



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**QUANTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS,  
BOLORES COMUNS E TERMORESISTENTES  
EM LINHA DE PROCESSAMENTO  
ASSÉPTICO DE BEBIDA DE UVA**

**Vanessa Aparecida Marcolino**  
(Farmacêutica)

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Pilar Rodriguez de Massaguer, PhD  
Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências de Alimentos.

CAMPINAS  
SÃO PAULO - BRASIL  
2003



## **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Pilar Rodriguez de Massaguer, PhD  
(Orientadora)

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gláucia Maria Falcão de Aragão  
Membro

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Hillary Castle de Meneses  
Membro

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Denise Aparecida Delgado  
Suplente

## **Agradecimentos Especiais**

**A Deus**

**Ao meu Pai** José Galvão Marcolino, por seu apoio, dedicação, me incentivando, para que nunca me deixasse ser vencida pelos desafios da vida.

**A minha Mãe** Maria Aparecida Tenerello Marcolino, por seu discernimento e ternura apaziguando meu coração nos momentos mais difíceis.

**Ao meu Noivo** Kleber Pitarelli, pela paciência e compreensão, abdicando da minha presença constante durante estes dois longos anos.

**Aos meus Irmãos** Viviane Galvão Marcolino e Thiago Galvão Marcolino, pelo apoio e atenção especial dedicada aos meus pais enquanto não pude estar na presença deles.

## **Agradecimentos**

A Profa Dra Pilar Rodriguez de Massaguer pela orientação, apoio e grande contribuição a minha formação profissional.

A grande amiga Rosa Maria Tavares Andrasso (Rosinha) pelo apoio técnico e mais específico pelo apoio moral, fazendo da sua família, a minha família por me encontrar distante de casa.

A amiga Ana Cláudia, pela ajuda dispensada no trabalho com análises físico-químicas.

A todos os amigos do laboratório de Termobacteriologia da Unicamp que contribuíram de maneira direta ou indireta para a elaboração do meu trabalho.

Às amigas Elizete e Silvane, que estiveram sempre ao meu lado diariamente durante esta longa caminhada.

A FAPESP pelo auxílio financeiro.

## ÍNDICE

1- INTRODUÇÃO .....	1
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
2.1- Importância de Fungos Comuns e Leveduras em Alimentos .....	4
2.2- Fungos Termoresistentes em Alimentos .....	5
2.1- <i>Byssochlamys</i> e <i>Paecilomyces</i> (estado anamórfico).....	7
2.2.2- <i>Neosartorya</i> .....	8
2.2.3- <i>Talaromyces</i> .....	11
2.2.4- <i>Eupenicillium</i> .....	11
2.2.5- Leveduras .....	12
2.3- Produção de Micotoxinas por Fungos Termoresistentes .....	12
2.3.1- Patulina .....	13
2.3.2- Ácido byssochlamico.....	14
2.3.3- Verrucologena.....	15
2.4- Como Controlar o Desenvolvimento de Bolores Termoresistentes.....	15
2.4.1- Boas práticas de manufatura (BPM) .....	16
2.4.2- Atividade de água ( $a_w$ ) .....	16
2.4.3- Atmosfera ( $O_2$ , $CO_2$ e $N_2$ ).....	18
2.4.4- Temperatura.....	20
2.4.5- Emprego de antimicrobianos.....	21
2.4.6- Tratamento termoquímico .....	23
2.4.7- Métodos não térmicos de inativação de bolores .....	26
2.4.7.1- Emissão de pulso elétrico .....	27
2.4.7.2- Altas pressões.....	28
2.4.7.3- Radiação ionizante.....	29
2.5- Idade do Esporo como Fator de Risco .....	30
2.6- Meios de Cultura e Identificação de Fungos Termoresistentes.....	31
2.6.1- Meios de crescimento, isolamento e esporulação de fungos termoresistentes.....	31
2.6.2- Identificação de Fungos Termoresistentes.....	34
2.7- Detecção e Enumeração de Fungos Termoresistentes em Alimentos.....	35
2.8- Parâmetros de Resistência Térmica .....	36
2.9- Cinética de Inativação Térmica .....	37
2.10- Métodos Utilizados na Produção, Ativação e Avaliação de Resistência Térmica de Fungos .....	40
2.10.1- Produção e coleta de esporos.....	40
2.10.2- Ativação de esporos.....	41
2.10.3- Determinação de resistência térmica .....	42
2.11- Meios para Recuperação de Ascósporos Após Resistência Térmica .....	43
3- MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
3.1- Material Utilizado.....	45
3.2- Amostragem .....	45
3.2.1- Número e obtenção das amostras .....	45
3.2.2- Pontos analisados na linha de processo .....	45
3.3- Quantificação de Bolores Comuns e Leveduras .....	50

3.4- Bolores Termoresistentes .....	51
3.4.1- Procedimento de quantificação de bolores termoresistentes .....	51
3.4.2- Determinação do tempo de subida da temperatura (tempo de atraso térmico) .....	51
3.4.3- Isolamento e codificação dos bolores termoresistentes .....	52
3.4.4- Estocagem das culturas isoladas .....	52
3.4.5- Produção de esporos .....	53
3.4.6- Coleta de esporos .....	54
3.4.7 Contagem das suspensões de esporos dos bolores isolados .....	55
3.4.7.1- Contagem em Câmara de Neubauer .....	55
3.4.7.2- Contagem por diluição e plaqueamento .....	55
3.4.8- Aplicação de choques térmicos para seleção do isolado mais termoresistente .....	56
3.3.8- Identificação dos isolados mais termoresistentes .....	58
3.4- Resistência térmica dos isolados mais termoresistentes .....	59
3.5- Análises físico-químicas .....	60
3.5.1-Medição de valores de pH .....	60
3.5.2- Medição de valores de °Brix .....	60
3.6- Pesquisa de níveis de sulfitos no produto final .....	60
3.7- Análise estatística .....	61
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	62
4.1- Particularidade dos Fluxogramas .....	62
4.2- Bolores Comuns e Leveduras .....	63
4.2.1. Ponto tanque pulmão (TQ) – comparações entre lotes .....	64
4.2.2. Ponto após pasteurização 1 (TP1) – comparações entre lotes .....	65
4.2.3. Ponto antes do concentrador (AC) – comparação entre lotes .....	66
4.2.4. Ponto formulação (TF) – comparação entre lotes .....	66
4.2.5- Ponto produto final após 90 de vida de prateleira (TPF90) .....	70
4.2.6- Análise estatística dos resultados das contagens de bolores comuns e leveduras em linha de processo .....	71
4.3- Bolores Termoresistentes .....	72
4.3.1- Contagem de bolores termoresistentes .....	72
4.3.2- Análise estatística dos resultados das contagens de bolores termoresistentes em linha de processo .....	74
4.3.3- Isolamento e Codificação .....	75
4.3.4- Seleção do isolado mais termoresistente para suspensões de esporos com idade de 1 mês e 3 meses .....	84
4.3.5- Identificação dos isolados termoresistentes para idade de 1 e 3 meses .....	86
4.3.5.1- Identificação do isolado I22FL5TQ .....	86
4.3.5.2- Identificação do Isolado I5FL1TQ .....	90
4.3.6- Ativação dos Ascósporos .....	93
4.3.7- Resistência térmica dos isolados I22FL5TQ e I5FL1TQ em bebida de uva pH: 3,0 e 14°Brix .....	97
4.3.7.1- Isolado I22FL5TQ .....	97
4.3.7.2- Isolado I5FL1TQ .....	101
4.3.8- Discussão dos Parâmetros Cinéticos dos Isolados I22 e I5 .....	106

4.3.9- Cálculo para F requerido no processo de pasteurização de bebida de uva pH: 3,0 e 14ºBrix .....	108
4.4- Análises Físico-Químicas.....	111
4.4.1- Medição de pH .....	111
4.4.2 Medição de ºBrix .....	113
5- CONCLUSÕES .....	115
6- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	117
Anexo I .....	131
Anexo II .....	139
Anexo III .....	147
Anexo IV.....	155
Anexo V.....	161
Anexo VI.....	167

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Fluxograma de produção de suco de uva concentrado.....	48
<b>Figura 2:</b> Fluxograma de produção de bebida de uva .....	49
<b>Figura 3:</b> Nível médio de bolores comuns e leveduras por lote na amostragem ..	64
<b>Figura 4:</b> Média do logaritmo de microrganismos acrescidos do limite superior do intervalo de confiança, baseados nos 6 lotes de análise do produto. ....	70
<b>Figura 5:</b> Concentração ponto a ponto de bolores termoresistentes nos 6 lotes de análise .....	73
<b>Figura 6:</b> Número de microrganismos (esporos/100ml), apresentados com média e acrescidos do limite superior do intervalo de confiança, baseados nos 6 lotes de análise do produto. ....	74
<b>Figura 7:</b> Porcentagem de contaminação por bolores termoresistentes por ponto do processo em todos os lotes analisados. ....	83
<b>Figura 8:</b> porcentagem de contaminação por bolores termoresistentes por lote analisado .....	83
<b>Figura 9:</b> Foto de lâmina do isolado I22FL5TQ com presença de ascósporos de <i>Neosartorya fischeri</i> com aumento de 1000 vezes. ....	89
<b>Figura 10:</b> Foto de placa contendo colônia de <i>Neosartorya fischeri</i> referente ao isolado I22FL5TQ, cultivado em MEA 30°C durante 7 dias. ....	90
<b>Figura 11:</b> Foto de ascósporos em lâmina feita a partir do isolado I5FL1TQ com aumento de 1000 vezes .....	92
<b>Figura 12:</b> foto de placa contendo colônia de <i>Neosartorya fischeri</i> referente ao isolado I5FL1TQ, cultivado em MEA 30°C durante 7 dias. ....	93
<b>Figura 13:</b> Curva de ativação a 85°C para esporos do Isolado I22FL5TQ .....	96
<b>Figura 14:</b> Curva de ativação a 85°C para esporos do Isolado I5FL1TQ .....	96
Curva experimental de inativação térmica para isolado I22FL5TQ (1 mês de idade) nas temperaturas de 90, 95 e 98°C. ....	98
<b>Figura 16:</b> Determinação do valor “a” para o isolado I22FL5TQ (1 mês de idade) na temperatura de 90°C .....	99
<b>Figura 17:</b> Curvas de linearização da inativação térmica para o isolado I22. ....	100
<b>Figura 18:</b> Determinação do valor Z para o isolado I22FL5TQ .....	101
<b>Figura 19:</b> Curvas experimentais de inativação térmica para isolado I5FL1TQ (3 meses de idade) nas temperaturas de 90, 95 e 98°C. ....	103
<b>Figura 20:</b> Determinação do valor “a” para o isolado I5FL1TQ (3 meses de idade) na temperatura de 90°C .....	104
<b>Figura 21:</b> Curvas de linearização da inativação térmica para o isolado I5FL1TQ (3 meses de idade). ....	104
<b>Figura 22:</b> Determinação do valor Z para o isolado I5 (3 meses de idade). ....	105
<b>Figura 23:</b> Valores de pH por ponto de amostragem dos 6 lotes analisados .....	112
<b>Figura 24:</b> Médias e desvios padrões, acrescidos do limite superior do intervalo de confiança, apresentados nos valores de pH dos pontos analisados em cada um dos lotes .....	113
<b>Figura 25:</b> Comportamento dos valores de °Brix durante a produção de bebida de uva nos vários pontos de amostragem realizado por lote. ....	114

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Binômios de choques térmicos aplicados às suspensões fúngicas isoladas nas duas idades 1 e 3 meses conforme necessidade de seleção. ...	57
<b>Tabela 2:</b> Médias de contagem em placas para as 3 diluições realizadas no ponto TF para os lotes 1 e 2 .	67
<b>Tabela 3:</b> Teor de sulfito presente no produto final, análise realizadas para os 6 lotes de amostragem.	68
<b>Tabela 4:</b> Análise de variância/ p-value para efeitos principais e interação entre bolores comuns e leveduras e bolores termoresistentes em suco de uva. ....	71
<b>Tabela 5:</b> Contraste entre média dos logaritmos e entre pontos de coleta consecutivos estatisticamente significativos para bolores e leveduras comuns em bebida de uva	72
<b>Tabela 6:</b> Bolores Termoresistentes (UFC/ml) - médias +/- Desvio Padrão por ponto/tipo de lote	72
<b>Tabela 7:</b> Contraste entre médias dos logaritmos e entre pontos de coleta consecutivos estatisticamente significativas para bolores termoresistentes em bebida de uva.	75
<b>Tabela 8:</b> Códigos dos fungos isolados, local proveniente na planta de processo, contagem da suspensão de esporos em Câmara de Neubauer e contagem em placa por diluição para idades de 1 e 3 meses. ....	76
<b>Tabela 9:</b> Código dos fungos termoresistentes, procedência e limite de sobrevivência para esporos de 1 e 3 meses de idade. ....	86
<b>Tabela 10:</b> Medida dos diâmetros (cm) das colônias nos diferentes meios e temperaturas, para o isolado I22 FL5TQ	87
<b>Tabela 11:</b> Medida dos diâmetros (cm) das colônias nos diferentes meios e temperaturas, para o isolado I5 FL1TQ	90
<b>Tabela 12:</b> Contagem direta de ascósporos (Câmara de Neubauer) de <i>Neosartorya fischeri</i> para os isolados I22FL5TQ e I5FL1TQ	94
<b>Tabela 13:</b> Recuperação em MEA (profundidade) dos ascósporos de <i>N. fischeri</i> para os isolados I22FL5TQ e I5FL1TQ e a porcentagem (%) de ascósporos ativados em relação à contagem direta em Câmara de Neubauer. ....	94
<b>Tabela 14:</b> Contagem do número de sobreviventes com o tempo de aquecimento, em bebida de uva pH: 3,0 e 14 <sup>º</sup> Brix de ascósporos de <i>Neosartorya fischeri</i> com 1 mês de idade. ....	97
<b>Tabela 15:</b> Valores de resistência térmica para o isolado I22 (1 mês de idade). ....	100
<b>Tabela 16:</b> Contagem do número de sobreviventes com o tempo de aquecimento, em bebida de uva pH: 3,0 e 14 <sup>º</sup> Brix de ascósporos de <i>Neosartorya fischeri</i> com 3 mês de idade. ....	102
<b>Tabela 17:</b> Valores de resistência térmica para o isolado I5 (3 meses) ....	105
<b>Tabela 18:</b> Comparação dos valores de D a 90, 95 e 98 <sup>º</sup> C para os isolados I22FL5TQ e I5FL1TQ. ....	106
<b>Tabela 19:</b> Valores de F calculados para todas as temperaturas testadas durante a resistência térmica, além do valor de $\gamma$ obtidos pela indústria durante o binômio de pasteurização considerando-se a média contaminação encontrada no ponto antes do concentrador (AC). ....	109

## RESUMO

O consumo de bebida de uva pasteurizada, pronta para beber, vem aumentando nos últimos anos no Brasil. No ano de 2001, o consumo nacional foi de 11 milhões de litros, enquanto que nos primeiros 9 meses de 2002 este valor já ultrapassou 17 milhões, segundo Tetra Pak (2002). Com intuito de melhorar a qualidade microbiológica do produto, desde o início de sua produção até o final da linha de processo, foi realizada esta pesquisa, com base na investigação da presença de bolores termoresistentes e não termoresistentes em bebida com pH: 3,0 e ° Brix: 14, produzida a partir das variedades Ceiber e Concordia.

As análises realizadas incluíram desde a matéria-prima até o produto final, além da verificação da microbiota fúngica após 3 meses de vida útil do produto, a fim de se obter um produto microbiologicamente estável sob condições de armazenamento e, portanto, seguro para o consumidor.

A amostragem foi realizada num total de 9 pontos, da linha de processamento, em cada uma das 6 coletas. No período de 27/01/2002 a 03/03/2002, foram feitas análises de 6 lotes do produto.

A metodologia empregada para quantificação de bolores termoresistentes foi a descrita por Beuchat & Pitt (1992) com modificações preconizadas por Baglioni (1998); já para bolores e leveduras comuns foram utilizadas as análises preconizadas pelo Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (A.P.H.A.) e Splittstoesser et al (1993).

Durante as análises dos 6 lotes amostrados, foram isoladas 25 linhagens fúngicas dentre as quais 24 apresentaram comportamento totalmente distinto, vindo posteriormente a confirmar sua termoresistência, após aplicação de choques térmicos seletivos. Os lotes 2 e 3 mostraram maior nível de contaminação por bolores termoresistentes apresentando 4,8 e 3,5 esporos /100ml, respectivamente,

mesmo assim, a incidência foi baixa em geral menor que 5 esporos/100ml em todos os lotes. O lote 1 foi o responsável pela maior parte dos isolados termoresistentes, com 48% de cepas, representando 12 fungos diferentes.

A incidência de leveduras em todos os lotes, foi alta e semelhante entre lotes, apresentando média de  $7,55 \times 10^6$  UFC/ml, na matéria prima.

Com intuito de demonstrar maior capacidade de resistência térmica de esporos mais velhos, foram utilizados esporos com idade de 1 mês e 3 meses. Todos os isolados, de ambas as idades, foram submetidos a choques térmicos programados que variaram de 85°C/15 min a 115°C/15 min. O isolado mais termoresistente, com 1 mês de idade, sobreviveu a 100°C/55 min, e foi identificado como *Neosartorya fischeri*, com parâmetros de  $D_{95^\circ\text{C}} = 1,66$  min e  $Z = 11,98^\circ\text{C}$ . Já o isolado de idade de 3 meses sobreviveu a 110°C/10 min e foi identificado também como *Neosartorya fischeri*, com parâmetros de  $D_{95^\circ\text{C}} = 1,96$  min e  $Z = 16,29^\circ\text{C}$ . Os parâmetros cinéticos foram obtidos por linearização de Alderton & Snell (1970) devido ao comportamento não logarítmico de ambos os fungos.

O processamento foi capaz de eliminar a contaminação fungíca no produto final e não se detectou bolores em produto final e produto final após 90 dias de vida útil. Existe, porém, a possibilidade de que bolores como *Neosartorya fischeri* sejam capazes de permanecer viáveis após o processo de pasteurização utilizado pela maioria das indústrias processadoras de bebida de uva, que aplicam binômios que variam entre 90-92°C/30 seg, devido à sua grande capacidade de termoresistência.

## **ABSTRACT**

In Brazil the consumption of ready to drink pasteurized grape juice has increased in the last few years. In 2001, the national consumption was 11 million liters, however, in the first nine months of 2002, this number exceeded 17 million liters (Tetra Pak, 2002). The aim of this study was to quantify the incidence of heat-resistant and non heat-resistant molds in the production line of juice formulated from Ceiber and Concordia grapes (pH: 3,0 and 14°Brix).

The analysis was carried out from the raw material up to the final product, and after 3 months of shelf-life to obtain the microbiological security of the product.

Nine (9) points from the processing line were sampled for each batch. Six (6) production batches were analyzed from January 27<sup>th</sup>, 2002 to March 3<sup>rd</sup>, 2002.

The method of Beuchat and Pitt (1992) was used to quantify the heat-resistant molds with the modifications suggested by Baglioni (1998). Common molds and yeast were analyzed according to the Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (A.P.H.A.) (1992), and Splittstoesser et al (1993).

Twenty-five (25) mold strains were isolated from the 6 batches, of which 24 showed completely different behavior. Heat-resistance was confirmed in all of the 24 strains, after selective heat shocks. Batches 2 and 3 showed greater contamination with heat-resistant molds, showing 4,8 and 3,5 spores/100ml respectively in the raw material, however in general the contamination level with heat-resistant strains was low, normally less than 5 spores/100ml. Batch 1 was responsible for the greatest variety of strains, 48% of the total, equivalent to 12 different molds.

The highest incidence of yeasts was observed in the raw material, with levels of up to  $10^6$  CFU/ml.

To confirm the greater heat-resistance of older spores when compared with younger spores, the heat-resistance test was carried out with 1 month and 3 months old spores. All the isolates, of both ages, were submitted to programmed heat shocks from 85°C/15 min up to 115°C/15 min. The most heat-resistant 1 month old mold spore survived 100°C/55 min and was identified as *Neosartorya fischeri* with  $D_{95^\circ\text{C}} = 1,66$  min and  $Z = 11,98^\circ\text{C}$ . The most heat-resistant 3 months old mold survived 110°C/10min and was also identified as *Neosartorya fischeri* with  $D_{95^\circ\text{C}} = 1,96$  min e  $Z = 16,29^\circ\text{C}$ . The kinetics parameters were realized using Alderton & Snell (1970) methodology because both molds present non logarithmic behavior.

The process used was able to eliminate the mold contamination and its presence was not detected in the final product or in the final product after 3 months of shelf life. Nevertheless, molds like *Neosartorya fischeri* may survive the juice pasteurization process of 90-92°C/30 seconds commonly used in industry, because of the high heat-resistance of this mold.

# 1- INTRODUÇÃO

Os sucos de frutas vêm sendo consumidos já há alguns séculos pela população mundial. Até o século XIX, a fermentação e conversão de suco em vinhos e cidras era a única maneira de atingir a preservação. No entanto, em 1869, uma indústria de sucos americana, conseguiu inserir no mercado o primeiro suco de frutas não fermentado, sendo este um suco de uvas. A partir disto, introduziu-se o conceito de pasteurização para preservação de sucos de frutas.

Antigamente, o consumo de suco de frutas era restrito a ocasiões especiais. Com o incremento das técnicas de preservação, esta bebida popularizou-se e hoje seu consumo ainda continua atingindo altos índices quando relacionado com o aumento de pessoas que procuram um estilo de vida saudável, buscando principalmente nos sucos integrais um suplemento vitamínico ou nutricional.

Os sucos cítricos são consumidos em larga escala e atingem 50% do comércio internacional. Outros sucos muito populares são o de maçã seguido pelo de uva e abacaxi. Uma grande variedade de outros tipos de suco são produzidos, mas seu volume é relativamente pequeno quando comparado aos demais.

Apesar do surgimento de novas técnicas de conservação, os sucos ainda são um dos itens alimentares de grande perecibilidade, pois dependem de fatores como manipulação correta na colheita dos frutos, boas técnicas de seleção e processamento, armazenagem adequada, correto procedimento adequado de sanitização dos equipamentos envolvidos no processo, além de outros cuidados que devem ser tomados para que haja diminuição da carga microbiológica do produto. Isto é um fator preocupante para o consumidor com relação à qualidade do produto, como também para as indústrias que fabricam o alimento, afinal as uvas de melhor qualidade são destinadas para produção de vinhos, enquanto que, as de qualidade inferior vão para produção de sucos.

Os microrganismos envolvidos na deterioração de sucos de frutas são os que conseguem manter suas características de reprodução inalteradas, quando em contato com pHs relativamente baixos (igual ou inferiores a 3) como os encontrados em sucos de frutas. Entre estes incluem-se leveduras, mofos, bactérias lácticas e acéticas. No caso de sucos que sofreram tratamento térmico como pasteurização ou outros, os microrganismos de maior relevância são os fungos termoresistentes (Branen, 1993).

Os fungos remanescentes do tratamento térmico poderão causar problemas nos sucos pela capacidade de alterar as características organolépticas como mudanças de cor, sabor, odor e até a produção de “off-flavor” (formação de sabores estranhos nos alimentos) (Tournas, 1994).

No entanto, o aspecto de maior relevância na deterioração fungíca é a formação de micotoxinas. Hoje já se conhecem mais de 400 tipos de micotoxinas e este número cresce a cada dia. Os principais efeitos tóxicos causados pela exposição às micotoxinas são os problemas com imunossupressão e a formação de diferentes tipos de cânceres (Frisvad & Samson, 1991).

Um outro aspecto a ser considerado é o aumento progressivo de produção e consumo de bebida de uva pronto para beber no país. A título de ilustração, segundo Tetra Pak (2002), o consumo nacional em 2001 atingiu o volume de 11 milhões de litros, e nos primeiros 9 meses do ano de 2002, o montante foi ultrapassado excedendo 17 milhões de litros. É importante ressaltar que a uva é uma fruta produzida em larga escala nas regiões Sul e Sudeste do país.

Com base nesta discussão, nota-se a importância de analisar este tipo de produto, principalmente os que passaram por algum tratamento térmico, para garantir que o nível de contaminação esteja dentro de parâmetros permitidos pela legislação. Também, ressalta-se, a necessidade de identificar a incidência de fungos termoresistentes e, dentre eles os que apresentam maior resistência

térmica, priorizando-se assim a qualidade do produto final e evitando que, futuramente, este tipo de fungo possa contaminar uma planta industrial.

Um último fator a ser considerado é a escassez de estudos deste tipo de suco no Brasil. Outros países já desenvolvem pesquisas nesta área com alguns avanços, enquanto que, em nosso país não se encontram publicações de relevância sobre o assunto.

Assim, vale ressaltar que este trabalho teve como principais objetivos o isolamento de linhagens fúngicas termoresistentes em linha de processo e no produto final, bem como a identificação da cepa mais termoresistente com o estabelecimento dos parâmetros cinéticos de resistência térmica da mesma.

O presente trabalho fez parte de um projeto maior de Segurança Microbiológica de Sucos e Drinques, envolvendo a EMBRAPA, PRODETAB, UNICAMP (Laboratório de Termobacteriologia) e as Indústrias Processadoras de Sucos, responsável pela avaliação da microbiota de sucos principalmente os microrganismos patogênicos e deteriorantes e em conjunto com estabelecimento de programas de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC).

## **2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1- Importância de Fungos Comuns e Leveduras em Alimentos**

Os fungos e leveduras constituem um grande grupo de microrganismos que, em sua maioria, podem ser encontrados no solo e no ar (Eiroa, 1985). Devido à sua capacidade de adaptação a diferentes condições, os fungos e leveduras são freqüentemente encontrados como contaminantes em alimentos, equipamentos de processo sanitizados de maneira inadequada, assim como em alimentos subprocessados (Mislivec et al. 2001).

Malletroit et. al. (1990) demonstraram que suco de uva, não pasteurizados, possuem contaminação de  $10^3$  a  $10^7$  UFC/ml, dependendo da época do ano, normalmente o período de safra do produto costuma ser mais contaminado do que na entressafra.

As leveduras são raramente envolvidas em casos de deterioração de sucos pasteurizados, devido à sua baixa resistência térmica. Estes microrganismos podem estar relacionados com o processo deteriorante na recontaminação pós processo ou em casos de processos térmicos deficientes. Os principais produtos da fermentação, causada pelas leveduras, são o  $CO_2$  e o etanol e sua maior consequência esta relacionada com o estufamento de embalagens (Porreta, 1992).

Diferentemente das bactérias, os fungos e leveduras podem iniciar seu crescimento em pHs ácidos, crescendo numa faixa de 2 a 11 (Tournas, 1994). Com relação à temperatura, a faixa de crescimento é bastante ampla variando de 5 a  $35^\circ C$ , com espécies podendo crescer abaixo e acima destes valores (Mislivec et al. 2001).

Ainda segundo Mislivec et al. (2001) as leveduras e os fungos podem causar diferentes níveis de decomposição que variam conforme o grau de invasão. O crescimento de fungos e leveduras pode ser manifestado por pontos de podridão, formação de crostas, secreção limosa, micélio branco ou de cores variadas, bem como, presença de esporos. O fato de não se observar crescimento visual, não significa que o produto não esteja contaminado por estes microrganismos.

As metodologias utilizadas para detecção de fungos comuns e leveduras não variam muito de autor para autor, sendo bastante semelhantes. Mislivec, Beuchat and Cousin, (2001), preconizam um método considerado, reconhecido e indicado nos padrões da ANVISA (2001).

Spittstoesser et al (1993) em suas pesquisas comprovaram a obtenção da mesma recuperação de esporos e células, comparando os métodos de plaqueamento em profundidade com o de plaqueamento em superfície, demonstrando que a utilização do método profundidade é perfeitamente viável.

## **2.2- Fungos Termoresistentes em Alimentos**

A maior parte dos fungos são pouco termoresistentes à exposição ao calor. Algumas espécies com maior resistência térmica produzem ascósporos que posteriormente provocarão a deterioração do alimento processado. (Tournas 1994; Baglioni 1998). A pasteurização, normalmente aplicada a produtos vegetais ácidos, ativa ascósporos dormentes, que iniciarão o processo de germinação, causando deterioração no produto final (Enigl et al. 1993).

A característica dos bolores termoresistentes é a formação de ascósporos (grupo dos Ascomicetos) resistentes, sendo que a forma e disposição destes esporos podem variar com o tipo, as espécies e linhagens de microrganismos

(Tournas, 1994). Os gêneros de interesse na área de alimentos normalmente produzem ascos e ascósporos, sendo que estes podem estar dentro de um corpo esférico de parede lisa, denominado cleistotécio (gêneros *Eupenicillium* spp e *Neosartorya* spp), ou em corpos de paredes formadas por hifas entrelaçadas, gimnotécio (gênero *Talaromyces* spp) (Pitt & Hocking, 1985).

Sendo assim, a ocorrência de deterioração pela formação de ascósporos termoresistentes são comuns aos gêneros *Byssochlamys*, *Neosartorya*, *Talaromyces* e *Eupenicillium* (Tournas 1994 e Rajashekhara et al 2000).

Segundo Suresh et al. (1996), a espécie *Neosartorya fischeri* é de extrema importância, pela sua frequência de detecção, em suco de uva. Estes autores encontraram uma cepa capaz de resistir 100°C/12 minutos, sendo que os valores  $D_{80^{\circ}\text{C}}$  e Z foram 46,6 minutos e 6,9°C, respectivamente. Já para King et al. (1979) as espécies de maior relevância em suco de uva são os fungos *Byssochlamys fulva* e *Byssochlamys nivea*. Desta maneira, os autores fizeram uso destas duas cepas para controle de parâmetros cinéticos relacionados com conservantes em suas pesquisas.

Os fungos acima mencionados fazem parte do sub-reino Ascomicotina e são chamados Ascomicetos. Como características, estes fungos apresentam um micélio vegetativo septado e haplóide, suas estruturas reprodutivas sexuais são os ascomatas, que abrigam ascos de formato globoso a subgloboso, que por sua vez podem ser ornamentados com 8 ascósporos originando o significado do nome Ascomiceto recebido pelo grupo (Samson & van Reenen-Hoekstra, 1988).

Os mesmos autores acima referenciados mencionaram que o estado formador de ascos, mais conhecido como estado teleomórfico (fungo perfeito), está sempre acompanhado de um ou mais estados reprodutivos assexuados denominado estado anamórfico. Desta maneira, a maioria dos Deuteromicetos (fungos imperfeitos), são o ciclo de vida anamórfico dos Ascomicetos. Assim, as

espécies anamórficas (Deuteromicetos) representativas dos Ascomicetos são encontradas como *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Basipetospora*, e *Aspergillus*.

### **2.1- *Byssochlamys* e *Paecilomyces* (estado anamórfico)**

Os fungos deste gênero são caracterizados pela ausência de cleistotécio, gimnotécio ou qualquer outro corpo que envolva os ascos durante o desenvolvimento. Os ascos de *Byssochlamys* são produzidos em cachos irregulares e abertos, contendo geralmente oito ascósporos em associação por fragmentos de hifas brancas. Para formação de ascósporos, os fungos devem ser incubados a uma temperatura próxima a 30° C (Pitt & Hocking, 1985).

A incidência de *Byssochlamys* em frutas e posteriormente nos seus derivados foi detectada por Splittstoesser et al. (1970) e Beuchat & Rice (1979). Segundo estes pesquisadores, isto se dá pelo contato direto das frutas com o solo. Ascósporos de *Byssochlamys* podem permanecer no solo em estado latente, e durante o período de frutificação, contaminarem os frutos, conseguindo assim penetrar no ambiente industrial (Eiroa, 1985 e Jesenka et al 1993). Por estas razões, frutas como a uva podem ser um abrigo para fungos termoresistentes.

Beuchat & Rice (1979) relatam que ascósporos de *Byssochlamys* são capazes de sobreviver em suco de frutas mesmo após tratamento térmico, e que, as altas temperaturas utilizadas para inativação além de causarem perda da qualidade do produto ainda não são suficientes para que se obtenha completa eliminação. Segundo Bayne and Michener (1979), ascósporos deste fungo podem sobreviver a aquecimento térmico de 90°C durante 25 minutos.

