eficiente na prevenção do crescimento de ascosporos de *Byssochlamys fulva* (KING et alii, 1969) e *Byssochlamys nivea* (BEUCHAT, 1976). Sua utilização em sucos de frutas, entretanto, é assunto muito controvertido nos Estados Unidos e Europa e também no Brasil, devido à sua elevada toxidez (COUTINHO, 1987), havendo ainda a desvantagem de seu uso em suco de morango, pois reage com a antocianina da fruta, provocando a sua descoloração (ANTUNES & CANHOS).

O benzoato de sódio apresenta maior atividade antimicrobiana na faixa de pH de 2.5 a 4.0, atuando contra leveduras, fungos filamentosos e bactérias. Não é normalmente indicado contra bactérias, devido à sua decrescente atividade em pH acima de 4.0. Esta atividade está relacionada com a

concentração do ácido não dissociado, que o torna mais indicado para uso em sucos, devido ao baixo pH desses produtos. É considerado GRAS ("generally recognized as safe") pela F.D.A., ("Food and Drug Administration") quando usado até o limite de 0,1% (ROBACH, 1980). Tem a vantagem de ser solúvel, inodoro e incolor, e a desvantagem de possuir um sabor levemente adocicado e adstringente (DZIEZAK, 1986). TAYLOR et alii (1986) relatam pesquisas que sugerem que este conservante, assim como o sulfito, podem provocar reações asmáticas. No Brasil, a legislação permite sua utilização em sucos de frutas até um limite de 1000 ppm (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1988).

O sorbato de potássio é altamente solúvel e normalmente utilizado em sucos de frutas (DZIEZAK, 1986; ROBACH, 1980). Apresenta um sabor neutro, em contraste com o benzoato que pode alterar o sabor do produto. É um ácido graxo de cadeia curta, metabolizado pelo organismo a CO_2 e água, não possuindo grau de toxidez (ROBACH, 1980). Tem-se demonstrado eficiente na inibição do crescimento de leveduras, fungos filamentosos e algumas bactérias. Sua atividade contra bactérias, entretanto, não é tão abrangente quanto para fungos filamentosos e leveduras (SOFOS & BUSTA, 1981). É considerado GRAS pela F.D.A. (DZIEZAK, 1986; ROBACH, 1980) e no Brasil é permitido em sucos de frutas até a concentração de 1000 ppm (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1988).

KING et alii (1969) avaliaram o efeito de conservantes no desenvolvimento de ascos de *Byssoschlamys fulva*, constatando que, após inocular 2×10^2 ascos por placa de Ágar Batata-Dextrose (B.D.A.) contendo 500ppm de sorbato de potássio ou 1000ppm de

benzoato de sódio, não havia crescimento de fungos. Várias concentrações dos dois conservantes foram então adicionadas ao suco de uva diluído e pasteurizado, com resultados que demonstraram que o crescimento de fungos foi prevenido com 250ppm de benzoato de sódio ou sorbato de potássio, por até 16 dias à temperatura ambiente.

Concentrações destes conservantes, bem superiores às utilizadas por KING et alii (1969) foram necessárias para inibir o crescimento de *Byssochlamys nivea*, em experimentos realizados por BEUCHAT (1976). O autor estudou o efeito dos conservantes sobre a germinação dos ascósporos ativados de *B. nivea* em suco de uva, armazenado a 30 °C por 60 dias. Observou que o benzoato de sódio foi o menos efetivo e, para completa inibição dos ascósporos, era necessário 400 ppm de sorbato de potássio e concentrações acima de 1000ppm de benzoato de sódio.

O requerimento de altas concentrações de benzoato de sódio para inibição de ascósporos de *B. nivea* em suco de morango, também foi estabelecido por PUT et alii (1968). A partir de 500ppm de ácido benzóico, foi observada apenas uma repressão parcial da germinação destes ascósporos, sendo que, com 1000ppm a inibição foi total.

KING & HALBROOK (1987) avaliaram o efeito dos conservantes sobre os ascósporos de *Talaromyces flavus*, em Ágar Extrato de Malte (M.E.A. pH 5.4) e B.D.A. (pH 3.5) adicionados de benzoato de sódio e sorbato de potássio. Concluíram que os conservantes foram mais efetivos no controle do crescimento, quando presentes em B.D.A. (pH 3.5) em concentrações acima de 100 ppm.

II.4.3. TRATAMENTO TERMOQUÍMICO

Enquanto vários estudos têm sido conduzidos para determinar a ação fungistática de conservantes como benzoato de sódio e sorbato de potássio, relativamente pouca atenção tem sido dada à possibilidade dos microrganismos poderem ser expostos, simultaneamente, ao calor e aos conservantes (BEUCHAT, 1981b). Esta seria uma forma de aumentar o efeito dos conservantes (SHIBASAKI & TSUCHIDO, 1973), devido ao efeito sinérgico, com possibilidade de uma consequente redução do tempo/temperatura de pasteurização requerido por certos produtos ácidos, mesmo os que contenham altos teores de sacarose, aumentando a possibilidade de manter as qualidades sensoriais e nutricionais do produto (BEUCHAT, 1981b).

BEUCHAT (1976) estudou o efeito sinérgico da aplicação de calor (70 °C por 1 hora), combinado com a adição de sorbato de potássio ou benzoato de sódio, sobre os ascósporos de *B. nivea*, em suco de uva. Os resultados demonstraram que concentrações de 50 e 100ppm de sorbato de potássio parecem ter um efeito estimulante da ativação dos ascósporos de *B. nivea*, enquanto concentrações maiores apresentam um efeito inibitório, sendo que 1000ppm do conservante resultou em uma redução de 1.7 ciclos logarítmicos na população. O benzoato de sódio foi mais efetivo na destruição que o sorbato de potássio, promovendo uma redução de 2.5 ciclos logarítmicos à concentração de 1000ppm.

BEUCHAT (1981a), entretanto, não observou diferença entre

a ação dos conservantes sorbato de potássio e benzoato de sódio sobre os ascosporos de *B. nivea*, quando adicionados a tampão fosfato pH 4.5 e aquecidos a 80 °C. Os conservantes reduziram o valor D, porém não apresentaram efeito diferenciado entre eles, quando usados na mesma concentração. Em experimento adicional com conservantes, em presença de sacarose, sob aquecimento, observaram que o efeito sinérgico de conservantes/calor parece ser retardado pelo aumento da concentração da sacarose.

BEUCHAT (1988) estudou o efeito do acidulante ácido fumárico como sensibilizador de ascosporos de *Talaromyces flavus*, comparando-o à ação dos conservantes benzoato de sódio e sorbato de potássio, sob aquecimento a 80 °C. Observou que o ácido fumárico foi mais efetivo do que os outros dois na sensibilização dos esporos. Em solução 0.5% de ácido fumárico, com pH entre 2.5 a 3.0, os ascosporos foram inativados após 20 minutos de aquecimento. Para obtenção do mesmo resultado com ácido sórbico ou benzoico, foram necessárias concentrações de 1%, nas mesmas condições. No mesmo trabalho foi também determinado o efeito de sorbato e benzoato sobre a viabilidade dos ascosporos de 2 linhagens de *Talaromyces flavus*, presentes em um derivado de frutas ("blueberry"). Sob aquecimento a 75 e 85 °C, observou-se uma redução na resistência térmica destas linhagens, sendo o benzoato mais efetivo do que o sorbato. A inativação dos ascosporos da linhagem menos resistente ocorreu com 60 minutos de aquecimento a 75 °C, em presença de 1000ppm de benzoato. Nenhum dos conservantes foi capaz de inativar a segunda linhagem, mesmo sob aquecimento a 85 °C.

O efeito sensibilizador do ácido fumárico também foi

observado por SPLITTSTOESSER & SPLITTSTOESSER (1977) quando estudavam o efeito de vários ácidos orgânicos sobre ascosporos de *B. fulva*, aquecidos a 85 C por 120 minutos. Observaram que o aquecimento em presença de ácido acético, succínico, láctico e fumárico, aumentava a sensibilidade dos ascosporos, sendo o último mais efetivo. Foi observado ainda um efeito protetor dos ácidos tartárico e málico sobre os ascosporos de *B. fulva*. Para *Aspergillus* (*Neosartorya fischeri*), não foram observadas alterações no número de sobreviventes, quando do aquecimento de seus ascosporos em soluções 0.05M dos ácidos cítrico, fumárico, málico e tartárico, pH 3.5. Os resultados indicaram que a resistência dos ascosporos de *Aspergillus* não variou em presença destes ácidos, ao contrário do ocorrido com *B. fulva*.

Em contraste com os resultados de SPLITTSTOESSER & SPLITTSTOESSER (1977) dados obtidos por CONNER & BEUCHAT (1987) mostraram que os ácidos fumárico, cítrico, acético e tartárico aumentam a inativação térmica dos ascosporos de *Neosartorya fischeri* aquecidos a 82 C. O ácido fumárico em solução 0.5% (p/v) e pH 3.0 mostrou-se o mais eficiente, observando-se ainda que a ação sinérgica dos ácidos orgânicos com o calor varia com o pH, com o tipo de ácido e com a quantidade adicionada ao meio de aquecimento.

III- MATERIAL E MÉTODOS

III.1. CONTAGEM, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO

III.1.1. MATÉRIA-PRIMA

Para o isolamento de fungos filamentosos termo-resistentes, foram utilizadas como matéria-prima, 15 amostras de polpa de morango (4 resfriadas e 11 congeladas), produzidas com morangos de várias fontes, escolhidas aleatoriamente. As amostras foram obtidas de um fornecedor de polpa de frutas de Jundiaí, S.P., sendo que as congeladas estavam embaladas em sacos plásticos contendo 10Kg, forma como esta matéria-prima é habitualmente comercializada. As resfriadas eram coletadas diretamente da despulpadeira em frascos de vidro estéreis e mantidas sob resfriamento para o transporte até o laboratório.

III.1.2. CONTAGEM E ISOLAMENTO

Antes do isolamento de fungos filamentosos termo-

resistentes, a matéria-prima foi submetida a um choque térmico com a finalidade de destruir as formas termosensíveis e ativar os esporos presentes (BEUCHAT, 1986). Cem gramas de polpa de morango foram colocados em erlenmeyer estéril de 250ml, aquecidos por 2 horas a 70 °C, e imediatamente resfriados em banho de gelo.

Foram preparadas diluições decimais sucessivas, em água estéril, a partir de 10ml de polpa resfriada e a seguir 10ml da amostra e 10ml das diluições 10^{-1} e 10^{-2} foram plaqueadas em profundidade, em triplicata, em meio de Ágar Batata- Dextrose (B.D.A.) preparado com 3% de agar e adicionado de 1% de solução do corante rosa de bengala. O corante foi adicionado para evitar o espalhamento das colônias, e para permitir a contagem sem afetar a germinação dos esporos. As placas foram incubadas a 30 °C por 5 a 7 dias, após o que observou-se o desenvolvimento de colônias que foram contadas e isoladas em tubo de ensaio com meio B.D.A. inclinado. As culturas foram numeradas de acordo com a sequência de isolamento, dentro de cada amostra. Este método segue recomendações de SPLITTSTOESSER (1976).

III.1.3. IDENTIFICAÇÃO

A identificação foi feita a partir da observação macroscópica e microscópica dos fungos filamentosos isolados. A análise macroscópica, foi baseada nas descrições das colônias nos meios Ágar Czapeck, B.D.A. e Ágar Extrato de Malte (M.E.A.). A observação microscópica baseou-se na análise da morfologia do fungo após cultivo em lâmina (RIDDELL, 1950), com três tempos

de incubação diferentes (aproximadamente 3, 7 e 15 dias), para observação de diferentes fases de crescimento. Com a finalidade de preservar ao máximo as estruturas de interesse, utilizou-se lâminas preparadas com pequenos cortes de colônias desenvolvidas em placa, corados com Azul de Amann e recobertos com lamínula.

Os principais fungos termo-resistentes, citados na literatura como deterioradores de alimentos, são ascomicetos pertencentes à classe dos Plectomicetos, cuja taxonomia é estabelecida basicamente na observação microscópica da presença e características dos ascocarpos, ascos e ascosporos, bem como na identificação da fase anamorfa. A identificação baseou-se nas chaves de identificação e características dos fungos citadas principalmente na seguinte literatura: AINSWORTH et alii (1973); BEUCHAT & RICE (1979); BROWN & SMITH (1957); DOMSCH et alii (1980); HOCKING & PITT (1984); PITT (1979); RAPER & FENNELL (1977); SAMSON (1974); SCOTT (1968); STOLK & SAMSON (1972); STOLK & SAMSON (1983).

Após a identificação, as culturas foram agrupadas por gêneros e espécies e armazenadas à temperatura de 4 °C em tubos de ensaio com meio B.D.A. inclinado.

III.2. SELEÇÃO DAS CULTURAS

Para o estudo da resistência térmica foi selecionada uma cepa de cada gênero de fungo perfeito isolado. Estes fungos apresentam estruturas (ascos e ascosporos) que concedem-lhe

resistência térmica reconhecidamente superior às formas imperfeitas normalmente encontradas (SCOTT & BERNARD, 1987; SPLITTSTOESSER et alii, 1971; VAN DER SPUY et alii, 1975).

As espécies foram escolhidas de acordo com a frequência com que têm sido citadas, na literatura, como deterioradoras de sucos e outros produtos pasteurizados de frutas (HOCKING & PITT, 1984; SCOTT & BERNARD, 1987; KING et alii, 1969; BEUCHAT & TOLEDO, 1977; KAVANAGH et alii, 1963; KING & HALBROOK, 1987; BEUCHAT, 1986).

As espécies selecionadas para avaliação da resistência térmica, de acordo com os critérios acima são apresentadas no Quadro 1.

=====

QUADRO 1- CULTURAS SELECIONADAS PARA O TESTE DE RESISTÊNCIA

TÉRMICA

=====

ESPÉCIE	AMOSTRA		CULTURA	
	(No)*	-	(No)**	
Byssochlamys nivea	4	-	1	
Talaromyces flavus var. flavus	2	-	5	
Neosartorya fischeri	14	-	2	
Eupenicillium javanicum var. javanicum	15	-	2	

=====

* número da amostra de origem da cultura isolada

** numeração dada à cultura de acordo com a sequência de isolamento, dentro de cada amostra

III.3 PRODUÇÃO DE ASCOSPOROS

Para o cálculo de resistência térmica, foi necessária prévia produção de ascosporos, que são as estruturas termo-resistentes destes fungos.

Foram preparadas suspensões dos fungos, adicionando aproximadamente 5ml de água estéril a cada tubo de cultura, seguido de agitação manual, para melhor retirada do material da superfície do ágar. A seguir, porções de 1ml de cada suspensão foram inoculadas em 20 garrafas contendo 60ml de meio de cultura inclinado, sendo utilizado para cada fungo, o meio que forneceu as melhores condições de esporulação (Quadro 2). As garrafas foram incubadas a 30 °C durante 4 a 6 semanas baseado nas recomendações de BAYNE & MICHENER (1979); KING et alii (1969); SCOTT & BERNARD (1987).

QUADRO 2- CONDIÇÕES UTILIZADAS PARA A ESPORULAÇÃO DOS FUNGOS

FUNGO	MEIO	pH	TEMPO DE INCUBAÇÃO
B. nivea	B.D.A.	5.6	6 SEMANAS
N. fischeri	B.D.A.	5.6	4 SEMANAS
T. flavus var. flavus	M.E.A.	5.5	5 SEMANAS
E. javanicum var. javanicum	B.D.A.	5.6	5 SEMANAS

Para uma boa esporulação de *Talaromyces flavus* e *Eupenicillium javanicum*, foi necessária uma ativação prévia da suspensão utilizada para a inoculação das garrafas. *T. flavus* foi submetido a aquecimento por 10 minutos a 80 °C e *E. javanicum* por 5 minutos a 80 °C. As suspensões de *Byssosclamyces nivea* e *Neosartorya fischeri* foram inoculadas diretamente nas garrafas, sem prévio aquecimento, pois esporularam satisfatoriamente com este método.

A observação da presença de ascosporos e ascos foi feita através de exame macroscópico, uma vez que a cultura torna-se arenosa quando há predominância destas estruturas, e de exame microscópico de lâminas preparadas com o material das garrafas, utilizando os mesmos métodos descritos para identificação (item III.1.3)

III.3.1. COLETA DOS ASCOSPOROS

A coleta dos ascosporos da superfície do meio, foi feita pela adição de pérolas de vidro e 15ml de água estéril a cada garrafa, seguido de agitação manual. A suspensão foi filtrada através de várias camadas de gaze estéril e centrifugada a 5000rpm por 15 minutos. Para completar a limpeza foram efetuadas duas centrifugações com água estéril; o precipitado foi ressuspensionado em um volume de água estéril suficiente para obtenção de uma contagem final entre 10^6 e 10^7 ascosporos/ml.

No caso de *Neosartorya fischeri*, *Eupenicillium javanicum* e *Talaromyces flavus*, o processo utilizado para a limpeza da suspensão foi suficiente para liberar os ascosporos dos ascos. Para *Byssochlamys nivea*, entretanto, a suspensão resultante da limpeza apresentou-se quase que totalmente composta por ascos inteiros, sendo então testados diversos métodos para ruptura dos ascos e liberação dos ascosporos. Os métodos utilizados foram: ultra-som com e sem pérolas de vidro, homogeneizador, agitação com pérolas de vidro e aquecimento sub-letal (MICHENER & KING, 1974; KING et alii, 1969). Nenhum destes métodos, entretanto, obteve sucesso na ruptura dos ascos, além de não apresentarem reprodutibilidade nos resultados. Tal fato demonstra uma alta resistência física da membrana do asco, levando a crer que, dificilmente, os ascos sejam quebrados no pré-processamento de frutas. Consequentemente, é provável que um suco contaminado por este fungo, antes do processamento, irá conter ascos inteiros e baixo número de ascosporos livres. Pesquisas anteriores também relatam problemas na quebra dos ascos para liberação dos ascosporos (MICHENER & KING, 1974; KING et alii, 1969). Com base nestes dados, para determinação da resistência térmica de *B. nivea*, foi utilizada, neste trabalho, uma suspensão contendo ascos inteiros e não ascosporos, como para os demais fungos.

III.3.2. ATIVAÇÃO DOS ASCOSPOROS

Para a determinação do melhor choque térmico para ativação

dos ascosporos, foram construídas curvas de ativação térmica usando suco de morango como meio de aquecimento. O tratamento ótimo assim determinado foi utilizado, posteriormente, na ativação da suspensão de esporos utilizada nos testes de determinação da resistência térmica.

O método utilizado para construção destas curvas foi o método de tubos TDT- Thermal Death Time, desenvolvido por Bigelow & Esty (1920) e citado por STUMBO (1973). Foi adicionada 0.2ml de suspensão de ascosporos a 1.8ml de suco de morango previamente esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121 °C, e distribuído em tubos TDT estéreis. Os tubos foram selados em maçarico e submetidos ao calor em banho de óleo, que já estava com a temperatura requerida para o teste previamente estabilizada. Após o tempo necessário ao choque térmico, os tubos foram imediatamente resfriados em banho de gelo. O tempo necessário para que o tubo atingisse o equilíbrio térmico foi calculado previamente, por acompanhamento em registrador digital, e acrescentado ao tempo total de aquecimento. Abertos os tubos com diamante, as amostras foram diluídas e plaqueadas em duplicata, em profundidade, em meio B.D.A. adicionado de 1% da solução de rosa de bengala. As placas foram incubadas a 30 °C e as contagens foram realizadas após um período de incubação de 2 a 7 dias.

III.4. AVALIAÇÃO DA DETERIORAÇÃO DO SUCO DE MORANGO PELAS CULTURAS SELECIONADAS

Com a finalidade de observar se as culturas termo-resistentes selecionadas eram capazes de desenvolver-se e causar deterioração do suco de morango, este foi inoculado com uma suspensão de cada fungo.

Preparou-se suspensões com concentração entre 10^4 e 10^5 ascosporos/ml, que foram ativadas, com um tratamento baseado nos dados do item III.3.2., quantificadas e adicionadas ao suco contido em tubo de ensaio, na proporção de 1ml de suspensão para 9ml de suco, para cada fungo, separadamente. O teste foi realizado em duplicata, com dois tubos adicionados de uma camada estéril de Vaspar e dois sem a adição de Vaspar, para cada espécie. Para distinção das alterações ocorridas no suco, não provocadas pelos fungos, foi preparado um tubo controle, ao qual adicionou-se água estéril em lugar da suspensão de esporos.

Os tubos foram incubados durante 6 semanas a 30°C , e observados periodicamente para acompanhamento do desenvolvimento de colônias, alterações de cor e produção de gás nos tubos fechados. Foi observada, ainda, a ocorrência de precipitação e variação na altura do precipitado, que pudessem indicar a presença de enzimas pectinolíticas, produzidas pelos fungos. No final do período de incubação mediu-se adicionalmente o valor do pH do suco.

III.5. DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA TÉRMICA

Para a determinação da resistência térmica, foram construídas curvas de sobreviventes a várias temperaturas, selecionadas de acordo com cada espécie. Utilizou-se, inicialmente, o método de tubos TDT mas, como este não forneceu resultados reprodutíveis, optou-se pelo método do frasco de três bocas. Os testes foram realizados em duplicata e foi estabelecida previamente a população inicial de ascosporos ativados presentes na suspensão, antes do início de cada teste.

Quando as curvas de sobreviventes 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 e Z.

Para determinação da dependência da taxa de reação com a temperatura foi calculado, além de Z^* (equivalente a Z pelo método de ALDERTON & SNELL, 1970) o valor da energia de ativação (Ea), baseado na relação estabelecida por Arrhenius:

$$k = S \exp (-Ea/RT) \quad (\text{equação 4})$$

onde:

k = constante da taxa de reação (min^{-1})

S = constante, fator de frequência (min^{-1})

Ea = Energia de ativação (cal/mol)

R = constante universal dos gases (1.987 cal/K mol)

T = temperatura absoluta (K)

A E_a foi determinada pela curva de $\ln k$ versus $1/T$ (K), cuja inclinação é igual a $-E_a/R$.

Os métodos utilizados são apresentados a seguir.

III.5.1. MÉTODO DE TUBOS TDT

O método utilizado foi o mesmo descrito no item III.3.2., para ativação. A suspensão, previamente distribuída nos tubos TDT com suco de morango, foi ativada, com o tratamento anteriormente estabelecido, e imediatamente resfriada. Seguiu-se o aquecimento, em banho de óleo com temperatura previamente estabilizada e, após os tempos requeridos, as amostras foram resfriadas, diluídas e plaqueadas em duplicata, em profundidade, em meio B.D.A., adicionado de 1% da solução de rosa de bengala.

III.5.2. MÉTODO DO FRASCO DE TRÊS BOCAS

O trabalho foi conduzido com base na metodologia desenvolvida por Levine (1920), e descrita por STUMBO (1973).

Foi utilizado um balão de três bocas (2000ml), com entrada para termômetro, agitador e amostras, contendo 782ml de suco de morango estéril e suspensão de esporos, previamente ativada. Para

ativação, foi colocado 8ml da suspensão em um tubo de ensaio com 10ml de suco de morango estéril, sendo o choque térmico aplicado de acordo com os resultados do item III.3.2. A alteração na proporção entre suspensão de ascosporos e suco de morango utilizado na ativação, não produziu resultados diferentes o suficiente para justificar nova curva de ativação, de forma que foi utilizado o mesmo tratamento previamente estabelecido. Esta suspensão foi adicionada ao balão após o suco atingir a temperatura requerida para o experimento. Imediatamente, foi retirado 1ml de amostra para a contagem inicial, seguindo-se então a marcação de tempo para as amostras periódicas subsequentes. Os tempos e temperaturas de amostragem utilizados na determinação da resistência térmica de cada uma das cepas testadas encontram-se indicados no Quadro 3.

Para a contagem de sobreviventes, as amostras foram imediatamente resfriadas, diluídas e plaqueadas em duplicata, por profundidade em B.D.A. adicionado de 1% de solução de rosa de bengala. As placas foram incubadas a 30^o C e as contagens realizadas após um período de incubação de 2 a 7 dias.

III.5.3. TRATAMENTO TERMOQUÍMICO

Para determinação da influência dos conservantes sorbato de potássio e benzoato de sódio, sob aquecimento, na sensibilização dos esporos, foi utilizado o fungo mais resistente, baseados no resultado do item III.5.2. A temperatura

=====

QUADRO 3- TEMPERATURAS E TEMPOS DE AQUECIMENTO UTILIZADOS NA
DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA TÉRMICA DAS CEPAS SELECIONADAS

=====

ESPÉCIE	TEMP. (° C)	TEMPO (MINUTOS)
=====		
^a		
B. nivea	80	0, 80, 170, 260, 350, 440, 710, 800, 890, 980, 1070, 1160
	85	0, 30, 60, 80, 100, 120, 140
	90	0, 5, 20, 25, 30
	93	0, 2, 4, 6, 8

^b		
N. fischeri	80	0, 50, 140, 230, 290, 350, 410
	85	0, 20, 40, 60, 90
	90	0, 3, 5, 6, 8, 10
	93	0, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0

^c		
E. javanicum	80	0, 20, 40, 60
	85	0, 4, 8, 12
	90	0, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0

^a		
T. flavus	75	0, 10, 60, 120, 240
	80	0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 80
	85	0, 5, 10, 15
	90	0, 1, 2, 3, 4
=====		

- ^o
a- ativado a 80 C por 5 minutos
- ^o
b- ativado a 80 C por 10 minutos
- ^o
c- ativado a 70 C por 5 minutos

de aquecimento foi de 85 C^o, para avaliar a eficiência dos conservantes a uma temperatura inferior a 90 C^o, como sugere PUT & KRUISWIJK (1964) e verificar a viabilidade de sua utilização no processamento industrial de suco de morango.

Para este teste foi utilizado o método do frasco de três bocas. Os conservantes foram adicionados ao suco após a estabilização da temperatura, seguindo-se a imediata inoculação da suspensão ativada de esporos. Os tempos de amostragem utilizados foram 0, 30, 60, 80, 100 e 120 minutos. A contagem de sobreviventes, após cada amostragem periódica, foi feita por plaqueamento em profundidade em meio B.D.A. adicionado de 1% da solução de rosa de bengala, seguido de incubação a 30 C^o por 2 a 7 dias.

As concentrações finais de conservantes utilizadas são apresentadas no Quadro 4.

=====

QUADRO 4- CONCENTRAÇÕES FINAIS DE CONSERVANTES ADICIONADAS AO SUCO NA AVALIAÇÃO DOS TRATAMENTOS TERMOQUÍMICOS

=====

TRATAMENTO	SORBATO DE POTÁSSIO	BENZOATO DE SÓDIO
	(ppm)	(ppm)
1	1000	---
2	---	1000
3	500	500
4	200	800

=====

IV- RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1- CONTAGEM, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS TERMO-RESISTENTES

O resultado da contagem de fungos filamentosos termo-resistentes nas amostras examinadas encontra-se no Quadro 5. Observou-se uma baixa concentração de esporos destes fungos em todas as amostras examinadas, o que confirmou relatos anteriores (SPLITTSTOESSER et alii, 1971; PUT, 1964). A baixa concentração de esporos justificou o plaqueamento em triplicata e a utilização de 10ml de inóculo por placa, para isolamento de fungos termo-resistentes.

Foram isoladas 58 culturas de fungos termo-resistentes à partir das 15 amostras de polpa de morango. O resultado da identificação das cepas isoladas é apresentado nos Quadros 6 e 7 para fungos perfeitos e imperfeitos, respectivamente. Como pode ser observado no Quadro 6, foram isolados os quatro gêneros de fungos perfeitos (*Byssoschlamys*, *Neosartorya*, *Talaromyces* e *Eupenicillium*) citados com maior frequência na literatura, como deterioradores de produtos de fruta pasteurizados (HOCKING &

=====

QUADRO 5- CONTAGEM DE FUNGOS TERMO-RESISTENTES NAS AMOSTRAS DE

POLPA DE MORANGO EXAMINADAS

=====

NUMERO DA AMOSTRA	CONTAGEM (UFC*/g)	NUMERO DA AMOSTRA	CONTAGEM (UFC/g)
1**	1.0	9**	1.0
2	1.0	10	<1.0
3	<1.0	11	<1.0
4**	1.0	12**	1.0
5	<1.0	13	1.0
6	<1.0	14	<1.0
7	10.0	15	3.0
8	1.0		

=====

* unidades formadoras de colônias

** resfriadas

PITT, 1984).

No Quadro 8 as cepas foram agrupadas por gênero e é apresentado o número de amostras em que estes gêneros estiveram presentes, bem como a frequência de isolamento em relação ao número total de amostras. Pode-se observar que 20, das 58 cepas de fungos termo-resistentes isoladas, pertencem ao gênero *Eupenicillium*. Os isolados deste gênero estiveram presentes em 8 das 15 amostras de polpa de morango examinadas, número superior aos apresentados por outros gêneros. Observou-se, entretanto, (Quadro 6) que 13 destas culturas foram retiradas de uma única amostra (amostra 15), que apresentou maior grau de contaminação por espécies de *Eupenicillium* do que as demais amostras.

Pode ser observado ainda, pelo Quadro 8, que o segundo gênero mais prevalente foi *Talaromyces*, presente em 6 diferentes amostras. O resultado de grau de incidência deste fungo confirmam os relatos de FRAVEL & ADAMS (1986) que observaram que

=====

QUADRO 6-IDENTIFICAÇÃO DAS CULTURAS DE FUNGOS PERFEITOS ISOLADOS
DE POLPA DE MORANGO, APÓS TRATAMENTO TERMICO DE 70 C
POR 2 HORAS

=====

NÚM.	NÚM.	NÚM.	NÚM.	ESPECIE	NÚM.
a	b				c
AMOST	CULT	AMOST	CULT		REGIS
4	-	1		Byssoclhamys nivea Westling	2965
4	-	2			
4	-	3			
13	-	2			
12	-	1		Neosartorya fischeri (Wehmer)	2967
14	-	2		Malloch & Chain	
2	-	5		Talaromyces flavus (Klocker)	2962
6	-	1			
7	-	1		Stolk & Samson var. flavus	
3	-	3		Talaromyces trachyspermus	2964
11	-	1		(Shear) Stolk & Samson	
15	-	15		Talaromyces wortminnii	3055
				C.R. Benjamin	
11	-	2		Talaromyces sp.	
2	-	2	15	-	3
2	-	4	15	-	4
4	-	4	15	-	5
10	-	1	15	-	6
13	-	3	15	-	7
13	-	4	15	-	9
13	-	6	15	-	10
13	-	7	15	-	11
15	-	1	15	-	12
15	-	2			
9	-	2			
9	-	3		Eupenicillium euglaucum	3056
12	-	3		(van Beyna) Stolk & Samson	
13	-	5			
14	-	1			
2	-	1	13	-	1
2	-	6	15	-	8
2	-	7	15	-	13
				Eupenicillium sp.	

=====

a- número da amostra de origem da cultura isolada

b- número da cultura referente à amostra

c- número de registro da cultura no acervo da micoteca URM-
(UFPE- Dept. de Micologia)

=====

QUADRO 7- IDENTIFICAÇÃO DE CULTURAS DE FUNGOS IMPERFEITOS

ISOLADOS DE POLPA DE MORANGO, APÓS TRATAMENTO TÉRMICO

DE 70 °C POR 2 HORAS

=====

NUM.		NUM.	ESPECIE	NUM.
a	-	b		c
AMOST		CULT		REGIST
1	-	1	<i>Paecilomyces penicillatus</i> (Huhnel) Samson	3057
3	-	1	<i>Paecilomyces varioti</i> Bainier	2966
3	-	2		
12	-	2		
1	-	2	<i>Paecilomyces lilacinus</i> (Thom) Samson	3058
8	-	1	<i>Penicillium chermesium</i> Biourge	
9	-	1	<i>Penicillium citrinum</i> Thom	2968
9	-	4		
14	-	3	<i>Penicillium</i> sp.	
15	-	14		
2	-	3	<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresenius	2969
7	-	2		
7	-	4		
7	-	3	<i>Mycelia sterilia</i>	
12	-	4		

=====

a- número da amostra de origem da cultura isolada

b- número da cultura referente à amostra

c- número de registro da cultura no acervo da micoteca URM-
(UFPE- Depto. de Micologia)

=====

QUADRO 8- NÚMERO TOTAL DE CEPAS IDENTIFICADAS EM CADA GÊNERO E
NÚMERO DE AMOSTRAS DE POLPA DE MORANGO DE ONDE FORAM
ISOLADAS

=====

GÊNERO	NÚMERO DE CEPAS	NÚMERO DE AMOSTRAS	FREQUÊNCIA DE ISOLAMENTO (%)*
Byssochlamys	4	2	13.3
Neosartorya	2	2	13.3
Talaromyces	7	6	40.0
Eupenicillium	30	8	53.3
Paecilomyces	5	3	20.0
Penicillium	5	4	26.7
Aspergillus	3	2	13.3

=====

* em relação ao número total de amostras

Talaromyces flavus estava amplamente distribuido na natureza.

No item IV.1.1. são descritas as características que levaram à identificação das cepas, resultados úteis às futuras pesquisas de identificação de fungos termo-resistentes. Entre as descrições ressaltamos a de B. nivea, que pertence ao gênero normalmente considerado como o mais resistente, que se destaca entre os demais por ser o único que apresenta ascus nus, ou seja, sem ascocarpo.

IV.1.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS QUE LEVARAM A IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS

IV.1.1.1. *Byssochlamys nivea* Westling

Descrição macroscópica:

As colônias em B.D.A. apresentaram cor branco-gelo, reverso bege a ligeiramente amarelo, com bordas finas e de aspecto aracnoide durante o período de crescimento, tornando-se esbranquiçadas e de aspecto granular quando houve predominância de ascos. O desenvolvimento da colônia foi rápido a 30 °C, cobrindo toda a placa em 5 dias.

Descrição microscópica:

Apresentou ascos arranjados de forma irregular, em pequenos grupos, contendo oito ascosporos, sendo sua principal característica a presença de ascos nus (FOTO 1 - Anexo 2), ou seja, sem qualquer tipo de ascocarpio que o envolvesse. Esta espécie foi diferenciada de *B. fulva*, devido à presença de clamidosporos (BEUCHAT & RICE, 1979).

A fase anamorfa deste fungo foi o *Paecilomyces variotii* Bainier. Estas características estão de acordo com a descrição de *Byssochlamys nivea* Westling (BROWN & SMITH, 1957).

IV.1.1.2. *Neosartorya fischeri* (Wehmer) MALLOCH & CAIN

Descrição macroscópica:

As colônias em M.E.A. consistiram de uma camada contínua de cleistotécio, primeiramente de cor branca, tornando-se amarela com a idade, com reverso incolor.

Descrição microscópica:

Cleistotécio globoso a sub- globoso, pseudoparenquimático, ascos irregularmente dispostos, globosos e evanescentes, contendo oito ascosporos elipsoidais, hialinos e fortemente ornamentados por duas rugas equatoriais (FOTO 2 - Anexo 2).

Apresentou *Aspergillus* (*A. fumigatus* Fresenius) como fase anamorfa, o que o diferenciou dos outros fungos termo-resistentes normalmente encontrados em alimentos (HOCKING & PIIT, 1984).

Estas características estão de acordo com a descrição de *Aspergillus fischeri* Wehmer (em sinonímia com *Neosartorya fischeri*) (RAPER & FENNEL, 1965) e *Neosartorya fischeri* (MALLOCH & CAIN, 1972).

IV.1.1.3. *Talaromyces* sp.

Os fungos deste gênero foram diferenciados das outras fases teleomorfas de *Penicillium* spp. por terem apresentado ascocarpo não muito rígido, formado pelo entrelaçamento de hifas, não sendo pseudo-parenquimático em nenhuma fase de crescimento (STOLK & SAMSON, 1972).

IV.1.1.4. *Talaromyces flavus* (Klocker) STOLK & SAMSON var.
flavus

Descrição macroscópica:

As colônias em M.E.A. apresentaram-se amarelas, com reverso, primeiramente de coloração laranja, variando até marrom com a idade. Uma das cepas apresentou reverso com manchas avermelhadas e escuras, com difusão do pigmento no agar.

Descrição microscópica:

Asocarpos amarelos, globosos, ascos sub-globosos, evanescentes, com oito ascosporos elipsoidais, amarelos, com paredes grossas e espinosas (FOTO 4- Anexo 2). Uma caracterização importante para identificação desta espécie, foi a presença de anterídio enrolado ao ascogônio, com sua célula apical fundindo-se na parte superior do ascogônio (FOTO 5 - Anexo 2).

Apresentou *Penicillium vermiculatum* Dangeard como fase anamorfa. Todas estas características estão de acordo com STOLK & SAMSON (1972).

IV.1.1.5. *Talaromyces trachyspermus* (Shear) STOLK & SAMSON

Descrição macroscópica:

As colônias em M.E.A. apresentaram cor branca, com ascocarpo primeiramente branco, tornando-se amarelo com a idade, com reverso incolor.

Descrição microscópica:

Ascocarpo globoso, ascos sub-globosos, evanescentes, com oito ascosporos elipsoidais e espinosos. Célula ascógena facilmente distinta por consistir de uma porção de hifa aérea inchada, nodosa e retorcida.

Apresentou *Penicillium spiculisporium* Lehman como fase anamorfa. As características apresentadas estão de acordo com STOLK & SAMSON (1972).

IV.1.1.6. *Talaromyces wortmannii* C.R. Benjamin

Descrição macroscópica:

As colônias em M.E.A. apresentaram-se de cor amarela brilhante, com numerosos ascocarpos amarelos e reverso amarelo com manchas marrons.

Descrição microscópica:

Ascocarpo globoso, ascos globosos a sub-globosos com oito ascosporos elipsoidais e espinosos. Célula ascógena consistindo em parte de hifa aérea inchada com ramificações enroladas.

Talaromyces wortmannii apresenta estruturas muito semelhantes a *Talaromyces flavus*, sendo diferenciado principalmente pela célula ascógena e pelo formato do conídio em sua fase anamorfa, *Penicillium wortmannii* Klocner, que mostrou-se elipsoidal e predominantemente fusiforme.

Todas as características apresentadas estão de acordo com

IV.1.1.7. *Eupenicillium* spp.

Este gênero foi diferenciado das demais fases perfeitas de *Penicillium*, por possuir ascocarpo (cleistotécio) pseudo-parenquimático, globoso, composto de células poligonais e hialinas, com paredes rígidas. Os ascos apresentaram oito ascosporos globosos ou lenticulares, levemente rugosos ou com estrias equatoriais.

Os fungos foram classificados como *Eupenicillium* sp. de acordo com as características do gênero (SCOTT, 1968).

IV.1.1.8. *Eupenicillium javanicum* (van Beyna) STOLK & SAMSON var. *javanicum*

Descrição macroscópica:

As colônias em Czapeck apresentaram cores desde branco a cinza claro, passando por amarelo, até marrom claro. O reverso mostrou-se marrom, algumas vezes amarelo e ocasionalmente com manchas cremes e amarelas.

Descrição microscópica:

Cleistotécios com cores que variavam de creme a amarelo, chegando a marrom-claro em algumas linhagens (FOTO 3 - Anexo 2). Ascos soltos, evanescentes, com oito ascosporos lenticulares, sem

rugos equatoriais ou qualquer outro traço, sendo levemente espinosos.

Apresentou *Penicillium simplicissimum* (Dudem) Thom como fase anamorfa. As características da espécie estão de acordo com STOLK & SAMSON (1983).

IV.1.1.9. *Eupenicillium euglaucum* (van Beyna) STOLK & SAMSON

Descrição macroscópica:

As colônias em Czapeck apresentaram-se de cor rosa, creme ou branca, flocosas, com presença de exudado inicialmente avermelhado, tornando-se marrom com a idade. Apresentou difusão de pigmento amarelo no agar e reverso avermelhado a marrom.

Descrição microscópica:

Cleistotécios de cores que variavam de amarelo a marrom claro, sub-globosos. Ascosporos de forma lenticular, com duas rugas equatoriais próximas.

Apresentou *Penicillium citreonigrum* Dierckx como fase anamorfa, sendo este caracterizado por conídios globosos e delicadamente rugosos.

As características da espécie estão de acordo com STOLK & SAMSON (1983).

IV.1.1.10. *Paecilomyces penicillatus* (Hohmel) SAMSON

Descrição macroscópica:

As colônias em M.E.A. apresentaram cor creme, com áreas de esporulação brancas e reverso incolor.

Descrição microscópica:

As fiálides consistiram de uma porção basal cilíndrica, com pescoço distinto, sendo a principal característica da espécie o formato dos conídios, que apresentaram-se cilíndricos e eventualmente septados. Produziu clamidosporos hialinos, lisos e piriformes.

As características da espécie estão de acordo com Samson (1974).

IV.1.1.11. *Paecilomyces varioti* Bainier

Descrição macroscópica:

As colônias em B.D.A. apresentaram-se de cor ligeiramente amarela, tornando-se verdes com a idade, de aspecto aracnóide, flocosas no centro e com reverso claro.

Descrição microscópica:

Os conidióforos apresentaram ramificações arranjadas irregularmente, com cada ramo contendo de 2 a 7 fiálides de formas variadas, podendo ter bases cilíndricas ou elipsoidais. Os conídios variaram de hialinos a amarelos, e podiam ser sub-

globosos a elipsoidais ou cilíndricos. Clamidosporos globosos a piriformes, com paredes rígidas.

As características da espécie estão de acordo com BROWN & SMITH (1957) e SAMSON (1974).

IV.1.1.12. *Paecilomyces lilacinus* (Thom) SAMSON

Descrição macroscópica:

As colônias em B.D.A. e Czapeck apresentaram cor branca a lilás, e reverso com zonas claras radiais.

Descrição microscópica:

Os conidióforos apresentaram-se com paredes rugosas, levemente pigmentados. Fiálides com base dilatada, e pescoço muito fino, conídios elipsoidais a fusiforme, lisos e hialinos.

As características da espécie estão de acordo com SAMSON (1974).

IV.1.1.13. *Aspergillus fumigatus* Fresenius

Descrição macroscópica:

As colônias em Czapeck apresentaram-se primeiramente de cor branca, tornando-se verdes com a idade, extremamente flocosas e reverso incolor.

Descrição microscópica:

Cabeça conidial de forma colunar, compacta, densamente carregada de conídios. Conidióforo com contorno bem definido, cor verde, e esterigmas uniseriados, esverdeados, saindo apenas da parte superior da vesícula; os conídios mostraram-se globosos e levemente rugosos.

As características da espécie estão de acordo com RAPER & FENNELL (1977).

IV.1.1.14. *Penicillium chermesinum* Biourge

Descrição macroscópica:

As colônias em Czapeck apresentaram cor branca, sulcos radiais profundos, exudado ausente e reverso claro.

Descrição microscópica:

Característico por apresentar conidióforos curtos e de parede lisa, estritamente monoverticilado. Fiálides ampuliformes, relativamente pequenas e estreitas; conídios pequenos, elípticos, com paredes lisas.

As características da espécie estão de acordo com PITT (1979).

IV.1.1.15. *Penicillium citrinum* Thom

Descrição macroscópica:

As colônias em M.E.A. apresentaram-se de cor verde azulada, com sulcos radiais, velutina, com margens irregulares, exudado ausente e reverso claro.

Descrição microscópica:

Conidióforos com paredes lisas, caracterizados por apresentarem métulas terminais divergentes, em número de 3-5, com ocasionais ramos divergentes. Fiálides ampuliformes, conídios sub-globosos, ligeiramente rugosos e de cor azulada.

As características da espécie estão de acordo com PITT (1979).

IV.1.1.16. *Mycelia sterilia*

Os fungos que não produziram nenhum estado conidial sexual ou assexual reconhecido na cultura, foram classificados, por conveniência, como *Mycelia sterilia*, de acordo com BARRON (1972).

IV.2. ATIVAÇÃO TÉRMICA

As curvas de ativação térmica dos fungos *Byssoschlamys nivea*, *Neosartora fischeri*, *Talaromyces flavus* e *Eupenicillium javanicum*, usando suco de morango como meio de aquecimento, são mostradas nas Figuras 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Os melhores tempos e temperaturas de ativação de cada fungo encontram-se no Quadro 9, que apresenta ainda o incremento em termos de número de ciclos logarítmicos, acima da contagem inicial, causada pelo choque térmico. Notou-se que apenas *Eupenicillium javanicum* não foi ativado a 80 °C, pois começou a ser destruído nesta temperatura, sendo ativado a 70 °C. Observou-se ainda que, mesmo a 70 °C, este fungo foi pouco ativado, com um incremento na sua concentração de esporos de apenas 0.3 ciclos logarítmicos. O fungo mais favorecido pela ativação foi *T. flavus*, ativado em 2 ciclos logarítmicos, seguido do *B. nivea* com 1.2 ciclos logarítmicos.

O resultado obtido para ativação térmica de *Byssoschlamys nivea* foi próximo ao obtido por KING et alii (1969) que, trabalhando com *B. fulva* em suco de uva, encontraram um tempo de ativação de 4 minutos a 80 °C. Para *Neosartorya fischeri*, o resultado obtido (10 minutos de aquecimento a 80 °C) confirmou indicação de SCOTT & BERNARD, (1987). Estes autores indicaram

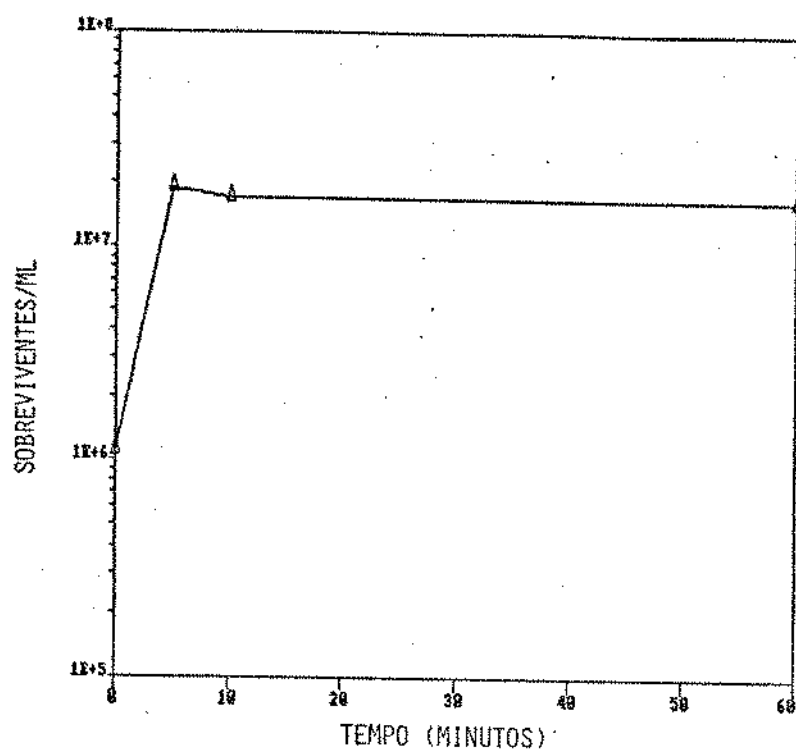


FIGURA 1 - CURVA DE ATIVAÇÃO DE ASCOS DE *BYSSOSCLANIA NIVEA* AQUECIDOS A 80°C EM SUCO DE MORANGO.