Maunder (1969) e Splittstoesser et al. (1970) demonstraram a deterioração em sucos e concentrados por *Paecilomyces variotii*. Maunder (1969) constatou a

presença do mesmo microrganismo em três tipos de sucos processados, entre eles o de uva além dos de maçã e ameixa, ambos processados.

Durante as análises de suco de morango pasteurizado e preservado com benzoato de sódio e sorbato de potássio, Salomão (2002) conseguiu isolar uma cepa de *Byssochlamys fulva* demonstrando a resistência termoquímica deste microrganismo.

Recentemente, vem-se atribuindo ao *Paecilomyces* e também a algumas espécies de *Fusarium* a capacidade de sobrevivência a choques térmicos de 95°C por 10 a 20 segundos devido, principalmente, à observação de estruturas de paredes grossas, assim como hifas e clamidósporos. A importância da resistência térmica destas espécies para a indústria de enlatados ainda não foi devidamente investigada, e já foram encontradas espécies de *P. variotti* em alimentos em fase de degradação que sofreram pasteurização de 93° C por 5 minutos. Outro fato importante é o destas espécies também serem sorbato resistente (Piecková, 2000).

### **2.2.2- *Neosartorya***

Os ascósporos deste gênero de fungo são produzidos em ascos denotando à colônia um aspecto granular. A única espécie significativa na deterioração de alimentos é *Neosartorya fischeri* (Pitt & Hocking 1985; Baglioni 1998).

Este fungo, quando cultivado em MEA (Agar Extrato de Malte), apresenta coloração branca, variando até creme, aspecto granular devido à grande concentração de ascomatas, com reverso creme. Microscopicamente podem ser visualizados ascomatas com tamanho de 80-150 µm de diâmetro, contendo ascos (8 ascósporos) globosos medindo 8-10 x 10-12 µm. Os ascósporos deste fungo

são biconvexos (6-7 x 4  $\mu\text{m}$ ), possuem uma fenda equatorial e caracterizam-se por sua superfície irregular (Samsom, 1988).

É discutido, na maioria das pesquisas, que o fungo *Neosartorya fischeri* possui uma fase anamórfica do gênero *Aspergillus* (*A. fischeri*), que apresenta uma resistência térmica menor quando comparada com a forma sexuada caracterizada pela resistência térmica da espécie (Tournas 1994).

Devido ao fato dos ascósporos serem termoresistentes, estes são capazes de sobreviver à rotina de pasteurização sofrida por produtos derivados de frutas e assim, podem ocasionar deterioração pós-pasteurização com germinação e posterior crescimento (Conner and Beuchat 1987). Ascósporos deste fungo podem sobreviver a tratamentos térmicos de 100° C por 12 minutos (Pitt & Hocking, 1985). Já Baglioni (1998) demonstrou em seus estudos que este mesmo fungo suportou um aquecimento de 100° C por até 25 minutos.

Baglioni (1998) também relatou que os fungos termoresistentes são importantes, pois, além de sobreviverem ao tratamento térmico de pasteurização possuem grande relevância quando se considera a pré-contaminação da matéria prima, pois podem aparecer na planta de processo por falta de procedimentos adequados de higienização. Já uma das causas principais de deterioração é a recontaminação do produto por fungos pós-processo, especialmente no que diz respeito à contaminação durante o envase. Estes contaminantes podem causar mudanças organolépticas e favorecer o desenvolvimento de outros microrganismos por aumentarem o pH do produto, causando um fenômeno conhecido como *metabiosis* já constatado por Gomez et al. (1989). O fungo *N. fischeri* é uma das espécies com maior capacidade de elevar o pH dos produtos favorecendo a produção de toxinas por *Clostridium botulinum* nas proximidades ou abaixo do crescimento micelial (Baglioni, 1998).

Durante uma pesquisa de investigação de fungos termoresistentes em frutas, Suresh et al (1996) mostram que uma espécie de fungo isolado de uvas apresentou-se moderadamente resistente à temperatura, e mais tarde, este microrganismo foi identificado como sendo *Neosartorya fischeri*.

Rajashekhara et al (2000) realizaram um estudo com suco de uva e manga onde analisaram comparativamente as temperaturas de ativação de esporos termoresistentes de fungos como *N. fischeri*. Estes pesquisadores utilizaram inóculos de  $10^4$  esporos/ml e observaram que os ascósporos de *N. fischeri* podiam sobreviver por mais de 300 minutos quando expostos a temperaturas de 70, 75 e 80° C. Segundo os mesmos autores, geralmente a porcentagem de inativação térmica de ascósporos em suco de uva é menor do que em suco de manga, e a natureza protetora de certos constituintes do suco de uva (como os ácidos orgânicos) é que influenciam este fenômeno.

Gumerato (1995) isolou o fungo *Neosartotya fischeri* presente em polpa de maçã, sendo que o mesmo microrganismo foi isolado na matéria prima, e no concentrado de maçã, mesmo depois deste último produto ter passado por efeitos térmicos da pasteurização e concentração, demonstrando potencial de resistência térmica do isolado.

Salomão (2002) durante suas pesquisas, em suco de maçã, isolou cepas de *Neosartorya fischeri*, *Byssochlamys fulva* e *Eupenicillium*, sendo que dentre estes fungos, a cepa de *N. fischeri* demonstrou ser a mais termoresistente em comparação com os demais. Este fungo apresentou valores de  $D_{80^{\circ}\text{C}}$  312,5 min,  $D_{85^{\circ}\text{C}}$  = 38,61min e  $D_{90^{\circ}\text{C}}$  = 2,20min, quando se utilizou para os ensaios de resistência suco de maçã com pH 4,5.

### 2.2.3- *Talaromyces*

Este gênero é caracterizado pela produção de gimnotécios brancos ou amarelados em associação com o estado anamórfico característico de *Penicillium*, *Paecilomyces* ou *Geosmithia*. Gimnotécio é o ascocarpo (sacos onde os ascos são produzidos) composto por hifas finas entrelaçadas resultando numa estrutura mais ou menos fechada de tamanho indeterminado. A espécie mais comumente isolada de alimentos ácidos termoprocessados é *Talaromyces flavus* que geralmente produz colônias amarelas em MEA (Ágar extrato de malte) devido à pigmentação tanto do micélio como dos gimnotécios, entretanto existem linhagens que desenvolvem coloração avermelhada (Pitt & Hocking 1985; Splittstoesser 1991; Baglioni 1998).

*Talaromyces* é uma variedade de fungo encontrado com facilidade em frutas e produtos derivados, responsável pela deterioração dos mesmos. Os ascósporos produzidos por este fungo são extremamente resistentes e podem sobreviver de 5 a 12 minutos a aquecimento de 100° C (Pitt & Hocking 1985; Tournas 1994).

Salomão (2002) constatou em suas pesquisas que o fungo *Talaromyces* spp, é um dos gêneros mais comuns encontrados em suco de polpas comerciais congeladas de morango. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Aragão (1989), que considera este fungo filamentoso o segundo mais relevante no levantamento de contaminantes fúngicos realizado em polpa de morango, perdendo somente para *Eupenicillium*.

### 2.2.4- *Eupenicillium*

Tournas (1994) relatou em sua pesquisa o isolamento do fungo *Eupenicillium brefeldianum*, como principal microrganismo responsável pela deterioração de sucos na África.

Segundo Pitt & Hocking (1985), o fungo *Eupenicillium* spp, tem capacidade de produzir esporos de parede lisa, com formato esférico a ovóide, sendo comum a visualização de cleistotécio que, posteriormente, liberará no meio ascos contendo 8 ascósporos. Suas características de crescimento em CYA (Czapek Yeast Agar) são de crescimento rápido e denso, com micélio amarelo e pouco exudado sem cor, sendo seu reverso usualmente âmbar.

Aragão (1989) demonstrou em seus estudos em suco de morango que a espécie de maior incidência se tratava de *Eupenicillium* com capacidade de resistência térmica maior do que citada por outros autores, apresentando  $D_{80^{\circ}\text{C}} = 14,5$  minutos.

### **2.2.5- Leveduras**

Outra fonte de contaminação, encontrada com facilidade em sucos após a pasteurização, são os ascósporos de leveduras termoresistentes (Splittstoesser et al., 1970). Todos estes microrganismos não são exclusivos de sucos podendo atingir outros alimentos processados derivados de frutas.

## **2.3- Produção de Micotoxinas por Fungos Termoresistentes**

Alterações causadas pela deterioração proveniente de fungos e leveduras são importantes por promoverem mudanças de natureza sensorial no produto, além de causarem uma modificação de textura dos alimentos seguido da fermentação de açúcares, produção de ácidos, gases e outros (Huis in't Veld, 1996) no entanto, o problema realmente relevante é a capacidade de alguns fungos filamentosos de sintetizarem as micotoxinas.

As micotoxinas são metabólitos secundários, produzidos por alguns fungos filamentosos, que aparecem como resultado do crescimento do microrganismo. Estas substâncias causam respostas tóxicas classificadas como micotoxicoses. A ingestão de micotoxinas por seres humanos se dá pelo consumo de alimentos contaminados, que possuem resíduos ou o metabólito presente. (Sweeney & Dobson, 1998).

Os sucos de uvas são passíveis como os outros alimentos de contaminação, e o microrganismo termoresistente de maior interesse na produção de micotoxinas é o gênero *Byssochlamys*. Os metabólitos produzidos por este fungo são: Patulina, Ácido Byssochlâmico, Byssotoxina A, Asymetrina e Variotina, como já constatado nas pesquisas de Beuchat & Rice (1979) e Rice (1980). Outros fungos como *Neosartorya fischeri*, bem como *Eupenicillium* são capazes também de produzir toxinas citadas por Tournas (1994) como Fumitremorgina A e C, Verruculogena, Fischerina além de Eupenifeldina, se mostrando tão preocupantes quanto as anteriores já citadas.

Frisvad & Samson (1991) em sua pesquisa mostraram que já foram identificadas mais de 400 tipos de micotoxinas diferentes, no entanto as de maior relevância para análises em suco de uva são estas já citadas.

### **2.3.1- Patulina**

A patulina é uma micotoxina proveniente de *Aspergillus* (*A. clavatus*, *A. terreus*), *Penicillium* (*P. urtical*, *P. expansum*) e *Byssochlamys* (*B. nivea*, *B. fulva*). A patulina é considerada tóxica para microrganismos, plantas e animais, além de perigosa à saúde humana (Tournas, 1994).

Primeiramente, esta micotoxina foi descrita como um antibiótico, sendo posteriormente comprovado seu alto grau de toxicidade para tal fim. Autores como

Beuchat & Rice (1979) mostraram em suas pesquisas, que espécies de *B. fulva* e *B. nivea* foram capazes de produzir esta micotoxina, quando o fungo se desenvolveu em produtos armazenados a temperatura ambiente, as frutas mais atingidas foram maçã, abacaxi, uva e morango. Com relação aos sucos, os mesmos autores constataram que uma espécie de *B. fulva* previamente inoculada, mostrou-se capaz de produzir patulina em 11 das 13 amostras preparadas.

Scott e Somers (1968) estudaram a estabilidade térmica da patulina em diferentes sucos, utilizando temperaturas variando de 22 a 80°C e constataram que, em concentração de 4 mg/l, após tratamento térmico de 80°C/10 min e 80°C/20 min, a toxina foi detectada em concentrações de 50% e 45% respectivamente, quando comparada com a inicial.

Lovett e Peeler (1973) constataram em suas pesquisas que a patulina é estável a aquecimento de 100°C por 15 minutos, e torna-se mais resistente a destruição na faixa de pH entre 3,5 e 5,5. Ambos os valores D e Z, aumentaram quando o pH foi reduzido, indicando maior termoestabilidade frente a pHs ácidos.

### **2.3.2- Ácido byssochlamico**

O ácido byssochlamico é um metabólito secundário produzido por espécies de *Byssochlamys*. Em laboratório, a presença desta toxina foi detectada após armazenagem do produto contaminado por 1 a 2 meses. Verificou-se também que compostos como sacarose, maltose frutose, galactose, ácido cítrico, ácido glucônico além do glicerol promovem um aumento da capacidade de formação do ácido byssochlamico (Tournas, 1994).

### **2.3.3- Verrucologena**

Segundo Perera et al. (1982) algumas espécies de *Neosartorya fischeri* são capazes de produzir toxinas como Fumitremorgina A e C, Verrucologena e Fischerina, que têm ação no sistema nervoso central causando tremores, convulsões e morte. O mesmo autor, considerou em seus estudos, a verrucologena como sendo a mais tóxica e perigosa dentre as toxinas acima mencionadas por necessitar de concentrações pequenas (5-10µg/Kg) para manifestação dos efeitos neurológicos.

### **2.4- Como Controlar o Desenvolvimento de Bolores Termoresistentes**

Muitos fatores podem influenciar o crescimento de fungos termoresistentes em alimentos processados. No entanto, os considerados de maior importância estão relacionados com o nível de contaminação inicial, os tipos de microrganismos contaminantes, composição do produto, temperatura de armazenagem, pH, atividade de água (aw), tensão de oxigênio residual, tratamento térmico e o grau de ascósporos sobreviventes, além da presença de antimicrobióticos, conservantes, ou inibidores do crescimento. Se o grau de contaminação do produto *in natura* é baixo, um tratamento térmico brando já resultará num decréscimo de unidades formadoras de colônias para um nível aceitável. Contudo, contaminações altas necessitarão de longos tratamentos térmicos, e possivelmente altas temperaturas para que seja atingido o mesmo grau de esterilidade (Tournas 1994).

Tournas (1994) relata que aquecimentos extensivos destroem características organolépticas e diminuem a qualidade nutricional do produto. A espécie de microrganismo presente afeta a deterioração e o tempo de tratamento, o que poderá influenciar o crescimento e a capacidade de termoresistência dos

mesmos. O tratamento empregado deve ser adequado para destruição da maioria dos organismos termoresistentes, sem que haja diminuição da qualidade do produto. Se isso não for possível, pode-se considerar algumas alternativas para controlar o crescimento microbológico como:

#### **2.4.1- Boas práticas de manufatura (BPM)**

Segundo Eiroa et al. (1985), o solo dos pomares de uva representam a maior fonte de contaminação para fruta, podendo carrear bolores termoresistentes, desta maneira as boas práticas de manufatura se tornam ponto fundamental na obtenção de uma produto de qualidade.

As BPMs em linha de sucos consistem basicamente na sugestão de critérios como a lavagem adequada por aspersão (8 atm), para remoção das sujidade das frutas; utilização de 100mg/l de cloro para lavagem de frutas lisas; transporte adequado para que não ocorra risco de rompimento das frutas facilitando a contaminação por bolores termoresistentes; lavagem e sanitização adequada das caixas utilizadas para o transporte das frutas; evitar um possível contato dos equipamentos da planta de processo com terra ou poeira; os resíduos provenientes da matéria prima devem ser removidos não entrando em linha de produção, bem como o cuidado a ser tomado com a água de lavagem de frutas que deverá sempre ser desprezada e jamais recirculada (Gressoni, 2002).

#### **2.4.2- Atividade de água ( $a_w$ )**

Todos os microrganismos necessitam de uma certa atividade de água para que possam crescer e se reproduzir. Se esta atividade de água estiver abaixo do necessário não haverá germinação nem crescimento. A atividade de água mínima varia de microrganismo para microrganismo e é influenciada por outros fatores.

A atividade de água mínima para germinação de *Byssochlamys* é de 0,84 (Beuchat & Rice 1979; Tournas 1994; Baglione 1998), e para *Neosartorya fischeri* é 0,915. Uma atividade de água relativamente baixa em um alimento susceptível de contaminação por fungos termoresistentes aumenta sua preservação. Produtos com atividade de água mais alta devem ser estocados a temperaturas mais baixas para evitar que ascósporos sobreviventes do processo de pasteurização germinem. O abaixamento da atividade de água e a utilização de temperaturas mais baixas de armazenagem têm ação sinérgica na conservação de alimentos termoprocessados (Beuchat & Rice 1979; Nielsen et al. 1988).

Oliver & Rendle (1934) fizeram uma estimativa da quantidade máxima de sacarose tolerada por *B. fulva* em PDA (Potato Dextrose Ágar), CYA (Czapek Yeast Ágar) e solução fisiológica. Encontraram que a máxima concentração variava entre 60 e 65% de sacarose na temperatura de incubação de 28° C, obtendo-se resultados semelhantes na troca de sacarose por maltose, glicose e frutose. Por outro lado, Nielsen et al (1988) verificaram que, a uma dada atividade de água, a sacarose produziu um efeito inibitório maior que a glicose ou frutose no crescimento de *N. fischeri* em CYA à 25° C.

L'ubomir e Piecková (2001) utilizaram meio (Ágar Sabouraud) acrescido de diferentes quantidades de sacarose, que proporcionaram atividades de água variando entre 0,990 e 0,85 para o teste de capacidade de crescimento de 3 espécies de fungos (*Neosartorya fischeri*, *Talaromyces avellaneus* e *Byssochlamys fulva*). Como resultado, estes pesquisadores obtiveram que, na atividade de água de 0,85, o fungo *Neosartorya fischeri* teve sua taxa de capacidade de crescimento reduzida em 77,80%, já para *Talaromyces avellaneus* este valor foi de 85,43% e com relação a *Byssochlamys fulva* a redução foi de 95,73%. Os mesmos autores ainda afirmam que os resultados experimentais obtidos podem ser aplicados para prevenção de deterioração fúngica em sucos e derivados.

Tournas & Traxler (1994) demonstraram que os ascósporos de *Neosartorya fischeri* aquecidos a 85, 88, 90, 95, e 100°C por 1 hora, em suco de abacaxi concentrado (42,7 Brix), eram mais termoresistentes do que quando aquecidos em água deionizada estéril, ou mesmo suco de abacaxi (12,6 Brix), sendo este efeito protetor bastante perceptível, provavelmente devido à porcentagem de sólidos solúveis.

Em concordância com os demais já citados, King Jr & Whitehand (1990) comprovaram em seus experimentos, que uma maior quantidade de açúcar no meio de aquecimento contendo ascósporos de *Talaromyces flavus* fez com que a resistência dos mesmos aumentasse.

#### **2.4.3- Atmosfera (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>)**

Os fungos são considerados microrganismos aeróbios e a presença de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) é citada como um fator de inibição para o crescimento (Tournas 1994).

Uma pequena quantidade de espécies de fungos é capaz de crescer sob condições anaeróbias, sendo que muitos deles têm a característica de serem microaerófilos (Tournas 1994).

Yates and Ferguson (1963) relatam que espécies de *B. nivea* podem crescer sob baixas taxas de oxigênio. Yates et al. (1967), num estudo mais detalhado, concluíram que estes fungos poderiam crescer em atmosferas com grande concentração de CO<sub>2</sub>, e que, os acréscimos de concentração deste gás levaria a um decréscimo linear do crescimento do micélio. Outras conclusões relatadas por estes pesquisadores mostram que em atmosferas com 100% de CO<sub>2</sub>, *B. nivea* apresenta 4% do seu crescimento normal (na presença de ar atmosférico). Já em atmosferas com 80% de CO<sub>2</sub> e 20% de O<sub>2</sub>, 85% do

crescimento normal foi observado, mas quando são combinados 80% de CO<sub>2</sub> com 20% de ar atmosférico, apenas 16% do crescimento foi visualizado. Esta diferença de crescimento nas mesmas concentrações de CO<sub>2</sub> poderia ser explicada devido ao fato do ar comum ter uma taxa de O<sub>2</sub> menor do que quando se usa O<sub>2</sub> puro.

Outros pesquisadores como King et al. (1969) relataram que houve crescimento de *B. fulva* em meio sintético sob atmosfera contendo 0,27% de O<sub>2</sub>, mas não em condições estritas de anaerobiose.

Nielsen et al., (1989b) avaliaram o crescimento de *N. fischeri* em atmosferas com níveis de O<sub>2</sub> variando entre 0,0095 e 20,9%, usando como meio CYA ajustado nos pHs 3,5 e 7 e incubado a 25° C no período de 38 dias. Os resultados mostraram que *N. fischeri* foi capaz de crescer na presença de atmosferas com 0,10% de O<sub>2</sub>, isto indica que fungos desta classe poderiam crescer com facilidade em ambiente apresentado pelas embalagens cartonadas, que são as mais comuns para o envase de suco de uva. Não ocorreu crescimento em 0,0095% de O<sub>2</sub> ou mesmo em N<sub>2</sub> puro (menos de 10 mg/l de O<sub>2</sub>) dentro de 38 dias de incubação. Em pH 7, a taxa de crescimento deste fungo foi maior que em meio com pH 3,5. Estes resultados contrastam com afirmações feitas por Pitt & Hocking (1985) que atribuíram somente ao gênero *Byssochlamys* à capacidade de desenvolvimento em baixas tensões de O<sub>2</sub>. King Jr. & Whitehend (1990) demonstraram que *Talaromyces flavus* é menos tolerante a baixos níveis de oxigênio do que *Byssochlamys spp.* e *N. fischeri*. Em uma câmara de gás nitrogênio fluente (presença de 250 mg/l de O<sub>2</sub>, à 25° C), não houve crescimento de *T. flavus* após 56 dias, enquanto que *Byssochlamys fulva* e *Neosartorya fischeri* desenvolveram colônias sob as mesmas condições.

Atmosferas com níveis de oxigênio que impedem o desenvolvimento de fungos termoresistentes não são letais para estes microrganismos, um vez que, se forem expostos ao ar após, estarem submetidos ao oxigênio limitado durante certo

tempo, desenvolvem colônias normalmente (Nielsen et al. 1988; King Jr. & Whitehand 1990).

#### **2.4.4- Temperatura**

A influência da temperatura sob o desenvolvimento de fungos termoresistentes vem sendo investigada a tempos Olliver and Rendle (1934) relataram que a temperatura ótima para o crescimento de *Byssochlamys* estava entre 30 e 37° C, em concordância com Roland et al. (1984) e Roland and Beauchat (1984).

Verificou-se também que a estocagem a baixas temperaturas (-12 a -7° C) inibe o crescimento, mas não inativa o fungo *Byssochlamys*. Sobre o comportamento de ascósporos de *B. nivea* em sucos e néctares suplementados de sacarose, Beuchat & Toledo (1977) sugeriram que as temperaturas testadas de 7 e -30° C tiveram efeito letal sobre os ascósporos de *B. nivea*, no entanto a adição de sacarose nestes produtos de fruta tende a proteger ascósporos da morte.

Um outro aspecto abordado nas pesquisas de King Jr & Whitehand (1990), tratou da temperatura de crescimento do fungo que, segundo estes pesquisadores, é de suma importância quando relacionado com sua capacidade de resistência ao calor. O fungo *Talaromyces flavus* foi incubado às temperaturas de 20, 25, 30 e 35°C. Os autores encontraram produção abundante de ascósporos nas temperaturas de 25, 30 e 35°C e limitada a 20°C . A resistência térmica foi maior para os ascósporos produzidos em temperaturas extremas, ou seja, 20 e 35°C, sendo 1/k (segundo Baglioni (1998), 1/k é um parâmetro equivalente a D) de 5,2 e 4,8 min, respectivamente, já para os ascósporos produzidos em temperaturas de 25 e 30°C foram obtidos valores de 1/k de 3,0 e 4,1 min respectivamente.

#### 2.4.5- Emprego de antimicrobianos

Desde a pré-história, os homens tentam preservar os alimentos para utilizá-los mais tarde. Tradicionalmente, eram utilizados o frio, calor, secagem e fermentação para se obter essa preservação. Hoje em dia, com a necessidade de que os alimentos sejam transportados por longas distâncias ou que possuam longa vida de prateleira, passou-se a utilizar aditivos químicos como conservantes (Branen 1993). A variedade de aditivos disponíveis para utilização é bastante grande, mas em sucos os mais utilizados são os sorbatos, benzoatos e o dióxido de enxofre.

Quanto à utilização de benzoato de sódio sabe-se que, devido à quantidade de ácido benzóico ou benzoato de sódio não dissociado diminui com o aumento do pH, bem como para os sorbatos, o uso destes conservantes em alimentos é limitado a produtos que sejam naturalmente ácidos. Estes compostos são antimicóticos e atuam inibindo o crescimento de fungos e leveduras (Chiplely 1993).

Com relação aos sorbatos, a atuação primordial é verificada preferencialmente para fungos e leveduras (Sofos & Busta 1993). Roland et al. (1984) relatam que, em seus experimentos, a concentração de sorbatos (até 50 µg/ml) e a temperatura de 21°C, foram capazes de inibir o crescimento de *B. nivea* em suco de uva por até 15 dias, e após este período, a quantidade de biomassa produzida ficou em nível bem menor do que nas temperaturas de 30 e 36° C.

*N. fischeri* é um fungo termoresistente facilmente isolado de sucos depois de processados. Por isso, Nielsen et al. (1989a) utilizaram pequenas quantidades de conservantes, ou seja, cerca de 75 mg/l de sorbato de potássio ou benzoato de sódio, para conseguir inibir completamente a germinação de ascósporos.

Segundo Roland et al. (1984), o fungo *B. nivea* necessita de quantidades altas de benzoato de sódio para que se consiga a inibição. Os valores encontrados para completa inibição deste fungo em suco de uva foram de 500 µg/ml para qualquer uma das temperaturas aplicadas (21, 30 e 36° C).

Com relação ao dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>), sabe-se que seu uso para o controle de fungos e leveduras já é praticado há muitos anos. Roland et al., 1984) mostram que concentrações de 100 µg/ml de SO<sub>2</sub> foram necessárias para reprimir o crescimento de *B. nivea* e que esta concentração atrasou o crescimento de 17 para 21 dias a uma temperatura de 30° C. Comparativamente, o SO<sub>2</sub> tem um efeito mais significativo no retardamento de produção de biomassa por *B. nivea* seguido pelo sorbato de potássio e benzoato de sódio respectivamente.

Atualmente, está sendo testada a utilização de quitosano como anti-séptico em alimentos. O quitosano é um derivado diacetilado da quitina obtido por tratamento com álcalis. Estudos realizados por Roller & Covill (1999) mostraram que, das sete espécies de fungos testadas, apenas os Zigomicetos como *M. racemosus* e os Ascomicetos como *Byssoschlamys spp* podem ser inibidos com facilidade pelo quitosano na concentração de 1-5 g/l. Já os Deuteromicetos como *Aspergillus flavus* são resistentes a concentrações superiores a 10 g/l de quitosano. Com relação ao crescimento de leveduras, o quitosano obteve ótimos resultados necessitando de baixas concentrações para a inibição da maioria das leveduras relacionadas com deterioração em alimentos.

O Dimetildicarbonato (DMDC) é um antimicrobiano que vem sendo utilizado no controle da deterioração de bebidas, em particular suco de frutas. Esta substância é ativa contra vários tipos de microrganismos incluindo bactérias, fungos e leveduras, sendo que possui uma alta reatividade química com a água apresentando traços de metanol e de dióxido de carbono na sua decomposição. Segundo Van der Riet e Pinches (1991), as formas vegetativas são mais sensíveis a baixas concentrações deste produto (25 mg/l) do que as formas esporuladas que

suportam até 1000 mg/l. Para pesquisa com uso intermitente de DMDC estes pesquisadores utilizaram inóculos de cinco cepas diferentes de *B. fulva* isoladas de produtos comerciais com suspensão estimada de  $10^4$  esporos /ml em meio contendo PDA (Agar de Batata Dextrose). Os resultados mostram que houve um controle melhor do crescimento quando a temperatura de exposição esteve em torno de 25° C e 30°C. Já em temperaturas de 20°C, o controle foi menor e, isto se explica pelo efeito destrutivo do DMDC a baixas temperaturas. Quando se utilizou processo de tinalização e uso intermitente de DMDC, a maioria dos ascósporos foram eliminados após 24 hs de contato a temperaturas de 25 ou 30°C.

#### **2.4.6- Tratamento termoquímico**

A faixa de pH que um fungo pode crescer em determinado meio é bastante ampla. Fungos do gênero *Byssochlamys* crescem em substratos nutrientes com pH variando de 2 a 9, sendo que o pH ótimo para o crescimento está próximo de 3. *Neosartorya fischeri* cresce bem em pHs entre 3 e 7,95. Portanto, a manipulação do pH como medida de inibir o crescimento destes fungos nos produtos alimentícios seria inviável, pois só em valores extremos de pH (não adequado para alimentos) isto ocorre (Tournas 1994).

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, devido ao efeito sinérgico, com possibilidade de uma redução dos binômios de tempo e temperatura de pasteurização, requeridos por certos produtos ácidos, mesmo os que possuem altos teores de sacarose, aumentando a possibilidade de manter as qualidades sensoriais e nutricionais do produto (Beuchat, 1981b).

Bayne and Michener (1979) mostram em seus experimentos que, após um tratamento de 90° C por 25 minutos, variedades de ascósporos de *Byssochlamys* plaqueados em meio com pH 5 apresentaram maior capacidade de crescimento e sobrevivência do que os plaqueados em meio com pH 3,6.

Beuchat (1976) estudou o efeito sinérgico da aplicação de calor (70°C/1 hora), combinado com a adição de sorbato de potássio ou benzoato de sódio, sobre ascósporos de *B. nivea*, em suco de uva. Os resultados demonstraram que concentrações de 50 e 100mg/l de sorbato de potássio acrescidos antes do processo térmico, parecem ter um efeito estimulante da ativação de dos ascósporos do fungo em questão, enquanto concentrações maiores apresentam um efeito inibitório, sendo que 1000mg/l do conservante resultou numa 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 na concentração de 1000mg/l.

Beuchat (1981a), entretanto, não observou diferença entre a ação dos conservantes sorbato de potássio e benzoato de sódio, sobre os ascósporos de *B. nivea*, quando adicionados em tampão fosfato pH 4,5 e aquecidos a 80°C. Os conservantes reduziram o valor de D, porém não apresentaram efeito diferenciado entre eles, quando utilizados nas mesmas concentrações. Em experimento adicional com conservantes, em presença de sacarose sob aquecimento, os autores observaram que o efeito sinérgico (conservante/calor) parece ser retardado pelo aumento da concentração de sacarose.

Beuchat (1988) estudou o efeito do acidulante ácido fúmarico como sensibilizador de ascósporos de *Talaromyces flavus*, comparando-o a ação dos conservantes benzoato de sódio e sorbato de potássio, sob aquecimento a 80°C. o autor observou que o ácido fumárico foi mais efetivo do que os outros dois na sensibilização do ascósporos. Em solução 0,5% de ácido fumárico, com pH entre 2,5 a 3,0, os ascósporos foram inativados após 20 minutos de aquecimento. Para

obtenção do mesmo resultado com ácido sórbico ou benzóico, foram necessárias concentrações de 1% nas mesmas condições. Na mesma pesquisa foi determinado o efeito do sorbato e benzoato sobre a viabilidade dos ascósporos de duas linhagens de *Talaromyces flavus*, presentes em derivados 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 ascósporos da linhagem menos resistente ocorreu a 75°C/60 min, em presença de 1000mg/l de benzoato. Nenhum dos conservantes foi capaz de inativar a segunda linhagem, mesmo sob o aquecimento de 85°C.

O efeito sensibilizador do ácido fúmarico também foi observado por Splittstoesser & Splittstoesser (1977), quando estudavam o efeito de vários ácidos orgânicos sobre ascósporos de *B. fulva*, aquecidos a 85°C por 120 minutos. Os autores observaram que o aquecimento em presença de ácido acético, succínico, láctico e fumárico aumentava a sensibilidade dos ascósporos, sendo o último mais efetivo do que os demais. Ainda, foi constatado um efeito protetor do ácido tartárico e málico sobre os ascósporos de *B. fulva*. Já para *Neosartorya fischeri*, não foram observadas alterações no número de sobreviventes, quando comparado o aquecimento dos ascósporos em soluções de 0,05M dos ácidos cítrico, fumárico, málico e tartárico, pH 3,5. os resultados indicaram que a resistência dos ascósporos de *N. fischeri* não variaram frente a presença dos ácidos como o ocorrido com *B. fulva*.

Em contraste com os resultados de Splittstoesser & Splittstoesser (1977), os dados obtidos por Conner & Beuchat (1987) demonstraram que os ácidos fumárico, cítrico, acético e tartárico aumentam a inativação térmica dos ascósporos de *N. fischeri* quando aquecidos a 82°C. O ácido fumárico em solução 0,5% (p/v) e pH 3 mostrou-se 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.

Rajashekhara et al. (1998) demonstraram que ascósporos de *N. fischeri* e *B. fulva* têm uma menor inativação na presença de ácido tartárico, do que quando na utilização de outros ácidos orgânicos. Estes pesquisadores mostraram que em suco de manga a população ascósporos de *N. fischeri* demorou mais tempo para sofrer reduções logarítmicas na presença de ácido tartárico do que se estivesse sem esta substância. Resultados semelhantes foram obtidos com ascósporos de *B. fulva*, demonstrando a proteção causada por este ácido nos ascósporos. Entretanto King & Whitehand (1990) não encontraram diferença na resistência térmica de *T. flavus* quando exposto a diferentes ácidos orgânicos como cítrico, tartárico, málico e láctico.

Os estudos de Rajashekhara et al. (1998) concluíram que o aquecimento térmico prolongado é essencial para completa eliminação de ascósporos em suco de frutas. Entretanto, esta prática não é desejável para produção comercial, pois causa efeitos adversos na qualidade sensorial e nutricional. O uso de acidulantes e preservantes químicos pode aumentar a vida de prateleira de produtos de frutas termicamente processados.

Salomão (2002) constatou grande diferença entre parâmetros de resistência térmica aplicados em néctar de maçã com pH 4,5 e 2,5. Os valores de  $D_{90^{\circ}\text{C}}$  2,20 min para pH 4,5, enquanto que, para o pH 2,5 na mesma temperatura encontrou-se  $D_{90^{\circ}\text{C}}$  0,94 min, o que representa uma queda de 42,72% na capacidade de termoresistência.

#### **2.4.7- Métodos não térmicos de inativação de bolores**

Os sucos de frutas são em geral bastante apreciados pela população mundial. Entretanto, propriedades como cor, aroma e sabor são susceptíveis a reações desfavoráveis quando o suco é submetido a tratamento térmico, resultando em produção de “off-flavor” e escurecimento. Para evitarem estes tipos

de problemas, métodos não térmicos de combate aos microrganismos, têm sido sugeridos no intuito de melhorar a qualidade dos sucos.

#### **2.4.7.1- Emissão de pulso elétrico**

A Emissão de Pulso Elétrico é um método não térmico de preservação alimentícia, que visa a inativação dos microrganismos e enzimas, sem perda significativa do sabor, aroma, nutrientes e cor dos produtos. Este método envolve a aplicação de altas voltagens em alimentos situados entre dois eletrodos. Assim, a corrente elétrica de alta voltagem é descarregada, provocando um fluxo elétrico através dos alimentos líquidos, que por sua vez são bons condutores por possuírem íons na sua constituição. O tempo de descarga elétrica varia na casa dos microsegundos, fazendo com que o aquecimento que poderia ser provocado pela corrente seja insignificante. Quando comparado com o processo térmico convencional, a Emissão de Pulso Elétrico possui a vantagem de diminuir a desnaturação protéica, além de preservar as porcentagens de vitamina C disponíveis no suco fresco (Heins et al., 2002).

Yeom et al. (2000) utilizaram este método em suco de laranja com contaminação inicial de bolores e leveduras de  $10^7$  UFC/ml. Estes pesquisadores concluíram que a Emissão de Pulso Elétrico se mostrou efetiva no controle microbiológico e enzimático no suco analisado. O tratamento de 35 hv/cm por 59 $\mu$ s, foi capaz de reduzir a população de microrganismos, dentre estes bolores e leveduras, em 7 ciclos logarítmicos e inativar a enzima pectinametilesterase em 90%, o suco ainda mostrou extensa vida de prateleira nas temperaturas de 4, 22, 37°C durante 112 dias, comprovando a eficiência do método. Durante o período de prateleira não foram detectados bolores de nenhuma espécie, o que indica que maiores pesquisas relacionadas com bolores termoresistentes utilizando-se desta técnica podem ser feitas para comprovar a letalidade dos mesmos frente à Emissão de Pulsos Elétricos.

#### 2.4.7.2- Altas pressões

Ogawa et al. (1990) utilizaram o método de inativação microbiana por alta pressão, dentre os microrganismos testados, os autores utilizaram uma cepa termoresistente, não especificada, de levedura, onde aplicaram tratamento variando de 2500-4000 bars, durante 5 a 30 minutos, e concomitantemente um tratamento térmico nas temperaturas de 53, 58, 60 e 62°C, pelos mesmos períodos de tempo. Os autores concluíram que a espécie isolada de uma indústria de suco, foi capaz de resistir a ambos os tratamentos aplicados.

Os autores citados acima, também testaram duas cepas, consideradas nas suas pesquisas como termoresistentes, compostas por *Aspergillus awamori* e *Mucor plúmbeos*. A técnica utilizada para tratamento térmico e de pressão foram as mesmas mencionadas anteriormente para leveduras. Ogawa et al. (1990) mencionaram que os fungos termoresistentes são claramente capazes de sobreviver ao tratamento por altas pressões, afirmando que pressões de 4000 bars/5 minutos não são suficientes para inativação dos esporos presentes em sucos.

Maggi et al. (1994) estudaram o efeito do tratamento por altas pressões em ascósporos termoresistentes de bolores como *Byssochlamys nivea*, *Byssochlamys fulva*, *Neosartorya fischeri* e *Talaromyces flavus* em néctar de damasco, assim como em água destilada. Em néctar de damascos na temperatura de 20°C, um tratamento de 9000bars/20minutos foi suficiente para inativar todos os ascósporos de *Talaromyces flavus* e conseguir uma redução de dois ciclos logarítmicos nos ascósporos de *Neosartorya fischeri*. No entanto, não se conseguiu nenhuma redução mensurável no que se diz respeito aos ascósporos de *B. nivea* e *B. fulva*. Tratamentos realizados em néctar de damasco pré-aquecidos a 50 e 60°C utilizando-se binômios de 8000bars/1-4minutos e 7000bars/1-2minutos respectivamente, mostraram-se capazes de inativar completamente os ascósporos da quatro linhagens estudadas. Um outro dado importante apresentado pelos autores, foi a maior capacidade de resistência a alta pressão dos ascósporos

quando inoculados em néctar de damasco, do que quando em testes realizados em água destilada.

Butz et al. (1995) testaram o tratamento combinado de alta pressão e temperatura em formas vegetativas e termoresistentes de fungos como *Byssochlamys fulva*, *Byssochlamys nivea*, *Eurotium*, *Eupenicillium spp* e *Paecilomyces spp*, utilizando como meio de inoculação suco de uva. Os autores demonstraram que todas as formas vegetativas foram destruídas com binômio de 300Mpa/25°C utilizando poços minutos. As cepas de *Eupenicillium* e *Paecilomyces* se mostraram mais sensíveis à pressão quando comparadas com *Byssochlamys* e *Eurotium*, apesar deste fato a cepa de *B. nivea* se mostrou mais resistente que as demais necessitando de 60 minutos de tratamento a 700Mpa/70°C para que se obtivesse uma redução de 99,9%.

#### **2.4.7.3- Radiação ionizante**

Pelo fato de que os ascósporos de *Byssochlamys* podem muitas vezes sobreviver a temperaturas superiores a 100°C por períodos maiores do que os normalmente utilizados no processo de pasteurização, Partsh & Altmann (1970) buscaram no método de radiação ionizante uma forma de poder inativar os ascósporos sem influenciar sobremaneira o sabor e a aparência dos sucos. Estes autores demonstraram que sucos de maçã, uva e laranja inoculados com 10<sup>3</sup> esporos/ml de *Byssochlamys*, após exposição à irradiação em doses de 2.2-2.4 kGy se mantiveram estáveis por um período de 3 meses. No entanto, o calor (72°C), quando associado simultaneamente, pode diminuir as doses de irradiação para 1,6 kGy em suco de maçã e 1,8 kGy em suco de uva e laranja, mantendo a eficiência de controle, durante o mesmo período de estocagem.

Já Van Der Riet et al.(1985) investigando presença de *Byssochlamys fulva* em suco de maçã, demonstrou que cepas diferentes do mesmo fungo necessitavam de diferentes níveis de radiação para completa destruição dos

ascósporos. Desta maneira o isolado mais resistente precisou de 7.2 kGy/1h na temperatura de 25°C, para inativação de 10<sup>6</sup> esporos/ml.

## 2.5- Idade do Esporo como Fator de Risco

Conner & Beuchat (1987b) constataram que ascósporos de *Neosartorya fischeri* com idade de 21 dias eram mais termoresistentes que os de 8 dias. Uma outra verificação feita pelos mesmos autores mostrou que ascósporos cultivados em temperaturas menores (18 e 21°C) tendiam a ser menos resistentes ao calor do que ascósporos da mesma idade cultivados a 25 e 30°C.

Segundo Conner & Beuchat (1987a), fatores diversos são capazes de influenciar a resposta de ascósporos de *Neosartorya fischeri* ao tratamento térmico e assim causar uma variação nos valores D (tempo em minutos necessário para reduzir uma população em 90%, numa dada temperatura) obtidos em estudos de tempo de morte térmica (TDT). Desta maneira, para a padronização dos valores D, os fatores como natureza do meio de aquecimento, produção de ascósporos, pH do meio, idade dos esporos e presença de ácidos orgânicos devem ser bem definidos, bem como a temperatura de tratamento.

Nos trabalhos com ascósporos de *Neosartorya fischeri* de 1, 2, 3 e 6 meses de idade, isolados de suco de abacaxi, que posteriormente foram aquecidos a 88°C por 1 hora em água deionizada, Tounas e Traxler (1994) constataram que os ascósporos mais velhos mostraram-se mais resistentes que os mais jovens na mesma temperatura.

Casella et al. (1990) observaram que ascósporos de *Byssochlamys nivea* com 16 semanas mostraram-se mais resistentes ao tratamento térmico do que os de 8 semanas, porém esse fato só foi verificado em esporos obtidos a partir de culturas em meio rico em nutrientes como MEA, nas temperaturas de 25 e 35°C.

No entanto, com relação ao PDA, meio considerado menos nutritivo, a idade do esporo só demonstrou diferença significativa nas culturas mantidas a 35°C, enquanto que para a temperatura de 25°C este fato não foi observado, demonstrando que o substrato aliado a temperatura afetou a termoresistência dos ascósporos. Em contradição aos resultados obtidos por Casella et al. (1990), os autores Conner & Beuchat (1987b) em seu trabalho, afirmaram que o tipo de meio de esporulação utilizado não afetava a termoresistência de ascósporos de *N. fischeri*.

Estudando o efeito de alguns desinfetantes sobre fungos normalmente encontrados em processos de fabricação de pães e queijos, os autores Nielsen & Nielsen (1995) investigaram a resistência de ascósporos e conídios de várias idades frente ao etanol 70%. As culturas utilizadas para testar a relação existente entre a idade do ascosporo e a resistência ao etanol, foram cultivadas em tempos de 17 a 110 dias. Os autores demonstraram que a resistência dos ascósporos dos fungos *Eurotium repens*, *Monascus ruber* e *Neosartorya pseudofischeri* era fortemente aumentada pela idade, porém com relação aos conídios de alguns fungos não foi possível a observação da relação entre o aumento da idade com o aumento da resistência ao etanol 70%. O aumento da resistência observada com a idade, para ascósporos, pode ser consequência de alterações estruturais e/ou bioquímicas ocorrida no ascosporo com o tempo, o que poderia explicar essa alteração de resistência ao etanol, segundo os autores.

## **2.6- Meios de Cultura e Identificação de Fungos Termoresistentes**

### **2.6.1- Meios de crescimento, isolamento e esporulação de fungos termoresistentes**

Durante experimentos para determinação de resistência térmica de ascósporos de *Byssochlamys*, Bayner & Michener (1979) necessitavam utilizar um

meio de cultura que beneficiasse a formação de ascósporos com maior caráter termoresistente. Desta maneira, os autores observaram que havia uma diferença potencial de crescimento por parte das variadas linhagens em meios padrões como PDA e MEA, bem como, a formação de ascósporos por parte das mesmas. Os autores preconizam que somente culturas crescidas em meios naturais têm a possibilidade produzir ascósporos de alta resistência térmica como os encontrados em contaminações industriais.

Casella et al. (1990), em testes de influência do meio de crescimento na resistência térmica de ascósporos, demonstraram que os ascósporos de *Byssochlamys nivea* provenientes de MEA possuíam uma maior termoresistência do que os obtidos através de PDA.

No que se refere a *Byssochlamys fulva*, Splittstoesser et al. (1969) obtiveram máxima produção de ascósporos em caldo de extrato de malte, incubado a 30°C no período de 7-14 dias com pH ótimo do meio abaixo de 3,0, em detrimento aos outros meios de comparação como caldo de extrato de levedura-triptona-glucose, bem como em PDA.

Segundo Tournas (1994), o fungo *Byssochlamys fulva* desenvolve-se rapidamente em Ágar Czapek, assim como em CYA. As colônias apresentadas em Ágar Czapek são bastante semelhante as obtidas em PDA e MEA, exceto por se mostrarem mais funiculosas nestes dois últimos meios. Com relação ao fungo *Byssochlamys nivea*, este também apresenta um crescimento rápido em Ágar Czapek incubado a 30°C, sendo que o crescimento obtido se mostra similar em PDA e em MEA, com o diferencial de se mostrar mais acelerado em MEA nos estágios iniciais. No entanto, segundo o autor, o melhor meio de crescimento para *B. nivea* é o Ágar Saboraud, onde o fungo atinge 45 mm de diâmetro da colônia após 2 dias de incubação.

Os bolores do gênero *Neosartorya*, segundo Nielsen & Samsom (1992), podem ser cultivados em diferentes meios de cultura como AO (Ágar Farinha de Aveia), CYA, MEA e YES (Ágar Sacarose Extrato de Levedura), todavia, por preferência dos autores, durante a pesquisa foram utilizados somente ascósporos coletados em meio AO.

Tournas (1994) utilizou meio CYA para desenvolvimento mais abundante de cleistotécio pelo fungo *Neosartorya fischeri*, apesar das colônias em MEA se mostrarem maiores. Já Conner & Beuchat (1987b), optaram pela utilização de PDA (pH 5,6) com incubação a 30°C, para o crescimento do mesmo fungo.

Em relação ao isolamento de *Neosartorya fischeri*, Jesenská (1991) analisando amostras de solo, fez uso de Ágar Saboraud (pH 6,57) contendo 150mg de rosa de bengala/L. Tournas & Traxler (1994) isolaram o mesmo fungo de suco de abacaxi concentrado, utilizando-se de Ágar Czapek para o crescimento e esporulação do *N. fischeri*.

King Jr & Whitehand (1990) observaram que os ascósporos de *Talaromyces flavus* apresentavam maior termoresistência quando foi utilizado o meio MEA para o crescimento do fungo, em detrimento a outro meio de composição similar, sem o emprego do ágar. Segundo os autores, este dado é bastante relevante, pois em uma situação prática onde um fungo contamine um produto, sua resistência térmica pode ser alterada dependendo da natureza do produto contaminado.

Segundo King Jr & Halbrook (1987), para *Talaromyces flavus* o meio de cultura MEA se mostrou mais eficiente, pois, proporcionou um maior crescimento deste bolor do que quando comparado com PDA. Em concordância com estes relatos, Tournas (1994) complementou a pesquisa demonstrando que o fungo tem crescimento bastante semelhante em CYA e em MEA, porém neste último, ocorre abundante formação de gimnotécio.

## **2.6.2- Identificação de Fungos Termoresistentes**

Pitt & Hocking (1985) padronizaram uma metodologia de identificação baseada em chaves primariamente descritas. Segundo os autores, a cepa a ser identificada deve ser transferida para 3 diferentes meios, sendo estes MEA, CYA e G25N (Ágar Nitrato com Glicerol 25%), por inoculação com agulha (3 pontos por placa), cultivados durante 7 dias, utilizando-se para isto 3 temperaturas (5, 25, 37°C).

Depois do prazo de incubação, os mesmos autores preconizam o exame macroscópico das culturas, onde parâmetros como diâmetro da colônia em milímetros, cor apresentada na superfície e reverso da placa, bem como, a aparência da colônia, devem ser anotadas para posterior comparação com as chaves de identificação. Já, com relação às análises microscópicas, o procedimento adotado baseia-se na preparação de lâminas de montagem úmida para observação de estruturas (ascósporos, formação de hifas, septos, metula, fialides, entre outras) que podem fazer parte da chave de pesquisa.

Sansom (1988) não adota a utilização de meios específicos para identificação de fungos, o autor só recomenda que sejam usados os meios mais comuns como MEA, CYA e outros. A incubação preconizada é sempre à 25°C, enquanto que o período não é rigorosamente definido podendo variar de 5-10 dias. A observação macroscópica seguida da microscópica é indicada, porém este autor sugere a utilização de dois tipos de preparo de lâminas, sendo estas de montagem úmida e de fixação com fita transparente adesiva.

Após visualização das estruturas fúngicas de interesse, a chave de consulta deve ser seguida para identificação.

Uma outra metodologia de identificação foi proposta por Gumerato (1995), mediante o uso de um programa computacional FUNG HOM para a identificação

fungíca de *Aspergillus* e *Penicillium*, baseados em 63 características macroscópicas e microscópicas, obtidas através de verificações realizadas no isolado a ser identificado inseridas no programa.

## **2.7- Detecção e Enumeração de Fungos Termoresistentes em Alimentos**

Devido à baixa incidência de fungos termoresistentes em alimentos os métodos descritos sugerem sempre a utilização de grandes amostras (em torno de 100g) durante as análises, Beuchat & Pitt (1992), assim como Tournas (1994), padronizaram um choque térmico no qual as estruturas fúngicas vegetativas e as demais formas termosensíveis são prontamente destruídas e os ascósporos (interesse da pesquisa) sofrem uma ativação.

Pitt & Hocking (1984) e Pitt & Hocking (1985) descreveram uma metodologia que consiste na utilização de duas amostras de 50ml cada colocadas em tubos de 200x30mm, sendo aquecidas 80°C/30 minutos, somado ao tempo de subida térmica. Após este choque as amostras são resfriadas em banho de gelo rapidamente até atingirem temperatura ambiente. O conteúdo deve ser plaqueado depois de homogeneizado com meio de PDA (concentração de 1,5). As placas devem ser colocadas em saco plástico e posteriormente incubadas invertidas em estufa regulada a 30°C, sendo que a verificação de crescimento deve ser feita semanalmente.

Anos mais tarde uma variação do método foi proposta por Beuchat & Pitt (1992), onde 100g/ml do produto, divididas em duas porções, sofrem aquecimento de 80°C/30 minutos, sendo resfriados posteriormente e transferidos na proporção de 1:1 com PDA ou outro ágar nutriente em concentração dupla, que devem ser distribuídos em placas de Petri. As mesmas ficam em estufa a 30°C por 7 dias e, caso não tenha ocorrido crescimento a verificação poderá ser feita após 30 dias.

Os métodos acima descritos podem apresentar problemas relacionados com contaminação aérea. Desta maneira não é raro o aparecimento de colônias de cor verde ou preta comuns aos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* respectivamente. Estas colônias quando identificadas devem ser ignoradas, não sendo incluídas na enumeração final. Para diminuir este problema, preferencialmente o procedimento deve ser realizado em câmara de fluxo laminar (Pitt & Hocking 1984; Pitt & Hocking 1985; Beuchat & Pitt 1992).

Os mesmos autores sugerem a adição de antibióticos aos meios de culturas utilizados a fim de evitar a germinação e o desenvolvimento indesejável de esporos bacterianos. Substâncias como cloranfenicol a 100 mg/l, acidificação do meio com ácido tartárico 10% p/v (1,2ml para cada 100ml de meio) e utilização de rosa de bengala são suficientes para evitar o crescimento destas bactérias.

## **2.8- Parâmetros de Resistência Térmica**

Conner & Beuchat (1987) utilizaram binômios de ativação, para ascósporos de *Neosartorya fischeri*, compostos pela temperatura de 84°C por 30, 60 e 90 minutos utilizando como meio de aquecimento suco de uva, maçã e tampão fosfato. Após análise de resultados, os autores verificaram que ao utilizarem tempos de 30 e 60 minutos só ocorriam ativações sendo que a morte de ascósporos não foi visualizada. Esta somente começou a ocorrer após o tempo de 90 minutos a 84°C. Outro detalhe importante é que em todos os tempos utilizados o suco de uva foi o que mostrou melhor recuperação dos ascósporos, seguido pelo suco de maçã, sendo que o tampão fosfato não demonstrou resultados expressivos.

Rajashekhara (1998) em seus experimentos com suco de manga e uva demonstrou que ascósporos de *Neosartorya fischeri* foram capazes de sobreviver por mais de 6 horas quando aquecidos a 75°C, 5 horas a 80°C e a 85°C de 3 a 4

horas. Na temperatura de 85°C os valores de D encontrados para suco de manga e uva foram respectivamente 63, 51 e 69,27 minutos, a temperatura não foi elevada acima deste valor para que as características organolépticas fossem preservadas.

Durante ensaios de ativação de ascósporos de *Byssochlamys fulva*, Splittstoesser et al. (1972) verificaram que este processo era influenciado pela temperatura e pelo meio nos quais os ascósporos estavam presentes. Os autores demonstraram que, em pH 1, após aquecimento a 60°C durante 120 minutos, o número de esporos ativados foi maior do que quando comparando as mesmas condições somente aumentando o pH para 1,4. Neste pH houve uma diminuição de 90% no número de ascósporos ativados.

## 2.9- Cinética de Inativação Térmica

Segundo King Jr et al. (1979), grande parte dos microrganismos apresenta um comportamento logarítmico frente à inativação térmica, desta maneira uma linha reta é obtida quando se constrói uma curva de morte plotando o logaritmo do número de sobreviventes *versus* tempo de aquecimento a uma dada temperatura. Os fungos termoresistentes, quando analisados através deste tipo de gráfico mostram uma curva de inativação térmica não logarítmica, onde é possível a visualização de um “ombro” inicial, representando uma maior lentidão de morte por parte dos esporos, seguido de uma taxa de morte acelerada, que dá a curva um aspecto logarítmico e por fim apresentando uma “calda” (tailing) onde os ascósporos mais resistentes passam a demorar mais tempo para apresentar completa inativação. Este comportamento segundo teorias pode se dar por substâncias protetoras (açúcares, ácidos) (Splittstoesser & Splittstoesser, 1977), ou por conformação de proteínas, com presença ou não de certos peptídeos capazes de fornecer termoresistência (Conner & Beuchat, 1987). Conforme a temperatura aplicada para inativação aumenta, o comportamento da curva na

parte relativa ao “ombro” diminui, tornando-a semelhante a uma reta (King Jr et al., 1979; Bayne e Michener, 1979; King & Halbrook, 1987; Kotzekido, 1997; Baglioni, (1998) e Delgado (2001).

A cinética de inativação térmica de microrganismos que possuem uma taxa de morte logarítmica é feita pela determinação dos parâmetros D (tempo requerido a uma dada temperatura necessário para inativar 90% da população de microrganismos em um meio de aquecimento definido) e Z (graus de temperatura requeridos para ocasionar uma variação de 10 vezes no valor de D) que podem ser obtidos a partir regressão dos dados da própria curva de sobreviventes. Entretanto, em microrganismos que não apresentam este tipo de comportamento existe a necessidade de se fazer uma linearização da curva para que os valores de D e Z seja mais próximos do real, não considerando apenas a parte linear da curva para estimativa destes parâmetros. Desta forma, Bayner & Michener (1979), Aragão (1989), Kotzekidou (1997), Baglioni (1998), Delgado (2001), Pacheco (2001) e Gressoni (2002) verificaram que os tempos de aquecimento, a uma dada temperatura, necessários para que haja um determinado número de reduções decimais são mais próximos dos valores experimentais quando o método de Alderton & Snell (1970), para linearização da curva, foi empregado para obtenção dos parâmetros cinéticos.

Gumerato (1995) ao tratar dos parâmetros cinéticos para *N. fischeri*, selecionado como bolor mais termoresistente em polpa de maçã, encontrou na temperatura de 93°C valor  $D=0,4$  minutos e  $Z= 5,28^{\circ}\text{C}$ . Já Baglioni (1998), também trabalhando com *N. fischeri*, porém isolado de polpa de tomate, constatou que o valor  $D_{90^{\circ}\text{C}}= 6,14$  minutos para ascósporos com 1 mês de idade, todavia os ascósporos com 3 meses de idade apresentaram valor D superior ( $D_{90^{\circ}\text{C}}= 6,14$  minutos), comprovando que o fator idade do esporo é bastante relevante. Segundo o mesmo autor o valor de Z para idade de 1 mês foi de 10,8, enquanto que para 3 meses o encontrado foi 11,6.

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

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

onde:

$N_0$ : População inicial (esporos/ml)

$N$ : População sobrevivente após um tempo  $t$  de tratamento térmico a uma dada temperatura (esporos/ml)

$a$ : expoente de linearização

$k$ : Constante de taxa de morte (coeficiente angular da curva linearizada)

$C$ : Constante e intercepto da curva linearizada

$t$ : tempo (minutos)

O valor representado pela letra “ $a$ ” é o inverso do coeficiente angular da curva  $\log (\log N_0 - \log N)$  *versus*  $\log t$ , sendo calculado para o menor tratamento térmico, pois este teoricamente, representa a pior condição de morte, ou seja, a curva onde se observa um “ombro” mais acentuado e desta maneira seu valor pode ser aplicado para as demais curvas.

Se a taxa de morte segue a equação 1 e se não ocorrem erros experimentais, “ $C$ ” seria igual a zero. Sendo assim, o valor de “ $1/k$ ” é derivado da equação 2:

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

(equação 2)

A equação 2 é similar à equação da curva logarítmica, quando  $a = 1$

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

(equação 3)

Por analogia das equações 2 e 3, “1/k” é um parâmetro equivalente a “D” (Baglioni, 1998).

## **2.10- Métodos Utilizados na Produção, Ativação e Avaliação de Resistência Térmica de Fungos**

### **2.10.1- Produção e coleta de esporos**

Suresh (1996) fez uso de placas contendo meio de cultura PDA, para produção de ascósporos de *N. fischeri* isolado de uvas. O mesmo meio foi utilizado também por Rajashekara (1996). No entanto, neste caso o fungo foi isolado de mamão em estado de deterioração. Autores como Aragão (1989) e Casella et al. (1990) preferiram a utilização de dois meios de cultura, sendo estes PDA e MEA para obtenção de ascósporos, porém Baglioni (1998) utilizou somente MEA para bolores isolados de suco de tomate processados assepticamente. Para produção de ascósporos dos fungos *Talaromyces flavus* e *N. fischeri* isolados de suco de abacaxi, maçã e “grapefruit”, Scott & Bernard (1987) utilizaram MA (Ágar Malte). Já King Jr & Whitehand (1990) deram preferência a MEA, acrescido de 7,5 mg/l de rosa de bengala incubados a 25°C durante 30 dias, na produção de ascósporos de *T. favus* isolado de suco de frutas deteriorados. Já Samson & van Reneen-Hoekstra (1988) preconizam que o meio MEA tem maior capacidade de recuperação de esporos pois este se mostra mais rico em nutrientes do que os demais.

Segundo Casella et al. (1990), houve um forte aumento nos valores D com o aumento da idade dos ascósporos de *Byssochlamys nivea* crescidos em meio de cultura MEA. Este aumento foi menos pronunciado em ascósporos cultivados em PDA. O meio MEA é por sua composição mais nutritivo que o PDA e desta maneira os ascósporos formados no primeiro meio se mostraram mais resistentes à temperatura.

O tempo de incubação de 4 a 6 semanas foi utilizado como parâmetro nas pesquisas de Scott & Bernard (1987) e Aragão (1989). A coleta dos ascósporos foi feita por raspagem do micélio, seguindo-se de uma filtração e estoque em garrafa contendo pérolas de vidro a 4°C até sua utilização.

Baglioni (1998) utilizou bagueta de vidro estéril para raspagem do micélio, sendo que a suspensão resultante da filtragem foi centrifugada 3 vezes para limpeza (11962,6 x g/15 minutos à 4°C). Suresh et al. (1996) e Rajashekhara et al. (1996) fizeram a coleta de ascósporos utilizando água destilada estéril contendo 0,1% de Tween 80, para evitar formação de agregados de esporos.

### **2.10.2- Ativação de esporos**

King Jr et al. (1979) utilizaram tubos TDT selados para ativação a 80°C/20 minutos de ascósporos de *Byssochlamys fulva*.

Gressoni (2002) utilizou tubos de 16 x 150mm, acrescidos do atraso térmico, com meio de aquecimento de suco de laranja, para ativação de *Byssochlamys nivea*, sendo que dentre os binômios pesquisados o de 75°C por 30 minutos foi capaz da maior ativação dos ascósporos.

No que se trata da ativação de ascósporos de *Neosartorya fischeri*, Gumerato (1995), trabalhando com isolado de polpa de maçã, conseguiu o melhor

binômio de ativação utilizando 85°C/5 minutos. Já Baglioni (1998), ao pesquisar polpa de tomate 8°Brix, fez uso de binômios de 85°C por 10 e 20 minutos para ativação de bolores de *N. fischeri* de 1 mês e 3 meses respectivamente. Mais recentemente, Salomão (2002), trabalhando com o mesmo fungo, isolado de néctar de maçã encontrou valores de 85°C/10 minutos como melhor binômio de ativação, estando em concordância com os valores apresentados por Baglioni (1998) relatados anteriormente.

### **2.10.3- Determinação de resistência térmica**

Normalmente, os métodos utilizados para avaliação de resistência térmica de esporos de microrganismos são basicamente de 4 diferentes tipos: método do frasco de 3 bocas, tubos TDT selados ou não, tubo capilar e lata TDT, sendo que todos tomam como base o aquecimento do microrganismo nas temperaturas de estudo desejadas e verificação posterior da sobrevivência do mesmo. Nos ensaios para esta avaliação os parâmetros temperatura e tempo de processo devem ser rigorosamente controlados (Stumbo, 1973).

O método do frasco de 3 bocas foi utilizado por Rajashekhara et al. (1996) e Suresh et al. (1996) para determinar a resistência térmica de ascósporos de *Neosartorya fischeri*.

Splittstoesser & Splittstoesser (1977) realizaram o processo de resistência térmica com esporos previamente ativados utilizando tubos de rosca de 16 x 150mm. Após aquecimento por tempo requerido os tubos foram transferidos para banho de gelo até as suspensões serem plaqueadas.

Casella et al. (1990) fizeram uso de bolsa de alumínio estéreis seladas com dispositivo especial para os testes de resistência térmica, sendo que, a suspensão

de esporos nas bolsas, atingiam a temperatura do teste em menos de 15 segundos, após imersão no banho de água pré-aquecido.

O método do tubo TDT selado foi utilizado por King Jr & Halbrook (1987), dispondo de meio glicose-tartarato (5 mg/ml) 16°Brix como meio de aquecimento para determinar a resistência térmica de *T. flavus*. A curva de morte obtida era não logarítmica, no entanto se aproximava das curvas logarítmicas a temperaturas altas.

King Jr. et al. (1979) utilizaram tubos TDT, selados em maçarico, para ensaios de resistência dos ascósporos de *B. fulva*. Os tempos de aquecimento foram corrigidos utilizando 1,7 minutos como tempo de subida da temperatura (lag). Este método foi utilizado por diversos outros pesquisadores como Scott & Bernard (1987), Kotzekidou (1997), King Jr & Whitehand (1990). Pacheco (2001) fez uso desta técnica para determinação de resistência de ascósporos de *Neosartorya fischeri* em polpa de tomate. Já Gressoni (2002) testou resistência de ascósporos de *B. nivea* pela mesma metodologia em suco de laranja.

## **2.11- Meios para Recuperação de Ascósporos Após Ensaio de Resistência Térmica**

Tournas & Traxler (1994) fizeram uso de Ágar Czapek para recuperação de ascósporos de *Neosartorya fischeri* que sofreram tratamento térmico de 85, 88, 90, 95 ou 100°C por 1 hora. Os ascósporos foram plaqueados e incubados a 30°C por 10 dias. O mesmo meio foi utilizado para crescimento e esporulação.