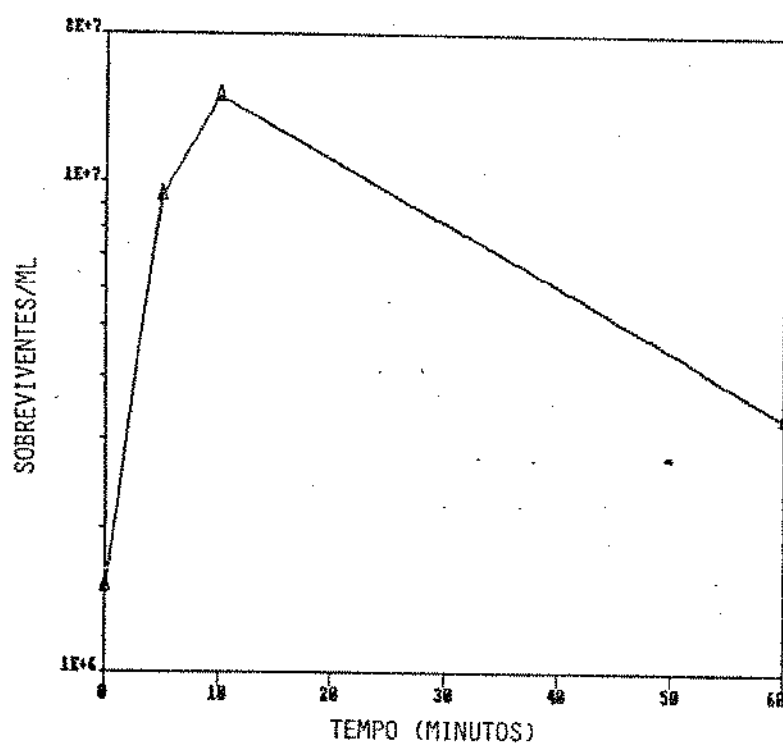


FIGURA 2 - CURVA DE ATIVAÇÃO DE ASCOSPOROS DE *NEOSARTORYA FISCHERI* AQUECIDOS A 80°C EM SUCO DE MORANGO.

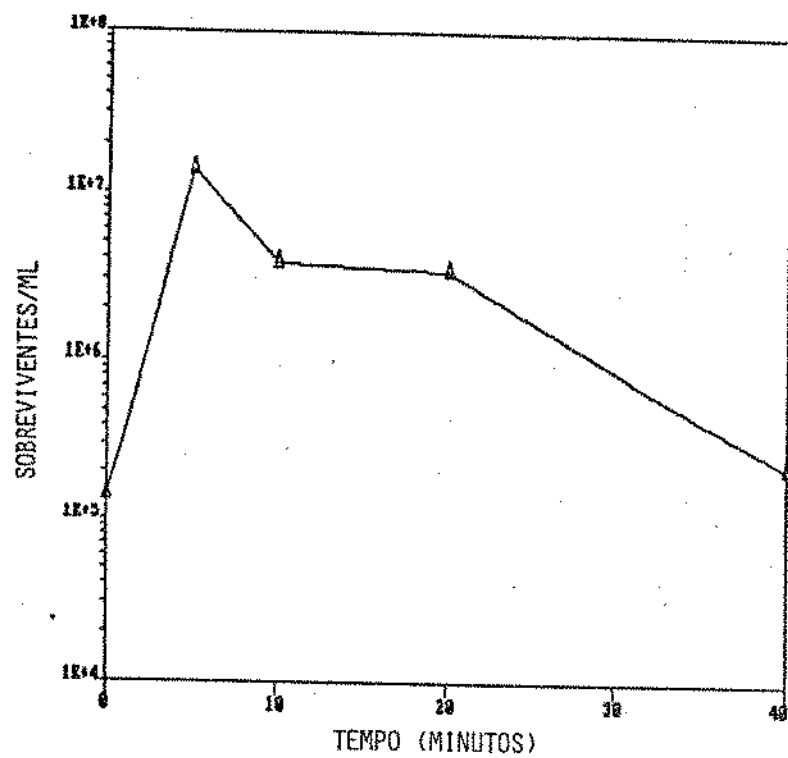


FIGURA 3 - CURVA DE ATIVAÇÃO DE ASCOSPOROS DE *TALAROMYCES FLAVUS* AQUECIDOS A 80°C EM SUCO DE MORANGO.

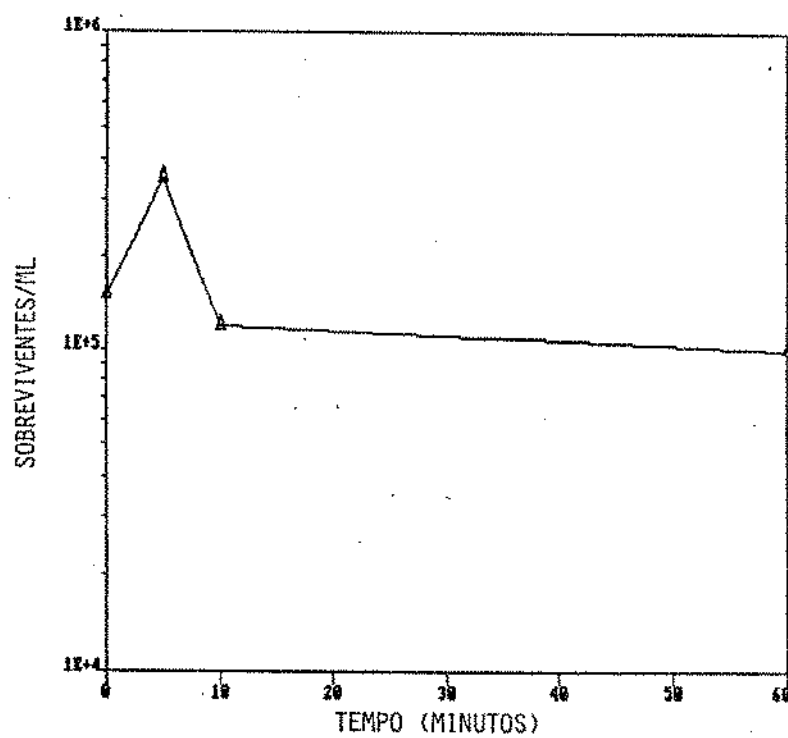


FIGURA 4 - CURVA DE ATIVAÇÃO DE ASCOSPOROS DE *EUPENICILLIUM JAVANICUM* AQUECIDOS A 70°C EM SUCO DE MORANGO.

também para *Talaromyces flavus*, um choque térmico de 10 minutos a 80 °C que foi, entretanto, superior ao obtido no presente trabalho. Não foi encontrado na literatura dados sobre a ativação térmica de *Eupenicillium javanicum*.

O incremento no número inicial de sobreviventes obtido com a ativação térmica dos ascosporos de *Neosartorya fischeri* foi o mesmo relatado por CONNER & BEUCHAT (1987), que trabalharam com este fungo utilizando suco de maçã (12.3 Brix; pH 3.8) como meio de suspensão para aquecimento dos esporos.

Os tratamentos apresentados no Quadro 9, que forneceram o maior número de ascosporos ativados para cada fungo, foram usados para a ativação da suspensão utilizada como inóculo para o estudo da resistência térmica.

=====

QUADRO 9-TRATAMENTO TÉRMICO ÓTIMO PARA ATIVAÇÃO, EM SUCO DE MORANGO, DOS ESPOROS DAS ESPÉCIES SELECIONADAS E O INCREMENTO NA CONTAGEM INICIAL CAUSADO PELO CHOQUE TÉRMICO (em termos de número de ciclos logarítmicos)

=====

ESPÉCIE	TRATAMENTO		INCREMENTO*
	TÉRMICO		
=====			
	o		
B. nivea	80 C por	5 minutos	1.2
	o		
N. fischeri	80 C por	10 minutos	1.0
	o		
T. flavus	80 C por	5 minutos	2.0
	o		
E. javanicum	70 C por	5 minutos	0.3

* -em termos de número de ciclos logarítmicos

IV.3. AVALIAÇÃO DA DETERIORAÇÃO DO SUCO DE MORANGO PELAS CULTURAS SELECIONADAS

Os resultados obtidos nos testes de deterioração são apresentados no Quadro 10. Todas as observações são referentes à comparação de cada tubo com o tubo controle.

O crescimento dos fungos em condições de aerobiose foi observado, para as quatro espécies, em 72 horas de incubação, com o aparecimento de micélio na superfície do tubo. Os resultados confirmaram testes anteriormente realizados com *B. nivea* por BEUCHAT & TOLEDO (1977) que detectaram a germinação de ascospores deste fungo em vários sucos de fruta, com Brix variando de 11.2 a 15.7 e pH entre 2.7 e 3.8. O tempo de incubação para o desenvolvimento das colônias também mostrou-se próximo ao obtido por HATCHER et alii (1979) trabalhando com *B. fulva* inoculado em suco de maçã a 15 Brix.

A única espécie que apresentou desenvolvimento em tubo selado com vaspar foi *B. nivea*, indicando que este fungo consegue desenvolver-se em ambientes com baixas tensões de oxigênio, como os encontrados em latas e garrafas. Este resultado confirmou as observações de BROWN & SMITH (1957); YATES & FERGUSON (1963); YATES et alii (1967); PERCEBOIS et alii (1975).

Além do crescimento, foi detectada produção de gás, nos

=====

QUADRO 10- ALTERAÇÕES CAUSADAS PELAS ESPÉCIES INOCULADAS EM SUCO
DE MORANGO (pH 3,0 e 15^o Brix)

=====

ESPÉCIE	CRESCIMENTO		PROD.	ALTERAÇÃO		ALTERAÇÃO
			DE	DA COR		DE pH
	a A	b F	GAS	A	F	
B.nivea	+	+	+	+ claro (1 tubo)	SA ^c	SA
N. fischeri	+	-	-	SA	SA	SA
E. javanicum	+	-	-	SA	SA	SA
T. flavus	+	-	-	amarelado	SA	SA

=====

a- A= tubo aberto
b- F= tubo fechado
c- SA= sem alteração

tubos selados e inoculados com *B.nivea*. O fato de espécies de *Byssochlamys* produzirem gás foi relatado anteriormente por PUT & KRUISWIJK (1964) e CARTWRIGHT & HOCKING (1984).

Foi observada uma separação de fases em todos os tubos, não havendo, porém, variação entre a altura do precipitado no controle e nos tubos inoculados. Este resultado não permitiu concluir nada sobre a hidrólise da pectina da polpa, por possível presença de enzimas pectinolíticas. Além do teste visual nenhum outro método de detecção de enzimas foi empregado.

A alteração de cor observada em um tubo inoculado com *B. nivea*, onde o suco apresentou-se mais claro, não foi reproduzida na duplicata. A cor amarelada apresentada no suco inoculado com

T. flavus pode ser devido à cor da própria suspensão do fungo, que tem a cor amarelo-alaranjado.

Não foi observada variação de pH, o que confirma resultados anteriormente obtidos por PUT & KRUISWIJK (1964) que trabalharam com *Byssochlamys nivea* em morangos pasteurizados.

IV.4. RESISTÊNCIA TÉRMICA DAS CEPAS SELECIONADAS

IV.4.1. UTILIZAÇÃO DO MÉTODO DE TUBOS TDT

As Figuras 5 e 6 mostram as curvas de sobreviventes de *N. fischeri* a 85 °C, e de *B. nivea* a 80 °C, respectivamente, como resultado da utilização do método de tubos TDT. Na Figura 5, as curvas 1A e 1B representam os resultados de dois tubos retirados, resfriados e plaqueados simultaneamente, enquanto que a curva 2 representa um experimento realizado separadamente. Pode ser observada a não reprodutibilidade dos resultados entre as curvas, especialmente em tempos superiores a 90 minutos de aquecimento. Aos 120 minutos os pontos das curvas 1A e 1B apresentam uma diferença de mais de 4 ciclos logarítmicos na contagem de sobreviventes e, comparando-se as curvas das experiências 1A e 2, neste mesmo tempo, a diferença aumenta para mais de 6 ciclos logarítmicos.

As curvas apresentadas na Figura 6 mostram que, assim como para *N. fischeri*, no começo do aquecimento dos ascos de *B. nivea* (curvas 3A e 3B) houve boa reprodutibilidade dos resultados e a curva de sobreviventes foi praticamente constante até 400 minutos. Para os tempos de aquecimento acima de 720 minutos, não foram observados resultados reprodutíveis, nem comparando as

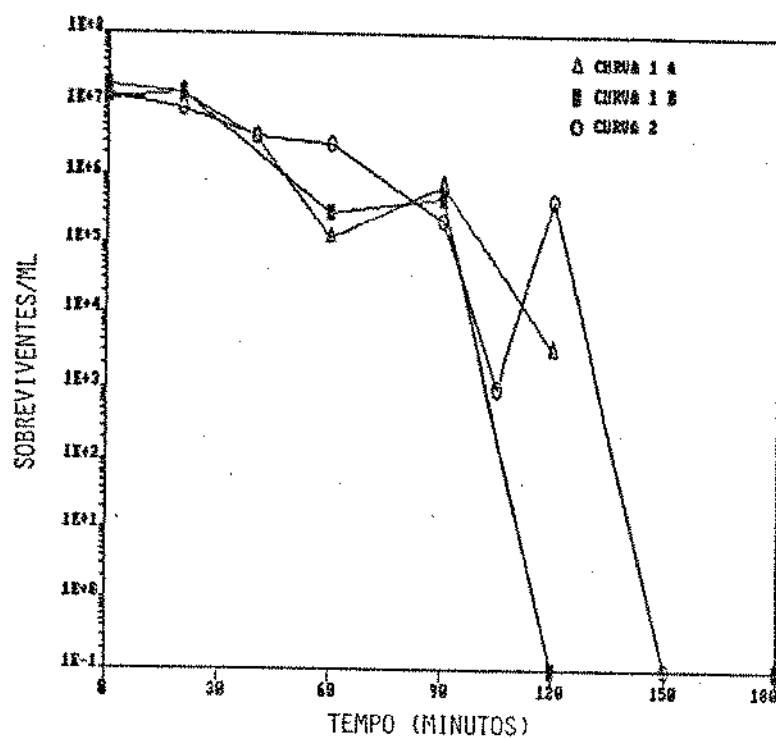


FIGURA 5 - CURVAS DE SOBREVIVENTES DE ASCOSPOROS DE *NEOSARTORYA FISCHERI* AQUECIDOS A 85°C EM SUCO DE MORANGO PELO MÉTODO DE TUBOS T.D.T.

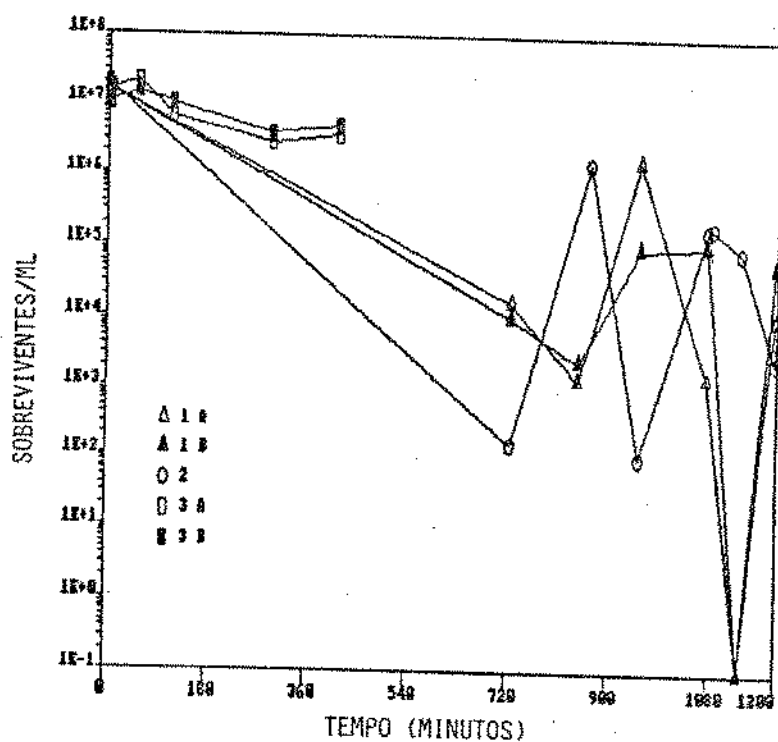


FIGURA 6 - CURVAS DE SOBREVIVENTES DE ASCOS DE *BYSSOSCLAMYS NIVEA* AQUECIDOS A 80°C EM SUCO DE MORANGO PELO MÉTODO DE TUBOS T.D.T.

curvas 1A e 1B (tubos retirados simultaneamente) nem comparando estas com a curva 2, cujo experimento foi realizado separadamente.

Os resultados demonstraram a não eficiência do método de tubos T.D.T. para o presente estudo, embora alguns autores o tenham empregado com sucesso para determinação da resistência térmica de fungos, utilizando meio sintético para aquecimento dos esporos (KING et alli, 1979; BAYNE & MICHENER, 1979). A observação experimental indica a possibilidade de formação de aglomerados de polpa e esporos, que protegem os esporos impedindo sua destruição sob aquecimento prolongado. Esta observação nos levou à utilização de um método que empregasse agitação para evitar este fenômeno, como é o caso do método do frasco de três bocas (item IV.4.2.).

IV.4.2. UTILIZAÇÃO DO MÉTODO DO FRASCO DE TRÊS BOCAS

As curvas de sobreviventes dos ascos de *B. nivea* e ascosporos de *N. fischeri*, que foram calculadas às temperaturas de 80, 85, 90 e 93 C, são mostradas nas Figuras 7 e 8, respectivamente. Na Figura 9 são apresentadas as curvas de sobreviventes de *E. javanicum* às temperaturas de 80, 85 e 90 C. Não foi determinada a resistência do *E. javanicum* a 93 C, devido à baixa resistência deste fungo apresentada a 90 C. Nestes gráficos, pode ser observada a não linearidade das curvas, principalmente às temperaturas mais baixas (80 e 85 C). Com o

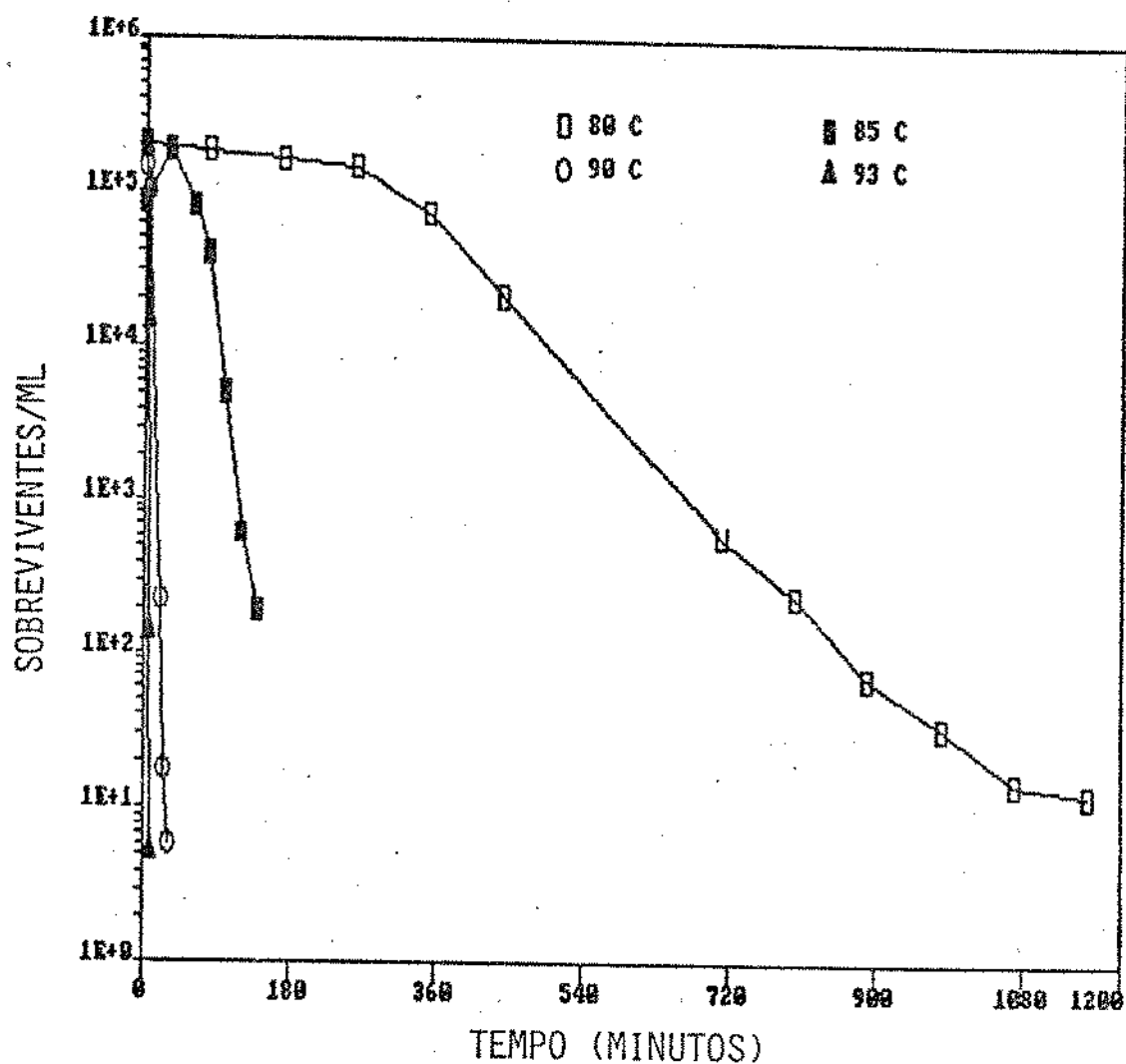


FIGURA 7 - CURVAS DE SOBREVIVENTES DE ASCOS DE *BYSSOCHLAMYS NIVEA* AQUECIDOS A 80, 85, 90 E 93°C EM SUCO DE MORANGO PELO MÉTODO DO FRASCO DE TRÊS BOCAS.