Também se tratando de recuperação de ascósporos de *N. fischeri*, Gumerato (1995) utilizou meio MEA em profundidade para contagem de número de sobreviventes do fungo isolado de suco de maçã, após tratamento de 85, 88, 90 e 93°C. Pacheco (2001) utilizou o mesmo meio para recuperação de

ascósporos de *N. fischeri*, no entanto suas temperaturas de resistência térmica foram de 100, 105, 107 e 109°C.

Splittstoesser & Churey (1991), Splittstoesser et al. (1993) assim como Beuchat (1992) utilizaram meio PDA para recuperação de ascósporos após serem submetidos ao tratamento térmico. Aragão (1989) também fez uso de PDA, no entanto com adição de rosa de bengala e incubação a 30°C.

A recuperação de ascósporos de *Byssochlamys*, segundo Bayner & Michener (1979) e Splittstoesser & Splittstoesser (1977), pode ser feita com a utilização de PDA. Opiniões diversas sobre o assunto são encontradas na literatura, assim, Banner et al. (1979) utilizaram meio Ágar Extrato de Levedura com triptona e glucose, acrescido de 8,3 µg/ml de rosa de bengala para estimativa de ascósporos sobreviventes de *B. fulva*, após tratamento de 85°C por 15,30,90 e 120 minutos. Gressoni (2002) empregou MEA como meio de cultura de escolha para recuperação de ascósporos de *B. nivea*, após tratamento de 85, 90 e 97°C.

## **3- MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1- Material Utilizado**

Bebida de uva obtida a partir das variedades Ceiber e Concórdia com pH: 3,0 e 14°Brix. As amostras foram obtidas diretamente de uma linha de processamento asséptico de bebida de uva de uma indústria localizada no interior do Rio Grande do Sul.

### **3.2- Amostragem**

#### **3.2.1- Número e obtenção das amostras**

No período de janeiro a março de 2002, foram feitas 6 amostragens (correspondendo 3 ao pico de safra e 3 de entressafra). A quantidade coletada foi de 300ml por amostra em cada ponto, sendo que todas foram mantidas sob refrigeração a 4°C, com exceção do produto final, até o momento das análises.

#### **3.2.2- Pontos analisados na linha de processo**

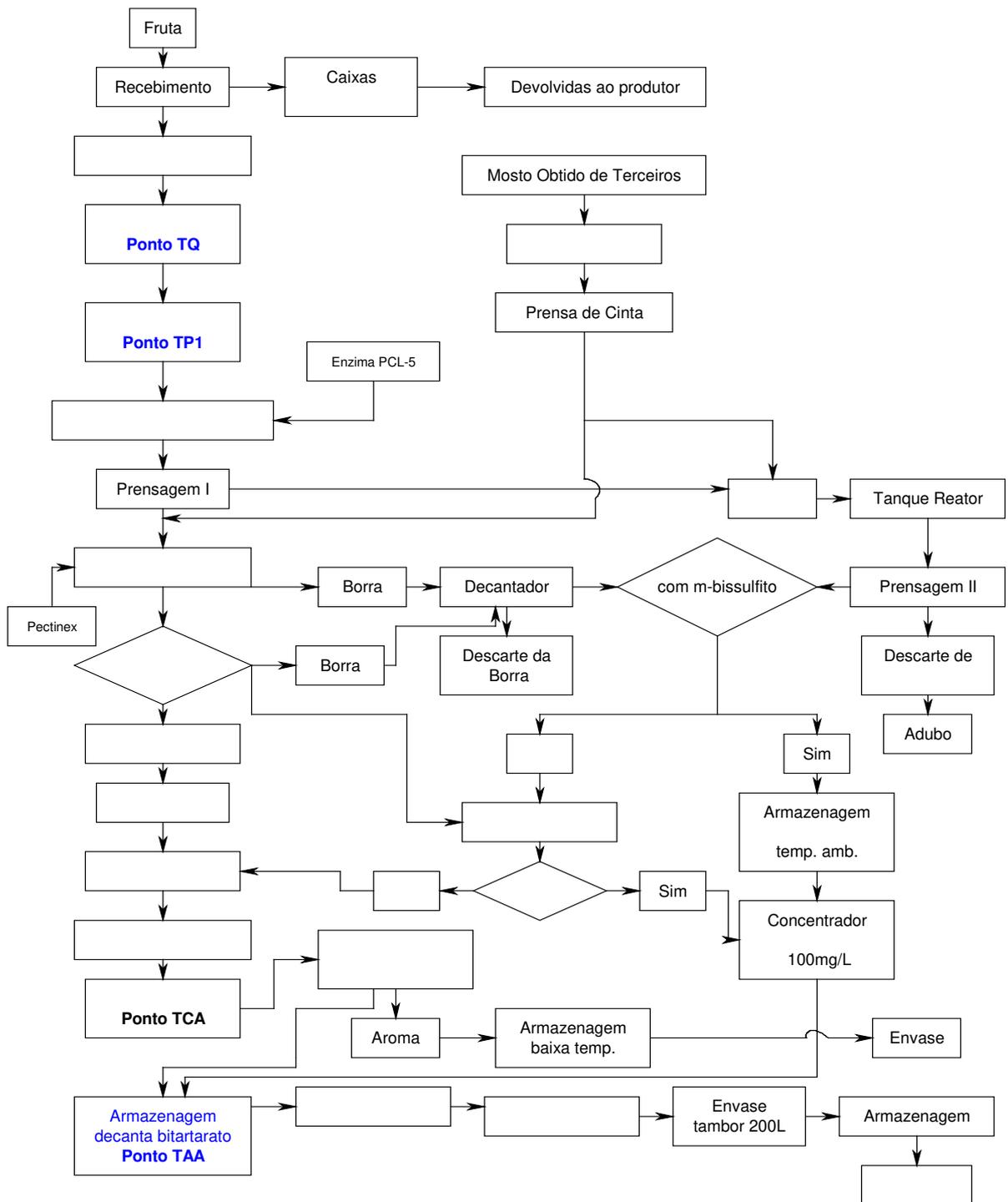
Para determinação dos pontos críticos de controle dentro da empresa, nos quais se procederiam as análises de detecção de bolores comuns e leveduras, e de bolores termoresistentes, foi realizado um estudo prévio do fluxograma de processamento de suco de uva. Os pontos selecionados dos 6 lotes e utilizados em todas as amostragens, assim como sua importância estão representadas nas **figuras 1 e 2**.

- **Tanque Pulmão (TQ):** sua importância é relativa à possibilidade da quantificação da contaminação inicial da matéria prima, ou seja, o quão contaminado está o produto quando entra na indústria, sendo considerado um ponto crítico (Carmo, 2002);
  
- **Pasteurização 1 (TP1):** estabelecida a contaminação da matéria prima, pode-se avaliar a eficiência do processo de pasteurização inicial que funciona como um branqueamento, além de reduzir a carga microbiológica do produto inicial sendo considerado um ponto crítico (Carmo, 2002);
  
- **Tanque Pulmão (TCA):** este ponto foi escolhido para fornecimento de informações microbiológicas do produto, depois deste passar por variadas etapas (tratamento enzimático, prensagem, despectinização, centrifugação, clarificação e filtração sob pressão) podendo-se saber, se o nível de contaminação aumentou ou permaneceu inalterado;
  
- **Armazenagem (TAA):** a importância deste ponto está no fato de que, durante a armazenagem ocorre um processo de decantação do bitartarato de sódio (composto presente no suco de uva responsável por sua turbidez), sendo que para isso são necessários de 18 a 45 dias, o tanque de decantação é mantido em refrigeração de 4°C e o suco presente no tanque está concentrado a 68-69°Brix.
  
- **Desenvase (TT):** para detecção de possível contaminação do produto no ato do tamboramento, ou depois de tamborado, enquanto aguarda na expedição.
  
- **Formulação (TF):** este ponto pode carrear para o produto, uma carga microbiológica que não existia anteriormente, devido à adição de água, xarope, aromas e ácidos para correção de pH.

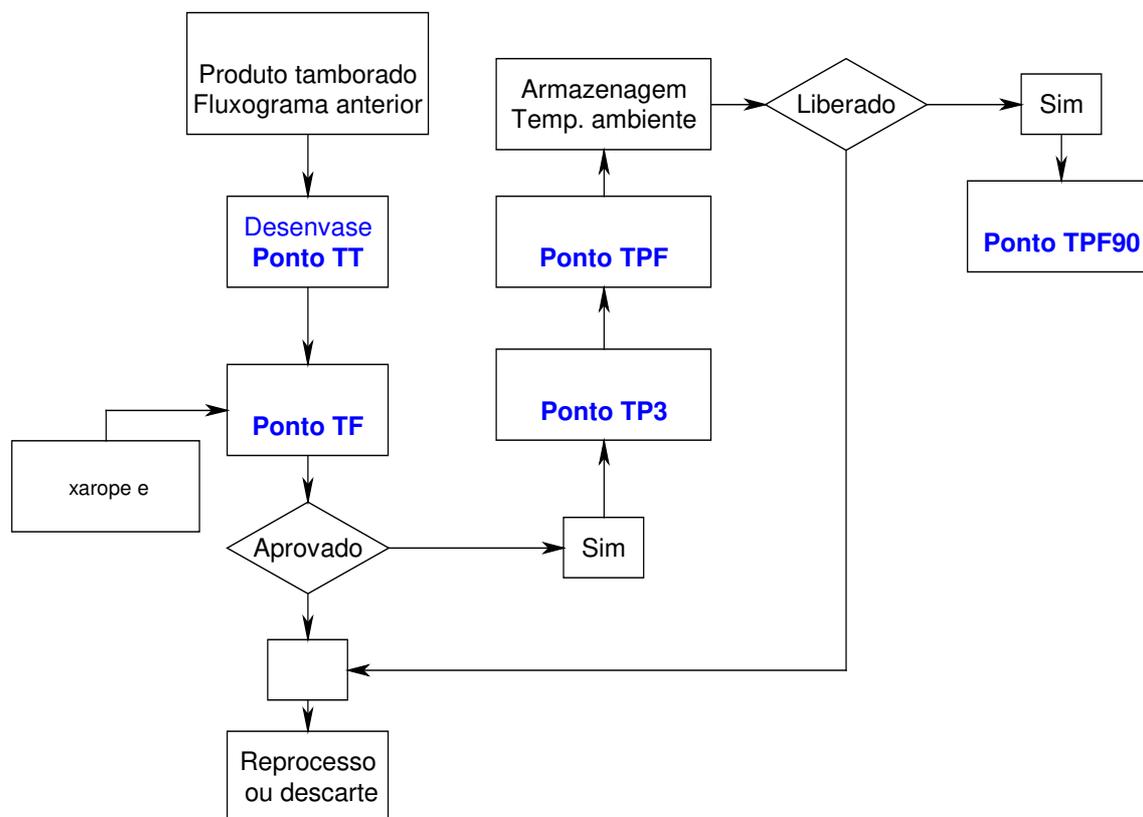
- **Pasteurização 3 (TP3):** este processo de pasteurização é importante por ser o último ponto de redução de carga microbiológica no produto final antes do envase, por isso considerado também um ponto crítico (Carmo, 2002).
- **Envase (TPF):** durante o envase podem existir riscos de contaminação pós-processo e perda da hermeticidade da embalagem, considerando-se este mais um ponto crítico (Carmo, 2002) e necessitando da análise do produto final.
- **Produto após 90 dias de vida útil (TPF90):** a análise feita após 90 dias de prateleira foi importante para definição do comportamento microbiológico do produto depois de envasado e submetido a condições ambientes.

De cada um dos pontos, foram coletadas sempre 4 amostras por lote, para que as análises fossem consideradas estatisticamente representativas. Somente nos dois últimos pontos (TPF e TPF90), é que se coletaram 5 amostras por se tratar do produto final com baixo nível de contaminação.

Foram analisados sempre os mesmos pontos tanto no pico de safra de uva de se dá num intervalo de três meses e acontece de janeiro a março com coleta dos três primeiros lotes (1, 2 e 3) no dia 27/01/2002, como entressafra, com coleta dos três últimos lotes (4, 5 e 6) no dia 03/03/2002.



**Figura 1:** Fluxograma de produção de suco de uva concentrado



#### Legenda de pontos (amostragem por ponto)

- TQ: Tanque Pulmão (4 amostras)
- TP1: Após Pasteurização 1 (4 amostras)
- TAC: Antes da Concentração (4 amostras)
- TAA: Após Padronização (4 amostras)
- TT: Após Desenvase (4 amostras)
- TF: Após Formulação (4 amostras)
- TP3: Após Pasteurização 3 (4 amostras)
- TPF: Produto Final Após Enximento (5 amostras)
- TPF 90: Produto Final Após 90 Dias (5 amostras)

**Figura 2:** Fluxograma de produção de bebida de uva e legenda de pontos do processo

### 3.3- Quantificação de Bolores Comuns e Leveduras

A contagem de fungos filamentosos e leveduras comuns em suco de uva *in-natura* e processado tem por objetivo verificar a presença de bolores e leveduras no suco processado, e/ou se houve uma seleção pobre das frutas, observando se houveram falhas durante o processamento. Para realização das análises foi utilizada a metodologia de Mislivecet al. (2001).

De posse das amostras, foram realizadas diluições necessárias de acordo com o ponto de análise utilizando água peptonada estéril (0,10%). Foram plaqueadas em profundidade 1 ml destas diluições, em duplicatas, com meio de PDA (Ágar de Batata Dextrose) acidificado com ácido tartárico 10% (p/V) (pH final 3,2), fornecendo um pH mais adequado para o crescimento de leveduras além de se evitar o crescimento de bactérias, que poderiam estar presentes nas amostras. Apesar de fungos comuns e leveduras se desenvolverem em ambientes aeróbios, a técnica de profundidade foi utilizada, pois Splittstoesser et al (1993), em suas pesquisas demonstrou a obtenção da mesma recuperação de esporos em plaqueamento de profundidade quando comparado com o plaqueamento em superfície, justificando a utilização da técnica.

As placas foram invertidas e incubadas a 30° C por 3 a 5 dias. A verificação das placas se deu com 3 dias de incubação, onde foi feita uma contagem prévia de microrganismos para prevenir a perda das placas por espalhamento total das colônias. Depois disto, as placas voltaram a ser incubadas e o procedimento de contagem foi feito novamente com 5 dias de incubação.

O resultado final foi expresso em número de unidades formadoras de colônia por ml do produto (UFC/ml).

### **3.4- Bolores Termoresistentes**

#### **3.4.1- Procedimento de quantificação de bolores termoresistentes**

Cem gramas (ml) de amostra foram transferidas assepticamente para dois tubos de 25x200 mm, com tampa rosqueável (50 ml em cada tubo) que posteriormente foram submetidos a um choque térmico em banho termostático (HAAKE, precisão de  $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ ) regulado a  $80^{\circ}\text{C}$ . Quando a amostra atingiu  $80^{\circ}\text{C}$  (tempo de subida previamente determinado com termopar), iniciou-se a contagem do tempo de choque térmico (30 minutos) (Beuchat & Pitt, 1992). Terminado o tempo de choque térmico, resfriou-se os tubos até  $45-50^{\circ}\text{C}$  e o conteúdo dos mesmos (100 ml), foi transferido para um erlenmeyer contendo 100ml de ágar batata dextrose (PDA) com 1 ml de solução de rosa de bengala (preparada com 0,084g do sal em 100ml de água, esterilizado a  $121^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos) e 4 g/l de cloranfenicol, com intuito de inibir bactérias, em especial as gram positivas, (meio em concentração dupla) (Aragão, 1989). Acidificou-se o conteúdo resultante com solução de ácido tartárico 10% p/v (pH final = 3,5), promovendo a homogeneização e distribuindo a mistura em oito placas de Petri de 90 mm de diâmetro. Todo este procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar. Após solidificação da mistura nas placas, estas foram envolvidas por um saco plástico (para evitar ressecamento) e incubadas invertidas a  $30^{\circ}\text{C}$  por um mês.

Apesar da incubação das placas ser de 30 dias, a contagem das mesmas foi feita em períodos de 15 dias até 30 dias, processo este que facilita a contagem.

#### **3.4.2- Determinação do tempo de subida da temperatura (tempo de atraso térmico)**

Os tubos com tampa de rosqueável 25 x 200mm foram preenchidos com a quantidade de amostra (50ml), e acoplado a estes foi inserido um termopar flexível

(tipo T) de cobre/constantan, o qual foi mantido na posição central do volume ocupado pela amostra, o termopar foi ligado a um registrador de temperatura. Os tubos assim montados foram colocados em um banho termostático ajustado a 80°C e um cronômetro foi acionado ao mesmo tempo. Quando a temperatura da amostra atingiu 80°C, o tempo marcado pelo cronômetro foi registrado (tempo de subida), este valor sempre foi acrescido ao tempo de choque térmico aplicado aos tubos.

### **3.4.3- Isolamento e codificação dos bolores termoresistentes**

Cada colônia de fungo que se desenvolveu nas placas de enumeração após tempo de incubação, foi devidamente isolada em placas contendo 25 ml de PDA. Com o auxílio de uma alça em “L”, transferiu-se um fragmento da colônia original para o centro das placas com o meio de isolamento (PDA), em duplicata. As culturas puras (verificação visual) diferentes entre si dentro de cada lote receberam um código, como ilustrado abaixo:

#### **I18FL1ACT**

I18: Isolado número 18

F: fungo termoresistente (após choque de 80° C por 30 minutos) isolado em PDA acidificado com ácido tartárico 10%, cloranfenicol e rosa de bengala.

Fc: fungo isolado sem choque térmico em PDA acidificado com ácido tartárico 10%.

L1: fungo pertencente às análises feitas no lote1

ACT: ponto de amostragem

### **3.4.4- Estocagem das culturas isoladas**

Os fungos isolados e codificados foram estocados em sílica gel de acordo com a metodologia descrita por Gumerato (1995), Baglioni (1998), Delgado (2001) e Pacheco (2001). A prévia preparação do material utilizado consistiu em: 1- Preencher frascos de penicilina (10 ml) até cerca de metade do seu volume com

sílica-gel (partículas de 4-8 mm), estes foram tampados com algodão e colocados em um recipiente metálico sendo esterilizados em calor seco (180° C/4 horas). Após este período de esterilização, o material foi resfriado naturalmente até temperatura ambiente e acondicionado sob refrigeração; 2- uma solução de leite desnatado 5% p/v foi preparada e esterilizada por 121° C/10 minutos; 3- tampas de borracha para serem utilizadas no fechamento dos frascos tipo penicilina foram esterilizadas (121° C/15 minutos).

O processo de estocagem seguiu basicamente os seguintes passos (operação foi realizada em câmara fluxo laminar): 1- 8 ml de uma solução de leite desnatado 5% p/v estéril foi transferida para a placa contendo o fungo cultivado; 2- Os esporos foram retirados levemente da superfície do fungo com auxílio de uma bagueta estéril; 3- Gradualmente transferiu-se para o frasco tipo penicilina 1,0 ml da suspensão de esporos resultante contida na placa (transferência gota a gota). Agitou-se o frasco para que a absorção da suspensão pela sílica-gel fosse a mais uniforme possível; 4- retirou-se uma pedra de sílica-gel e esta foi repassada para uma placa contendo meio MEA, já solidificado para comprovação da viabilidade dos esporos armazenados; 5- após esta operação o frasco foi colocado em banho de gelo por 5 minutos; 6- Fechou-se o frasco com borracha estéril e lacrou-se o mesmo com selo de alumínio.

### **3.4.5- Produção de esporos**

A preparação da suspensão para inoculação das Garrafas de Roux, foi feita com auxílio de uma alça em "L" estéril, onde um fragmento do fungo foi transferido para um tubo de 16x150 mm com tampa rosqueável contendo 2ml de solução 0,05% de tween 80 (para dispersar os esporos), seguido de agitação. Na seqüência 0,5-1,0ml da suspensão foi transferida para cada garrafa de Roux contendo 200ml de ágar extrato de malte (MEA, formulado segundo Pitt 1979). O procedimento de inoculação das garrafas foi feito em duplicata para cada isolado de fungo termoresistente codificado. As garrafas foram incubadas a temperatura

de 30° C por um mês e três meses para permitir a esporulação e desenvolvimento de resistência dos ascósporos e uma comparação entre as idades dos mesmos verificando diferenças em potencial de resistência térmica.

### **3.4.6- Coleta de esporos**

Após o período de incubação de um mês e três meses, 25 ml de água estéril foram transferidos para cada garrafa contendo os fungos cultivados, o procedimento foi repetido três vezes para completa retirada dos esporos. A superfície do fungo foi raspada delicadamente com uma bagueta estéril obtendo-se uma suspensão, que foi filtrada através de camadas de gaze estéril para a retenção de hifas e resto de meio de cultura.

Após a coleta de esporos, a suspensão obtida foi submetida a uma centrifugação a 4° C por 15 minutos a 11.962,6 x g (Tournas & Traxler, 1994) e o precipitado foi então lavado em duas centrifugações com água estéril. Após a segunda centrifugação, transferiu-se a suspensão para um frasco de 25 x 200mm, previamente autoclavado, com capacidade de 165 ml, contendo aproximadamente 30 pérolas de vidro (Delgado 2001).

Após cada coleta de esporos, realizou-se observações sob microscópio óptico (aumento de 400 vezes), para certificar-se que a suspensão obtida continha o mínimo possível de hifas. Para observação de bolores ao microscópio foi utilizada coloração de lactofucsina descrita por Pitt & Hocking (1985). As suspensões foram estocadas em geladeira a 4° C (Delgado, 2001).

### 3.4.7 Contagem das suspensões de esporos dos bolores isolados

#### 3.4.7.1- Contagem em Câmara de Neubauer

Para realização deste tipo de contagem se utiliza uma câmara denominada Câmara de Neubauer, onde uma gota da suspensão a ser verificada é colocada na cânula da câmara, sendo coberta com uma lamínula. Após este procedimento, a câmara é observada em microscópio no aumento de 400 vezes, onde contam-se os campos, obtendo-se no final um valor aproximado do número de esporos por mililitros contidos na suspensão, o valor é dado como aproximado pois nesta metodologia são contados todos os esporos considerados viáveis e não viáveis por não se conseguir distinguir cada um deles. Por este motivo, normalmente quando comparada com a contagem por diluição e plaqueamento, a contagem em câmara de Neubauer apresenta cerca de 1 ciclo logarítmico a mais. Para obtenção da concentração da solução a ser analisada utiliza-se a fórmula:

$$No = \frac{NxFx10^6}{0.25 \times n \times 16} \quad \text{equação 4}$$

onde:

No: Concentração da solução analisada (esporos/ml)

N: Número total de esporos contados

F: fator de diluição utilizado

0,25: constante da fórmula

n: número de quadrados da câmara contados

16: número de divisórias de cada quadrado

#### 3.4.7.2- Contagem por diluição e plaqueamento

Este método é bastante simples e consiste em utilizar-se a solução que se deseja saber a concentração, aplicado à mesmas diluições decimais seriadas (tubos contendo 9ml de água estéril), sendo que a cada diluição feita toma-se 1 ml

para plaqueamento, que deverá ser feito em duplicata. Nas placas os meios MEA e PDA podem ser utilizados, no entanto, o primeiro tende a recuperar mais esporos que por ventura estejam injuriados. Após o plaqueamento, incubam-se as placas por 7 dias a 30°C e realiza-se a contagem das mesmas, fazendo-se a média das duas placas, e multiplicando-se pelo fator de diluição utilizado.

### **3.4.8- Aplicação de choques térmicos para seleção do isolado mais termoresistente**

Para cada fungo, foram utilizados tubos com tampa rosqueável (16 x 150mm) com 9ml de bebida de uva estéril (meio de aquecimento), sendo que cada tubo foi inoculado com 1ml de suspensão de esporos calibrada para  $10^6$  esporos/ml, após este processo seguiu-se à homogeneização da mistura resultante. Os choques planejados são apresentados na **tabela 1**, sendo todos mais vigorosos que o inicial de 80°C/30minutos.

As suspensões de esporos com 1 mês de idade e 3 meses, de idade de cada um dos isolados fúngicos codificados, foram submetidas a diferentes binômios de tempo x temperatura, que variaram de 85°C por 15 minutos até 121°C por 1 minuto, quando necessário, até que fosse definido o isolado mais termoresistente para suspensões de 1 mês de idade assim como para as de 3 meses de idade

Utilizando um banho termostático (Polystat ®, precisão de +/- 0,1°C), foi aplicado o choque térmico aos tubos com tampa rosqueável contendo bebida de uva (pH 3,0 e Brix 14) inoculada, de acordo com o binômio pré estabelecido, sendo que o tempo de choque foi contado depois de aplicado o tempo de atraso, já descrito anteriormente. Após o choque térmico, os tubos foram resfriados imediatamente, até temperatura ambiente.

Na seqüência, o conteúdo de cada tubo foi transferido para um outro contendo 10ml de meio de cultura PDA dupla concentração (Baglioni, 1998), esta solução final foi homogeneizada e transferida para placas de Petri. Após solidificação, as placas foram incubadas a 30°C por até 7 dias. O crescimento do fungo neste período é um indicativo de sua capacidade de resistência térmica.

**Tabela 1:** Binômios de choques térmicos aplicados às suspensões fúngicas isoladas nas duas idades 1 mês e 3 meses conforme necessidade de seleção.

<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tempo (minutos)</b>
85	15
90	5
95	5
	10
	15
100	5
	10
	15
	25
	30
	35
	40
	45
	50
	55
	60
105	2
	4
	6
110	2
	4
	6
	10
	15
115	10
	15

### **3.3.8- Identificação dos isolados mais termoresistentes**

A identificação dos isolados mais termoresistentes, referentes ao tempo de incubação de 1 mês e 3 meses, foi realizada segundo metodologia proposta por Pitt & Hocking (1985) e Samson & van Reenen-Hoekstra (1988).

Cada fungo a ser identificado foi incubado em 3 diferentes meios, sendo estes MEA, CYA e G25N (Ágar Nitrato com Glicerol 25%), cultivados durante 7 dias. Para tanto, utilizou-se 3 temperaturas (5, 25, 37°C), segundo Pitt & Hocking (1985). A incubação a temperatura de 30°C também foi utilizada, pois Samson & van Reenen-Hoekstra (1988), que também descreveram o comportamento dos fungos nesta temperatura.

Depois do prazo de incubação, foi realizado o exame macroscópico das culturas, onde parâmetros como diâmetro da colônia em milímetros, cor apresentada pelo fungo na superfície e reverso da placa, bem como, a aparência da colônia, foram anotados e comparados com as chaves de identificação. Já, com relação às análises microscópicas, o procedimento adotado foi a preparação de lâminas de montagem úmida utilizando corante lactofucina indicado por Pitt & Hocking (1985) e a de preparação com fita adesiva transparente (Samson & van Reenen-Hoekstra, 1988). Por fim, todas as características macroscópicas e microscópicas como presença de hifas septadas ou não, asco, ascomata, fiálides, metulas, ascósporos e seu formato, conídios, assim como o tamanho apresentado por cada estrutura, foram corridas em chaves proposta por ambos autores.

### **3.4- Resistência térmica dos isolados mais termoresistentes**

A resistência térmica dos bolores foi determinada utilizando-se tubos TDT estéreis preenchidos com 1,8 ml de bebida de uva previamente esterilizada e inoculados com 0,2 ml de suspensão de esporos calibrada em  $10^7$  esporos/ml, seguido de homogeneização (Stumbo, 1973). Os tubos foram selados com maçarico e colocados em banho termostático (Polystat® com +/- 0,1°C de precisão) previamente ajustado às temperaturas de 90, 95 e 98°C.

O tempo de subida até a temperatura desejada foi determinado previamente, utilizando um termopar flexível para monitorar a temperatura em tubo TDT preenchido com 1,8ml de bebida de uva e 0,2ml de água, posteriormente selado. Em cada tempo de aquecimento definido, os tubos foram retirados do banho e resfriados imediatamente em banho de gelo, até temperatura ambiente.

Os tubos foram abertos assepticamente, em seguida foram feitas diluições decimais sucessivas, sendo semeadas alíquotas de 1ml em profundidade com meio de cultura MEA, em duplicata. As placas foram incubadas invertidas a 30°C por 7 dias e a leitura das colônias formadas foi feita a partir do terceiro até o sétimo dia de incubação (Delgado, 2001). A contagem foi expressa em UFC/ml. Sabendo-se o número de sobreviventes e o tempo de aquecimento respectivo, foram construídas curvas de sobrevivência. Como o comportamento cinético de inativação foi não logarítmico nas temperaturas empregadas, utilizou-se o método de linearização de Alderton & Snell (1979) determinado-se os parâmetros equivalentes a "D" (1/k) e Z.

### **3.5- Análises físico-químicas**

#### **3.5.1-Medição de valores de pH**

Os valores de pH de cada uma das amostras dos 6 lotes analisado foi realizada com auxílio de um aparelho potenciométrico previamente calibrado com tampões pH 4 e 7.

#### **3.5.2- Medição de valores de °Brix**

Os valores de °Brix de cada uma das amostras dos 6 lotes analisados foi realizada com auxílio de um refratômetro (ATAGO N-50E<sup>®</sup>) previamente calibrado com água para posteriormente se fazer as leituras das amostras.

### **3.6- Pesquisa de níveis de sulfitos no produto final**

Os níveis de sulfitos presentes no produto final foram detectados por método de sulfidimetria preconizada por Vogel (1992). Para realização deste método utiliza-se 25ml de uma solução de iodo padronizada 0,05 N, acrescida de 50ml de água destilada, 5ml de ácido clorídrico 0,1N, 5ml solução de oxalato de cálcio 0,1N, 5 ml da amostra a ser analisada e acetona P.A. Após a mistura de todos os reagentes, deve-se esperar cerca de 10 min para que o iodo consiga oxidar o sulfito da amostra. A titulação da solução é feita com tiosulfato de sódio padronizado 0,05N. A diminuição dos valores apresentados nas titulações com e sem a amostra indicará a concentração de sulfito no produto final. Desta maneira, a proporção que se tem é que cada 1ml de solução de iodo 0,05N, obtidas da diminuição das duas titulações é capaz de oxidar 0,16015 mg de SO<sub>2</sub>. Assim, o resultado é expresso em miligramas de sulfitos em 5ml da amostra, para se obter a concentração em mg/l basta multiplicar por 200 o número obtido.

### **3.7- Análise estatística**

Foram realizadas análise de variância (ANOVA) e técnicas de contrastes com auxílio dos softwares Statistica e Minitab ao nível de significância de 0,05%.

## 4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1- Particularidade dos Fluxogramas

Um ponto muito importante a ser ressaltado no fluxograma apresentado na **figuras 1**, é a presença de um processo de “blendagem”, que ocorre na linha de produção de suco concentrado de uva, apresentado na figura como padronização. Segundo Beaven (1949), o processo de blendagem é utilizado normalmente para padronizar aromas, acidez e quantidades de açúcares, além de minimizar as diferenças que possam haver entre os sucos produzidos no período de safra e entressafra, ou até mesmo como opção para criar novos sabores de sucos, provenientes da mistura de diferentes frutas.

Na “blendagem” realizada pela empresa, misturam-se porcentagens de suco concentrado de diferentes lotes, com intuito de se alcançar um padrão pré-determinado, exigido por compradores como, por exemplo: quantidade de sólidos solúveis, acidez, cor, concentração de sólidos insolúveis, além de outros.

Desta maneira, o produto que sai do “blend” para o restante da linha de produção, não corresponde mais ao produto inicial, pois, afinal houve uma mistura de lotes. Assim, este produto é considerado um produto novo e distinto dos anteriores e que terá seguimento no processo na linha de produção de bebida de uva. Isto dificulta a comparação da carga microbiológica entre os pontos posteriores à blendagem.

As comparações de contaminação lote a lote, bem como, a eficiência do processamento térmico, devem ser discutidas dentro da linha de processo, não cabendo extrapolações para o outro fluxograma.