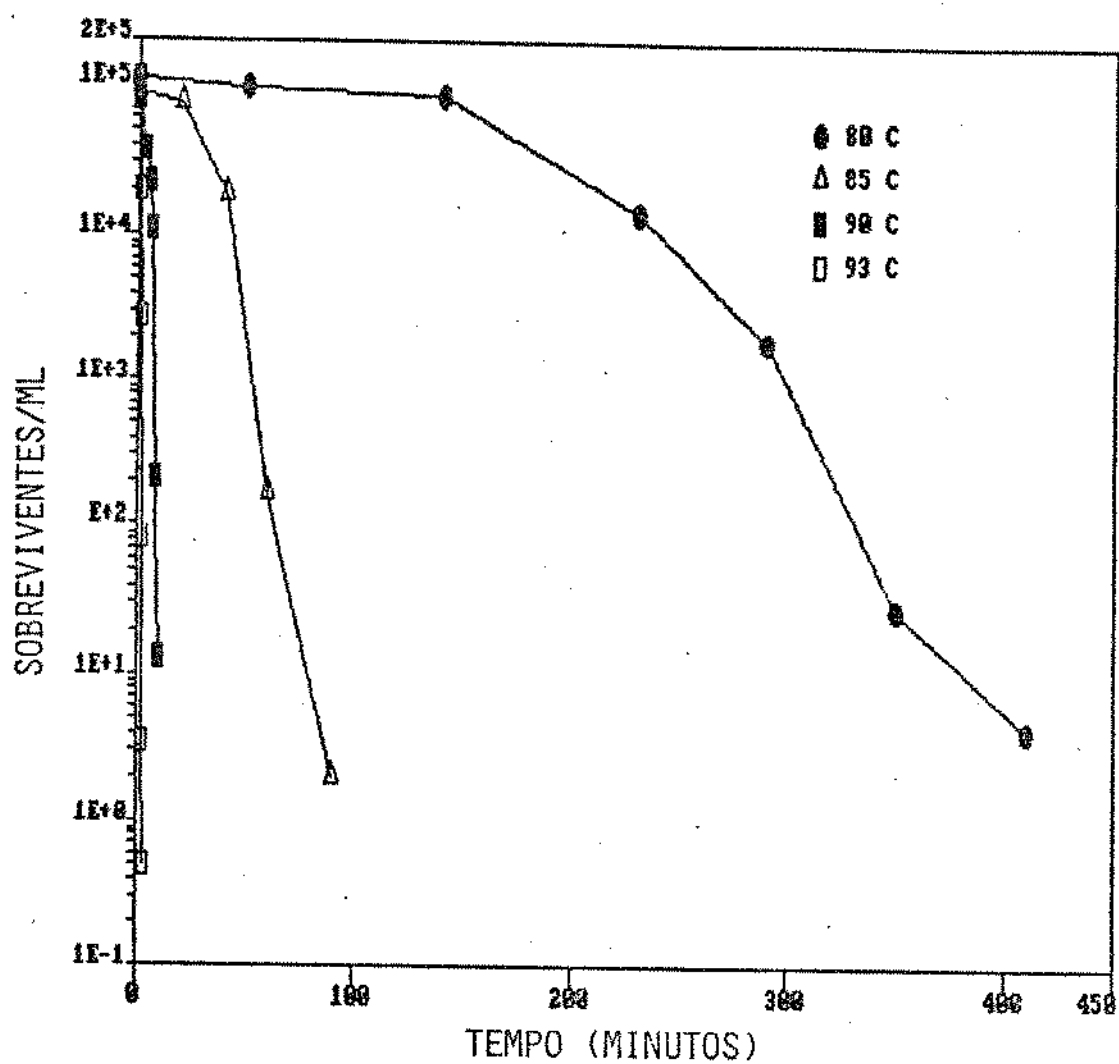


FIGURA 8 - CURVAS DE SOBREVIVENTES DE ASCOSPOROS DE *NEOSARTORYA FISCHERI* AQUECIDOS A 80, 85, 90 E 93°C EM SUCO DE MORA-
RANGO PELO MÉTODO DO FRASCO DE TRÊS BOCAS.

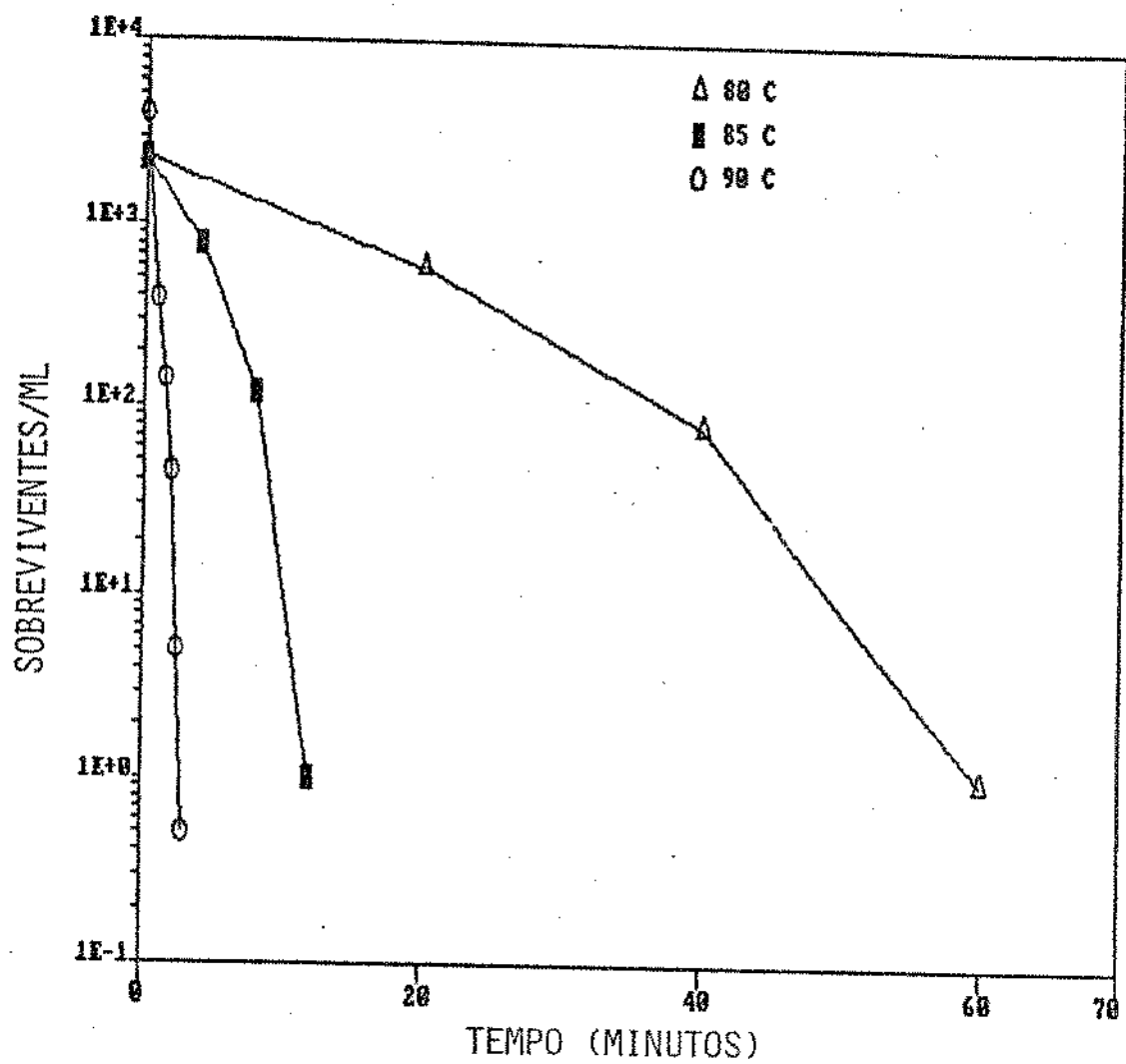


FIGURA 9 - CURVAS DE SOBREVIVENTES DE ASCOSPOROS DE *EUPENICILLIUM JAVANICUM* AQUECIDOS A 80, 85 E 90°C EM SUCO DE MORANGO PELO MÉTODO DO FRASCO DE TRÊS BOCAS.

aumento da temperatura, as curvas tornaram-se praticamente lineares, o que concordou com os resultados apresentados por KING et alii. (1979) e BAYNE & MICHENER (1979), trabalhando com linhagens de *Byssoschlamys*. Segundo estes autores, as altas temperaturas mascaram a não linearidade das curvas, sendo necessária a utilização de temperaturas mais baixas para evidenciar este fenômeno.

Uma explicação para a não linearidade das curvas de sobreviventes de ascos de *B. nivea* seria o fato de que os ascosporos encontram-se dentro de ascos íntegros, e que a destruição destes ascosporos não seria uniforme, o que é similar à observação feita por RAHN (1945) em relação à destruição não uniforme das células de *Staphylococcus* dispostas em cachos. Esta explicação, entretanto, não se aplica aos demais fungos em estudo, já que foi determinada a resistência térmica de seus ascosporos livres e não de ascos. SPLITTSTOESSER & SPLITTSTOESSER (1977) consideraram que a não linearidade das curvas de esporos de *Byssoschlamys* sp. e *Aspergillus* sp. não se deve à formação de aglomerados, nem à ativação de esporos dormentes, não apresentando, entretanto, uma explicação para o fato.

Para possibilitar o cálculo dos parâmetros de esterilização equivalentes a D e Z, foi aplicado o método de linearização de curvas de sobreviventes de ALDERTON & SNELL (1970). As Figuras 10, 11 e 12 mostram os gráficos de $\log(\log N^0 - \log N) \times \log \text{tempo (minutos)}$, para *B. nivea*, *N. fischeri* e *E. javanicum*, respectivamente, onde o inverso da inclinação fornece o parâmetro "a", utilizado na linearização das curvas através da

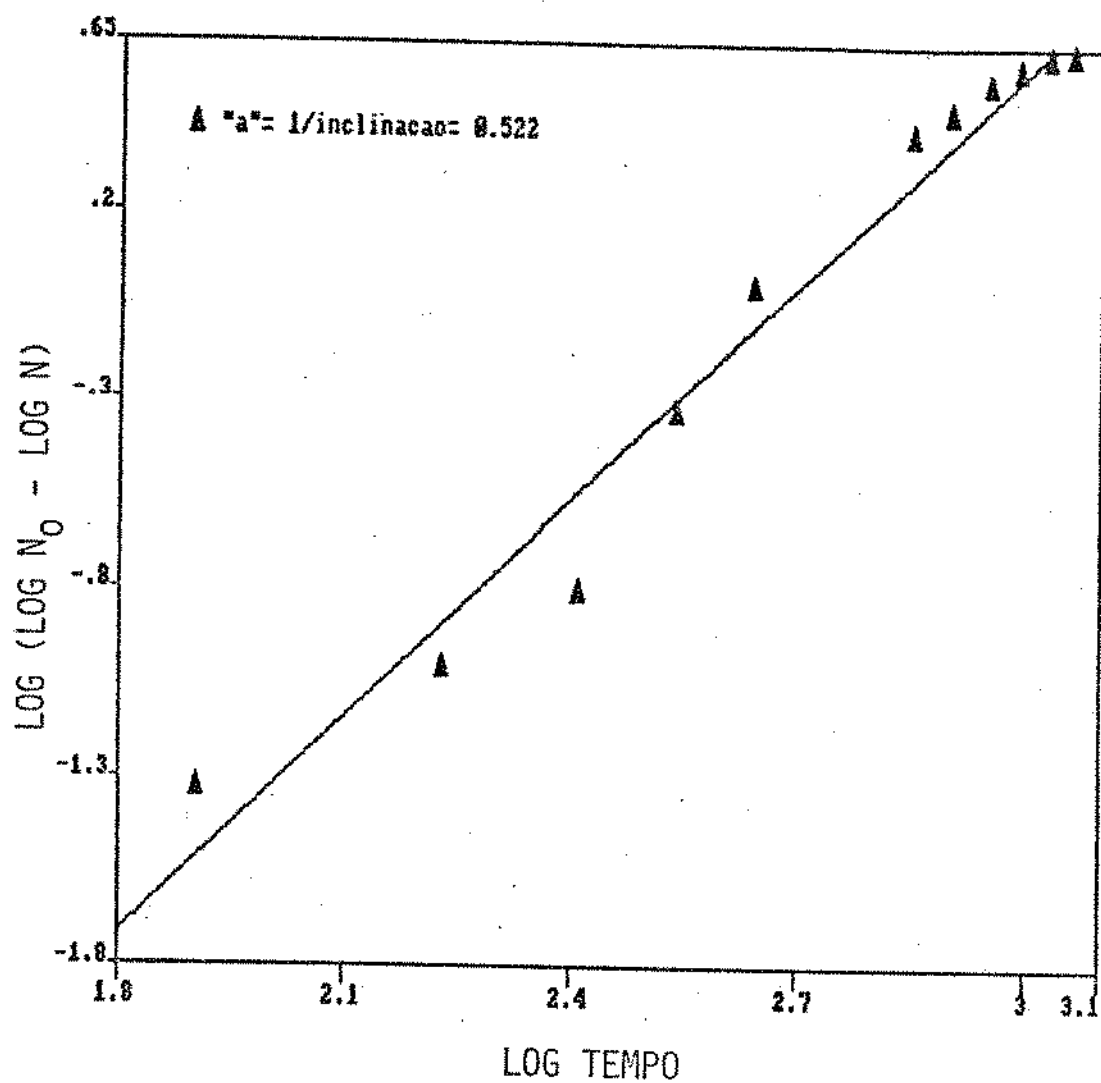


FIGURA 10 - DETERMINAÇÃO DO EXPOENTE "a" PARA BYSSÓCHLAMYS NIVEA A 80°C

$$\log (\log N_0 - \log N) = - 5.17 + 1.916 \log t$$

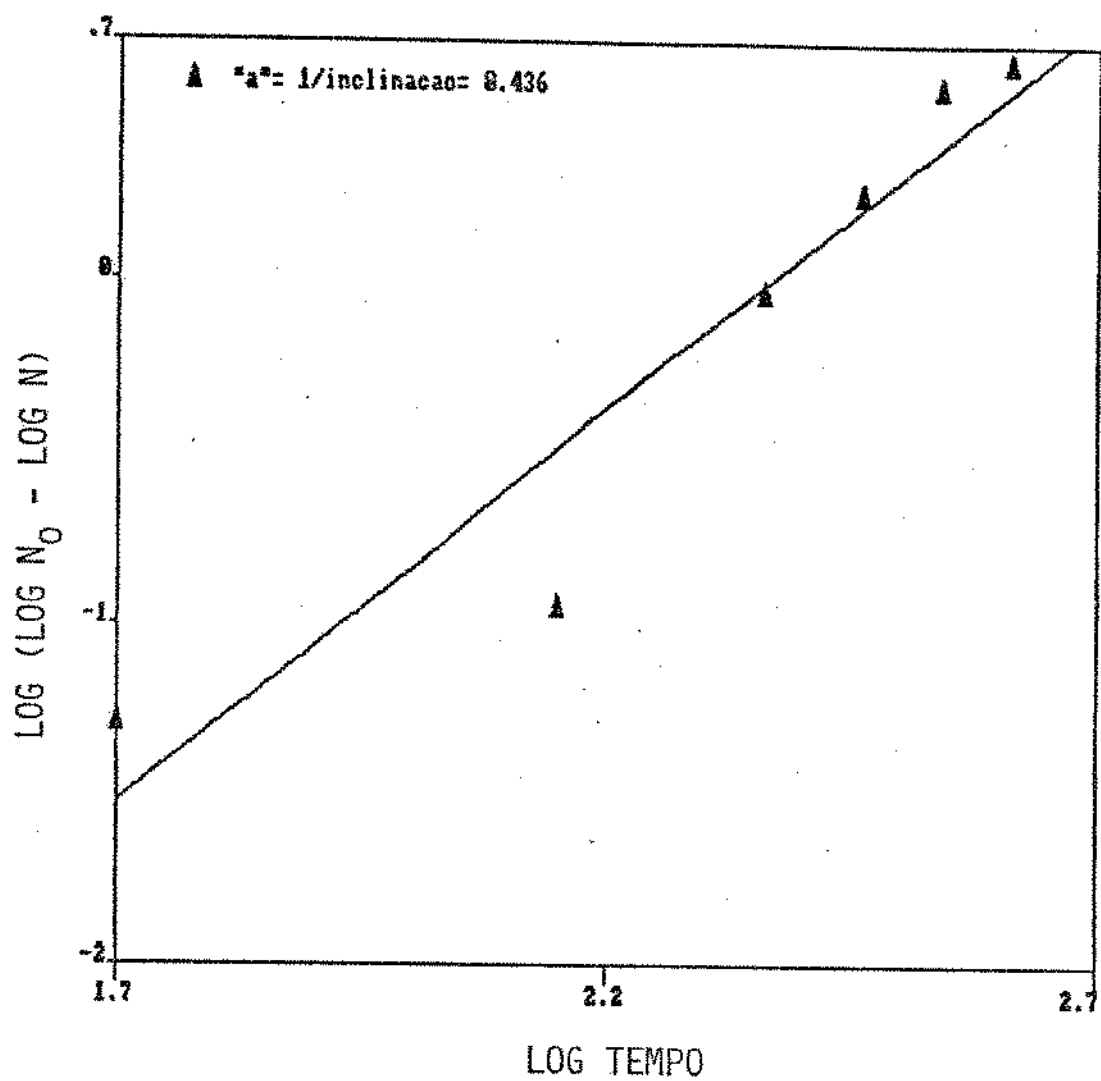


FIGURA 11 - DETERMINAÇÃO DO EXPOENTE "a" PARA *NEOSARTORYA FISCHERI* A 80°C

$$\log (\log N_0 - \log N) = - 5.28 + 2.294 \log t$$

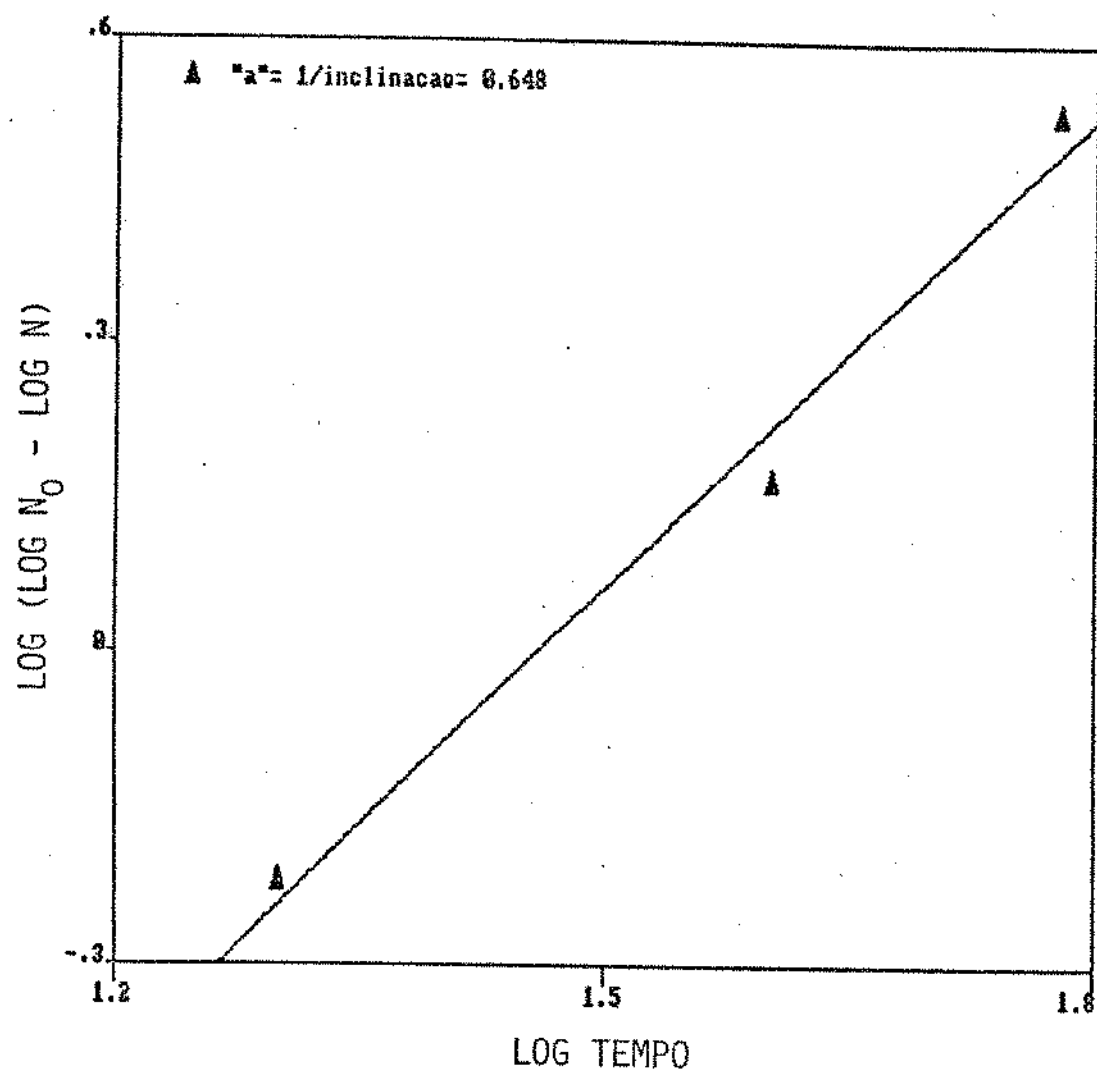


FIGURA 12 - DETERMINAÇÃO DO EXPOENTE "a" PARA *EUPENICILLIUM JAVANICUM* A 80°C

$$\log (\log N_0 - \log N) = -2.21 + 1.543 \log t$$

equação:

$$\log \frac{N}{N_0} - \log N = kt + C \quad (\text{equação 1})$$

Os valores do expoente "a", calculados a 80°C, e seus respectivos coeficientes de correlação, para as três espécies, são mostrados no Quadro 11.

QUADRO 11-VALORES DO EXPOENTE "a", CALCULADOS A 80°C, UTILIZADOS NA LINEARIZAÇÃO DAS CURVAS DE SOBREVIVENTES DE B. nivea, N. fischeri e E. javanicum

ESPÉCIE	valor "a"	* r
B. nivea	0.522	0.985
N. fischeri	0.436	0.953
E. javanicum	0.648	0.992

* coeficiente de correlação da curva:

$\log (\log \frac{N}{N_0} - \log N) \times \log \text{ tempo}$
para o cálculo de "a"

O valor de "a" calculado para a curva de 80^o C foi utilizado para linearizar toda a família de curvas para cada fungo, e as curvas linearizadas são mostradas nas Figuras 13, 14 e 15, para *B. nivea*, *N. fischeri* e *E. javanicum*, respectivamente. As equações regressionadas de cada curva de sobreviventes são apresentadas sob os gráficos (equações de números 5 a 15).

Os valores de k e C, obtidos à partir das equações das curvas linearizadas, são mostrados no Quadro 12. Os coeficientes de correlação para estas equações foram iguais ou superiores a 0.978, indicando alta correlação entre os dados.

Neste estudo foi calculado, também, o valor de D para as espécies em questão, à partir da porção linear da curva de sobreviventes, ou empregando todos os pontos quando esta se apresentava linear. Isto foi feito para possibilitar a comparação do método, considerando ordem logarítmica de morte, utilizado muitas vezes para fungos (KING et alii, 1969; BEUCHAT, 1986) com o método de linearização de ALDERTON & SNELL (1970). Estes valores são apresentados na Quadro 13, com seus respectivos coeficientes de correlação, para *B. nivea*, *N. fischeri* e *E. javanicum*. Nota-se que, de uma maneira geral, os coeficientes de correlação obtidos para o cálculo do valor D são ligeiramente inferiores aos obtidos pelo método de linearização.

Com os valores de k e C foi possível calcular o tempo necessário para causar 2, 3 e 4 reduções decimais da população inicial de *B. nivea* e *N. fischeri* e 1, 2 e 3 reduções decimais para *E. javanicum*. Estes valores estão nas Quadros 14, 15 e 16, para *B. nivea*, *N. fischeri* e *E. javanicum*, respectivamente, e são comparados ao tempo obtido experimentalmente para esta redução.