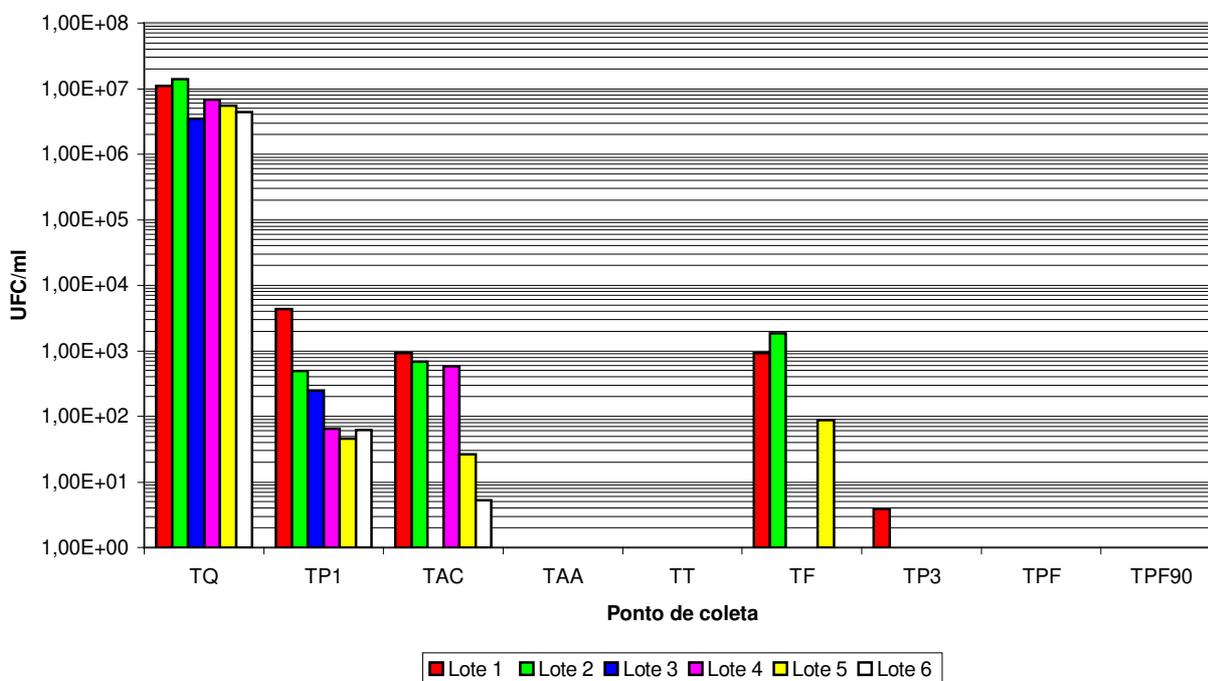
Um outro ponto de grande relevância é observado na **figura 1**, onde o fluxograma apresenta uma via secundária de produção, que é a inclusão de mosto comprado de terceiros na produção de bebida de uva. Este mosto é um subproduto da produção de vinho e apresenta-se sulfitado, carreando este conservante para linha de processamento.

Cabe ressaltar ainda que as uvas utilizadas na produção de sucos são as que não foram aproveitadas para consumo como uva de mesa, nem mesmo para produção de vinhos, onde se dá preferência para uvas selecionadas, visando um vinho de qualidade.

#### **4.2- Bolors Comuns e Leveduras**

Os 6 lotes de bebida de uva foram analisados conforme o previsto, e para melhor compreensão dos resultados viu-se a necessidade de uma comparação lote a lote, ponto a ponto, pois a partir disto tornou-se mais fácil a visualização do efeito do processo nos bolors e leveduras. Abaixo, encontra-se a **figuras 3**, referente à evolução da média de contagem por lote, representativa de cada um dos lotes e a contaminação do produto por bolors comuns e leveduras em cada ponto de coleta e para cada lote analisado, sendo que só foram graficados os pontos onde houveram contagens.

Todos os dados utilizados na confecção das **figuras 3**, encontram-se detalhados nas tabelas presentes no **ANEXO I**.



**Figura 3:** Nível médio de bolores comuns e leveduras por lote para cada ponto de amostragem

#### 4.2.1. Ponto tanque pulmão (TQ) – comparações entre lotes

Entre todos os pontos submetidos à pesquisa de bolores e leveduras comuns, apenas os denominados: tanque pulmão recebimento (TQ), após pasteurização 1 (TP1), tanque pulmão antes do concentrador (AC) e formulação (TF), apresentaram contagem (**figura 3**), no entanto, os microrganismos encontrados foram exclusivamente leveduras, não evidenciando a presença de bolores comuns.

Analisando a **figura 3**, apresentadas acima, pode-se verificar que, para o ponto denominado TQ os lotes 1, 2 e 3 obtiveram contaminação média de  $9,53 \times$

$10^6$  UFC/ml de leveduras, enquanto os demais apresentaram contaminação média de  $5,55 \times 10^6$  UFC/ml. Desta maneira, nota-se que a concentração de leveduras encontrados em todos os lotes para o ponto TQ, referente à matéria prima, é bastante similar, em torno de  $10^6$ .

Malletroit et. al. (1991) demonstraram que sucos de uva, não pasteurizados, possuem contaminação de  $10^3$  a  $10^7$  UFC/ml de leveduras dependendo da época do ano, sendo que normalmente, o produto no período de safra costuma ser mais contaminado do que na entressafra. Estes resultados, em termos de concentração de contaminação, demonstrados pelos pesquisadores, estão em conformidade com os valores encontrados nas análises do ponto TQ, desta pesquisa, no entanto, não houve diferença significativa na detecção de leveduras entre os períodos de safra e entressafra.

Cabe ressaltar que a presente pesquisa se propôs a identificar o fungo isolado de maior termoresistência não cabendo então identificações de leveduras.

#### **4.2.2. Ponto após pasteurização 1 (TP1) – comparações entre lotes**

Nas análises dos seis lotes, a primeira pasteurização aplicada, se mostrou eficiente por conseguir reduzir, em todos os lotes, de 4 a 5 ciclos logarítmicos, assim, a contaminação média dos lotes que era de  $7,54 \times 10^6$  UFC/ml na matéria prima, foi reduzida, após o processo, para uma contaminação média de  $8,8 \times 10^2$  UFC/ml. Desta maneira, o processo de pasteurização se torna indispensável para redução da carga microbiológica do produto e ajudar na fixação da cor.

Estudos realizados por Beaven (1949) mostraram que, os fungos, leveduras e bactérias quando presentes nos sucos produzem substâncias químicas de degradação, desta maneira deve-se proceder, um processo de pasteurização, para eliminação destes microrganismos. As células de leveduras são mais

susceptíveis ao processamento térmico do que seus esporos e os fungos (Splittstoesser, 1986).

#### **4.2.3. Ponto antes do concentrador (AC) – comparação entre lotes**

Durante todo percurso até chegar ao tanque pulmão, antes do concentrador (AC), o produto apresenta uma leve queda da carga microbiológica, com média dos seis lotes de  $3,72 \times 10^2$  UFC/ml.

As análises destes resultados através do fluxograma apresentado na **figura 1** mostram que os processos que antecedem a concentração, são os responsáveis diretos pela redução de meio ciclo logarítmico da contaminação, tais processos consistem em: prensagem com separação de bagaço, despectinização com separação de borra, filtração, centrifugação, clarificação, além de uma última filtração com terra diatomácea realizada sob pressão, antes da chegada ao tanque pulmão para posterior concentração. Desta maneira, os processo de retirada de bagaço, borra e resíduos do filtro, acabam por promover a leve diminuição da carga microbiológica do produto neste ponto. Esta diminuição foi constatada principalmente nos lotes 3, 5 e 6.

Nos lotes 1 e 2 o desvio padrão médio foi de  $1,14 \times 10^3$  UFC/ml, causando um desvio padrão médio de todos os lotes, que pode ser visualizado na **figura 4**.

#### **4.2.4. Ponto formulação (TF) – comparação entre lotes**

Este ponto de amostragem apresentou um comportamento atípico durante as análises dos lotes. Nos lotes 3, 4 e 6 não foram encontradas unidades formadoras de colônia em nenhuma das amostras, já no lote 5 foi detectada presença de leveduras num nível médio de  $8,77 \times 10^1$  UFC/ml, esta ocorrência pode estar relacionada à espera que pode chegar a até 5 horas em temperatura

ambiente, sendo este um tempo hábil para reprodução de microrganismos que por ventura estejam presentes.

No entanto, os lotes 1 e 2 apresentaram um comportamento bastante diferenciado dos quatro últimos lotes já descritos. No lote 1, durante as análises, foi constatado que, em uma das quatro repetições realizadas, as diluições  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ , possuíam maior número de células de leveduras do que as placas procedentes da diluição  $10^0$ , alcançando contagem que podem ser visualizadas na **tabela 2**. Com relação ao lote 2, o mesmo comportamento foi observado, no entanto para duas das quatro repetições realizadas.

**Tabela 2:** Médias de contagem em placas para as 3 diluições realizadas no ponto TF para os lotes 1 e 2 .

Diluições Utilizadas	Lote 1 (amostra1)	Lote 2 (amostras 1 e 2)
	Média da Contagem (UFC/ml)	Média da Contagem (UFC/ml)
$10^0$	1	<1
$10^{-1}$	112,5	0
$10^{-2}$	30	31,25

Este tipo de comportamento das leveduras com maior contagem nas diluições menores, evidencia uma possível presença de um agente inibidor na bebida cuja concentração é reduzida a medida que as diluições são feitas com conseqüente aparecimento das leveduras, sendo este fato o indicativo da necessidade de pesquisa de  $SO_2$  no produto formulado final.

Analisando o fluxograma de produção de suco concentrado de uva apresentado na **figura 1**, pode-se constatar que a empresa costuma comprar mosto de terceiros durante o período de safra e entressafra, sendo que este mosto, normalmente, apresenta-se sulfitado. A concentração de sulfitos se encontra em cerca de 1300mg/l (segundo a empresa), valor que posteriormente

será diminuído para cerca de 100mg/l no dessulfitor através de processo de concentração.

A inclusão de mosto de terceiros na manufatura de bebida de uva pode conferir ao produto inúmeros problemas. O mosto, subproduto da fabricação de vinho, é advindo de trocas constantes realizadas durante o processo fermentativo do vinho, sua inclusão na produção de sucos carrega para linha de produção microrganismos (leveduras), que por ventura, possam ter sofrido mutações, tornando-se por exemplo resistentes ao processo térmico, ou tolerantes à presença de sulfitos.

Baseados na suspeita da presença de sulfitos nos lotes analisados, foi realizada análise para quantificação deste conservante, para confirmação da presença e quantidade apresentadas na bebida de uva (produto final), com intuito maior de verificar se os teores estavam dentro do permitido pela legislação vigente (40mg/l, ANVISA, 1999). Os resultados obtidos nas análises estão expressos na **tabela 3**.

**Tabela 3:** Teor de sulfito presente no produto final, análise realizadas para os 6 lotes de amostragem.

	<b>Lote 1</b>	<b>Lote 2</b>	<b>Lote 3</b>	<b>Lote 4</b>	<b>Lote 5</b>	<b>Lote 6</b>
<b>Teor de Sulfitos (mg/l)</b>	48,04	48,04	172,96	172,96	137,72	137,72

Considerando os dados apresentados na **tabela 3**, verifica-se que justamente os lotes 1 e 2 onde foram constatados problemas, apresentaram índice de sulfitos mais baixos (no entanto, todos os lotes apresentaram índices superiores a 40mg/l permitido por lei), explicando desta maneira, o porque do desenvolvimento de leveduras nas placas conforme diluições decimais eram realizadas. O processo de diluição foi responsável por diminuir a concentração de sulfitos, e assim, as células de leveduras anteriormente inibidas tornaram-se viáveis. Nos outros lotes, como a concentração de sulfitos se mostrava 3,60 (lotes 3 e 4) e 2,86 (lotes 5 e 6) vezes maiores, provavelmente as diluições realizadas

não foram suficientemente eficazes para fazer com que as células voltassem a ter capacidade de se reproduzirem. Uma segunda explicação, é que os lote de 4 a 6 tivessem um nível de contaminação menor que o incidente nos lotes 1 e 2.

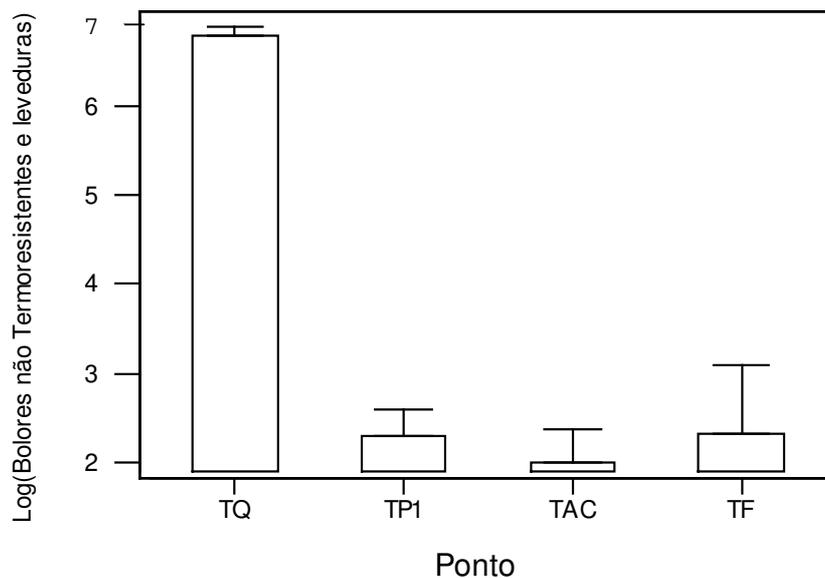
Rizzon e Miele (1995) pesquisando características analíticas de sucos de uva fabricados no Rio Grande do Sul, encontraram que, os principais sucos produzidos na região continham níveis sempre inferiores a 150mg/l de sulfitos, obtendo-se um valor geral médio de 62,1mg/l. Estes valores não condizem com os resultados encontrados nas análises das amostras dos 6 lotes, pois, a concentração média detectada foi de 119,57mg/l, já que 4 lotes possuíam quantidades superiores a 150mg/l, como apresentado na **tabela 3**.

Estudos realizados por Roland and Beuchat (1984), mostraram que 75mg/l de sulfito são suficientes para retardar a reprodução de células dos contaminantes (fungos e leveduras), deixando-as assim num estado estacionário. Sucos contaminados com  $10^4$  UFC/ml e que possuíam 50mg/l de sulfito, quando incubados a 21° C e 30° C demoraram 15 e 7 dias respectivamente, para apresentarem crescimento.

Já Malletroit (1991), em suas pesquisas, verificaram que pequenas concentrações de sulfitos, seguido de processo de pasteurização, são capazes de destruir as leveduras presentes em suco de uva. Estes autores testaram teores de 50 e 25mg/l, sendo que, em ambos os casos, após a pasteurização, não foi detectado crescimento microbiológico, nem mesmo alterações como estufamento de embalagens.

Como resultado final destas análises, o que pode ser visualizado em termos gráficos é um grande desvio padrão no ponto em questão. Este desvio padrão está bastante evidente na **figura 4**.

Uva - Bolores não Termoresistentes e leveduras por ponto de amostragem



**Figura 4:** Média do logarítmo de microrganismos (UFC/ml) acrescidos do limite superior do intervalo de confiança, baseados nos 6 lotes de análise do produto.

#### 4.2.5- Ponto produto final após 90 de vida de prateleira (TPF90)

É importante ressaltar que este ponto não apresentou contaminação em nenhum dos lotes analisados, mostrando-se microbiologicamente seguro, após 90 dias de vida de prateleira.

#### 4.2.6- Análise estatística dos resultados das contagens de bolores comuns e leveduras em linha de processo

Ocorreram diferenças significativas, a 95% de confiança, entre os lotes e entre os pontos de amostragem para os bolores comuns e leveduras (**tabela 4**). No ponto TQ referente à matéria prima (fruta), os lotes de safra e entressafra não mostram diferenças significativas ao nível de 95% de confiança, pois como já citado no item 4.2.1 a diferença entre estes períodos foi de meio ciclo logarítmico. No entanto, ao serem considerado os demais pontos dentro do processo industrial fica clara a diferença entre períodos de safra e entressafra.

**Tabela 4:** Análise de variância/ p-value para efeitos principais e interação entre bolores comuns e leveduras e bolores termoresistentes em suco de uva.

Variável	Lote	Ponto de coleta	Interação
Bolores termoresistentes	< 0,0001	0,003	0,005
Bolores comuns e leveduras (log)	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

Nos lotes de entressafra não ocorreram contagens nos pontos posteriores a TAC, com exceção do lote 5 que teve contagem média de  $8,76 \times 10^1$  UFC/ml em duas amostras no ponto TF. Nos lotes de safra ocorreu o mesmo: os pontos iniciais TQ, TP1, TAC e TF apresentaram contagens. O lote 1 se mostrou atípico, por ser o único a apresentar contagens (<10 UFC/ml) em todas as amostras do ponto TP3, embora não apresente contagem após esse ponto. O lote 3 não apresenta contagem já a partir do ponto TP1. Para o ponto TF, analisando bolores não termoresistentes e leveduras, observou-se contagens semelhantes às do ponto TAC. Um fato importante é que após o ponto TF as contagens zeraram em todos os lotes.

Analisando a diferença das médias de contagem obtidas entre a matéria prima e a primeira pasteurização, pode-se verificar que na passagem do ponto TQ para TP1 houve uma queda na ordem de 3,9 ciclos logarítmicos para os bolores

não termoresistentes e leveduras como apresentado na **tabela 5**. O produto final e o estocado durante 90 dias não apresentaram contagens para os microrganismos analisados. As análises estatísticas para bolores não termoresistentes e leveduras se concentraram nos pontos: TQ, TP1, TAC e TF como evidenciado na **figura 4**. O ponto TP3 não foi analisado, uma vez que apenas o primeiro lote apresentou contagem, sugerindo desvio no processo, regularizado nos lotes seguintes. O contraste não foi significativo entre os pontos antes da concentração e após a pasteurização 1.

**Tabela 5:** Contraste entre média dos logaritmos e entre pontos de coleta consecutivos estatisticamente significativos para bolores e leveduras comuns em bebida de uva

Contraste	Bolores comuns e leveduras (log)
TP1-TQ	-3,90
TAC-TP1	Não significativo

### 4.3- Bolores Termoresistentes

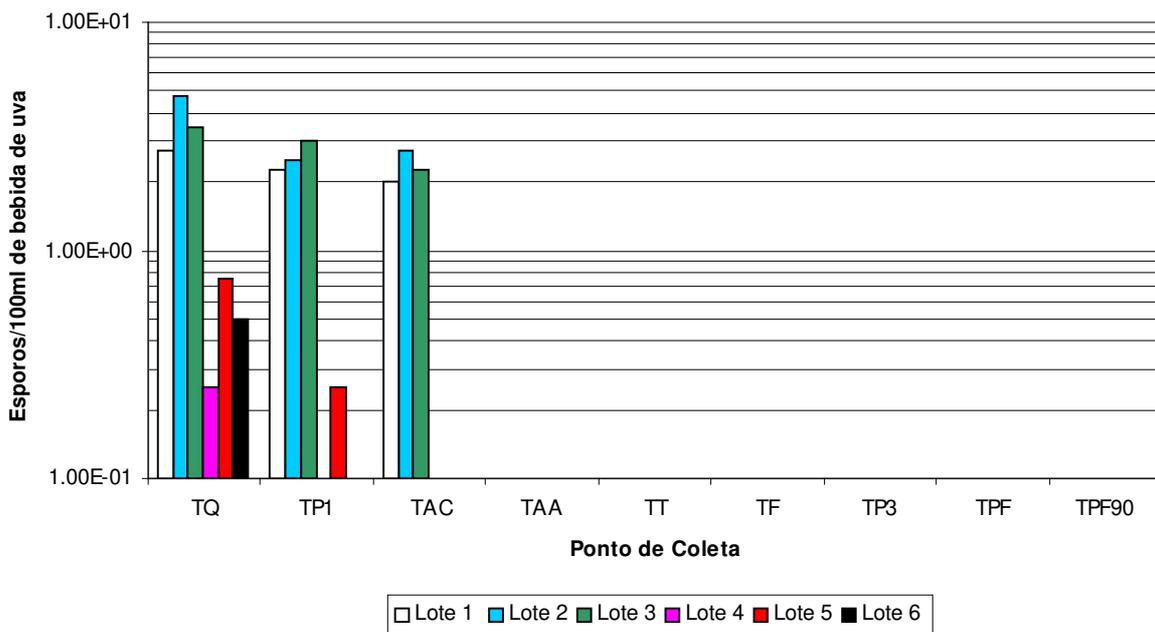
#### 4.3.1- Contagem de bolores termoresistentes

A contaminação por bolores termoresistentes foi baixa e significativamente diferente entre lotes de safra e entressafra sendo inferior a 10 esporos/100ml em todos os lotes pesquisados (**tabela 6**). Uma quantidade de 4,8 esporos/ml foi encontrada no ponto TQ do lote 2, referente à safra, sendo este o ponto mais contaminado do lote.

**Tabela 6:** Bolores Termoresistentes (UFC/ml) - médias +/- Desvio Padrão por ponto/tipo de lote

Ponto	Safra	Entressafra
TQ	3,67 +/- 1,23	0,500 +/- 0,673
TP1	2,58 +/- 0,52	0,083 +/- 0,288
TAC	2,33 +/- 0,78	0

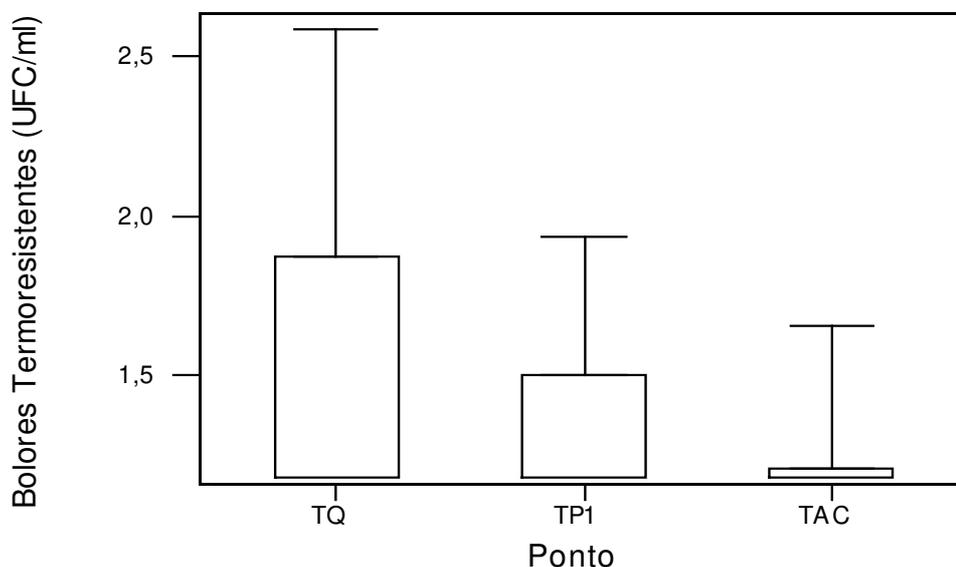
A contaminação mais alta encontrada para os lotes de entressafra foi de 0,8 esporos/ml, correspondente ao lote 5, ponto TQ, o que denota uma diminuição de 83,33% na taxa de contaminação por bolores termoresistentes, apenas variando-se os períodos de safra e entressafra. O efeito sazonal fica evidente quando se considera que a entressafra se dá nos meses de outono onde as temperaturas ambientais são menores. É importante salientar que após o processo de concentração, ou seja após o ponto TAC, não foram mais encontrados bolores termoresistentes em nenhum dos lotes analisados (ver **figura 5**). Este dados, condizem com os estudos de Malletroit et al. (1991) que demonstraram que os períodos de safra são responsáveis por apresentarem maiores níveis de contaminação, em detrimento aos períodos de entressafra do mesmo produto.



**Figura 5:** .Concentração ponto a ponto de bolores termoresistentes nos 6 lotes de análise

#### 4.3.2- Análise estatística dos resultados das contagens de bolores termoresistentes em linha de processo

Com relação aos bolores termoresistentes, os últimos três lotes (entressafra) apresentaram contagens mínimas (1 ou 2 UFC/100ml) em parte das amostras do ponto TQ e nenhuma contagem nos demais pontos (à exceção do lote 5 que também apresentou 1 UFC/100ml em uma das amostras do ponto TP1). Os lotes de safra apresentaram contagens menores que 10 esporos/100ml em todas as amostras dos três primeiros pontos (TQ, TP1 e TAC) e nenhuma contagem nos demais pontos. Considerado o processo como um todo, após a concentração nenhum dos lotes apresentou contagem de bolores termoresistentes. A Análise estatística se restringiu aos pontos onde ocorreram contagens: TQ, TP1 e TAC (ver **figura 6**).



**Figura 6:** Número de microrganismos (esporos/100ml), apresentados com média e acrescidos do limite superior do intervalo de confiança, baseados nos 6 lotes de análise do produto.

Ocorrem quedas de contagem do ponto TQ para TP1 no valor de 0,37 reduções esporos/100ml como apresentados na **tabela 7**.

**Tabela 7:** Contraste entre médias dos logaritmos e entre pontos de coleta consecutivos estatisticamente significativas para bolores termoresistentes em bebida de uva.

Contraste	Bolores Termoresistentes
TP1-TQ	-0,37
TAC-TP1	/

O produto final e o estocado durante 90 dias não apresentaram contagens para os microrganismos analisados.

Ocorre variabilidade significativa entre os lotes, entre os pontos de coleta e suas interações ao nível de 95% de confiança, no caso dos bolores termoresistentes. Os lotes de safra apresentam contagens superiores aos lotes de entressafra, considerados tanto os pontos nos quais as contagens ocorreram em todos os lotes quanto aqueles pontos nos quais as contagens foram obtidas em apenas alguns dos lotes.

Ocorreu variabilidade entre os lotes no caso dos bolores termoresistentes. Os lotes de safra apresentam contagens superiores aos lotes de entressafra, considerados tanto os pontos nos quais as contagens ocorreram em todos os lotes quanto aqueles pontos nos quais as contagens foram obtidas em apenas alguns dos lotes ( $p < 0,0001$ ). O ponto TAC revela a diferença mais significativa entre os lotes de safra e entressafra. Nesses últimos a contagem não ocorreu para esse ponto (ver **tabela 6**).

#### **4.3.3- Isolamento e Codificação**

A análise dos 6 lotes de bebida de uva resultou na obtenção de 25 isolados termoresistentes que estão representados na **tabela 8** com seus códigos, local proveniente e número de contagem da suspensão de esporos em Câmara de Neubauer e contagem por método de diluição e plaqueamento. Cada um deles recebeu uma descrição morfológica macroscópica e microscópica, sendo que a descrição foi feita de maneira parcial, somente para diferenciação de um fungo do

outro, já que o presente estudo visou identificar somente o isolado mais termoresistente.

O sistema de codificação apresentado abaixo seguiu o mesmo padrão, já descrito anteriormente em materiais e métodos.

**Tabela 8:** Códigos dos fungos isolados, local proveniente na planta de processo, contagem da suspensão de esporos em Câmara de Neubauer e contagem em placa por diluição para idades de 1 e 3 meses.

Código do Isolado	Esporos/ml Neubauer		Esporos/ml plaqueamento	
	1 mês	3 meses	1 mês	3 meses
I1FL1TP1	$1,69 \times 10^9$	$1,08 \times 10^9$	$3,80 \times 10^8$	$2,10 \times 10^8$
I2FL1TP1	$3,15 \times 10^8$	$2,80 \times 10^8$	$2,30 \times 10^8$	$2,10 \times 10^7$
I3FL1TP1	$1,10 \times 10^9$	$1,50 \times 10^9$	$8,00 \times 10^8$	$3,50 \times 10^8$
I4FL1TQ	$8,70 \times 10^7$	$3,30 \times 10^8$	$3,00 \times 10^7$	$2,00 \times 10^7$
I5FL1TQ	$9,60 \times 10^8$	$1,17 \times 10^9$	$1,50 \times 10^7$	$8,0 \times 10^8$
I6FL3TQ	$1,65 \times 10^8$	$7,80 \times 10^8$	$9,80 \times 10^7$	$1,30 \times 10^8$
I7FL1TQ	$3,25 \times 10^8$	$2,85 \times 10^8$	$1,05 \times 10^8$	$1,10 \times 10^8$
I8FL2TP1	$2,20 \times 10^8$	$6,85 \times 10^8$	$1,50 \times 10^7$	$2,30 \times 10^7$
I9FL2TP1	$1,00 \times 10^9$	$6,55 \times 10^8$	$4,10 \times 10^8$	$2,80 \times 10^7$
I10FL3TP1	$3,95 \times 10^8$	$6,00 \times 10^8$	$1,70 \times 10^7$	$1,00 \times 10^7$
I12FL3AC	$4,40 \times 10^8$	$1,42 \times 10^9$	$4,40 \times 10^7$	$2,40 \times 10^8$
I13FL1AC	$5,25 \times 10^8$	$9,20 \times 10^8$	$2,09 \times 10^8$	$7,10 \times 10^7$
I14FL1AC	$2,15 \times 10^8$	$3,45 \times 10^8$	$3,45 \times 10^7$	$3,40 \times 10^7$
I15FL2TP1	$3,20 \times 10^8$	$2,20 \times 10^8$	$9,80 \times 10^7$	$4,10 \times 10^7$
I16FL2TQ	$4,65 \times 10^8$	$2,30 \times 10^8$	$1,50 \times 10^8$	$7,00 \times 10^7$
I17FL1TQ	$2,30 \times 10^8$	$1,79 \times 10^9$	$1,00 \times 10^8$	$2,55 \times 10^8$
I18FL1AC	$9,80 \times 10^8$	$6,35 \times 10^8$	$1,08 \times 10^8$	$9,00 \times 10^7$
I19FL1TP1	$9,00 \times 10^8$	$1,20 \times 10^9$	$3,11 \times 10^8$	$3,20 \times 10^8$
I20FL1TP1	$9,70 \times 10^8$	$3,90 \times 10^8$	$3,35 \times 10^8$	$3,40 \times 10^7$
I21FL4TQ	$8,75 \times 10^8$	$5,55 \times 10^8$	$3,08 \times 10^8$	$8,75 \times 10^7$
I22FL5TQ	$1,06 \times 10^8$	$1,50 \times 10^8$	$1,50 \times 10^7$	$2,00 \times 10^7$
I23FL5TQ	$5,80 \times 10^8$	$1,20 \times 10^8$	$1,40 \times 10^7$	$1,30 \times 10^7$
I24FL6TQ	$6,40 \times 10^8$	$1,00 \times 10^9$	$1,30 \times 10^7$	$2,80 \times 10^8$
I25FL5TQ	$9,10 \times 10^8$	$4,10 \times 10^8$	$1,90 \times 10^8$	$4,00 \times 10^7$

**I1FL1TP1:** Características do fungo: branco, não cotonoso em MEA e levemente cotonoso em PDA, sem exudado e com reverso creme em PDA e ligeiramente mais escuro em MEA. Seus conídios apresentam parede lisa, formato

elipsoidal, com tamanho de 3,2 a 3,5 $\mu$ m. Após 5 dias de incubação a 30°C, o fungo apresentou crescimento de 7,0 cm de diâmetro em PDA e em MEA um crescimento que tomou toda extensão da placa.

**I2FL1TP1:** Características do fungo: marrom esverdeado (ocre), não cotonoso, sem exudado bem esporulado nos dois meios e com reverso caramelo em MEA e verde amarronzado (camurça) em PDA. Seus conídios apresentam parede lisa, formato elipsoidal, com tamanho de 2,5 a 4 $\mu$ m. Após 5 dias de incubação a 30°C, o fungo apresentou crescimento de 5,0 cm de diâmetro em PDA e 6,0 cm em MEA.

**I3FL1TP1:** Características do fungo: branco, não cotonoso, sem exudado e com reverso creme em PDA e ligeiramente mais escuro em MEA. Este fungo apresenta ascos de formato esférico, medindo de 6,4 a 8 $\mu$ m, contendo 8 ascósporos no seu interior. Os ascósporos por sua vez, possuem parede lisa, formato esférico, com tamanho de 2,5 a 3,5 $\mu$ m. Após 5 dias de incubação a 30°C, o fungo apresentou um crescimento que tomou toda extensão da placa tanto em PDA quanto em MEA.

**I4FL1TQ:** Características do fungo: amarelado, tendendo a laranja quando mais velho, não cotonoso, com exudado vermelho, bastante floculado de esporos, com reverso em PDA marrom claro levemente alaranjado e marrom claro avermelhado em MEA. Seus conídios apresentam parede lisa, formato arredondado, com tamanho de 3,0 a 3,5 $\mu$ m. Após 5 dias de incubação a 30°C, o fungo apresentou crescimento de 5,0 cm de diâmetro em PDA e 6,0 cm em MEA.

**I5FL1TQ:** Características do fungo: branco, não cotonoso, com exudado transparente e com reverso verde em PDA e em MEA. Seus conídios apresentam parede lisa, formato esférico, com tamanho de 3,0 a 4,0 $\mu$ m. Após 5 dias de

incubação a 30°C, o fungo apresentou crescimento de 3,5 cm de diâmetro em PDA e 4,0 cm em MEA.

**I6FL3TQ:** Características do fungo: marrom queimado, bem esporulado, não cotonoso, sem exudado e com reverso chumbo escuro em PDA como em MEA. Seus conídios apresentam parede lisa, formato arredondado, com tamanho de 4,0 a 5,0µm. Após 5 dias de incubação a 30°C, o fungo apresentou crescimento de 5,5 cm de diâmetro em PDA e em MEA um crescimento que tomou toda extensão da placa.

**I7FL1TQ:** Características do fungo: marrom camurça, não cotonoso, sem exudado e com reverso cinza amarronzado em PDA e MEA, bem esporulados nos dois meios, só que com melhor crescimento em MEA. Seus conídios apresentam parede lisa, formato esférico, com tamanho de 1,5 a 2,5µm. Após 5 dias de incubação a 30°C o fungo apresentou um crescimento que tomou toda extensão da placa tanto em PDA quanto em MEA.

**I8FL2TP1:** Características do fungo: branco, não cotonoso, sem exudado e com reverso creme claro em PDA e ligeiramente mais escuro em MEA, possui crescimento baixo, menos pronunciado em MEA e mais intenso em PDA e com boa produção de esporos em ambos. Seus conídios apresentam parede lisa, formato esférico levemente ovalado, com tamanho de 3,0 a 3,8µm. Após 5 dias de incubação a 30°C, o fungo apresentou crescimento de 7,5 cm de diâmetro em PDA e 6,0 cm em MEA.

**I9FL2TP1:** Características do fungo: branco, não cotonoso, sem exudado e com reverso creme em PDA e MEA, crescimento baixo, mais evidente em MEA. Seus conídios apresentam parede lisa, formato ovalado tendendo a esférico, com tamanho de 2,3 a 3,5µm. Após 5 dias de incubação a 30°C, o fungo apresentou

um crescimento que tomou toda extensão da placa tanto em PDA quanto em MEA.

**I10FL3TP1:** Características do fungo branco levemente amarelado, não cotonoso, sem exudado, bastante granulado e com reverso creme em PDA e ligeiramente mais escuro em MEA. Seus conídios apresentam parede lisa, formato esférico, com tamanho de 3,2 a 4,5 $\mu$ m. Após 5 dias de incubação a 30°C, o fungo apresentou crescimento de 6,5 cm de diâmetro em PDA e o mesmo valor em MEA. Fungo  $\cong$  a I11FL2TP1.

**I11FL2TP1:** Características do fungo: branco levemente amarelado, não cotonoso, sem exudado, bastante granulado e com reverso creme em PDA e ligeiramente mais escuro em MEA. Características similares ao isolado I10, por este motivo foi inoculado somente anterior.

**I12FL3AC:** Características do fungo: verde ocre, não cotonoso, sem exudado, bastante esporulado com crescimento baixo e com reverso marrom claro (doce de leite) em PDA e MEA. Seus conídios apresentam parede lisa, formato elipsoidal, com tamanho de 3,2 a 4,8 $\mu$ m. Após 5 dias de incubação a 30°C, o fungo apresentou crescimento de 5,0 cm de diâmetro em PDA e 5,5 cm MEA.

**I13FL1AC:** Características do fungo: branco levemente amarelado (branco encardido), não cotonoso, sem exudado, bastante granulado e com reverso creme amarelado em PDA e MEA. Seus conídios apresentam parede lisa, formato elipsoidal, com tamanho de 3,2 a 4,8 $\mu$ m. Após 5 dias de incubação a 30°C, o fungo apresentou um crescimento que tomou toda extensão da placa tanto em PDA quanto em MEA.

**I14FL1AC:** Características do fungo: verde ocre, não cotonoso, sem exudado, bastante esporulado e com reverso esverdeado em PDA e caramelo em

MEA, além de seu crescimento ser mais acentuado neste último meio. Seus conídios apresentam parede lisa, formato elipsoidal, com tamanho de 3,2 a 4,8 $\mu$ m. Após 5 dias de incubação a 30°C, o fungo apresentou crescimento de 6,0 cm de diâmetro em PDA e em MEA um crescimento que tomou toda extensão da placa.

**I15FL2TP1:** Características do fungo: marrom camurça, não cotonoso, sem exudado, bastante esporulado e com reverso marrom escuro em PDA e caramelo em MEA. Seus conídios apresentam parede lisa, formato elipsoidal, com tamanho de 3,2 a 4,8 $\mu$ m. Após 5 dias de incubação a 30°C, o fungo apresentou crescimento de 5,5 cm de diâmetro em PDA e 6,5 cm em MEA.

**I16FL2TQ:** Características do fungo: marrom camurça, não cotonoso, sem exudado e com reverso marrom (café com leite) em PDA e MEA, com crescimento mais evidente em MEA. Seus conídios apresentam parede lisa, formato elipsoidal, com tamanho de 4,0 a 5,0 $\mu$ m. Após 5 dias de incubação a 30°C, o fungo apresentou crescimento de 8,0 cm de diâmetro em PDA e em MEA um crescimento que tomou toda extensão da placa.

**I17FL1TQ:** Características do fungo: marrom camurça, não cotonoso, sem exudado e com reverso marrom escuro em PDA e marrom (café com leite) em MEA, apresenta crescimento menos pronunciado em PDA e boa esporulação nos dois meios. Seus conídios apresentam parede lisa, formato esférico tendendo a ovalado, com tamanho de 3,2 a 4,0 $\mu$ m. Após 5 dias de incubação a 30°C, o fungo apresentou crescimento de 4,0 cm de diâmetro em PDA e 7,0 cm em MEA.

**I18FL1AC:** Características do fungo: branco, não cotonoso, sem exudado e com reverso creme claro em PDA e MEA. Seus conídios apresentam parede lisa, formato elipsoidal, com tamanho de 2,4 a 3,2 $\mu$ m. Após 5 dias de incubação a 30°C, o fungo apresentou um crescimento que tomou toda extensão da placa tanto em PDA quanto em MEA.

**I19FL1TP1:** Características do fungo: branco levemente amarelado, não cotonoso, sem exudado, bem esporulado e com reverso creme claro em PDA e MEA. Apresenta melhor crescimento em MEA e em PDA é mais irregular. Seus conídios apresentam parede lisa, formato ovalado, com tamanho de 1,6 a 3,0 $\mu$ m. Após 5 dias de incubação a 30°C, o fungo apresentou um crescimento que tomou toda extensão da placa tanto em PDA quanto em MEA.

**I20FL1TP1:** Características do fungo: branco, não cotonoso, sem exudado, com crescimento mais apreciável em MEA e mais irregular em PDA. Seu reverso apresenta-se creme em PDA e ligeiramente mais escuro em MEA. Os conídios possuem parede lisa, formato ovalado, com tamanho de 2,4 a 4,0 $\mu$ m. Após 5 dias de incubação a 30°C, o fungo apresentou um crescimento que tomou toda extensão da placa tanto em PDA quanto em MEA.

**I21FL4TQ:** Características do fungo: verde ocre, não cotonoso, sem exudado, bastante esporulado, com crescimento baixo e reverso marrom claro (doce de leite) em PDA e MEA. Seus conídios apresentam parede lisa, formato elipsoidal, com tamanho de 3,2 a 3,5 $\mu$ m. Após 5 dias de incubação a 30°C, o fungo apresentou crescimento de 7,0 cm de diâmetro em PDA e em MEA um crescimento que tomou toda extensão da placa.

**I22FL5TQ:** Características do fungo: branco, não cotonoso, sem exudado, pouco esporulado e com reverso creme claro em PDA e MEA. Apresenta crescimento com borda irregular MEA e em PDA as colônias tem característica de serem levemente sulcadas. Seus conídios apresentam parede lisa, formato esférico, com tamanho de 4,5 a 6,5 $\mu$ m. Após 5 dias de incubação a 30°C, o fungo apresentou crescimento de 2,5 cm de diâmetro em PDA e 4,5 cm em MEA.

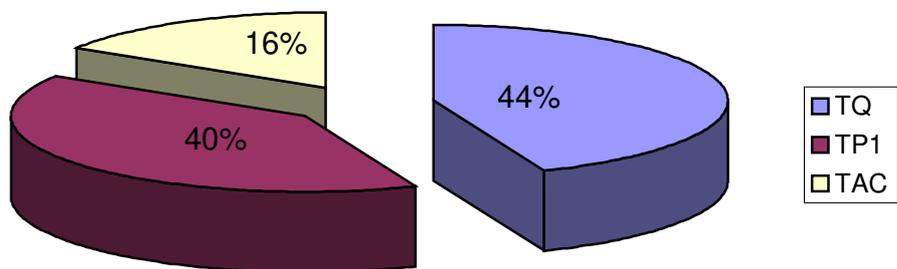
**I23FL5TQ:** Características do fungo: marrom claro, não cotonoso, sem exudado, reverso creme claro em PDA e MEA. Apresenta melhor crescimento em

MEA do que em PDA. Seus conídios apresentam parede lisa, formato esférico, com tamanho de 3,0 a 3,5 $\mu$ m. Após 5 dias de incubação a 30°C, o fungo apresentou crescimento de 6,0 cm de diâmetro em PDA e 6,5 cm em MEA.

**I24FL6TQ:** Características do fungo: marrom claro, com tons de salmão, não cotonoso, sem exudado, bastante esporulado, reverso creme claro em PDA e MEA. Seus conídios apresentam parede lisa, formato esférico, com tamanho de 4,5 a 5,5 $\mu$ m. Após 5 dias de incubação a 30°C, o fungo apresentou crescimento de 4,5 cm de diâmetro tanto em PDA quanto em MEA.

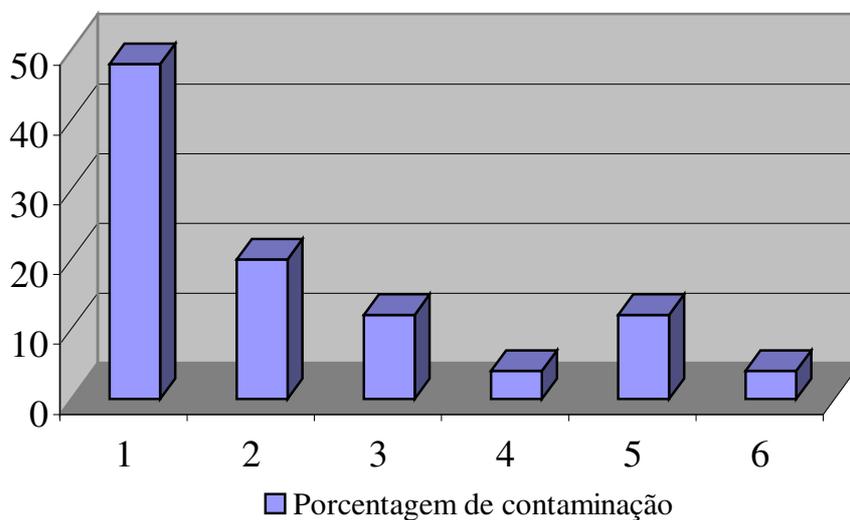
**I25FL5TQ:** Características do fungo: verde ocre, não cotonoso, sem exudado, bastante esporulado, com crescimento baixo e reverso marrom claro em PDA e MEA. Seus conídios apresentam parede lisa, formato elipsoidal, com tamanho de 2,5 a 3,5 $\mu$ m. Após 5 dias de incubação a 30°C, o fungo apresentou crescimento de 3,5 cm de diâmetro em PDA e 5,0 cm em MEA.

Analisando os dados pôde-se verificar que o ponto mais contaminado foi o Tanque Pulmão de recebimento (TQ) com 44% dos bolores encontrados, a **figura 7** apresentada abaixo mostra uma comparação percentual de contaminação ponto a ponto. No entanto, a contaminação foi inferior a 100 esporos/ml de bebida. Através da análise do sistema de códigos, verificou-se que os pontos de maior incidência de bolores termoresistentes foram os descritos como TQ (Tanque Pulmão), TP1 (Após pasteurização 1) e TAC (Antes do Concentrador). No produto final (TPF) e produto final após 3 meses de prateleira (TPF90), não foram encontrados bolores termoresistentes.



**Figura 7:** Porcentagem de contaminação por bolores termoresistentes por ponto do processo em todos os lotes analisados.

Com relação à contaminação dos lotes, os que apresentaram maior incidência de bolores termoresistentes foram os lotes 1 e 2, as porcentagens podem ser conferidas na **figura 8**, assim como também, nos dados das contagens contidas no **ANEXO II**.



**Figura 8:** apresenta a porcentagem de contaminação por bolores termoresistentes por lote analisado

Splittstoesser et al. (1970) relataram em suas pesquisas sobre incidência de bolores termoresistentes em suco de uva, com coletas realizadas em duas épocas distintas do ano englobando safra e entressafra, que 19 amostras de uvas íntegras dentro de 25 coletadas estavam contaminadas, principalmente com *Byssochlamys* e *Penicillium*. Já 18 amostras de uvas, com grãos cortados ou fissurados, dentro de 20, apresentavam contaminação principalmente por *Aspergillus fischeri* e *Byssochlamys*.

#### **4.3.4- Seleção do isolado mais termoresistente para suspensões de esporos com idade de 1 mês e 3 meses**

Durante o levantamento da contaminação de bolores termoresistentes em bebida de uva (pH: 3,0 e 14°Brix), foram obtidos um total de 25 isolados dos quais 24 se mostraram totalmente distintos e foram submetidos a choques térmicos programados para seleção do isolado mais termoresistente.

Os esporos de 1 mês de idade foram submetidos a choques térmicos seletivos que variaram de 85°C/15min a 100°C/60min, para que se pudesse selecionar o isolado com maior termoresistência.

Para os esporos de 3 meses de idade, os binômios tempo x temperatura aplicados foram mais drásticos, pois não se conseguiu o isolamento do bolor mais termoresistente aplicando somente 100°/60min, necessitando aumentar os valores de choque até 115°/15min. A **tabela 9** exhibe os dados obtidos durante o processo dos choques térmicos seletivos para as duas idades de esporos, além dos limites de sobrevivência aos choques térmicos.

Analisando-se os dados da **tabela 9** pôde-se constatar que 45,83% dos bolores com esporos de 3 meses de idade apresentaram ligeira queda de termoresistência quando comparado com os mesmos com idade de 1 mês, o que significa que longos tempos de incubação podem tornar os esporos menos resistentes, um dos fatores que podem vir a explicar o ocorrido segundo Conner & Beuchat (1987) é que alguns fungos como os Deuteromicetos muitas vezes não conseguem manter sua rede de proteínas constituintes da camada externa dos esporos durante longos períodos de incubação ao contrário dos Ascomicetos onde esta rede se mantém mais compacta protegendo o esporos dos fatores extrínsecos. Assim pôde-se verificar que 29,16% mantiveram a mesma taxa de resistência térmica, demonstrando pouca ou nenhuma influência do tempo de incubação sobre a resistência dos esporos. No entanto, 25% dos esporos com 3 meses de idade (marcados em negrito na **tabela 9**) possuíram uma grande elevação da sua capacidade de resistência a temperatura, estes fatos foram evidenciados também nos estudos de Conner & Beuchat (1987b) que constataram que os ascósporos de *Neosartorya fischeri* com idade de 21 dias eram mais termoresistentes que os de 8 dias. O mesmo comportamento foi observado por Tournas e Traxler (1994) em seus trabalhos com ascósporos de *Neosartorya fischeri* de 1, 2, 3 e 6 meses de idade, isolados de suco de abacaxi, posteriormente aquecidos a 88°C por 1 hora em água deionizada, puderam constatar que os ascósporos mais velhos mostraram-se mais resistentes que os mais jovens na mesma temperatura. O que comprova que os fungos com relevante interesse em contaminações industriais normalmente possuem seu valor de resistência aumentado, em relação ao tempo de incubação, o que deve ser encarado pelas indústrias produtoras de sucos, como um fator preocupante, caso um destes bolores venham a penetrar na linha de produção.

Desta maneira, foi possível selecionar a cepa I22FL5TQ como isolado mais termoresistente referente aos esporos com 1 mês de idade e a cepa I5FL1TQ dos esporos com 3 meses de idade. Vale ressaltar que ambas as cepas foram provenientes da matéria prima.

**Tabela 9:** Código dos fungos termoresistentes, procedência e limite de sobrevivência para esporos de 1 e 3 meses de idade.

Código do Fungo	Sobrevivência	
	1 mês de idade	3 meses de idade
I1FL1TP1	100°C/5min	95°C/10min
I2FL1TP1	100°C/5min	95°C/10min
I3FL1TP1	100°C/5min	95°C/10min
<b>I4FL1TQ</b>	<b>100°C/5min</b>	<b>110°C/6min</b>
<b>I5FL1TQ</b>	<b>100°C/5min</b>	<b>110°C/10min</b>
I6FL3TQ	100°C/5min	95°C/15min
I7FL1TQ	100°C/5min	95°C/10min
I8FL2TP1	100°C/5min	100°C/5min
I9FL2TP1	100°C/5min	95°C/10min
<b>I10FL3TP1</b>	<b>100°C/5min</b>	<b>100°C/60min</b>
I12FL3AC	95°C/15min	95°C/15min
I13FL1AC	95°C/15min	95°C/15min
I14FL1AC	100°C/5min	100°C/5min
I15FL2TP1	95°C/15min	95°C/10min
I16FL2TQ	95°C/15min	95°C/15min
I17FL1TQ	95°C/15min	90°C/5min
I18FL1AC	95°C/15min	95°C/15min
I19FL1TP1	95°C/15min	95°C/10min
I20FL1TP1	95°C/10min	95°C/10min
I21FL4TQ	100°C/5min	95°C/15min
<b>I22FL5TQ</b>	<b>100°C/55min</b>	<b>110°C/6min</b>
<b>I23FL5TQ</b>	<b>100°C/5min</b>	<b>100°C/25min</b>
<b>I24FL6TQ</b>	<b>100°C/5min</b>	<b>100°C/40min</b>
I25FL5TQ	95°C/15min	95°C/15min

#### 4.3.5- Identificação dos isolados termoresistentes para idade de 1 mês e 3 meses

##### 4.3.5.1- Identificação do isolado I22FL5TQ

A **tabela 10** indica os resultados dos diâmetros das colônias do isolado I22FL5TQ em diferentes meios de culturas e temperaturas obtidos após o período de incubação de 7 dias.

**Tabela 10:** Medida dos diâmetros (cm) das colônias nos diferentes meios e temperaturas, para o isolado I22 FL5TQ

Temperatura de incubação	MEA	CYA	G25N
5°C	SC*	SC*	SC*
25°C	5,0	3,7	0,5
30°C	6,5	4,5	0,8
37°C	6,0	4,0	0,65

\*Sem Crescimento

a) Características Macroscópicas:

- MEA: colônias brancas, com coloração levemente bege, não cotonosas, aspecto granuloso, borda irregular, sem presença de exudado, reverso da placa creme.
- CYA: colônias brancas, lisas, ou seja, sem aparência granular pronunciada, aspecto sulcado, borda regular, sem presença de exudado, reverso âmbar.
- G25N: colônias pequenas, brancas, não floculosas, aspecto sulcado, sem presença de exudado, reverso creme.

b) Características Microscópicas: alto índice de ascomatas com diferentes tamanho e estados de amadurecimento, seu tamanho variou de 72-154  $\mu\text{m}$  (figuras disponíveis no **ANEXO III**). Início de liberação de ascos, possuindo 8 ascósporos cada um, o tamanho dos ascos variavam de 8,5-9,6  $\mu\text{m}$ . Presença de ascósporos com formato biconvexo e fendas equatoriais bastante pronunciadas, parede de aspecto rugosa, não regular, tamanho entre 5,8-6,5  $\mu\text{m}$ . Além de ascósporos pôde-se verificar a incidência de conídios com formato esférico, tamanho similar, sem fendas equatoriais, estas duas estruturas podem ser visualizadas na **figura 9**.

c) Chaves de identificação:

➤ Pitt & Hocking (1985)

- 1) Colônias em CYA a 25 e 37°C ultrapassando 35 mm.....2
- 2) Colônias brancas ou coloridas que não pretas e cinzas.....3
- 3) Colônias brancas.....*Neosartorya fischeri*

➤ Samson (1988)

- 1) Ascomata sem formato difuso, forma anamórfica de *Penicillium*, *Paecilomyces* ou *Aspergillus*.....2
- 2) Ascomata com parede distinta. Forma anamórfica de *Aspergillus* ou *Penicillium*.....3
- 3) Forma anamórfica de *Aspergillus*, ascomata com células de Hülle, ou formado por hifas trançadas (várias camadas).....4
- 4) Parede do ascomata não circundado por células de Hülle.....5
- 5) Ascomata branco ou creme, com parede formada por hifas trançadas ou células achatadas.....*Neosartorya fischeri*

Este fungo apresentou capacidade de resistência térmica de 100°C/55min durante os choques seletivos. Segundo Samson (1988), na natureza é bastante comum que um fungo se manifeste em suas duas formas, a anamórfica e teleomórfica, apresentando assim, estruturas de reprodução assexuada (conídios) e sexuada (ascósporos).



**Figura 9:** Foto de lâmina do isolado I22FL5TQ com presença de ascósporos de *Neosartorya fischeri* com aumento de 1000 vezes.

A provável explicação para que este fungo apresentasse aspecto macroscópico diferente do isolado I5FL1TQ, cepa mais termoresistente isolada esporos de 3 meses de idade (identificado também como *N. fischeri*), e que pudesse resistir por menos tempo à temperatura de choque térmico do que o último, está na presença acentuada de conídios observada na estrutura micelial do isolado I22FL5TQ. Sendo os conídios formas reprodutivas mais susceptíveis a destruição térmica quando comparado aos ascósporos, torna-se compreensível a maior capacidade de resistência do isolado I5FL1TQ, que apresentou somente ascósporos em sua formação.



**Figura 10:** Foto de placa contendo colônia de *Neosartorya fischeri* referente ao isolado I22FL5TQ, cultivado em MEA 30°C durante 7 dias.

#### 4.3.5.2- Identificação do Isolado I5FL1TQ

A **tabela 11** indica os resultados dos diâmetros das colônias do isolado I5FL1TQ em diferentes meios de culturas e temperaturas obtidos após o período de incubação de 7 dias.

**Tabela 11:** Medida dos diâmetros (cm) das colônias nos diferentes meios e temperaturas, para o isolado I5 FL1TQ

Temperaturas de incubação	MEA	CYA	G25N
5°C	SC*	SC*	SC*
25°C	5,5	4,0	0,6
30°C	6,8	4,3	0,95
37°C	6,2	4,2	0,68

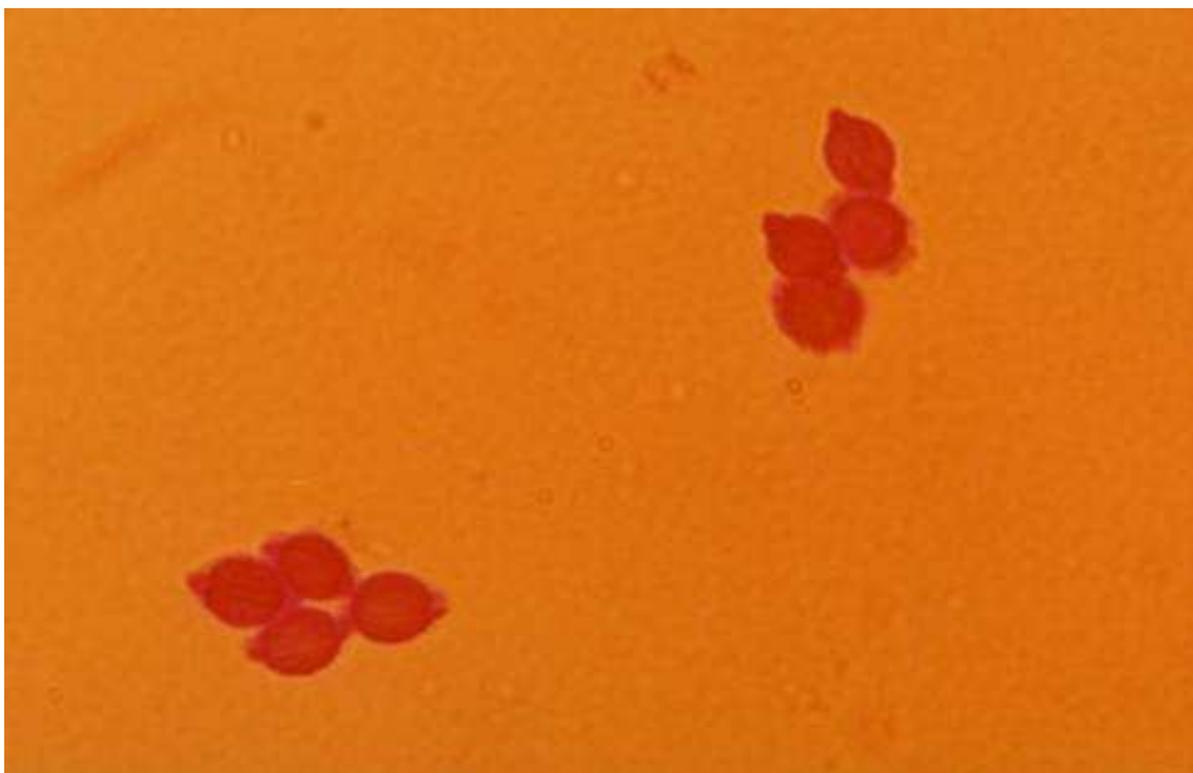
SC\*: Sem Crescimento

a) Características Macroscópicas:

- MEA: colônias brancas, com crescimento esparsos e levemente radial, não cotonosas, aspecto granuloso, borda regular, sem presença de exudado, reverso da placa esverdeado.
- CYA: colônias brancas, lisas, ou seja, sem aparência granular pronunciada, aspecto sulcado, borda regular, sem presença de exudado, reverso âmbar.
- G25N: colônias pequenas, brancas, não floculosas, aspecto sulcado, sem presença de exudado, reverso creme.

b) Características Microscópicas: alto índice de ascomatas com diferentes tamanho e estados de amadurecimento, seu tamanho variou de 87-264  $\mu\text{m}$  (figuras disponíveis no **ANEXO III**). Início de liberação de ascos, possuindo 8 ascósporos cada um, o tamanho dos ascos variavam de 9,1-9,8  $\mu\text{m}$ . Presença de ascósporos com formato biconvexo e fendas equatoriais bastante pronunciadas, parede de aspecto rugosa, não regular, tamanho entre 6,2-6,8  $\mu\text{m}$ , esta estrutura pode ser visualizada na **figura 11**.

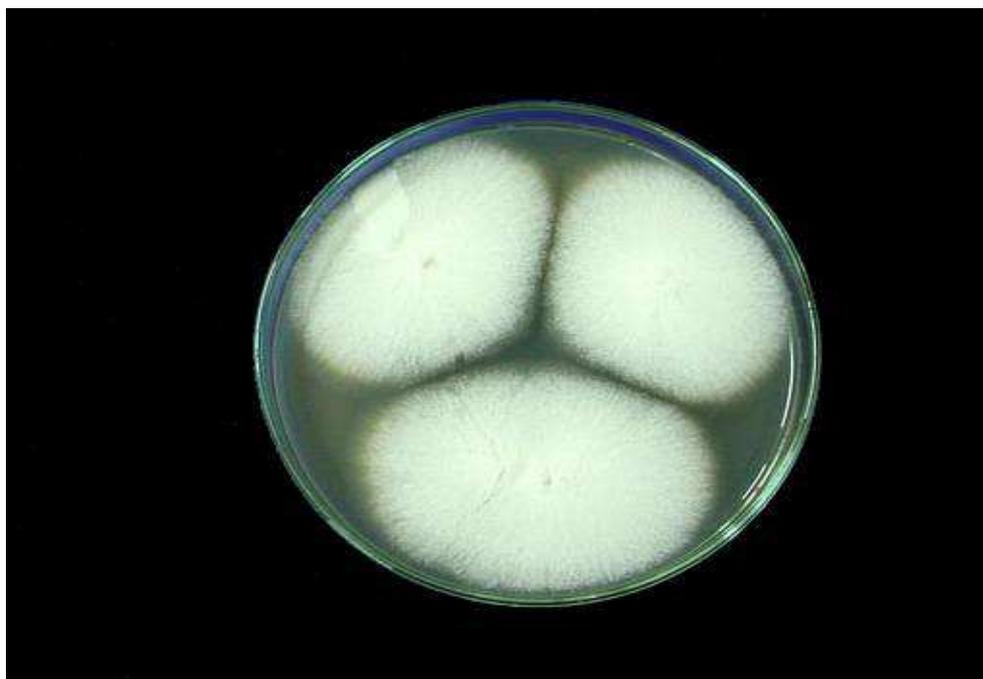
A chave de identificação preconizada por Pitt & Hocking (1985), bem como a chave utilizada por Samson (1988), foram apresentadas no item anterior não havendo necessidade de repeti-las, já que o isolado I5FL1TQ foi identificado também como *Neosartorya fischeri*.



**Figura 11:** Foto de ascósporos em lâmina feita a partir do isolado I5FL1TQ com aumento de 1000 vezes

É importante ressaltar que, o isolamento e seleção deste fungo como o mais termoresistente dentre os demais é bastante comum. Pesquisadores brasileiros como Gumerato (1995), Baglioni (1998) e Salomão (2002) encontraram este mesmo bolor como sendo a espécie mais termoresistente nos produtos por eles analisados, sendo estes purê de maçã, polpa de tomate e suco de maçã respectivamente. Desta maneira, verifica-se uma alta incidência deste fungo nos mais variados produtos nacionais, como no caso desta pesquisa em bebida de uva.

Na **figura 12** pode-se visualizar as diferenças macroscópicas como cor e textura do micélio, granulação, além de sutis linhas radiais apresentadas pelo isolado I5FL1TQ, que não são observadas quando comparada com a **figura 10**.



**Figura 12:** foto de placa contendo colônia de *Neosartorya fischeri* referente ao isolado I5FL1TQ, cultivado em MEA 30°C durante 7 dias.

#### 4.3.6- Ativação dos Ascósporos

Os ascósporos dos ascomicetos, como por exemplo, os de *Neosartorya fischeri* (**figuras 9 e 11**), apresentam dormência, sendo que esta pode ser quebrada com a realização de um tratamento de ativação. Os tratamentos para ativação são variados podendo utilizar-se baixas temperaturas, irradiação, bem como por outros métodos, porém o método mais utilizado visa a aplicação de altas temperaturas (choques térmicos) (Delgado, 2001).

O método de contagem através de Câmara de Neubauer (**tabela 12**) foi utilizado para que se obtivesse uma idéia geral da população de esporos em suspensão, no entanto nesta metodologia são contados os esporos viáveis e não viáveis. Assim, com intuito de conseguir um valor mais aproximado da população de viáveis, em termos de concentração (esporos/ml), realizou-se os testes de

contagem por diluição e plaqueamento com aplicação de choques térmicos de ativação.

**Tabela 12:** Contagem direta de ascósporos (Câmara de Neubauer) de *Neosartorya fischeri* para os isolados I22FL5TQ e I5FL1TQ

<b>Código do Fungo</b>	<b>Ascósporos/ml de suspensão</b>
I22FL5TQ	$1,06 \times 10^8$
I5FL1TQ	$1,17 \times 10^9$

Após a aplicação dos choques térmicos programados foi determinado o tratamento de ativação ótima. Estes dados podem ser visualizados na **tabela 13**. As **figuras 13 e 14** mostram as curvas obtidas para a ativação dos ascósporos de *Neosartorya fischeri* dos isolados I22FL5TQ e I5FL1TQ.