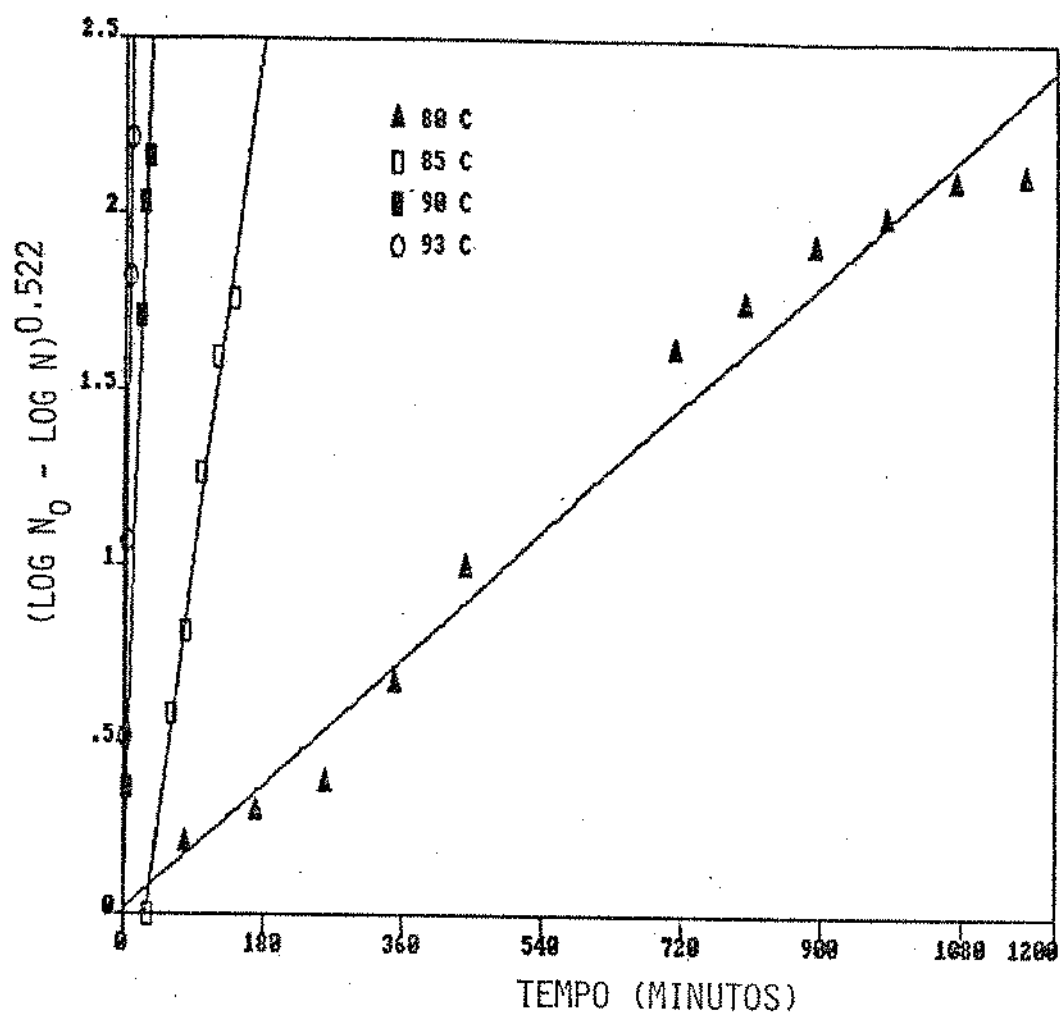


FIGURA 13 - CURVAS DE SOBREVIVENTES DE ASCOS DE *BYSSOCHLAMYS NIVEA* LINEARIZADAS PELA FÓRMULA $(\text{LOG } N_0 - \text{LOG } N)^a = KT + C$

$$(\log N_0 - \log N)^{0.522} = 0.0020 t + 0.018 \quad (\text{para } 80^\circ \text{ C}) \quad \text{eq.5}$$

$$(\log N_0 - \log N)^{0.522} = 0.0165 t - 0.453 \quad (\text{para } 85^\circ \text{ C}) \quad \text{eq.6}$$

$$(\log N_0 - \log N)^{0.522} = 0.0750 t + 0.067 \quad (\text{para } 90^\circ \text{ C}) \quad \text{eq.7}$$

$$(\log N_0 - \log N)^{0.522} = 0.2928 t - 0.059 \quad (\text{para } 93^\circ \text{ C}) \quad \text{eq.8}$$

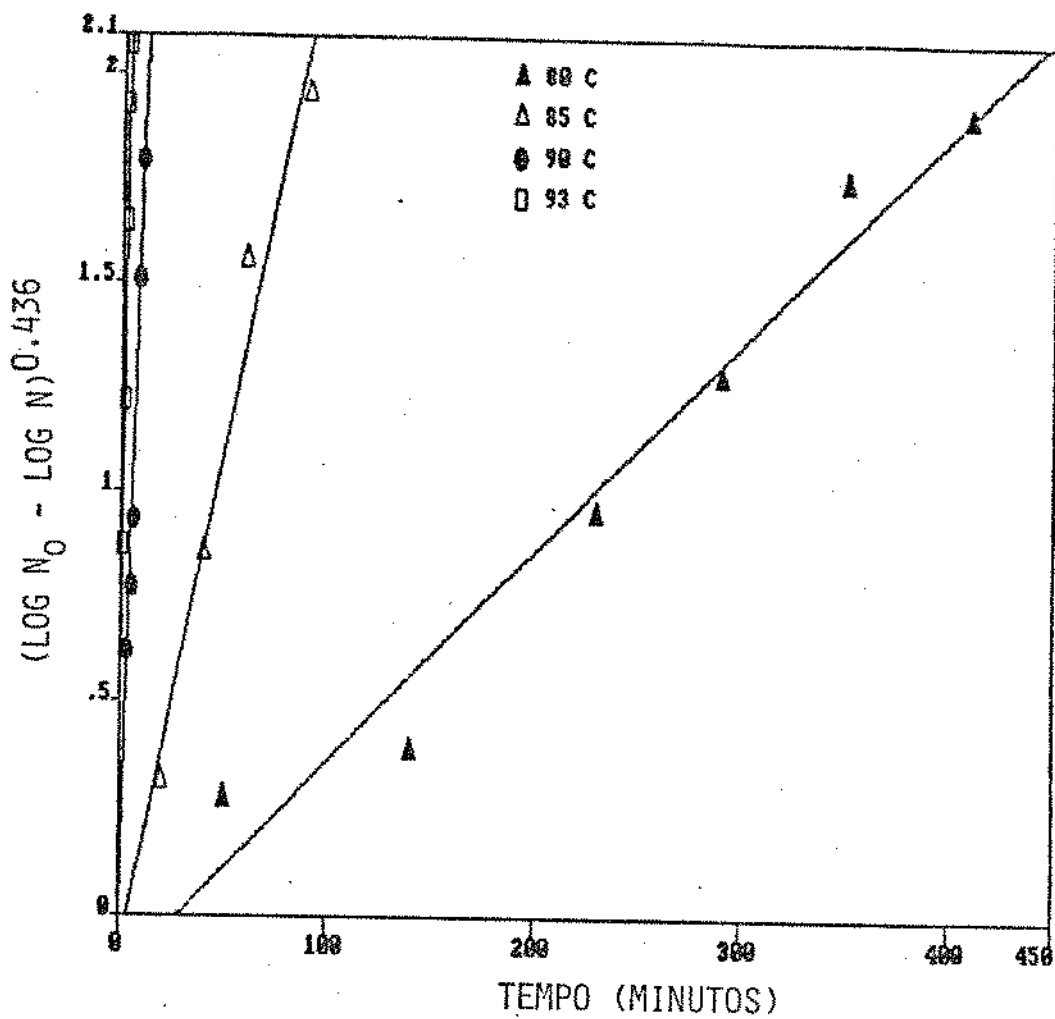


FIGURA 14 - CURVAS DE SOBREVIVENTES DE ASCOSPOROS DE NEOSARTORYA FISCHERI LINEARIZADAS PELA FÓRMULA $(\log N_0 - \log N)^a = KT + C$

$$(\log N_0 - \log N)^{0.436} = 0.0050 t - 0.140 \quad (\text{para } 80^\circ \text{C}) \quad \text{eq. 9}$$

$$(\log N_0 - \log N)^{0.436} = 0.0239 t - 0.092 \quad (\text{para } 85^\circ \text{C}) \quad \text{eq. 10}$$

$$(\log N_0 - \log N)^{0.436} = 0.1814 t - 0.035 \quad (\text{para } 90^\circ \text{C}) \quad \text{eq. 11}$$

$$(\log N_0 - \log N)^{0.436} = 0.6198 t + 0.309 \quad (\text{para } 93^\circ \text{C}) \quad \text{eq. 12}$$

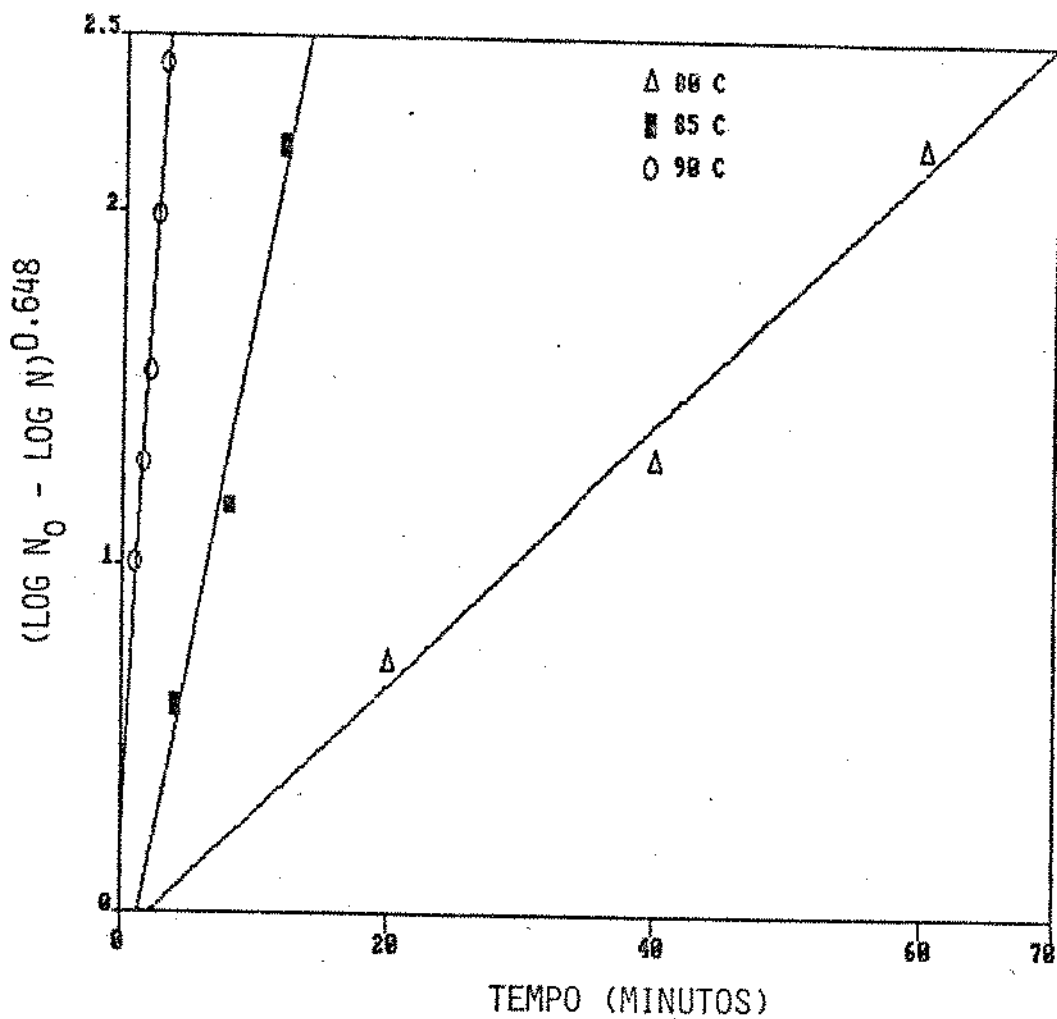


FIGURA 15 - CURVAS DE SOBREVIVENTES DE ASCOSPOROS DE *EUPENICILLIUM JAVANICUM* LINEARIZADAS PELA FÓRMULA $(\text{LOG } N_0 - \text{LOG } N)^a = \text{KT} + \text{C}$

$$(\text{log } N_0 - \text{log } N)^{0.648} = 0.0369 t - 0.079 \quad (\text{para } 80^\circ \text{ C}) \quad \text{eq. 13}$$

$$(\text{log } N_0 - \text{log } N)^{0.648} = 0.1988 t - 0.266 \quad (\text{para } 85^\circ \text{ C}) \quad \text{eq. 14}$$

$$(\text{log } N_0 - \text{log } N)^{0.648} = 0.7078 t + 0.232 \quad (\text{para } 90^\circ \text{ C}) \quad \text{eq. 15}$$

=====

QUADROS 12-VALORES DE k E C CALCULADOS PARA CADA TEMPERATURA DE
TRABALHO COM *B. nivea*, *N. fischeri* e *E. javanicum*

=====

ESPÉCIE	TEMP. (°C)	$k(\text{min}^{-1})$	C	* r
=====				
<i>B. nivea</i>	80	0.0020	0.018	0.987
	85	0.0165	-0.453	0.995
	90	0.0750	0.067	0.985
	93	0.2928	-0.059	0.993

<i>N. fischeri</i>	80	0.0050	-0.140	0.982
	85	0.0239	-0.092	0.981
	90	0.1814	-0.035	0.978
	93	0.6198	0.309	0.988

<i>E. javanicum</i>	80	0.0369	-0.079	0.991
	85	0.1988	-0.266	0.987
	90	0.7078	0.232	0.992

=====

* coeficiente de correlação entre :

$(\log N_0 - \log N) \times \text{Tempo}$

para determinação de k e C

=====

QUADRO 13-CÁLCULO DO VALOR D, CONSIDERANDO-SE ORDEM LOGARÍTMICA
DE MORTE E SEUS RESPECTIVOS COEFICIENTES DE
CORRELAÇÃO, CALCULADOS PARA *B. nivea*, *N. fischeri*
E *E. javanicum*.

=====

ESPÉCIE	TEMP. (°C)	VALOR D (min)	COEF. DE CORREL.
=====			
<i>B. nivea</i>	80	193.1*	0.997
	85	34.6*	0.972
	90	6.3	0.992
	93	1.7	0.965

<i>N. fischeri</i>	80	59.5*	0.975
	85	14.5*	0.986
	90	2.6	0.908
	93	0.5	0.971

<i>E. javanicum</i>	80	14.5*	0.978
	85	3.7	0.946
	90	0.8	0.982

* utilizando-se para o cálculo unicamente a porção linear da curva de sobreviventes.

Os quadros apresentam, ainda, a comparação dos tempos necessários para causar um determinado número de reduções decimais, calculados à partir do valor de D, utilizando-se múltiplos de D correspondentes ao número de reduções decimais requeridas.

Pode ser observado que, pelo método de linearização, chega-se a resultados muito próximos aos dados experimentais e, com poucas exceções, estes valores são menores que os reais. O sinal negativo foi utilizado para indicar quando o tempo calculado foi menor que o experimental. No caso de assumir ordem logarítmica de morte, comparando-se os valores de 1 a 4D, de acordo com o número de reduções requeridas, nota-se que os tempos obtidos não são muito próximos dos experimentais, sendo na maioria das vezes, menores que estes.

Este resultado confirma a observação de BAYNE & MICHENER (1979) que consideraram que, se o tratamento térmico aplicado a alimentos, que tenham como alvo microrganismos cuja curva de sobreviventes não é logarítmica, for baseado no valor D, poderá haver um risco de sub processamento no produto.

Os dados de resistência térmica obtidos por PUT & KRUISWIJK (1964), trabalhando com ascos de *B. nivea* suspensos em suco de morango a pH 3.5, mostraram que, para destruição de 10^5 ascos/ml a 90°C , era necessário um tempo de aquecimento de até 10 minutos. A linhagem estudada no presente trabalho, entretanto, mostrou uma resistência superior àquela, sendo obtida a redução de 10^4 ascos apenas aos 26.5 minutos de aquecimento a 90°C .

Os resultados apresentados por MICHENER & KING (1974) mostram que a resistência térmica de ascos integros e ascosporos livres é praticamente a mesma, o que nos permitiu comparar os

=====

QUADRO 14- COMPARAÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL REQUERIDO PARA CAUSAR

UM DETERMINADO NÚMERO DE REDUÇÕES DECIMAIS DE ASCOS DE

B. nivea, COM OS TEMPOS CALCULADOS PELA EQUAÇÃO DE

LINEARIZAÇÃO E OS TEMPOS CALCULADOS CONSIDERANDO ORDEM

LOGARÍTMICA DE MORTE (múltiplos do valor D)

=====

TEMP.	NÚMERO	TEMPO	TEMPO		TEMPO	
	REDUÇÕES			b		d
^o			a	%	c	%
(C)	DECIMAIS	EXPER.	CALC.		LOG.	
=====						
80	2	614.1	709.0	15.5	386.2	-37.1
	3	815.6	878.2	7.7	579.3	-29.0
	4	1050.0	1022.0	-2.7	772.4	-26.4

85	2	109.8	112.7	2.6	69.2	-37.0
	3	141.6	134.5	-5.0	103.8	-26.7
	4	166.2	153.1	-7.9	138.4	-16.7

90	2	15.6	18.3	17.3	12.7	-18.6
	3	21.1	22.8	8.1	18.9	-10.4
	4	26.5	26.6	0.4	25.2	- 4.9

93	2	4.8	5.1	6.3	3.4	-29.2
	3	5.9	6.3	6.8	5.1	-13.6
	4	7.4	7.2	-2.7	6.8	- 8.1
=====						

a- tempo calculado pela fórmula:

$$t = \frac{(\log N_o - \log N_a) D}{k}$$

b- % de diferença entre o tempo experimental e o tempo calculado

c- tempo logarítmico calculado pela fórmula:

$$t = (\log N_o - \log N_a) D$$

d- % de diferença entre os valores referentes ao tempo logarítmico e o tempo experimental

=====

QUADRO 15- COMPARAÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL REQUERIDO PARA CAUSAR UM DETERMINADO NÚMERO DE REDUÇÕES DECIMAIS DOS ASCOSPOROS DE *N. fischeri*, COM OS TEMPOS CALCULADOS PELA EQUAÇÃO DE LINEARIZAÇÃO E OS TEMPOS CALCULADOS CONSIDERANDO ORDEM LOGARÍTMICA DE MORTE (múltiplos do valor D)

TEMP.	NÚMERO	TEMPO	TEMPO		TEMPO	
	REDUÇÕES			b		d
^o			a	%	c	%
(C)	DECIMAIS	EXPER.	CALC.		LOG.	
80	2	296.7	298.6	0.6	119.0	-59.9
	3	328.3	350.9	6.9	177.6	-45.9
	4	376.7	394.0	4.6	238.0	-36.8
85	2	52.5	60.5	15.2	29.0	-44.8
	3	63.9	71.4	11.7	43.5	-31.9
	4	79.3	80.4	1.4	58.0	-26.9
90	2	7.3	7.7	5.5	5.2	-29.0
	3	8.7	9.1	4.6	7.8	-10.6
	4	10.4	10.3	-1.0	10.4	0.0
93	2	1.6	1.7	6.3	1.0	-37.5
	3	2.0	2.1	5.0	1.5	-25.0
	4	2.3	2.5	8.7	2.0	-13.0

a- tempo calculado pela fórmula:

$$t = \frac{(\log N_0 - \log N) \cdot C}{k}$$

b- % de diferença entre o tempo experimental e o tempo calculado

c- tempo logarítmico calculado pela fórmula:

$$t = (\log N_0 - \log N) D$$

d- % de diferença entre os valores referentes ao tempo logarítmico e o tempo experimental

=====

QUADRO 16- COMPARAÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL REQUERIDO PARA CAUSAR UM DETERMINADO NÚMERO DE REDUÇÕES DECIMAIS DOS ASCOSPOROS DE *E. javanicum*, COM OS TEMPOS CALCULADOS PELA EQUAÇÃO DE LINEARIZAÇÃO E OS TEMPOS CALCULADOS CONSIDERANDO ORDEM LOGARÍTMICA DE MORTE (múltiplos do valor D)

=====

TEMP.	NÚMERO	TEMPO	TEMPO		TEMPO	
	REDUÇÕES			b		d
^o				%		%
(C)	DECIMAIS	EXPER.	CALC.		^c LOG.	
=====						
80	1	29.0	29.2	0.7	14.5	-50.0
	2	45.2	44.6	-1.3	29.0	-35.2
	3	56.2	57.4	2.1	43.5	-22.6

85	1	6.3	6.4	1.6	3.7	-41.3
	2	9.3	9.2	-1.1	7.4	-20.4
	3	11.3	11.6	2.7	11.1	-1.8

90	1	1.1	1.1	0.0	0.8	-27.3
	2	2.1	1.9	-9.5	1.6	-23.8
	3	2.6	2.6	0.0	2.4	-7.7

a- tempo calculado pela fórmula:

$$t = \frac{(\log N_0 - \log N) \cdot D}{k}$$

b- % de diferença entre o tempo experimental e o tempo calculado

c- tempo logarítmico, calculado pela fórmula:

$$t = (\log N_0 - \log N) \cdot D$$

d- % de diferença entre os valores referentes ao tempo logarítmico e o tempo experimental

resultados deste trabalho, obtidos com ascos íntegros, com alguns dados de resistência de ascosporos livres citados na literatura. Em nosso trabalho, para obtenção de uma redução de 3 ciclos logarítmicos no número inicial de ascos de *B. nivea*, foi necessário um tempo de aquecimento de 22.8 minutos a 90 °C. Estes resultados estão na faixa de resistência das 7 linhagens de *B. fulva* testadas por BAYNE & MICHENER (1979) e próximos aos valores obtidos por KING et alii (1979) onde o tempo calculado para a mesma redução foi de 35.0 minutos.

A comparação dos dados de resistência do *Eupenicillium javanicum*, com os resultados de experimento de VAN DER SPUY et alii (1975) em suco de maçã, mostram que a linhagem utilizada no presente trabalho foi mais resistente. Estes autores obtiveram um tempo de aquecimento de 20 minutos a 80 °C para destruição de 10⁶ ascosporos de *E. javanicum*, enquanto que, para redução de três ciclos logarítmicos da cepa selecionada neste trabalho, foi necessário um aquecimento de 56.2 minutos a 80 °C.

As curvas de sobreviventes de *T. flavus* às temperaturas de 75, 80, 85 e 90 °C, são mostradas na Figura 16. Foi determinada a resistência térmica a 75 °C, devido à conformação da curva de sobreviventes calculada a 80 °C, que se aproximava muito de uma reta, indicando um possível comportamento logarítmico de inativação deste fungo. Como os resultados do teste a 75 °C também indicaram um comportamento praticamente logarítmico, o cálculo da resistência térmica deste fungo foi feito à partir do valor de D, pela regressão linear das curvas de sobreviventes (Figura 17). Os valores de D para as quatro temperaturas são mostrados no Quadro 17.

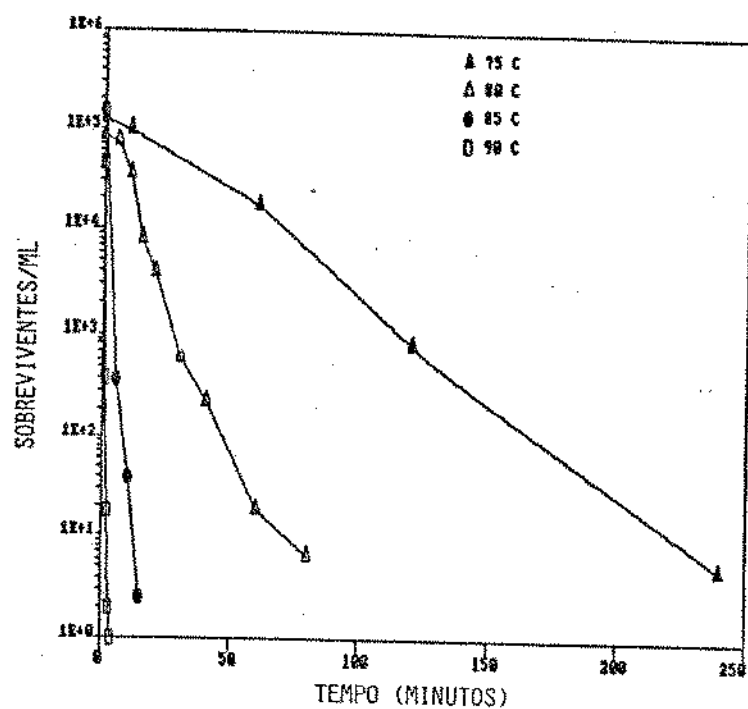


FIGURA 16 - CURVAS DE SOBREVIVENTES DE ASCOSPOROS DE *TALAROMYCES FLAVUS* AQUECIDOS A 75, 80, 85 E 90°C EM SUCO DE MORANGO PELO MÉTODO DO FRASCO DE TRÊS BOCAS.

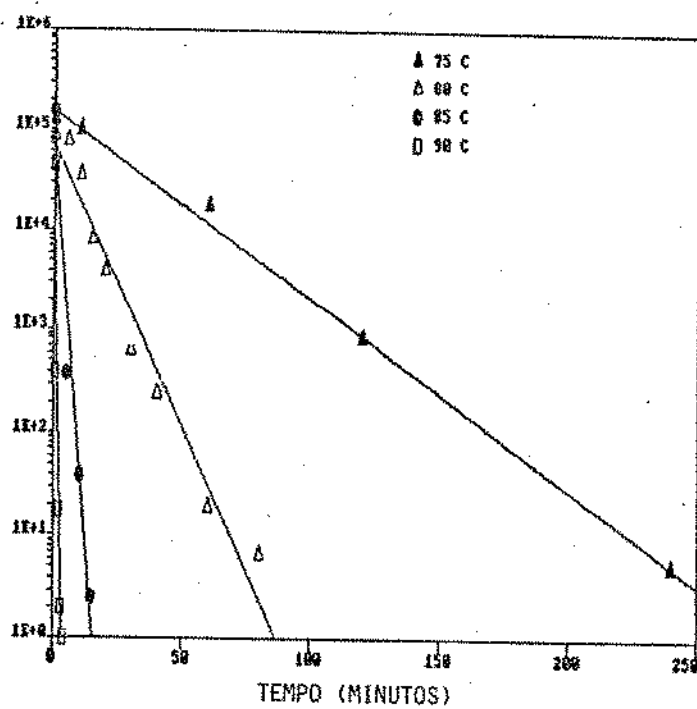


FIGURA 17 - CURVAS DE SOBREVIVENTES DE ASCOSPOROS DE *TALAROMYCES FLAVUS* LINEARIZADAS POR REGRESSÃO LINEAR

=====

QUADRO 17-CÁLCULO DO VALOR D E SEUS RESPECTIVOS COEFICIENTES DE

CORRELAÇÃO PARA T. flavus, ÀS TEMPERATURAS DE 75, 80,

85 E 90 °C

=====

TEMPERATURA	VALOR	COEF.
(°C)	D(min)	DE
		CORREL.
75	53.9	0.998
80	17.9	0.982
85	3.3	0.972
90	0.9	0.962

=====

Quando os tempos requeridos para causar um determinado número de reduções decimais (múltiplos de D), foram comparados aos tempos experimentais, foi observado que a porcentagem de diferença entre eles variava de -5.4 a 125%, como pode ser observado no Quadro 18.

Na tentativa de uma maior aproximação dos cálculos aos valores experimentais de tempo de redução, foi utilizado o método de linearização de ALDERTON & SNELL (1970) empregado anteriormente para os outros fungos em estudo.

A Figura 18 apresenta o gráfico utilizado para o cálculo de "a", cujo valor é 0.833, com um coeficiente de correlação de 0.999. As curvas de sobreviventes linearizadas pelo expoente "a", para as quatro temperaturas, são mostradas na Figura 19 com as equações das curvas para cada temperatura (eq. 16 a 19) e o Quadro 19 mostra os valores de k e C, à cada temperatura, com seus respectivos coeficientes de correlação.

Ainda no Quadro 18, os valores de tempo obtidos à partir dos dados experimentais são comparados aos calculados à partir da linearização. Pode ser observado que a porcentagem de diferença

=====

QUADRO 18- COMPARAÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL REQUERIDO PARA CAUSAR UM DETERMINADO NÚMERO DE REDUÇÕES DECIMAIS DOS ASCOSPOROS DE *T. flavus*, COM OS TEMPOS CALCULADOS PELA EQUAÇÃO DE LINEARIZAÇÃO E OS TEMPOS CALCULADOS CONSIDERANDO-SE ORDEM LOGARÍTMICA DE MORTE (múltiplos do valor D)

=====

TEMP.	NÚMERO	TEMPO	TEMPO		TEMPO	
	REDUÇÕES			b		d
^o				%		%
(C)	DECIMAIS	EXPER.	CALC.		^c	
					LOG.	
=====						
75	2	114.0	121.0	6.1	107.8	- 5.4
	3	167.0	171.1	2.5	161.7	- 3.2
	4	221.0	218.3	-1.2	215.6	- 2.4

80	2	28.2	35.9	27.3	35.8	27.0
	3	47.6	53.0	11.3	53.7	12.8
	4	74.1	69.2	-6.6	71.6	- 3.4

85	2	3.8	2.1	-44.7	6.6	73.7
	3	7.1	7.0	-1.4	9.9	39.4
	4	11.7	11.6	-0.9	13.2	12.8

90	2	0.8	0.6	-25.0	1.8	125.0
	3	1.4	1.8	28.6	2.7	92.9
	4	2.1	2.9	38.1	3.6	71.4

a- tempo calculado pela equação:

$$t = \frac{(\log N - \log N) \frac{a}{o}}{k} - \frac{C}{k}$$

b- % de diferença entre o tempo experimental e o tempo calculado

c- tempo logarítmico calculado pela equação:

$$t = (\log N - \log N) \frac{D}{o}$$

d- % de diferença entre os valores referentes ao tempo logarítmico e o tempo experimental.

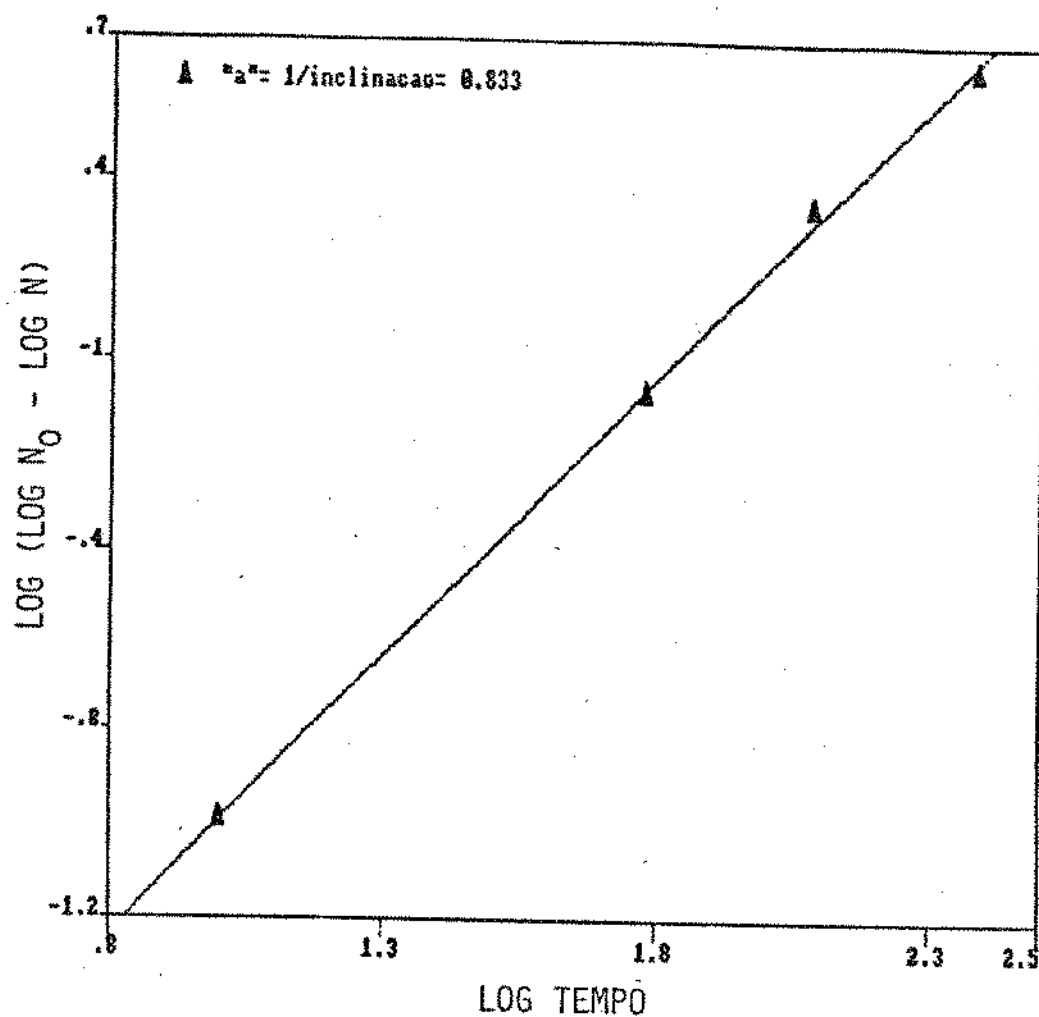


FIGURA 18 - DETERMINAÇÃO DO EXPOENTE "a" PARA *TALAROMYCES FLAVUS* A 75°C

$$\log (\log N_0 - \log N) = -2.21 + 1.200 \log t$$

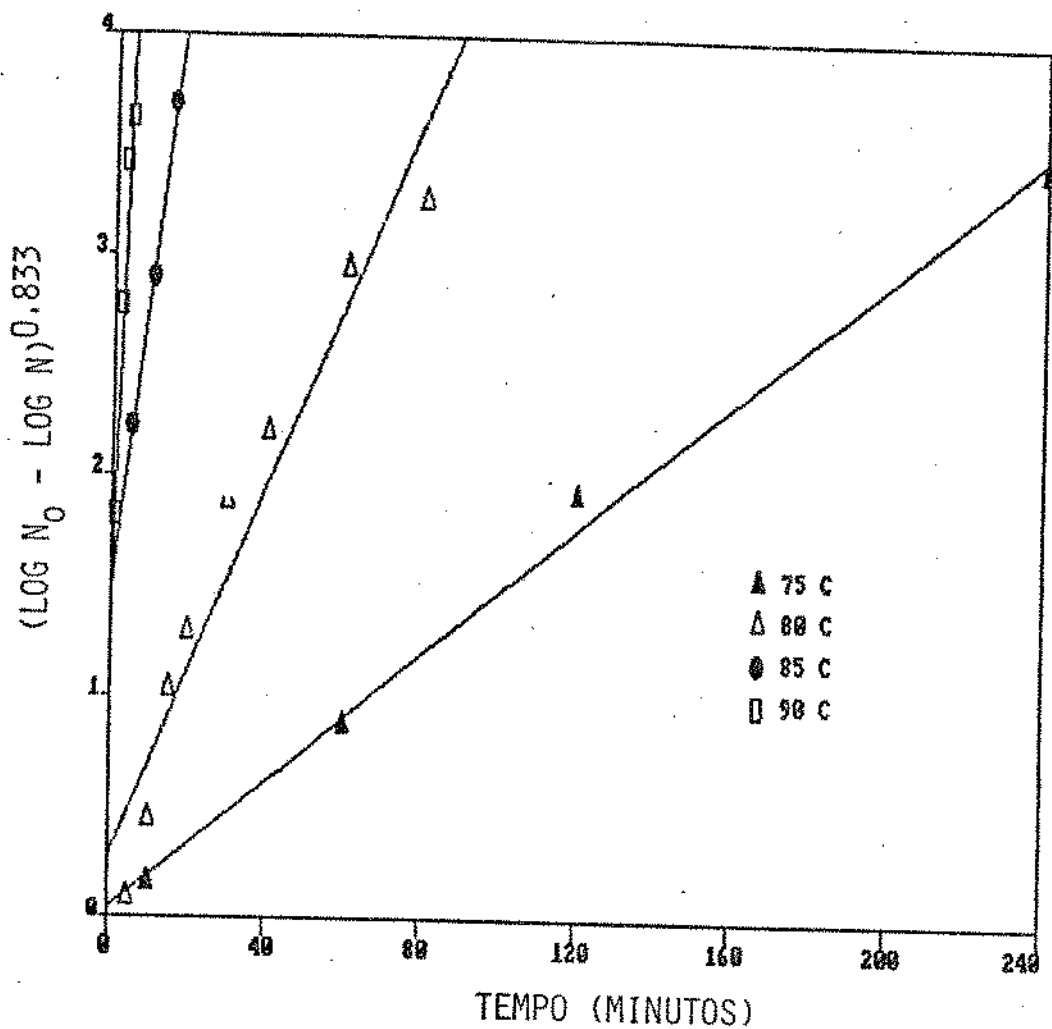


FIGURA 19 - CURVAS DE SOBREVIVENTES DE ASCOSPOROS DE *TALAROMYCES FLAVUS* LINEARIZADAS PELA FÓRMULA $(\text{LOG } N_0 - \text{LOG } N)^a = \text{KT} + \text{C}$

$$(\log N_0 - \log N) 0.833 = 0.0143 t + 0.051 \quad (\text{para } 75^\circ \text{C}) \quad \text{eq. 16}$$

$$(\log N_0 - \log N) 0.833 = 0.0418 t + 0.282 \quad (\text{para } 80^\circ \text{C}) \quad \text{eq. 17}$$

$$(\log N_0 - \log N) 0.833 = 0.1456 t + 1.479 \quad (\text{para } 85^\circ \text{C}) \quad \text{eq. 18}$$

$$(\log N_0 - \log N) 0.833 = 0.5971 t + 1.413 \quad (\text{para } 90^\circ \text{C}) \quad \text{eq. 19}$$

=====

QUADRO 19- VALORES DE k E C PARA *T. flavus* ÀS TEMPERATURAS DE 75, 80, 85 E 90 °C, E SEUS RESPECTIVOS COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO

=====

TEMPERAT. (°C)	k	C	* r
75	0.0143	0.051	0.998
80	0.0418	0.282	0.966
85	0.1456	1.479	0.999
90	0.5971	1.413	0.962

=====

* coeficiente de correlação entre:

$(\log N_0 - \log N) \times \text{Tempo}$
para determinação de k e C

entre eles varia de -44.7 a 38.1%. Os tempos de redução do número de sobreviventes, calculados pela linearização das curvas, não estão muito próximos dos dados experimentais, embora estejam mais próximos do que os tempos calculados à partir da consideração de ordem logarítmica de morte, devido a maior porcentagem de diferença apresentada pelos dados deste último método.

A linhagem de *Talaromyces flavus* apresentou resultados de resistência térmica superiores aos obtidos por KATAN (1985), que testou a resistência deste fungo em solução aquosa. Outros autores, entretanto, apresentam dados de resistência de *T. flavus* superiores aos obtidos no presente trabalho, como é o caso de VAN

DER SPUY et alii (1975) e SCOTT & BERNARD (1987) trabalhando com suco de maçã, BEUCHAT (1986) trabalhando com derivados de morango e KING & HALBROOK (1987) utilizando meio de suspensão sintético.

Nas Figuras 20, 21, 22 e 23, são apresentados os gráficos de $-(\log k) \times T$ (C), cujo negativo da inclinação fornece os valores equivalentes a Z , que são chamados Z^* , para *B. nivea*, *N. fischeri*, *E. javanicum* e *T. flavus*, respectivamente.

O Quadro 20 apresenta os tempos requeridos para obtenção de 4 reduções decimais no número inicial de esporos, dos quatro fungos testados, utilizando-se 90°C como temperatura de referência. O estabelecimento de quatro reduções decimais foi baseado nas contagens totais de fungos termo-resistentes presentes nas 15 amostras de polpa de morango estudadas (Quadro 5), cuja média foi de 1.7×10^{-3} UFC/g, reduzindo a população final a 10^{-3} UFC/g. Podemos observar, entretanto, que para cobrir 4 reduções no número inicial de ascos de *Byssosclamyces nivea*, que foi o fungo mais resistente entre os testados, seria necessário um tratamento térmico de 26.6 minutos a 90°C , o que causaria total cozimento do produto. O tempo requerido por *B. nivea* foi 2.6 vezes superior ao requerido por *N. fischeri*, que foi o segundo mais resistente, e pelo menos 9.2 vezes superior ao requerido por *T. flavus*, que foi o menos resistente.

A maior resistência térmica de *Neosartorya fischeri* em relação ao *Talaromyces flavus*, obtida neste trabalho, não confirma resultados anteriores de BEUCHAT (1986) e SCOTT & BERNARD (1987).

Apesar do gênero *Eupenicillium* estar presente no maior

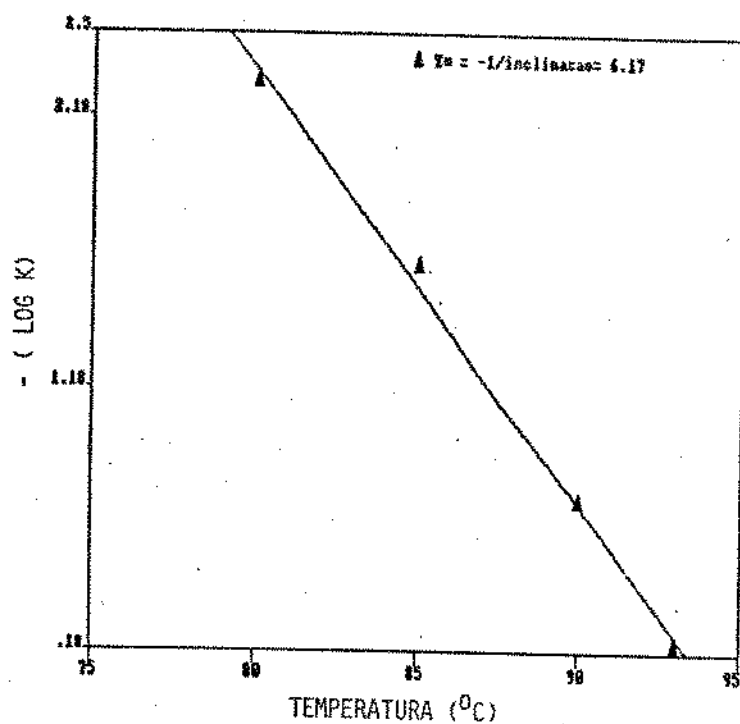


FIGURA 21 - DETERMINAÇÃO DO VALOR Z^* PARA *NEOSARTORYA FISCHERI*

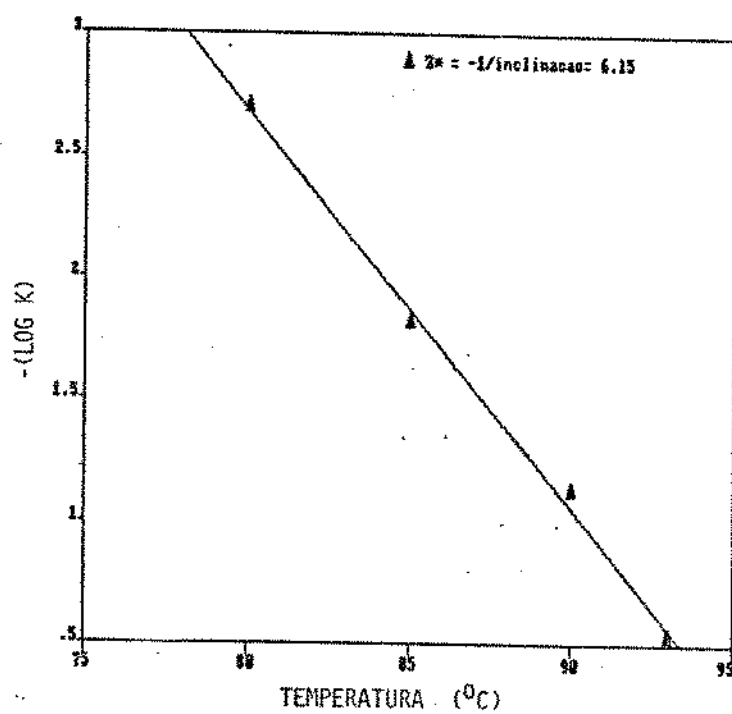


FIGURA 20 - DETERMINAÇÃO DO VALOR Z^* PARA *BYSSOCHLAMYS NIVEA*

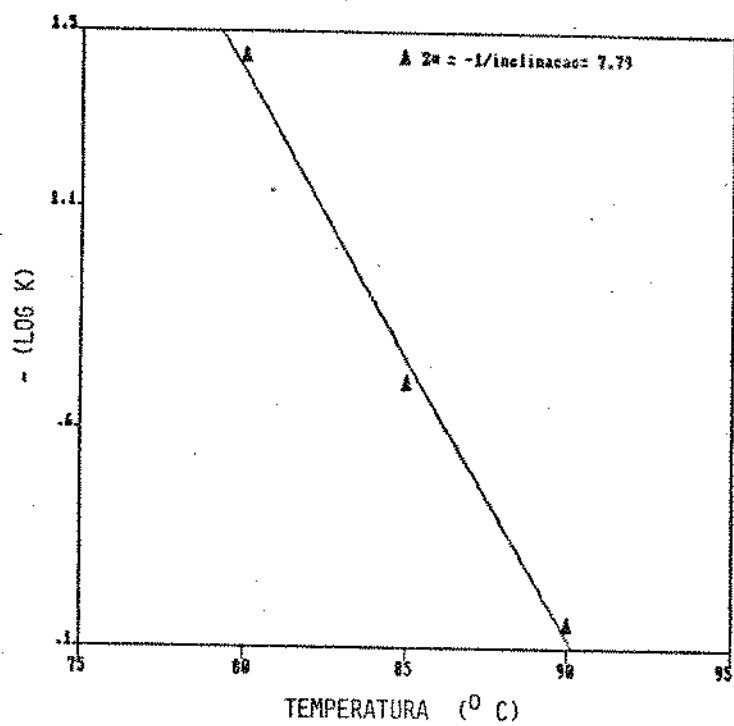


FIGURA 22 - DETERMINAÇÃO DO VALOR Z^* PARA *EUPENICILLIUM JAVANICUM*

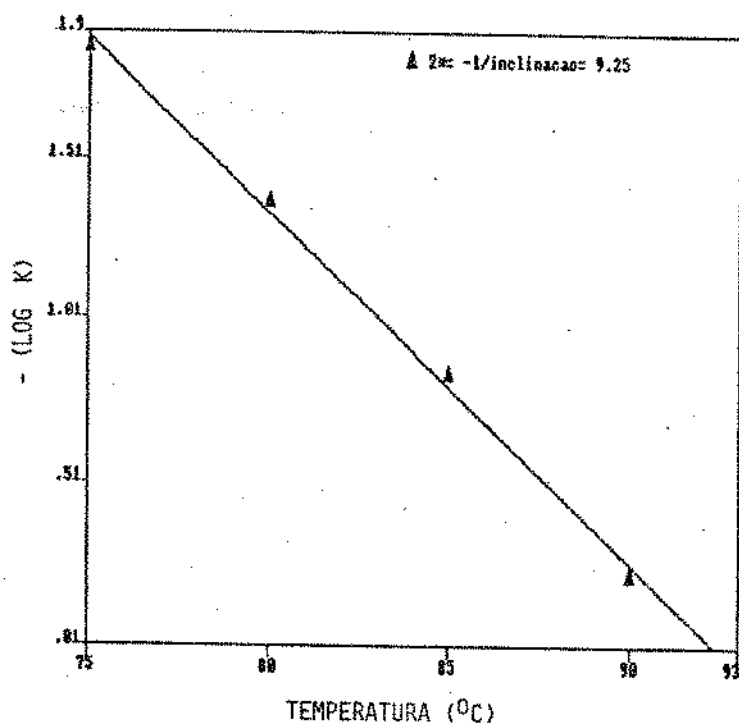


FIGURA 23 - DETERMINAÇÃO DO VALOR Z^* PARA *TALAROMYCES FLAVUS*

QUADRO 20- COMPARAÇÃO DOS TEMPOS CALCULADOS PARA INATIVAÇÃO DE
⁴ 10 ESPOROS/ML DE SUCO E VALORES DE Z^{*} E ENERGIA DE
 ATIVAÇÃO (Ea) PARA AS ESPÉCIES ESTUDADAS

ESPÉCIE	TEMPO (min.)	Z* (°C)	Ea (Kcal/mol)
	^D A 90 °C		
B. nivea	26.6	6.15	97.0
N. fischeri	10.3	6.17	96.5
E. javanicum	3.1	7.79	76.3
T. flavus	2.9	9.25	62.3

número de amostras examinadas (Quadro 8), a cepa de *Eupenicillium javanicum* selecionada apresentou baixa resistência térmica, principalmente em relação ao B. nivea. Isto nos leva a crer que, possivelmente seja este o motivo pelo qual este fungo é citado na literatura com menor frequência que os demais, como deteriorador de frutas e seus derivados.