**Tabela 13:** Recuperação em MEA (profundidade) dos ascósporos de *N. fischeri* para os isolados I22FL5TQ e I5FL1TQ e a porcentagem (%) de ascósporos ativados em relação à contagem direta em Câmara de Neubauer.

<b>Choque Térmico</b>	<b>Ascósporos/ml de Suspensão</b>		<b>% de Ascósporos Ativados</b>	
	I22FL5TQ	I5FL1TQ	I22FL5TQ	I5FL1TQ
Sem Choque	$1,06 \times 10^8$	$1,17 \times 10^9$	-----	-----
85°C/5min	$9,50 \times 10^6$	$5,00 \times 10^7$	8,96	4,27
<b>85°C/10min</b>	<b><math>2,00 \times 10^7</math></b>	$7,50 \times 10^7$	<b>18,86</b>	6,41
85°C/15min	$1,00 \times 10^7$	$1,50 \times 10^8$	9,43	12,82
85°C/20min	$5,00 \times 10^6$	$5,00 \times 10^8$	4,71	42,73
<b>85°C/25min</b>	$3,50 \times 10^6$	<b><math>8,00 \times 10^8</math></b>	3,30	<b>68,37</b>
85°C/30min	$1,50 \times 10^6$	$2,00 \times 10^8$	1,41	17,09

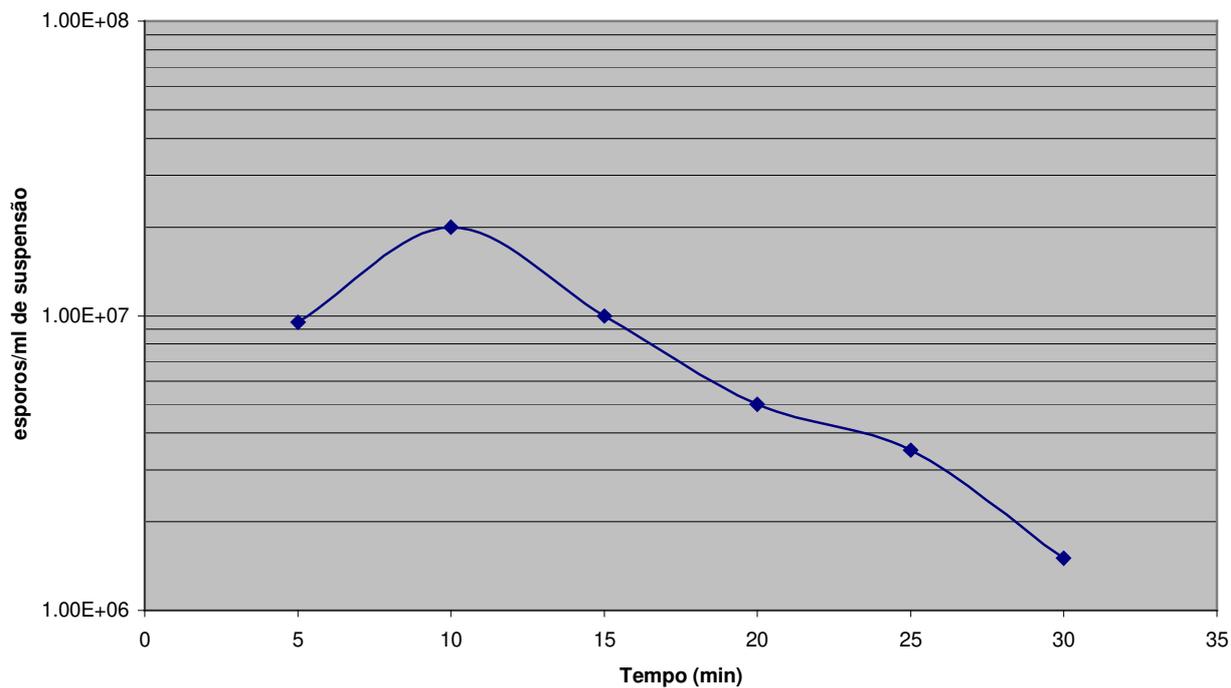
Os dados expostos na **tabela 12** demonstraram perda de praticamente um ciclo logarítmico entre a contagem em Câmara de Neubauer e a contagem em placa para o isolado I22FL5TQ. Um provável fator que explica esta queda é a presença, juntamente com ascósporos, de conídios, pois estes apresentam estruturas mais frágeis quando comparada aos ascósporos.

Para o isolado I5FL1TQ, houve uma perda de menos de meio ciclo logarítmico na contagem em placa, mediante o melhor choque de ativação,

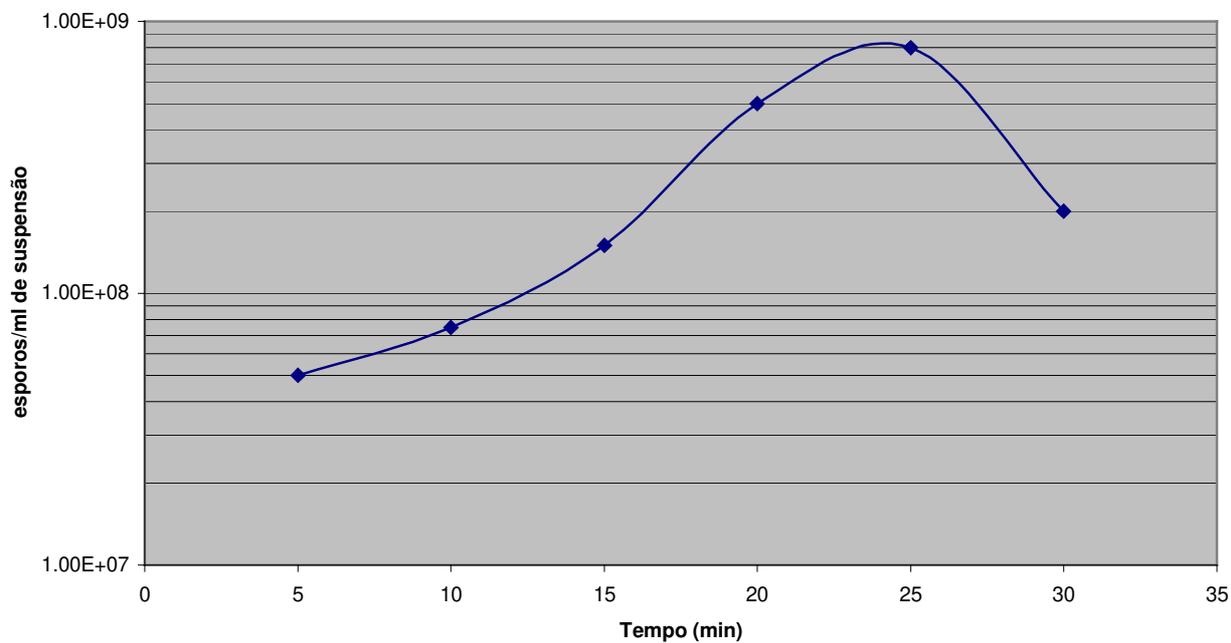
quando comparada com a contagem direta; por este motivo, a **tabela 13** apresenta porcentagens de ativação de até 68,34% em detrimento da contagem em Câmara de Neubauer.

Um outro dado interessante apresentado na mesma tabela, são os binômios de ativação encontrados, que para 1 mês de idade foi de 85°C/10 minutos e para 3 meses 85°C/25 minutos, este fato sugere que os ascósporos de *Neosartorya fischeri* desenvolvem maior dormência dependendo do tempo de incubação, estando de acordo com os relatos de Conner & Beuchat (1987c). Este fato é relevante pois se desconhece o tempo de incubação destes esporos na natureza.

Beuchat (1976) construiu curvas de ativação a 85°C (utilizando tampão fosfato 0,1M, pH7 como meio de aquecimento) para três linhagens diferentes de *Neosartorya fischeri* (ascósporos com 64 dias). As três linhagens mostraram ativação similar, sendo que a faixa de tempo ótima, considerando as três linhagens, esteve entre 15 e 30 minutos. Já Gumerato (1995), em ensaios semelhantes para uma linhagem do mesmo fungo (ascósporos 1 mês de idade), obteve ativação ótima a 85°C/5 minuto, utilizando água destilada como meio de aquecimento. O mesmo ocorreu com Baglioni (1998) que encontrou ativação de 85°C/10 minutos e 85°C/20 minutos para ascósporos de *N. fischeri* com 1 mês e 3 meses de idade respectivamente. Mais recentemente, Salomão (2002) trabalhando também com o mesmo fungo (ascósporos com 30 dias), encontrou o valor de 85°C/10 minutos como melhor binômio de ativação, utilizando como meio de aquecimento néctar de maçã.



**Figura 13:** Curva de ativação a 85°C para esporos do Isolado I22FL5TQ



**Figura 14:** Curva de ativação a 85°C para esporos do Isolado I5FL1TQ

#### 4.3.7- Resistência térmica dos isolados I22FL5TQ e I5FL1TQ em bebida de uva pH: 3,0 e 14°Brix

Nesta fase do trabalho, foram determinadas as resistências térmicas para as duas cepas identificadas como *Neosartorya fischeri* isoladas dos ensaios para bolores termoresistentes de 1 e 3 meses de idade, caracterizados pelos códigos I22FL5TQ e I5FL1TQ, respectivamente.

Foram obtidas curvas não logarítmicas apresentadas nas **figuras 15 e 19**. Sendo assim, houve a necessidade da aplicação da metodologia de Alderton & Snell (1970), para linearização das mesmas.

##### 4.3.7.1- Isolado I22FL5TQ

**Tabela 14:** Contagem do número de sobreviventes com o tempo de aquecimento, em bebida de uva pH: 3,0 e 14°Brix de ascósporos de *Neosartorya fischeri* com 1 mês de idade.

Temperatura: 90°C	
Tempo de aquecimento (segundos)	Número de sobreviventes (esporos/ml)
0	$1,6 \times 10^6$
120	$1,0 \times 10^6$
240	$3,0 \times 10^5$
360	$5,0 \times 10^4$
480	$5,0 \times 10^3$
600	$1,5 \times 10^2$

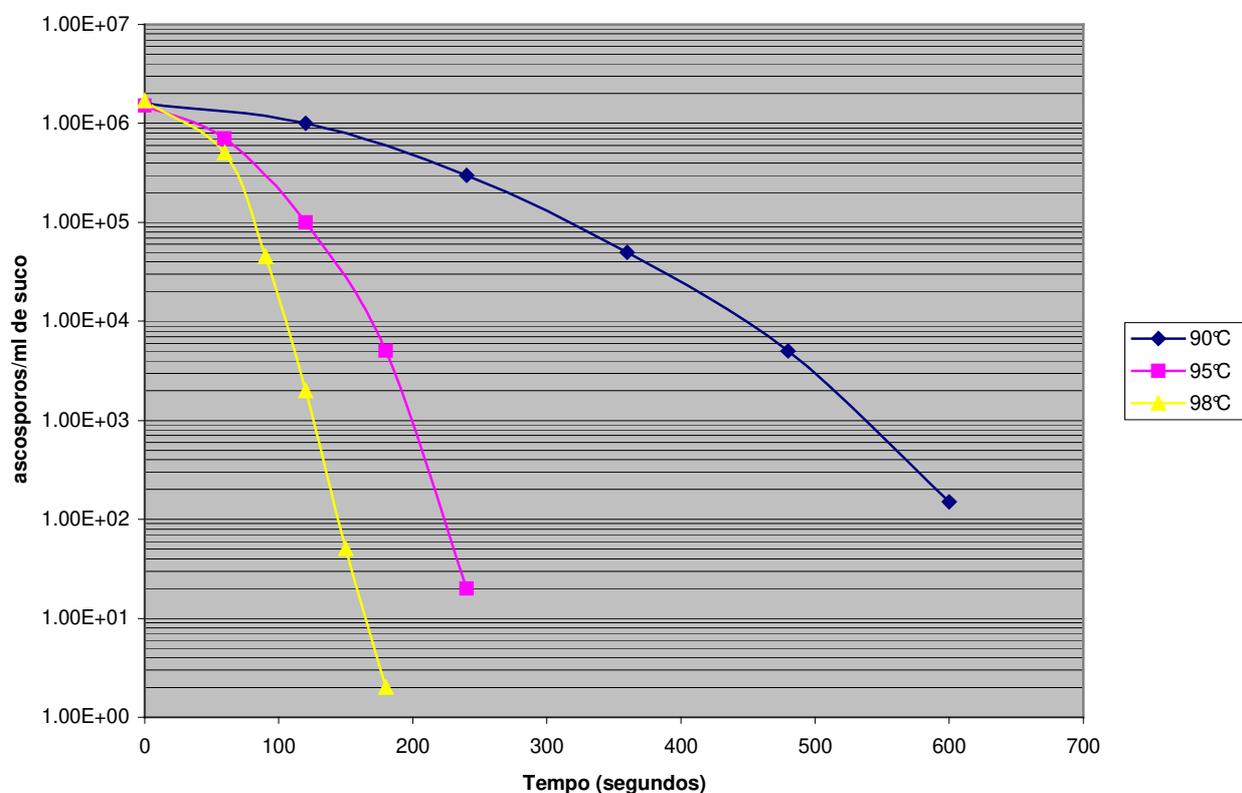
Temperatura: 95°C	
Tempo de aquecimento (segundos)	Número de sobreviventes (esporos/ml)
0	$1,5 \times 10^6$
60	$7,0 \times 10^5$
120	$1,0 \times 10^5$
180	$5,0 \times 10^3$
240	$2,0 \times 10^1$

Temperatura: 98°C	
Tempo de aquecimento (segundos)	Número de sobreviventes (esporos/ml)
0	$1,7 \times 10^6$
60	$5,0 \times 10^5$
90	$4,5 \times 10^4$
120	$2,0 \times 10^3$
150	$5,0 \times 10^1$
180	$2,0 \times 10^0$

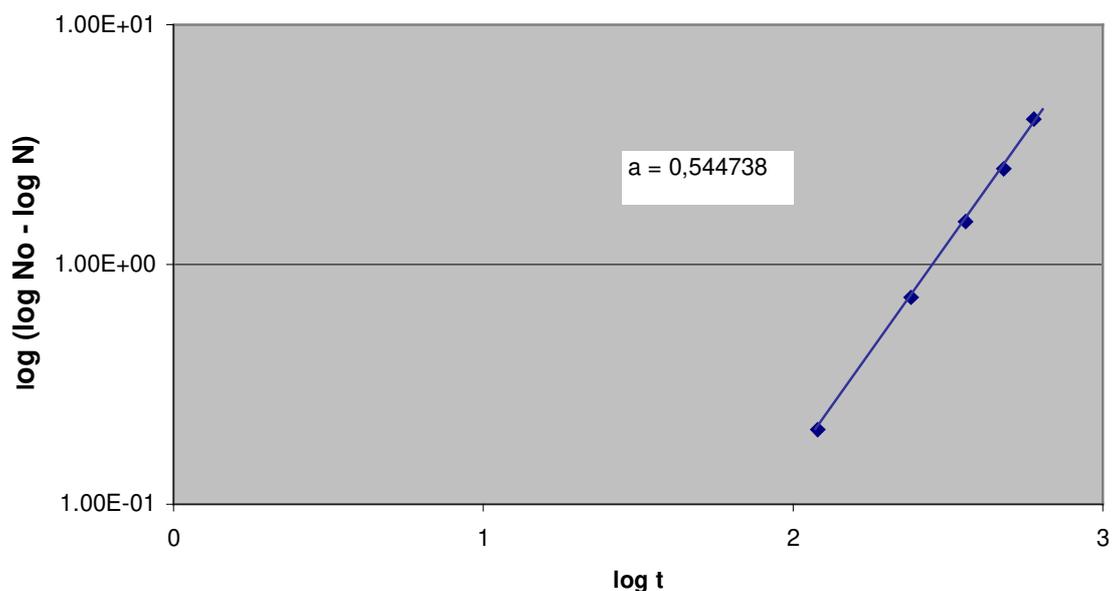
Os resultados obtidos nos ensaios de resistência térmica, nas temperaturas já mencionadas se encontram detalhados na **tabela 14**. É importante ressaltar que para realização dos ensaios, como preconizado por Baglioni (1998), a concentração inicial de esporos é sempre em torno de  $10^6$  UFC/ml.

Com base nos dados da **tabela 14** foram construídas as curvas experimentais de morte térmica para o isolado I22FL5TQ.



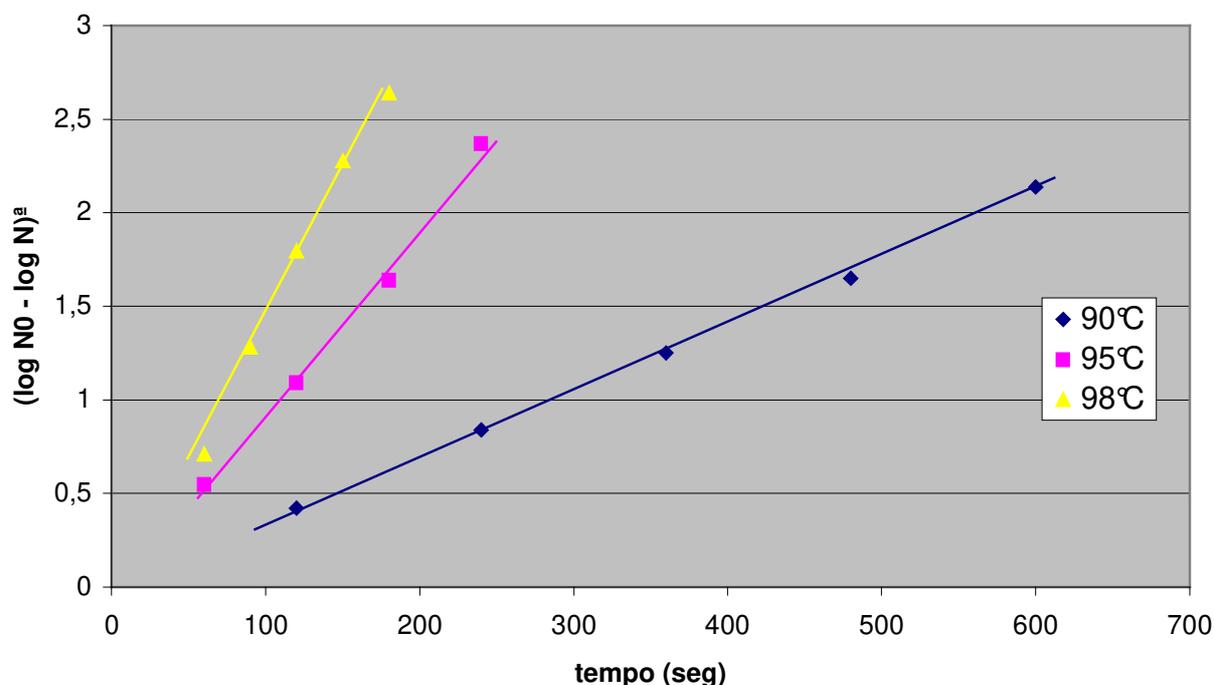
**Figura 15:** Curva experimental de inativação térmica para isolado I22FL5TQ (1 mês de idade) nas temperaturas de 90, 95 e 98°C.

Analisando-se a **figura 15**, percebe-se que a curva de inativação térmica para o presente bolor comporta-se de maneira não logarítmica, com ombro nos tempos iniciais, desta maneira um procedimento de linearização se faz necessário para melhor visualização dos parâmetros cinéticos D e Z. A **figura 16** refere-se à obtenção do expoente de linearização “a”, o qual é o inverso do coeficiente angular da curva  $\log (\log N_0 - \log N)$  versus  $\log t$ , na menor temperatura de tratamento térmico utilizada (90°C), sendo este expoente aplicado na linearização das demais curvas. A **figura 17** mostra as curvas de linearização obtidas através do método de Alderton & Snell (1970). Já a **figura 18**, onde os eixos apresentam –  $\log k$  versus temperatura, referem-se a obtenção dos parâmetro Z para os ascósporos do isolado I22FL5TQ.



**Figura 16:** Determinação do valor “a” para o isolado I22FL5TQ (1 mês de idade) na temperatura de 90°C

O valor do expoente “a” para o isolado I22FL5TQ (1 mês de idade) na temperatura de 90°C foi de 0,544738, com  $R^2 = 0,9995$ .

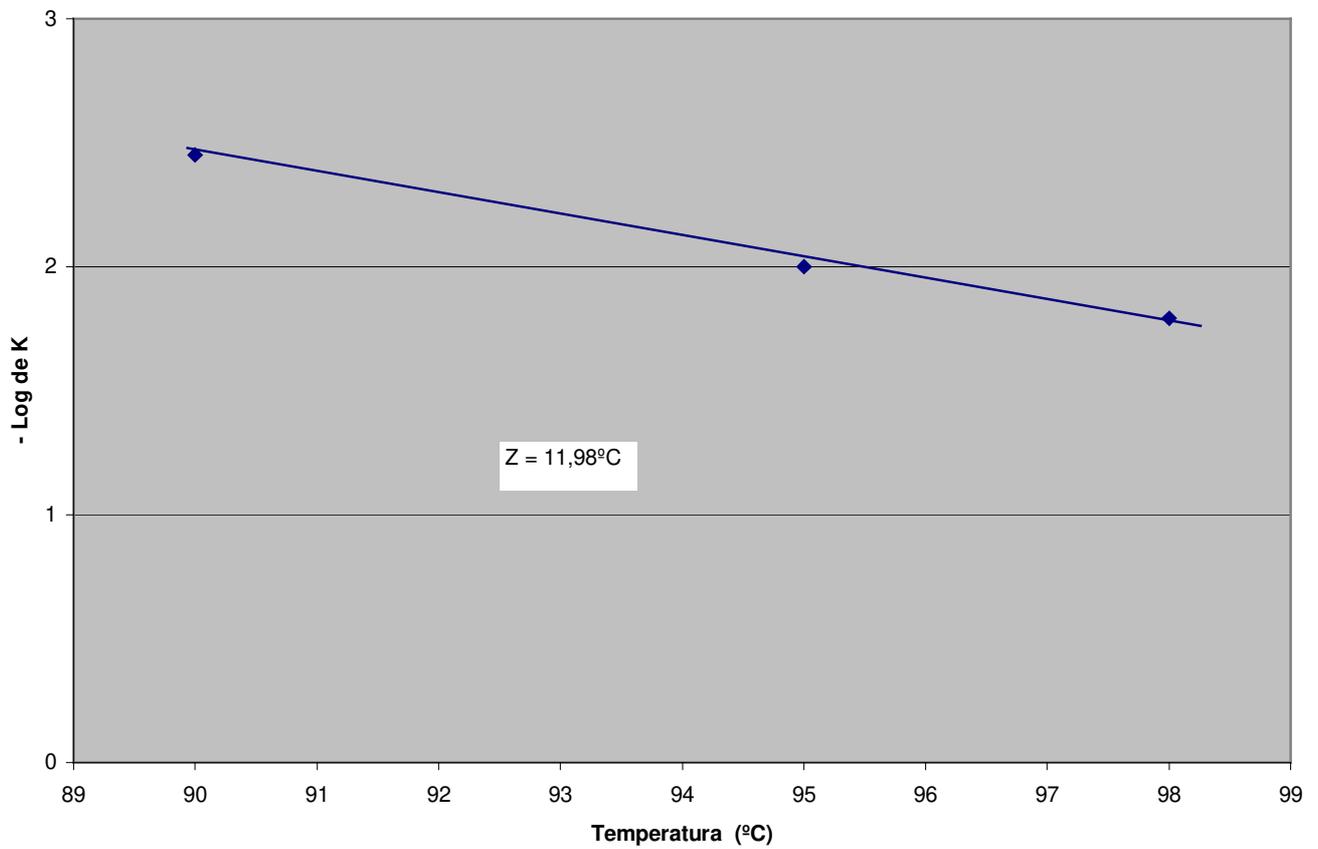


**Figura 17:** Curvas de linearização da inativação térmica para o isolado I22FL5TQ (1 mês de idade).

Os valores D, equivalentes a  $1/k$ , encontrados para este isolado, juntamente com os valores dos coeficientes de correlação e o intercepto, estão sintetizados na **tabela 15**.

**Tabela 15:** Valores de resistência térmica para o isolado I22FL5TQ (1 mês de idade).

Temperatura	K (seg <sup>-1</sup> )	C	R <sup>2</sup>	1/k (seg)	1/k (min)
90°C	0,003533	-0,01253	0,9987	283,28	4,72
95°C	0,010024	-0,09131	0,9943	99,76	1,66
98°C	0,016174	-0,20073	0,9933	61,82	1,03



**Figura 18:** Determinação do valor Z para o isolado I22FL5TQ (1 mês de idade).

#### 4.3.7.2- Isolado I5FL1TQ

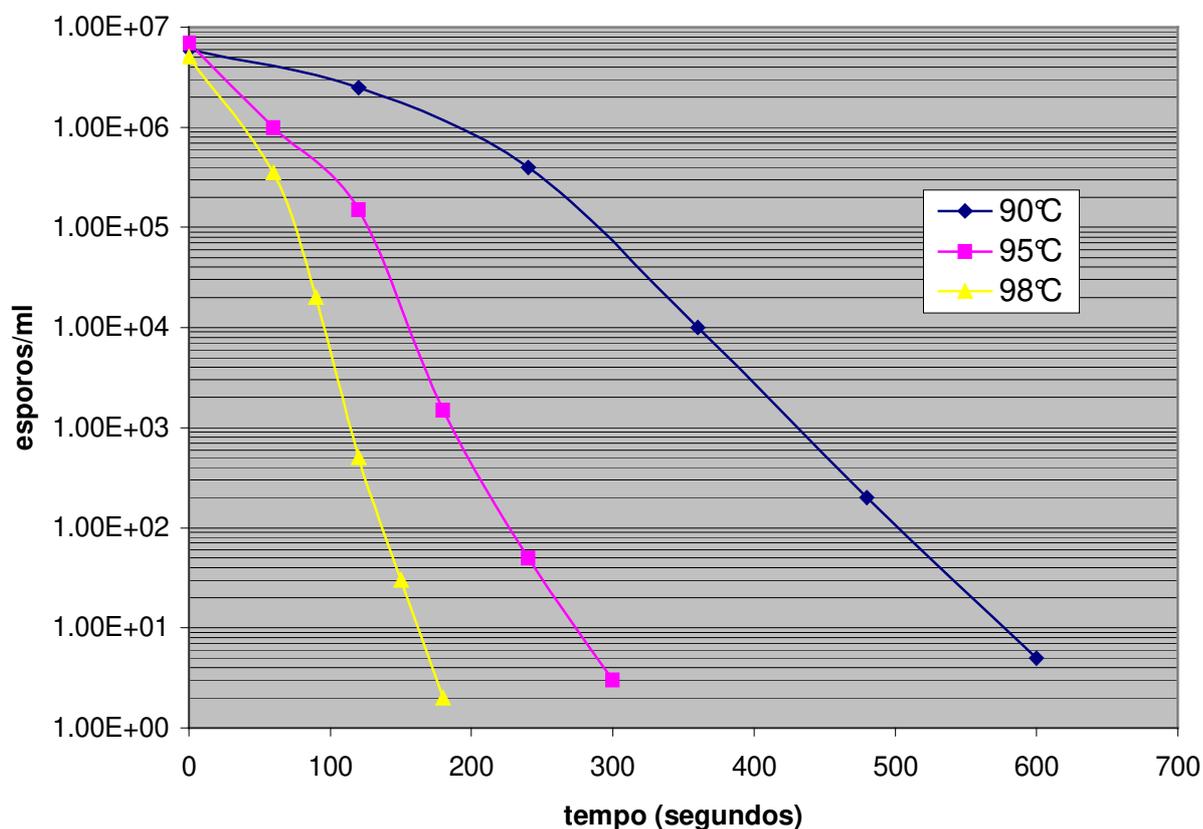
Os resultados obtidos nos ensaios de resistência térmica, nas temperaturas já mencionadas se encontram detalhados na **tabela 16**.

**Tabela 16:** Contagem do número de sobreviventes com o tempo de aquecimento, em bebida de uva pH: 3,0 e 14ºBrix de ascósporos de *Neosartorya fischeri* com 3 mês de idade.

Temperatura: 90°C	
Tempo de aquecimento (segundos)	Número de sobreviventes (esporos/ml)
0	$6,0 \times 10^6$
120	$2,5 \times 10^6$
240	$4,0 \times 10^5$
360	$1,0 \times 10^4$
480	$2,0 \times 10^2$
600	$5,0 \times 10^0$
Temperatura: 95°C	
Tempo de aquecimento (segundos)	Número de sobreviventes (esporos/ml)
0	$7,0 \times 10^6$
60	$1,0 \times 10^6$
120	$1,5 \times 10^5$
180	$1,5 \times 10^3$
240	$5,0 \times 10^1$
300	$3,0 \times 10^0$
Temperatura: 98°C	
Tempo de aquecimento (segundos)	Número de sobreviventes (esporos/ml)
0	$5,0 \times 10^6$
60	$3,5 \times 10^5$
90	$2,0 \times 10^4$
120	$5,0 \times 10^2$
150	$3,0 \times 10^1$
180	$2,0 \times 10^0$

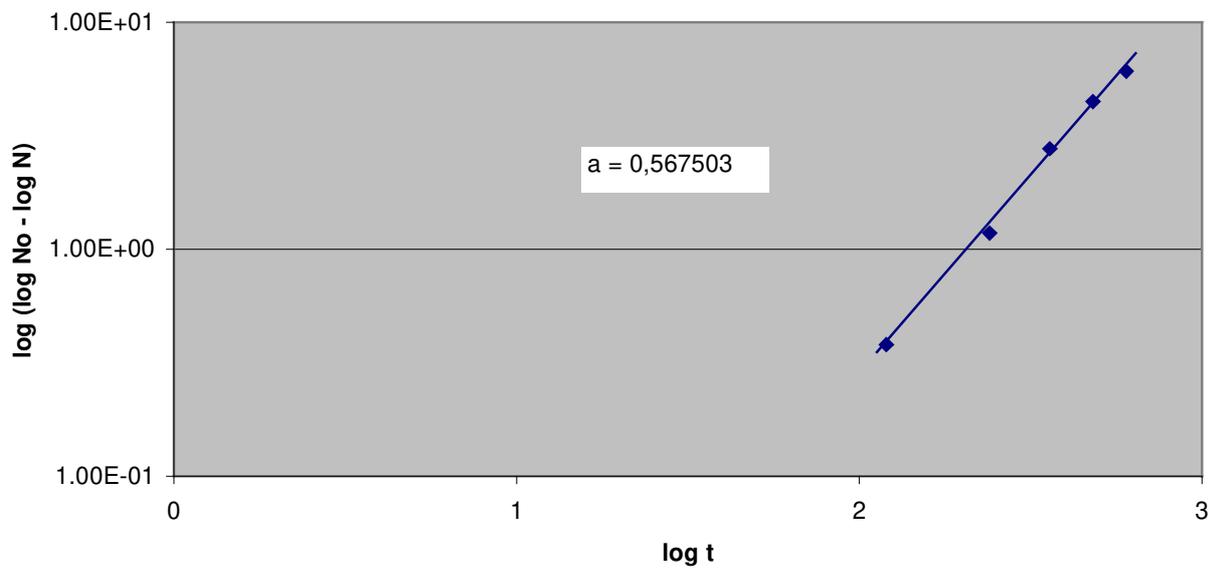
Analisando-se a **figura 19**, percebe-se que a curva de inativação térmica o presente bolor comporta-se também de maneira não logarítmica, desta maneira um procedimento de linearização se faz necessário para melhor visualização dos parâmetros cinéticos D e Z. A **figura 20** refere-se à obtenção do expoente de linearização “a”, através da curva  $\log (\log N_0 - \log N)$  versus  $\log t$ , na menor temperatura de tratamento térmico utilizada (90°C), sendo este expoente aplicado na linearização das demais curvas. A **figura 21** mostra as curvas de linearização obtidas através do método de Alderton & Snell (1970). Já a **figura 22**, onde os eixos apresentam  $-\log k$  versus temperatura, referem-se a obtenção dos parâmetro Z para os ascósporos do isolado I5FL1TQ.

Com base nos dados da **tabela 15** foram construídas as curvas de morte térmica para o isolado I5FL1TQ.