No Quadro 20 são também apresentados os valores de Z^{*} e pode ser observado que B. nivea e N. fischeri apresentaram valores de Z^{*} similares, ou seja, têm a mesma resistência relativa à temperatura, sendo que sua resistência é mais dependente da mudança de temperatura que T. flavus, que apresentou o maior valor de Z^{*}, seguido de E. javanicum. O valor de Z^{*} obtido para B. nivea é próximo ao encontrado por KING et alii (1969) para B. fulva que foi de 6.1 °C. No caso de N.

fischeri o valor de Z^* encontrado é superior ao obtido por SCOTT & BERNARD (1987) cujo valor de Z^0 foi igual a 5.6 C e também superior aos valores Z para *N. fischeri* apresentado por BEUCHAT (1984) que variaram entre 3.2 e 5.0 C. VAN DER SPUY, et alii (1975) apresentam um valor Z para *Penicillium brefeldianum* (*Eupenicillium javanicum*) de 7.2 C que é próximo ao obtido no presente trabalho ($Z^* = 7.79$). O intervalo de variação do valor Z para *Talaromyces flavus* apresentado por SCOTT & BERNARD (1987) que foi de 5.2 a 12.9 C, engloba o valor obtido neste trabalho.

Os valores da energia de ativação para os quatro fungos são mostrados ainda, no Quadro 20. Estes valores foram calculados baseado na equação de Arrhenius (equação 4).

Os dados de resistência térmica das quatro cepas selecionadas, comparados aos tratamentos sugeridos para pasteurização de suco de morango, como, 91 C por 40 segundos (GOLDONI et alii, 1981) ou ainda um tratamento não superior a 90 C, como sugere PUT & KRUISWIJK (1964), confirmam que, quando presentes, estes fungos, principalmente *B. nivea*, podem sobreviver aos tratamentos usuais de pasteurização. Isto indica a necessidade de um trabalho de prevenção ou sensibilização dos esporos ao calor, para que seja evitada possível deterioração do produto.

IV.4.3. TRATAMENTO TERMOQUÍMICO

Conforme resultado do item IV.4.2., *B. nivea* foi o fungo mais resistente entre os testados neste trabalho, sendo então estudado o efeito de tratamentos termoquímicos para sensibilização de seus ascos ao calor.

As curvas de sobreviventes dos ascos de *B. nivea*, aquecidos a 85 C em suco de morango com e sem conservantes, são mostradas na Figura 24. Pode ser observado que, embora a suspensão de inóculo já tivesse sofrido um choque térmico para ativação dos ascos quando foi inoculada ao suco, os ascos continuaram a ser ativados, sendo que todas as curvas atingiram um número entre 1.2 a 2.2 X 10⁵ de ascos ativados/ml, aos 30 minutos de aquecimento.

Pode-se observar que o benzoato de sódio (BS) a 1000ppm foi o mais efetivo entre todas as concentrações de conservantes utilizadas, resultado que concorda com os apresentados por BEUCHAT (1976) trabalhando com *B. nivea*. O Quadro 21 mostra os tempos experimentais (tempo total de aquecimento) para redução da população em 2 e 4 ciclos logarítmicos, em suco com e sem conservantes. Notou-se que o efeito sensibilizador de BS foi maior no início, já que o tempo necessário para obtenção de duas

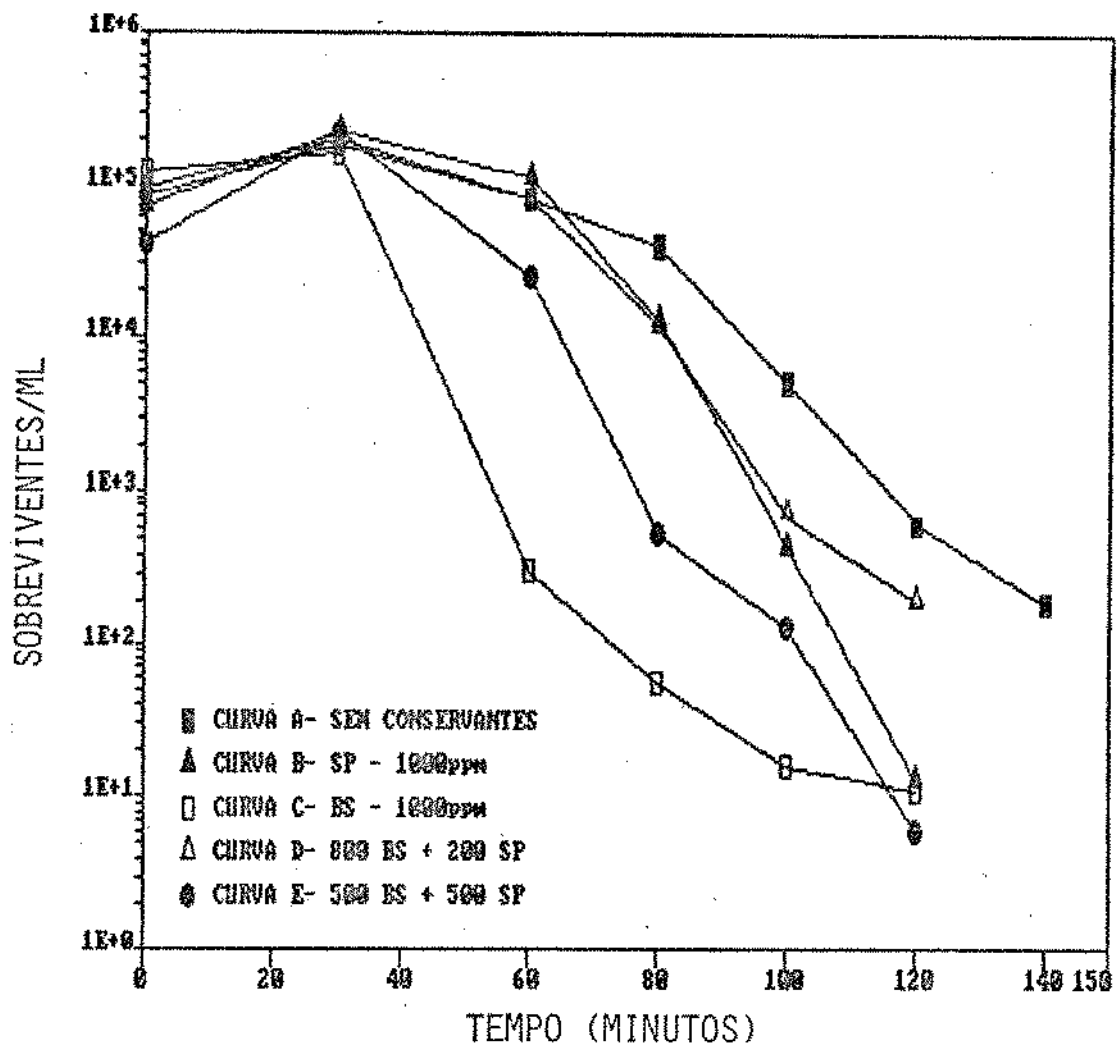


FIGURA 24 - CURVAS DE SOBREVIVENTES DE ASCOS DE *BYSSOCHLAMYS NIVEA* AQUECIDOS A 85°C EM SUCO DE MORANGO COM E SEM OS CONSERVANTES BENZOATO DE SÓDIO (BS) E SORBATO DE POTÁSSIO (SP).

=====

QUADRO 21- TEMPO DE AQUECIMENTO A 85 °C, REQUERIDO PARA OBTENÇÃO DE 2 E 4 REDUÇÕES DECIMAIS NO NÚMERO INICIAL DE ASCOS DE B. nivea, AQUECIDOS EM SUCO DE MORANGO COM E SEM ADIÇÃO DE CONSERVANTES

=====

CONCENTRAÇÃO DO CONSERVANTE	2		4	
	REDUÇÕES	^a %	REDUÇÕES	%
1000ppm BS	52.2	52.5	103.6	37.7
500ppm BS + 500ppm SP	72.8	33.7	111.9	32.7
1000ppm SP	90.6	17.5	117.3	29.4
800ppm BS + 200ppm SP	92.2	16.0	142.9	14.0
sem conservantes	109.8		166.2	

=====

a- porcentagem de diferença entre o tempo necessário para obtenção da redução em suco com e sem conservantes

BS- benzoato de sódio

SP- sorbato de potássio

reduções decimais foi 52.5% menor que o requerido no aquecimento sem conservante, e que, para 4 reduções decimais, esta porcentagem decresceu para 37.7%.

Quando as curvas resultantes do efeito sinérgico do calor e da ação conjunta de sorbato e benzoato, são observadas, na Figura 24, nota-se que não houve uma relação direta entre a concentração dos conservantes e sua ação de destruição. Isto é demonstrado pela comparação da curva E, que representa a ação conjunta de 500ppm de cada conservante, com a curva D, que foi

resultado da ação de 800ppm de benzoato + 200ppm de sorbato. A curva E está localizada praticamente no meio das curvas B e C, que são as curvas correspondentes a 1000ppm de cada conservante, indicando uma possível proporcionalidade entre a concentração e o efeito sinérgico resultante. Quando as concentrações foram variadas para confirmar este fenômeno (curva D), o resultado esperado era que esta se aproximasse da curva C, já que possuía maior concentração de benzoato, o que, entretanto, não ocorreu.

Os resultados indicam que há outros efeitos mais complexos influenciando a ação de conservantes sob aquecimento, efeitos esses que não foi possível elucidar com os dados obtidos. O estudo da ação conjunta de conservantes e calor é importante pois na indústria são adicionados na formulação do produto, antes do processamento.

Os tratamentos termoquímicos aplicados ao B. nivea a 85 C não causaram uma redução significativa no tempo de processamento térmico de suco de morango. Isto deveu-se ao fato de nenhum destes tratamentos produzir efeito sensibilizador dos esporos, antes de aproximadamente 40 minutos de aquecimento. Após este período, a maior destruição foi obtida pela adição de 1000ppm de BS.

Os dados indicam a necessidade de efetuar-se, em trabalhos futuros nesta área, uma avaliação do efeito do tratamento termoquímico a uma temperatura acima de 85 C e abaixo de 90 C. Este intervalo foi selecionado com base no fato de que, acima de 85 C tentar-se-ia evitar o fenômeno da ativação dos esporos, observado a 85 C mas não a 90 C (Figura 7), e não se atingiria a

temperatura de 90^o C, como sugere PUT & KRUISWIJK (1964).
Observa-se ainda a necessidade de que se efetuem, paralelamente, análises sensoriais do suco, para verificação de possíveis alterações de sabor causadas pela adição de conservantes, o que não foi realizado neste trabalho devido à extensão do mesmo. Adicionalmente, seria importante a pesquisa de outros ácidos orgânicos, que tivessem ação rápida, aumentando a sensibilidade dos esporos logo no início do aquecimento.

V- CONCLUSÕES

- 1- Das amostras de polpa de morango analisadas, foram isolados, entre outras cepas, os quatro gêneros de fungos perfeitos normalmente indicados como deterioradores de frutas e derivados, que são *Byssochlamys*, *Neosartorya*, *Talaromyces* e *Eupenicillium*.
- 2- O gênero *Eupenicillium* foi o que apresentou maior incidência entre os isolados, seguidos por espécies de *Talaromyces*.
- 3- Todas as espécies selecionadas tiveram seus esporos ativados pelo calor. A cepa mais favorecida por esta ativação foi *Talaromyces flavus* var. *flavus*.
- 4- Para evitar interferências de possível aglomeração da polpa, durante o estudo da resistência térmica em sucos, devem ser utilizados métodos que empreguem agitação, como é o caso do método do frasco de três bocas.
- 5- *Byssochlamys nivea* apresentou a maior resistência térmica entre as cepas selecionadas, seguida de *Neosartorya fischeri*, *Eupenicillium javanicum* e *Talaromyces flavus*.

- 6- A resistência térmica apresentada por *Byssochlamys nivea*, *Neosartorya fischeri* e *Eupenicillium javanicum* foi, em geral, igual ou superior às normalmente relatadas na literatura.
- 7- As curvas de sobreviventes dos fungos termo-resistentes estudados não apresentaram comportamento logarítmico, principalmente a temperaturas abaixo de 85 C.
- 8- O método de linearização de ALDERTON & SNELL (1970) forneceu resultados mais próximos aos dados experimentais do que o cálculo do valor D, considerando-se ordem logarítmica de morte.
- 9- A alta resistência térmica do *Byssochlamys nivea* indica a necessidade de aplicação de métodos de prevenção da contaminação ou de sensibilização de esporos nos produtos de morango, pois a aplicação exclusiva de calor, às temperaturas normalmente empregadas na pasteurização, provavelmente não eliminará o problema.
- 10- Entre os tratamentos termoquímicos testados o mais efetivo para sensibilização dos ascos de *Byssochlamys nivea* ao calor, sob aquecimento a 85 C, foi a adição de 1000ppm de benzoato de sódio.
- 11- Todas as espécies inoculadas no suco de morango, em condições

de aerobiose, germinaram e produziram colônias em 72 horas de incubação a 30^o C.

12- *Byssochlamys nivea* foi o único que se desenvolveu em tubo com baixa tensão de oxigênio, ou seja, selado com vaspar e foi observada posterior produção de gás.

VI- ANEXO 1

Formulação e preparo dos meios e soluções utilizadas neste trabalho.

1- Solução do corante rosa de bengala

- rosa de bengala 8.3 mg
- água destilada 10.0 ml

O corante foi dissolvido na água e posteriormente esterilizado por filtração, através de seringa Millipore estéril, e coletado em tubo de rosca estéril.

2- Meio Batata Dextrose Agar (B.D.A.)

- infusão de batatas- 4 g
- dextrose 20 g
- Agar-agar 30 g
- água destilada 1000 ml
- pH 5.6

Esterilizado em autoclave a 121 °C / 15 minutos

3- Meio Czapeck Agar

- sacarose 30.0 g
- nitrato de sódio 3.0 g

- fosfato bibásico de potássio 1.0 g
- sulfato de magnésio- 7 H₂O 0.5 g
- cloreto de potássio 0.5 g
- sulfato de ferro- 7H₂O 0.01g
- agar 15.0 g
- água destilada 1000 ml
- pH 7.3

Esterilizado em autoclave a 121 °C / 15 minutos.

4- Meio Extrato de Malte Agar (M.E.A.)

- extrato de malte 20.0 g
- peptona 1.0 g
- dextrose 20.0 g
- agar 15.0 g
- água destilada 1000 ml
- pH 5.5

Esterilizado em autoclave a 121 °C / 15 minutos

5- Corante Azul de Amann

- ácido fênico 10.0 g
- glicerina 10.0 ml
- ácido láctico 10.0 ml
- corante azul de algodão 0.02 a 0.05g
- água destilada 10.0 ml

6- Suco de Morango

- polpa de morango 300 g
- água destilada 1000 ml

- açúcar invertido a 85 Brix até que o suco atinja 15 Brix
- acidez: 10 g/l de ácido cítrico
- pH 2.9 - 3.0
- Esterilizado em autoclave a 121 C / 15 minutos.

ANEXO 2

Ilustrações de algumas das estruturas identificadas.

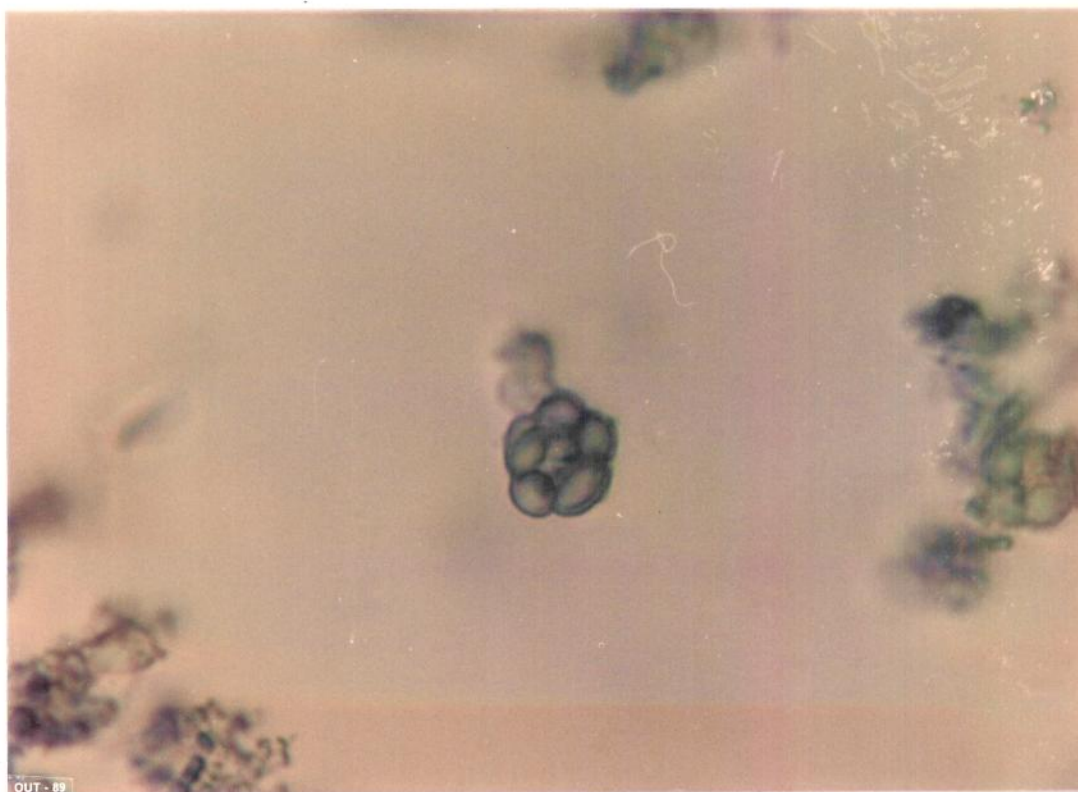


FOTO 1- Asco de *Byssochlamys nivea*

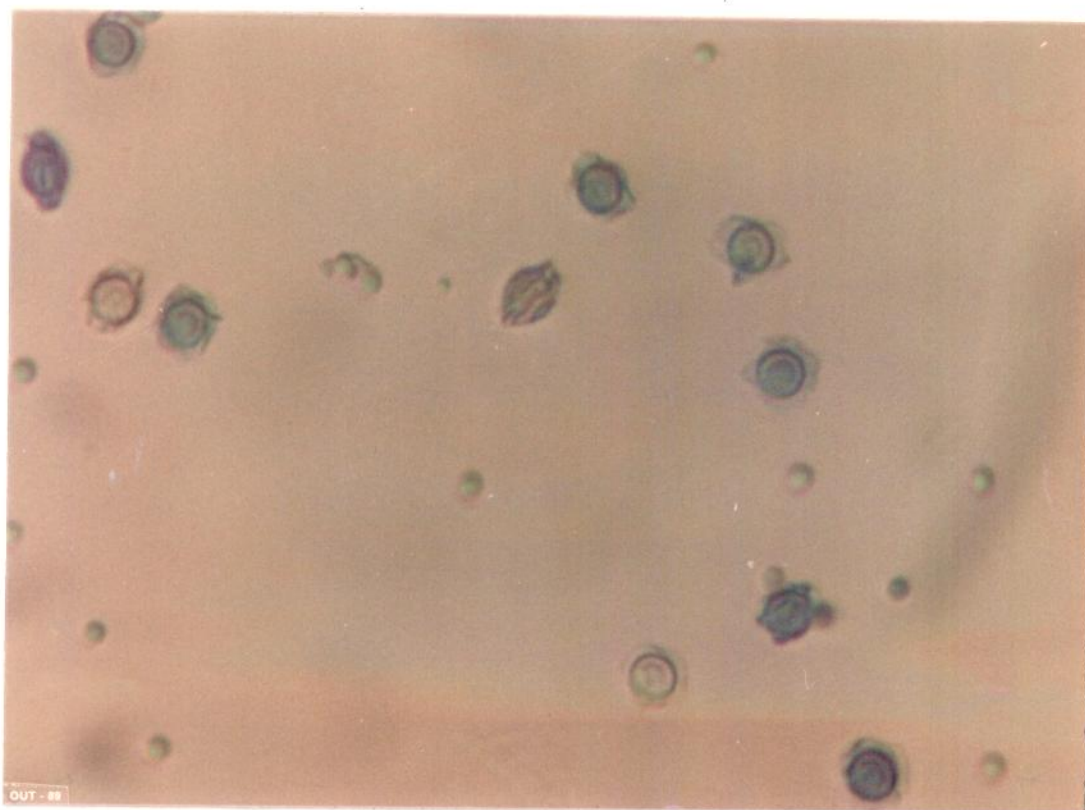


FOTO 2 - Ascosporos de *Neosartorya fischeri*



FOTO 3 - Cleistotécio de *Eupenicillium javanicum*

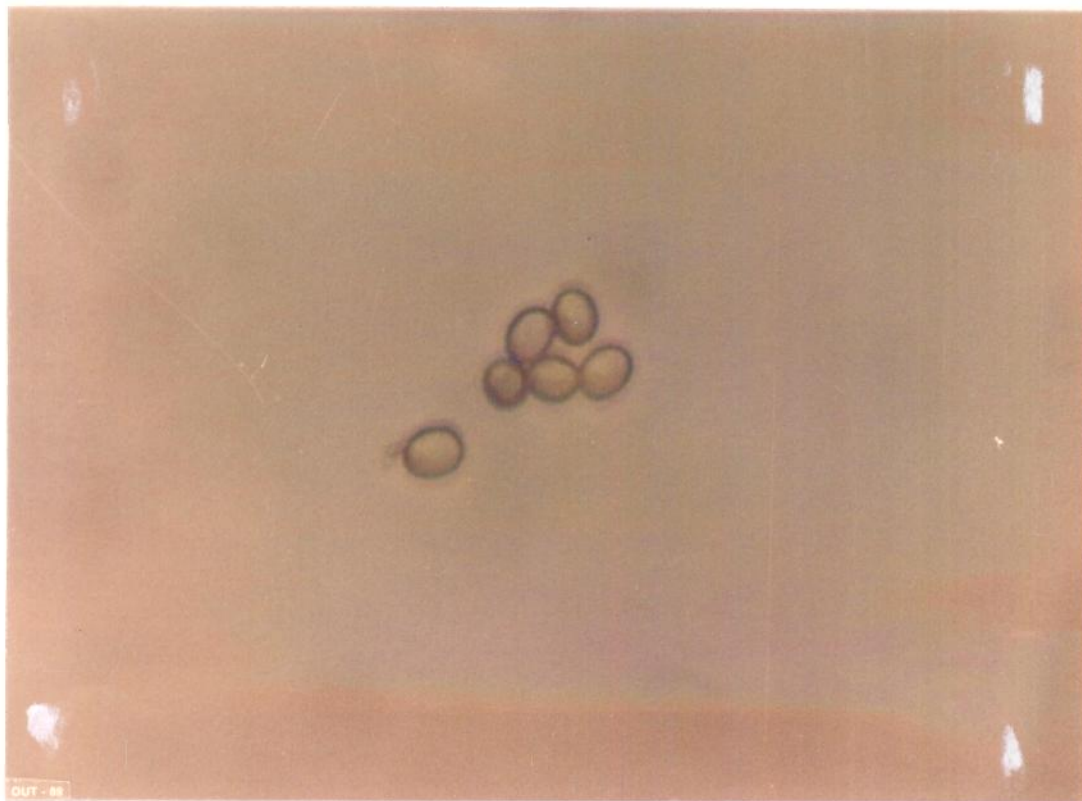


FOTO 4 - Ascosporos de *Talaromyces flavus*

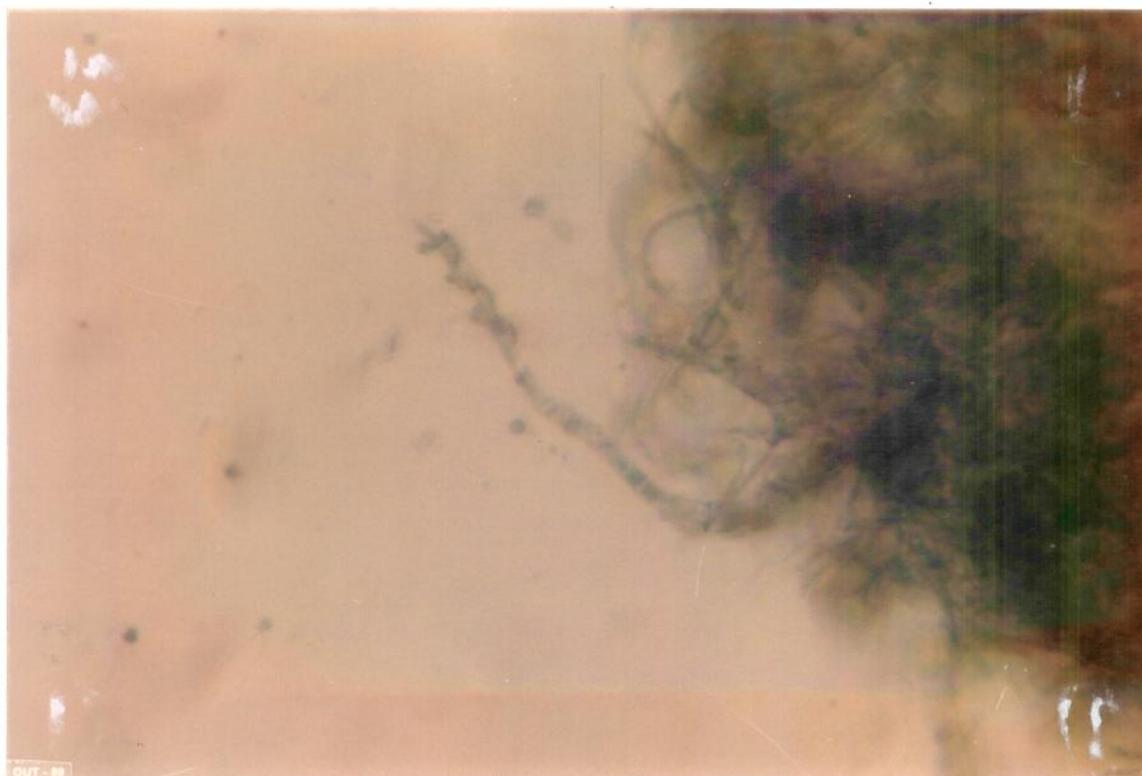


FOTO 5 - Célula Ascógena *Talaromyces flavus*

VII-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AINSWORTH, G.C.; SPARROW, F.K.; SUSSMAN, A.S. The Fungi. An Advanced Treatise. Vol. IV-A. A Taxonomic Review with Keys: Ascomycetes and Fungi Imperfect. Academic Press. New York and London, 1973.
- ALDERTON, J.; SNELL, N. Chemical States of Bacterial Spores: heat resistance and its kinetics at intermediate water activity. *Appl. Microbiol.* 19:565-572, 1970.
- ANTUNES, A.J.; CANHOS, V.P. Aditivos em alimentos. Apostila da Secretaria da Ind., Com. e Tec.- Coordenadoria da Ind. e Com.- Governo do Estado de São Paulo.
- BANNER, M.J.; MATTICK, L.R.; SPLITTSTOESSER, D.F. Chemical Composition of the ascospores of *B. fulva*. *J. of Food Sci.* 44(2):545-548, 1979.
- BAYNE, H.G.; MICHENER, H.D. Heat Resistance of *Byssochamys* Ascospores. *Appl. and Environ. Microb.* 37(3):449-453, 1979.

- BARRON, G.L. The Genera of Hyphomycetes from soil. Robert E. Krieger Publishing Company, 51-52, 1972.
- BEUCHAT, L.R. Effectiveness of Various Food Preservatives in Controlling the Outgrowth of *Byssosclamyces nivea* ascospores. *Mycopathologia* 59(3):175-178, 1976.
- BEUCHAT, L.R. Combined Effects of Solutes and Food Preservatives on Rates of Inactivation of and Colony Formation by Heated Spores and Vegetative Cells of Molds. *Appl. Environ. Microb.* 41(2):472-477, 1981a.
- BEUCHAT, L.R. Synergistic Effects of Potassium Sorbate and Sodium Benzoate on Thermal Inactivation of Yeasts. *J. Food Sci.* 46(3):771-777, 1981b.
- BEUCHAT, L.R. Extraordinary Heat Resistance of *Talaromyces flavus* and *Neosartorya fischeri* Ascospores in Fruit Products. *J. Food Sci.* 51(6):1506-1510, 1986.
- BEUCHAT, L.R. Influence of Organic Acids on Heat Resistance Characteristics of *Talaromyces flavus* Ascospores. *Int. J. of Food Microb.* 6:97-105, 1988.
- BEUCHAT, L.R.; RICE, S.L. *Byssosclamyces* spp. and Their Importance in Processed Fruits. *Adv. in Food Res.* 25:237-289, 1979.

- BEUCHAT, L.R.; TOLEDO, R.T. Behaviour of *Byssoschlamys nivea* Ascospores in Fruits Syrups. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 68(1):65-71, 1977.
- BROWN, A.H.S.; SMITH, G. The Genus *Paecilomyces* Bainier and its Perfect Stage *Byssoschlamys* Westling. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 40(11):17-89, 1957.
- CARTWRIGHT, P.; HOCKING, A.D. *Byssoschlamys* in Fruit Juices. *Food Tech. in Aust.* 36(5):210-211, 1984.
- CHANDER, H.; KLOSTERMEYER, H. Production of Lipase by *Byssoschlamys fulva*. *J. of Food Protection* 46(8):707-709, 1983.
- CHU, F.S. Studies of the Fungus *Byssoschlamys fulva*. In: *Byssoschlamys Seminar Abstracts*, Res. Circ. 20. Dept. of Food Sci. and Tech. New York State Agric. Exp. Station, Geneva, Cornell University, N.Y., 3-4, 1969.
- CHU, F.S.; NEI, P.Y.W.; LEUNG, P.S.C. *Byssoschlamyopeptidase A*, a Renin-like Enzyme Produced by *Byssoschlamys fulva*. *Appl. Microb.* 25(2):163-168, 1973.
- CIEGLER, A.; BECKWITH, A.C.; JACKSON, L.K. Teratogenicity of Patulin and Patulin Aducts Formed with Cysteine. *Appl. Environ. Microb.* 31:664-667, 1976.
- CIEGLER, A.; DETROY, R.W.; LILLEHOJ, E.B. Patulin, Penicilic Acid,

- and Other Carcinogenic Lactones. *Microb. Toxins* 6:409-434, 1971. APUD: BEUCHAT, L.R.; RICE, S.L.. *Byssoschlamys* spp. and their importance in Processed Fruits. *Adv. in Food Res.* 25:237-289, 1979.
- CONNER, D.E.; BEUCHAT, L.R. Heat Resistance of Ascospores of *Neosartorya fischeri* as Affected by Sporulation and Heating Medium. *Int. J. of Microb.* 4:303-312, 1987.
- CONNER, D.E.; BEUCHAT, L.R.; CHANG, C.J. Age-Related Changes in Ultrastructure and Chemical Composition Associated with Changes in Heat Resistance of *Neosartorya fischeri* Ascospores. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 89(4):539-550, 1987.
- COUTINHO, A.O. Contaminação de Sucos Industrializados por Dióxido de Enxofre. *Bol. SBQIA*, 21(3/4):188-191, 1987.
- DRAGONI, I.; COMI, G. Presenza di Muffe e Lievit in Succhi di Frutta Prodotti Industrialmente. *Indust. delle Bevande* 14(80):599-601, 1985.
- DOMSCH, K.H.; GAMS, W.; ANDERSON, T.H. *Compendium of Soil Fungi*. Vol. 1. Academic Press, 1980.
- DZIEZAK, J.D. Preservatives: Antimicrobial Agents. A means toward product stability. *Food Tech.* 40(9):104-111, 1986.

- EIROA, M.N.U.; AMSTALDEN, V.C. Ocorrência de Espécies de *Byssochlamys* em Hortas, Pomares e Vinhedos da Região de Campinas. Col. IIAL, Campinas. 15:61-70, 1985.
- FRAVEL, D.R.; ADAMS, P.B. Estimulation of United States and World Distribution of *Talaromyces falvus*. *Mycologia*, 78(4):684-686, 1986.
- GOLDONI, J.S.; CEREDA, M.P.; CEREDA, E.; CAGLIARI, A.M. Variação do Teor de Ácido Ascórbico em Suco Integral Durante Armazenamento pelo Frio. I. Morango [*Fragaria* sp.]. *Assoc. Bras. das Ind. de Alim. (A.B.I.A.)*: 24-30, (Ago)1981.
- HATCHER, W.S.; WEINE, J.L.; MURDOCK, D.I.; FOLINAZZO, J.F.; HILL, E.C.; ALBRIGO, L.G. Growth Requirements and Thermal Resistance of Fungi Belonging to the enus *Byssochlamys*. *J. Food Sci.* 44(1):118-122, 1979.
- HERSON, A.C.; HULLAND, E.D. In: *Conservas Alimentícias - Procesado Termico Y Microbiologia*. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza (Espana), 1980.
- HOCKING, A.D.; PITT, J.I. Food Spoilage Fungi. II- Heat-Resistant Fungi. *CSIRO Food Res. Quat.* 44(4):73-82, 1984.
- HULL, R. Studies of *Byssochlamys fulva* and Control Measures in Processed Fruit. *Ann. Appl. Biol.* 26:800-822, 1939. APUD: HOCKING, A.D.; PITT, J.I. Food Spoilage Fungi. II. Heat-

Resistant Fungi. CSIRO Food Res. Q. 44(4):73-82, 1984.

-ITO, K.A.; SEEGER, M.L.; LEE, W.H. The Destruction of *Byssochlamys fulva* Asci by Low Concentrations of Gaseous Methyl Bromide and by Aqueous Solutions of Chlorine, and Iodophor and Peracetic Acid. J. Appl. Bact. 35:479-483, 1972.

-JONES, D.; WILSON, M.J. Scanning Electron Microscopy and X-Ray Diffraction of Crystals of the Macrolide Dilactone Antibiotic, Vermiculine, Accumulating in Shake Cultures of *Talaromyces wortmannii*. Trans. Br. Mycol. Soc. 88(2):257-288, 1987.

-KATAN, T. Heat Activation of Dormant Ascospores of *Talaromyces flavus*. Trans. Brit. Mycol. Soc. 84:748-750, 1985.

-KAVANAGH, J.; LARCHET, N.; STUART, M. Occurrence of Heat-Resistant species of *Aspergillus* in Canned Strawberries. Nature 198:1322, 1963.

-KING Jr., A.D.; MICHENER, H.D.; ITO, K.A. Control of *Byssochlamys* and Related Heat-Resistant Fungi in Grape Products. Appl. Microb. 18(2):166-173, 1969.

-KING Jr., A.D.; BOOTH, A.N.; STAFFORD, A.E.; WAISS Jr., A.C. *Byssochlamys fulva*, Metabolite Toxicity in Laboratory Animals. J. Food Sci. 37:86-89, 1972.

- KING Jr., A.D.; BAYNE, H.G.; ALDERTON, G. Nonlogarithmic Death Rate Calculations for *Byssochlamys fulva* and Other Microorganisms. *Appl. Environ. Microb.* 32(3):596-600, 1979.
- KING Jr., A.D.; HALBROOK, W.U. Ascospore Heat-Resistance and Control Measures for *Talaromyces flavus* Isolated from Fruit Juice Concentrate. *J. Food Sci.* 52(5):1252-1254, 1987.
- KRAMER, R.K.; DAVIS, N.D.; DIENER, U.L. Byssotoxin A, A Secondary Metabolite of *Byssochlamys fulva*. *Appl. Environ. Microbiol.* 31:249-253, 1976.
- KURMANN, J.A.; RASIC, J.Lj. Yogurt: Scientific Grounds Technology and Manufacture. Switzerland, 1978.
- LOVETT, J.; PEELER, J.T. Effect of pH on the Thermal Destruction Kinetics of Patulin in Aqueous Solution. *J. Food Sci.* 38(6):1094-1095, 1973.
- MALLOCH, D.; CAIN, R.F. The Trichocomataceae: Ascomycetes with *Aspergillus*, *Paecilomyces* & *Penicillium* Imperfect States. *Can. J. of Botany* 50:2613-2627, 1972.
- MAUNDER, D.T. Summary of Work on Spoilage Problems Caused by Molds of the *Byssochlamys*-*Paecilomyces* group. In: *Byssochlamys Seminar Abstracts*. Res. Circ. 20, Dept. of Food Sci. and Tech., New York State Agric. Exp. Station, Geneva, Cornell University, N.Y., 1969.

-MENDOZA, S.; MONTEMAYOR, L.; BOSCAN, L.A.; BARREIRO, J.A. Microflora en Jugos de Frutas Pasteurizados Venezolanos. *Archiv. Latinoamericano de Nutricion*, 32(3): 617-629, 1982.

-MICHENER, H.D.; KIG Jr., D. Preparation of Free Heat-Resistant Ascospores from *Byssosclamyces* Asci. *Appl. Microb.*, 22(4):671-673, 1974.

-MINISTÉRIO DA SAÚDE- Normas Técnicas Especiais Sobre o Emprego de Aditivos em Alimentos. Aprovado pelo Decreto n. 55.871 de 26/01/1965. Revisada na Resolução n^o 4 de 24 de novembro de 1988.

-MURDOCK, D.I.; HATCHER Jr., W.S. A Simple Method to Screen Fruit Juice and Concentrates for Heat-Resistant Mold. *J. of Food Protection* 41(4):254-256, 1978.

-NIELSEN, P.V.; BEUCHAT, L.R.; FRISVAD, J.C. Growth of and Fumitremorgin Production by *Neosartorya fischeri* as Affected by Temperature, Light, and Water Activity. *Appl. Environ. Microb.*, 54(6):1504-1510, 1988.

-OLLIVER, M.; SMITH, G. *Byssosclamyces fulva*, sp. nov. *J. of Botany* 71:196-197, 1933.

-OLLIVER, M.; RENDLE, T. A New Problem in Fruit Preservation.

- Studies on *Byssochlamys fulva* and its effect on the Tissue of Processed fruit. J. Soc. Chem. Ind., London 53:166-172, 1934.
- APUD: BEUCHAT, L.R. & RICE, S.L. *Byssochlamys* spp. and Their Importance in Processed Fruit. Adv. Food Res. 25:237-289, 1979.
- PERCEBOIS, G.; BASILE, A.M.; SCHWERTZ, A. Existence Commune, sur les Fraises, D'Ascospores de *Byssochlamys nivea* Pouvant Produire de la Patuline. Mycoopathologia, 52(2):109-111, 1975.
- PITT, J.I. The Genus *Penicillium* and its Teleomorphic States *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, 1979.
- PUT, H.M.C. A Seletive Method for Cultiving Heat-Resistant Moulds, Particularly those of the Fenus *Byssochlamys* and Their Presence in Duth Soil. J. Appl. Bact. 27:59-64, 1964.
- PUT, H.M.C.; KRUISWIJK, J.Th. Desintegration and Organoleptic Deterioration of Processed Strawberries Caused by the Mould *Byssochlamys nivea*. J. Appl. Bact. 27(1):57-58, 1964.
- PUT, H.M.C., VAN REEVEN-BOWHUIS, A.; KRUISWIJK, J.Th. Alteration Microbiologique des Fraises au Sirop Pasteurisées due a *Byssochlamys*. Ann. Inst. Pasteur-Lille, 19:171-180, 1968.
- RAHN, O. Injury and Death of Bacteria by Chemical Agents. Reprinted from Biodinamica Monograph n 3. Biodinamica, Normandy, Missouri, 1945.

- RAPER, K.B.; FENNELL, D.I. The Genus *Aspergillus*. Robert E. Krieger Publishing Company. Malabar, Florida, 1977.
- RICE, S.L.; BEUCHAT, L.R.; WORTHINGTON, R.E. Patulin Production by *Byssochlamys* spp. in Fruit Juices. *Appl. Environ. Microbiol.* 34(6):791-796, 1977.
- RIDDELL, R.W. Permanent Stained Mycological Preparation by Slide Culture. *Mycologia* 42:265-270, 1950.
- ROBACH, M.C. Use of Preservatives to Control Microorganisms in Food. *Food Tech.* 34(10):81-84, 1980.
- SAMSON, R.A. *Paecilomyces* and Some Allied Hyphomycetes. *Studies in Mycology* 6, Jun., 1974.
- SCOTT, B. The Genus *Eupenicillium* Ludwig. *CSIR Research Report*, n.272: 1-33, Pretoria, South Africa, 1968.
- SCOTT, V.N.; BERNARD, D.T. Heat Resistance of *Talaromyces flavus* and *Neosartorya fisheri* Isolates from Commercial Fruit Juices. *J. of Food Protection* 50(1):18-20, 1987.
- SHIBASAKI, I.; TSUCHIDO, T. Enhancing Effect of Chemicals on the Thermal Injury of Microorganisms, *Acta Alimentaria*, 2(3):327-349, 1973.

- SOFOS, J.N.; BUSTA, F.F. Antimicrobial Activity of Sorbate. *J. Food Prot.*, 44(8):614-622, 1981.
- SPLITTSTOESSERT, D.F. Enumeration of Heat-Resistant Mold (*Byssosclamy*s). In: Compendium of methods for the Microbiol. Exam. of Foods. Am. Public. Health Assoc. pg. 230-234, 1976.
- SPLITTSTOESSERT, D.F.; KUSS, F.R.; HARRISON, W.; PREST, D.B. Incidence of Heat-Resistant Molds in Eastern Orchards and Vineyards, *Appl. Microbiol.* 21(2):335-337, 1971.
- SPLITTSTOESSERT, D.F.; WILKISON, M.; HARRISON, W. Heat Activation of *Byssosclamy*s *fulva* ascospores. *J. Milk Food Tech.* 35(7):399-401, 1972.
- SPLITTSTOESSERT, D.F.; SPLITTSTOESSERT, C.M. Ascospores of *Byssosclamy*s *fulva* Compared with those of Heat-Resistant *Aspergillus*. *J. of Food Sci.* 42(3):685-688, 1977.
- STOLK, A.C.; SAMSON, R.A. The Genus *Talaromyces* and Related Genera II. *Studies in Mycology*. 2, Nov, 1972.
- STOLK, A.C.; SAMSON, R.A. The Ascomycete Genus *Eupenicillium* and Related *Penicillium* Anamorphs. *Studies in Mycology*, 23, March, 1983.

- STUMBO, C.R. Thermobacteriology in Food Processing, 2nd ed., Academic Press. New York, 1973.
- SWANSON, K.M.J.; LEASOR, S.B.; DOWLING, D.L. Aciduric and Heat-Resistant Microorganisms in Apple Juice and Cider Processing Operations, *J. Food Sci.* 50:336-339, 1985.
- TAYLOR, S.L.; HIGLEY, N.A.; BUSH, R.K. Sulphites in Foods: Uses, Analytical Methods, Residues, Fate, Exposure Assessment, Metabolism, Toxicity, and Hypersensitivity. *Adv. Food Res.* 30:1-77, 1986.
- VALLETRISCO, M.; RUGGIERI, G.; NIOLA, I.; RUGGIERI, P. Considerazioni sullo Stato di Contaminazione da Patulina di Alcune Conserve Vegetali. *Industrie Alimentari*, 21(200):877-878, 883, 1982.
- VAN DER RIET, W.B.; VAN DER WALT, W.H. Effect of Ionizing Radiation on Ascospores of Three Strains of *Byssoschlamys fulva* in Apple Juice, *J. Food Protection*, 48(12):1016-1018, 1985.
- 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. *Phytochemistry* 7:105-108, 1975.
- YATES, A.R. Factors Affecting Respiration and Germination of Ascospores of the Food Spoilage Mould *B. nivea*. *Can. Inst.*

Food Sci. Technol. J. , 6 (4): 244-247, 1973.

-YATES, A.R. The Occurrence of *Byssoschlamys* sp. Molds in Ontario.

Can. Inst. Food Sci. Tech. J. 2(2):148-150, 1974.

-YATES, A.R.; FERGUSON, W.F. Observations on *Byssoschlamys nivea* isolated from Cucumber Brine. Can. J. of Botany 41:1599-1601, 1963.

-YATES, A.R.; MOONEY, D.R. Production of pectic enzymes by *Byssoschlamys nivea*. J. Inst. Can. Tech. Alim. 1(3): 106-109, 1968.

-YATES, A.R.; SEAMAN, A.; WOODBINE, M. Growth of *Byssoschlamys nivea* in various Carbon Dioxide Atmosfers. Can. J. Microb. 13:1120-1123, 1967.

-YATES, A.R.; SEAMAN, A. WOODBINE, M. Ascospore Germination in *B. nivea*. Can. J. of Microb., 14: 319-325, 1968.