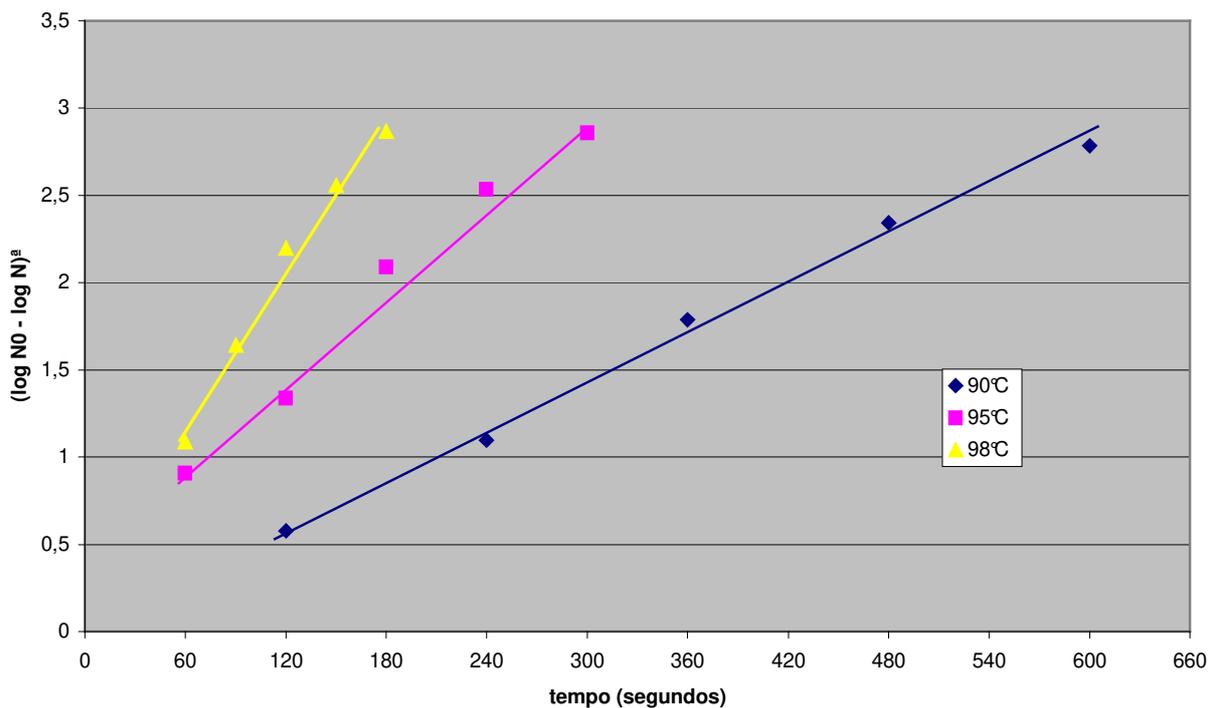


**Figura 19:** Curvas experimentais de inativação térmica para isolado I5FL1TQ (3 meses de idade) nas temperaturas de 90, 95 e 98°C.

O valor do expoente “a” para o isolado I5FL1TQ (3 mês de idade) na temperatura de 90°C foi de 0,567503, com  $R^2 = 0,996114$ , como pode ser visualizado na **figura 20**.



**Figura 20:** Determinação do valor “a” para o isolado I5FL1TQ (3 meses de idade) na temperatura de 90°C

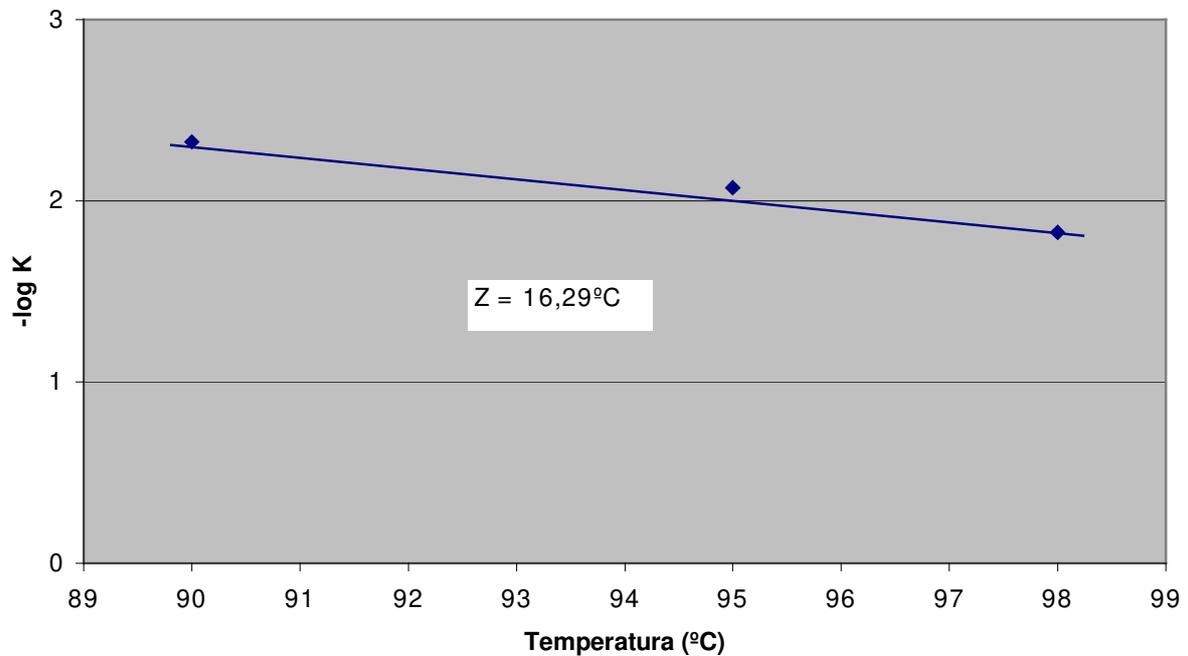


**Figura 21:** Curvas de linearização da inativação térmica para o isolado I5FL1TQ (3 meses de idade).

Os valores D encontrados para este isolado, juntamente com os valores de coeficientes de correlação e intercepto, estão sintetizados na **tabela 17**.

**Tabela 17:** Valores de resistência térmica para o isolado I5FL1TQ (3 meses de idade).

Temperatura	K (seg <sup>-1</sup> )	C	R <sup>2</sup>	1/k (seg)	1/k (min)
90°C	0,004716	0,01934	0,99368	212,04	3,53
95°C	0,008496	0,41689	0,98167	117,7	1,96
98°C	0,014921	0,27884	0,98263	67,02	1,11



**Figura 22:** Determinação do valor Z para o isolado I5FL1TQ (3 meses de idade).

#### 4.3.8- Discussão dos Parâmetros Cinéticos dos Isolados I22FL5TQ e I5FL1TQ

Analisando os dados apresentados na tabela 18, observa-se que os valores D do isolado I5FL1TQ são maiores do que os do isolado I22FL5TQ em todos os casos, com exceção do  $D_{90^{\circ}\text{C}}$  onde o inverso do comportamento é verificado. A ocorrência deste fato se deve provavelmente por  $90^{\circ}\text{C}$  ser o tratamento mais brando aplicado. O isolado I22FL5TQ não se apresenta uniforme nesta temperatura pela presença das duas estruturas reprodutivas (conídios e ascósporos), assim, quando temperaturas mais vigorosas são aplicadas os valores D para este isolado, passam a ser menores do que os valores apresentados pelo I5FL1TQ, pois os conídios são mais rapidamente atingidos e destruídos.

Conner & Beuchat (1987c) encontraram que tipos de proteínas presentes nos ascósporos de *N. fischeri* podem estar ligadas à maior termoresistência ao calor, assim como uma maior quantidade de glicerol, manitol e trealose também podem estar relacionados à resistência e fatores estressantes. Estes autores encontraram que, em ascósporos jovens e não muito resistentes ao calor, as proteínas presentes eram peptídeos pequenos ou aminoácidos e os mais resistentes possuíam proteínas de pesos moleculares maiores.

**Tabela 18:** Comparação dos valores de D a 90, 95 e  $98^{\circ}\text{C}$  para os isolados I22FL5TQ e I5FL1TQ.

Isolado	Temperaturas		
	90°C	95°C	98°C
<b>I22FL5TQ</b>			
Valores D (min)	4,72	1,66	1,03
R <sup>2</sup> Regressão	0,998	0,994	0,993
<b>I5FL1TQ</b>			
Valores D (min)	3,53	1,96	1,11
R <sup>2</sup> Regressão	0,993	0,981	0,982

Um outro fator importante está no valor Z, que para o isolado I5FL1TQ, mostra-se 26,2% mais alto do que para o isolado I22FL5TQ. Isto demonstra que para o primeiro, o acréscimo da temperatura deve ser maior para que o valor D seja reduzido a um décimo. Baglioni (1998) também estudando ascósporos de *N. fischeri* com idade de 1 e 3 meses encontrou valores de Z superiores em ascósporos mais velhos, coincidindo com os resultados demonstrados neste trabalho.

Ao se comparar as **figuras 15 e 19** (número de sobreviventes *versus* tempo de aquecimento para ascósporos de 1 e 3 meses respectivamente) observa-se que no caso da **figura 19** referente a 3 meses de incubação a fase lag (ombro) é ligeiramente mais acentuada principalmente na temperatura de 90°C onde a temperatura de choque é mais branda, estas constatações indicam que a constituição dos ascósporos com maior idade dificultam a penetração do calor. De acordo com Conner & Beuchat (1987b) o processo de maturação dos ascósporos de *N. fischeri* continua com o decorrer do tempo de incubação podendo ser relacionado com o aumento progressivo da resistência térmica.

Outros autores que também obtiveram curvas não logarítmicas em suas análises, utilizaram a metodologia de Alderton & Snell (1970), entre eles, como já citado, estão Bayner & Michener (1979), Aragão (1989), Baglioni (1998) e Gressoni (2002). Splittstoesser & Splittstoesser (1977), em especial, trabalhando com resistência térmica de *B. fulva* em suco de uva 5º Brix, pH: 3,5 também obtiveram curvas não logarítmicas. No entanto, os autores concluíram que o fato deste comportamento não se deve ao aglomerado de ascósporos, nem ao método de aquecimento utilizado, pois todos estes parâmetros foram testados, sendo este fato atribuído então ao efeito protetor de alguns sucos de frutas, causado principalmente pelos açúcares e ácidos orgânicos que estão em grandes quantidades nestes produtos.

Rajashekhara et al.(2000) estudaram a resistência térmica de ascósporos *Neosartorya fischeri* isolada de uvas, em sucos como de manga e uva. Os ascósporos deste fungo se mostraram capazes de conseguir sobreviver a mais de 300 minutos em aquecimentos de 70, 75 e 80°C, para completa inativação dos mesmos os pesquisadores necessitaram de 120 minutos a 85°C. As temperaturas não foram elevadas acima deste valor pois um dos objetivos do trabalho era manter a temperatura mais próxima de valores que tivessem menor interferência nas características organolépticas. Desta forma, estes pesquisadores determinaram o valor de  $D_{85^{\circ}\text{C}} = 46$  minutos para o isolado utilizado em suco de uva. Por cálculos de extrapolação foi possível demonstrar que o valor de  $D_{85^{\circ}}$  para o isolado mais termoresistente desta pesquisa, I5FL1TQ, foi de 8,05 minutos, o que comprova que os autores citados acima isolaram uma cepa de *N. fischeri* 5,7 vezes mais resistente do que a apresentada neste trabalho.

#### **4.3.9- Cálculo para F requerido no processo de pasteurização de bebida de uva pH: 3,0 e 14°Brix**

Considerando que a média de contaminação dos 6 lotes no ponto antes do concentrador (AC) foi de 1,18 esporos/100ml e que a partir deste ponto não houve mais contagem de esporos viáveis nos demais pontos, é possível afirmar que a aplicação de processos equivalentes a 5D do bolor reconhecidamente mais resistente viriam a produzir a probabilidade de sobrevivência de  $10^{-5}$  para este fungo significando então menos de 1 embalagens contaminadas por lote de produção ( em média 240.000 embalagens). O valor de  $F_{95^{\circ}}$  seria então calculado utilizando-se a fórmula:

$$F = \gamma D \longrightarrow F_{95^{\circ}} = 5D_{95^{\circ}} \quad \text{sendo } \gamma = 5$$

onde:

F: tempo, em minutos ou equivalente em minutos, requerido para causar determinada destruição de um microrganismo a uma temperatura T;

$\gamma$ : número de reduções logarítmicas

D: índice de redução decimal do tempo em minutos a uma temperatura constante, requerido para reduzir a população microbiana a 1/10 de seu valor.

Também foi calculado o valor de  $F_{98}^{\circ}$ , estes valores podem ser observados na **tabela 19**.

**Tabela 19:** Valores de F calculados para todas as temperaturas testadas durante a resistência térmica, além do valor de  $\gamma$  obtidos pela indústria durante o binômio de pasteurização considerando-se a média contaminação encontrada no ponto antes do concentrador (AC).

	$F_{90}^{\circ}$	$F_{95}^{\circ}$	$F_{98}^{\circ}$	$\gamma$ (obtido pelo tratamento na indústria)
<b>I5FL1TQ</b>	17,65	9,80	5,30	0,0259

A **tabela 19** demonstra valores de F para todas as temperaturas testadas durante o processo de resistência térmica, assim, utilizando-se como parâmetro a temperatura de 95°C, citada por Grice (1993) como temperatura limite utilizada na pasteurização onde as alterações organolépticas não são significativas, obtêm-se um valor de  $F_{95}^{\circ}$  9,80 minutos para o isolado I5FL1TQ. Estes tempos de tratamento apresentados para redução de 5 ciclos logarítmicos são inúmeras vezes superiores ao binômio empregado pela indústria, que alcança somente 0,0259 reduções referentes ao isolado I5FL1TQ.

Tendo em vista que o tempo estabelecido para 5 reduções chega próximo aos 10 minutos, pode-se concluir que este processamento seria inviável, pois as características sensoriais do produto estariam comprometidas.

É nítido que os ascósporos de ambos os isolados são perfeitamente capazes de sobreviver ao processo e permanecerem no produto final, apesar da

contaminação inicial ser considerada baixa (<10 esporos/100ml). Entretanto, os ascósporos não foram evidenciados nas pesquisas, ao serem analisados produto final e produto final após 90 dias de prateleira. A grande razão para explicar tal fenômeno, está na concentração de sulfitos detectado nas amostras, que em 4, dos 6 lotes analisados atingiram níveis superiores a 130mg/l, tais valores estão expressos na **tabela 3**.

King Jr. et al. (1969) pesquisando conservantes em suco de uva demonstraram que concentrações de 250 e 90 mg/l de SO<sub>2</sub> foram capazes de reduzir o valor  $D_{87,8^{\circ}} = 8.8$  minutos, para 1,6 e 4,5 minutos respectivamente, ou seja, com adição de 250mg/l de SO<sub>2</sub> o valor D caiu 5,5 vezes enquanto que com adição de 90mg/l a queda foi de 1,95 vezes do valor inicial. Um outro dado importante levantado pelos mesmos autores foi obtido através da análise de um fluxograma padrão para processamento de suco de uva (idealizado em laboratório), que como no apresentado neste trabalho nas **figuras 1 e 2**, apresentam uma filtração por terra diatomácea. Esta filtração segundo King Jr. et al. (1969) pode ser responsável por eliminar 99,9% dos ascósporos presentes no suco (teoricamente) independente da concentração inicial, desde que feita com procedimento correto de vazão pela área total do filtro. Estes valores não foram comprovados em planta comercial, no entanto, pode-se ter a certeza que a filtração em terra é capaz de reduzir uma parcela de esporos contidos no suco de uva. O processo de filtração por terra diatomácea é aplicado rotineiramente na indústria na linha de produção de suco de uva concentrado, acompanhado pela presente pesquisa (ver **figura 1**)

Beuchat (1976) estudou as propriedades do SO<sub>2</sub> na inibição de ascósporos de *Byssochlamys* e constatou que, após choque de 1 hora a 70°C, utilizando suco de uva como meio de aquecimento acrescido de 50 e 200 mg/l, os ascósporos deste fungo não conseguiram se desenvolver, não havendo germinação em nenhuma das duas concentrações testadas. Desta maneira, percebe-se que o

tratamento termoquímico aplicado ao suco pode inviabilizar completamente os ascósporos presentes, não sendo possível detectá-los no produto final.

#### **4.4- Análises Físico-Químicas**

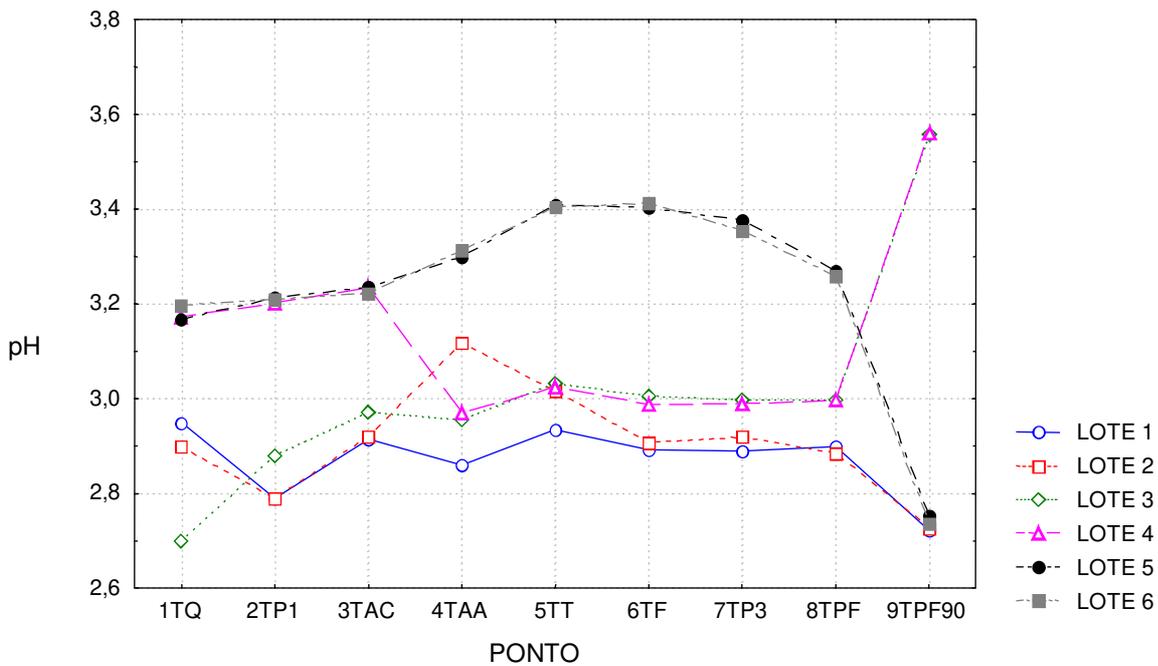
A medição de pH e Brix de cada ponto dos 6 lotes foram realizadas para obtenção de um controle maior sobre as amostras, os valores encontrados foram sintetizados na figura apresentada abaixo, sendo também possível sua consulta através das tabelas contidas no **ANEXO IV**.

##### **4.4.1- Medição de pH**

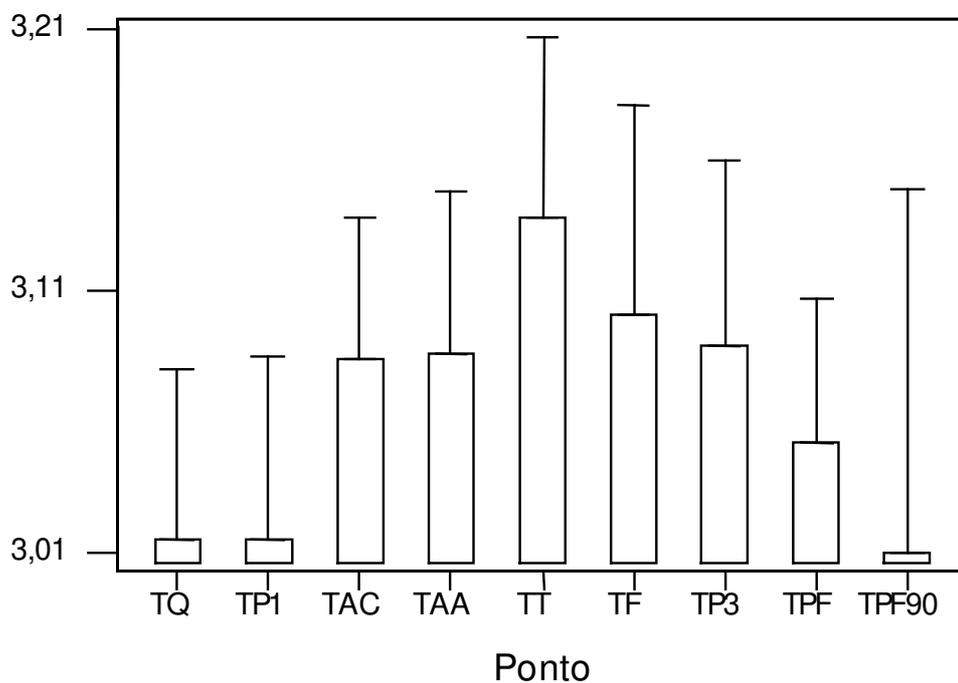
Analisando a **figura 23**, pode-se perceber que o estudo do pH sugere que apenas entre os dois primeiros pontos (TQ e TP1) e entre TAC e TAA não ocorreram diferenças significativas, considerados pontos consecutivos. O pH se mantém constante ou aumenta até o ponto TT, quando então, começa e ter quedas sucessivas, de menor monta do que os acréscimos anteriores, até o produto final, caindo um pouco mais durante a estocagem por 90 dias, o que causa um desvio padrão significativo, bem maior que os dos demais pontos, que podem ser observados na **figura 24**.

Os lotes de safra apresentaram valores de pH inferiores aos dos lotes de entressafra. O lote que acusa maior variabilidade é o lote 4, principalmente nos pontos de coleta da segunda data de coleta. O ponto de maior variabilidade é o ponto TPF90, especialmente por causa do comportamento do lote 4.

O decréscimo dos níveis de pH no produto final após 90 dias de prateleira apresentados pelos lotes 1, 2, 5 e 6 sugerem uma desestabilidade na bebida de uva que poderia ser causada por microrganismos como leveduras ou até mesmo alguns tipos bactérias, pois estes microrganismos têm capacidade de acidificar o meio onde estão, se permaneceram viáveis após pasteurização. Durante as análises do produto final após 90 dias de prateleira, a presença de leveduras não foi evidenciada, no entanto, pode ter sido inibida pelo SO<sub>2</sub> presente nas amostras. Como os sulfitos são voláteis a inibição causada nas células poderia estar diminuída após 90 dias, a temperatura ambiente, provocando alterações de pH.



**Figura 23:** Valores de pH em cada ponto de amostragem dos 6 lotes analisados



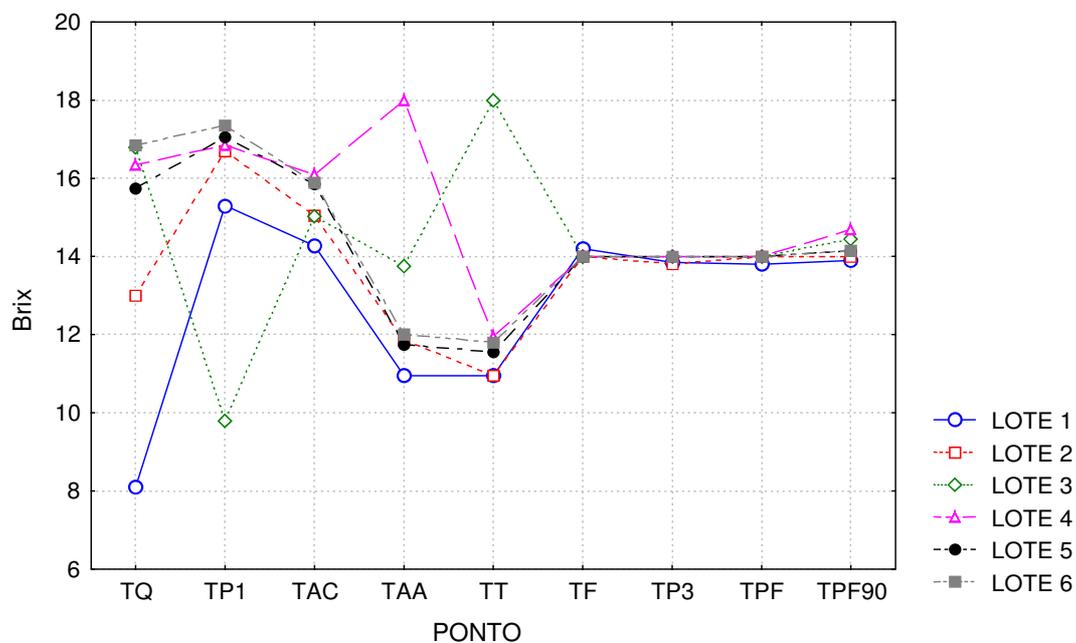
**Figura 24:** Médias e desvios padrões, acrescidos do limite superior do intervalo de confiança, apresentados nos valores de pH dos pontos analisados em cada um dos lotes

#### 4.4.2 Medição de °Brix

A **figura 25** apresenta graficamente o comportamento dos pontos em cada lote referente ao °Brix. Analisando esta figura, percebe-se que os lotes de safra (1, 2 e 3) apresentaram maior variabilidade no que se refere ao °Brix. O lote 1 apresentou a menor média e difere de todos os demais, à exceção do lote 2, que se encontra num valor intermediário que tanto pode ser igual ao do lote 1 quanto dos demais, que se equiparam.

A variabilidade dos dados referentes ao °Brix é muito maior nos primeiros cinco pontos de amostragem (TQ a TT). No produto final, o comportamento dos

lotes é bastante semelhante. O lote 3 é o principal responsável pelas diferenças registradas entre os lotes, mais evidenciada nos pontos TP1 e TT.



**Figura 25:** Comportamento dos valores de °Brix durante a produção de bebida de uva nos vários pontos de amostragem realizado por lote.

## 5- CONCLUSÕES E SUGESTÕES

1. A contaminação da fruta por leveduras, ( $7,55 \times 10^6$  UFC/ml) ficou próximo ao limite citado pela literatura ( $10^7$  UFC/ml), no entanto sua detecção em produto final não foi evidenciada.
2. A incidência de fungos termoresistentes nas amostras analisadas foi baixa,  $<10$  esporos/100ml, para todos os lotes. Porém, a diferença entre a contaminação durante o período de safra (4,8 esporos/100ml), comparado com a entressafra (0,8 esporos/100ml), se mostrou bastante clara e significativa.
3. Com base nos resultados sobre incidência e resistência dos fungos, pode-se dizer que devido à sua elevada resistência haveria uma grande probabilidade dos mesmos serem encontrados no produto final, entretanto, a utilização de conservantes, a filtração por terra diatomácea e o tratamento termoquímico praticados na indústria impediram esta detecção.
4. No que se refere à definição do isolado mais termoresistente, foi perceptível que o isolado I22FL5TQ que possuía as duas formas de desenvolvimento (anamórfica e teleomórfica), se mostrou menos resistente do que o isolado I5FL1TQ que possuía somente a forma teleomórfica, mesmo ambos os isolados sendo identificados como *Neosartorya fischeri*.

5. Para os dois bolores identificados como *Neosartorya fischeri*, a idade do esporo é um fator determinante para o incremento da resistência térmica dos ascósporos.
  
6. O uso de matéria prima de boa qualidade, lavagem e seleção adequada da matéria prima, a sanificação e as condições assépticas das áreas de processamento, são medidas de controle tanto para fungos termoresistentes quanto para os demais microrganismos comuns à planta de processamento de suco de uva concentrado e bebida de uva.
  
7. O presente trabalho sugere que sejam analisadas substâncias ou tratamentos, capazes de reduzir ou eliminar os microrganismos de interesse (fungos e leveduras), que sejam alternativos ao uso de SO<sub>2</sub>, para diminuição da sua concentração final em bebida de uva.
  
8. Um outro estudo importante a ser realizado, seria a inclusão do processo de lavagem da fruta na recepção, pois, provavelmente, esta simples medida poderia vir a diminuir a quantidade de bolores e leveduras que entrariam na linha de processamento.

## 6- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALDERTON, G; SNELL, N. Chemical States of Bacterial Spores: Heat Resistance and its kinetics at intermediat water activity. **Applied Microbiology**, v. 19, n.4, p.565-572, april, 1970.
2. ANVISA (Agencia Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução – RDC nº 389, de 5 de agosto de 1999 e RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001.
3. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDUSTRIAS DA ALIMENTAÇÃO; Valores referentes a quantidades de sulfitos permitidas por lei, 2001.
4. ARAGÃO, M. F. G. Identificação e determinação da resistência térmica de fungos termoresistentes isolados de polpa de morango. Campinas, 1989. Tese de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas.
5. BAGLIONI, F. Estudo da ocorrência de fungos filamentosos termoresistentes em polpa de tomate envasada assepticamente. Campinas, 1998. 94p. Tese de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas.
6. BANNER, J.M.; MATTICK, R.L.; SPLITTSTOESSER, F.D. Chemical composition of the ascospores of *Byssochlamys fulva*. **Journal of Food Science**, Chicago, v.44, n.2, p.545-548, 1979.
7. BAYNE, G. H.; MICHENER, D. H. Heat resistance of *Byssochlamys* Ascospores. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.37, n.3, p. 449-453, 1979.

8. BEAVEN, G.H.; BROWN, F.; The pectine enzymes of mold *Byssochlamys fulva*. **Biochemistry Journal**, v.45, 1949.
9. BEUCHAT L. R. Efectiveness of various food preservatives in controlling the outgrowth of *Byssochlamys nivea* ascospores. *Mycopatologia* 59 (3): 175-178, 1976.
10. BEUCHAT L. R. Combined effects of solutes and food preservatives on rates of inactivation of any colony formation by heated spores and vegetative cells of molds. **Applied Environmental Microbiology**, v.41, n.2 p. 472-477, 1981a.
11. BEUCHAT L. R. Synergistic effects of potassium sorbate and sodium benzoate on thermal inactivation of yeasts. **Journal of Food Science**, v.46, n.3, p.771-777, 1981b.
12. BEUCHAT L. R. Influence of organic acids on heat resistance characteristics of *Talaromyces flavus* ascospores. **International journal of Food Microbiology**, v.6, p.97-105, 1988
13. BEUCHAT L. R. Survival of *Neosartorya fischeri* and *Talaromyces flavus* ascospores in fruit powders. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.15, p.238-240, 1992
14. BEUCHAT L. R. & PITT, J. I. Detection and enumeration of heat resistant molds. In: VANDERZANT, C. & SPLISTOESSER, D. F. (Eds.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3<sup>o</sup> ed., Washington: A. P. H. A., 1992. Cap 17, p. 251-253.
15. BEUCHAT, L. R. & RICE, S. L. *Byssochlamys spp.* and their importance in processed fruits. **Advances in Food Research**, v.25, p.237-289, 1979.

16. BEUCHAT, L. R.; TOLEDO, R. T. Behaviour of *Byssochlamys nivea* ascospores in fruits syrups. **Transactions of British Mycological Society**, v.68, n.1, p.65-71, 1977.
17. BRANEN, A. L. Introduction to use of antimicrobials. In: DAVIDSON; P. M.; BRANEN A. L. **Antimicrobial in foods**. 2<sup>o</sup> ed. New York Marcel Dekken, 1993. Cap 2, p.1-10.
18. BUTZ, P.; FUNTENBERGER, S.; HABERDITZL, T.; TAUSCHER, B.; High-pressure inactivation of *Byssochlamys nivea* ascospores and other heat resistant moulds. **Lebensm-Wiss Technologie**, v.29, p.404-410, 1995.
19. CARMO; L.F.; Biossegurança de sucos de frutas processados, frente a *Escherichia coli* O157:H7, coliformes e Bactérias Lácticas. Piracicaba 2002. Tese de Doutorado apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luíz de Queiroz” , Universidade de São Paulo.
20. CASELLA, A. L. M.; MATASCI, F.; SCHIMIDT-LORENZ, W. Influence of age, growth medium and temperature, on heat resistance of *Byssochlamys nivea* ascospores. **Lebensmittel – Wissenschaft & Techonologie**. v. 23, n.5, p.404-411, 1990.
21. CHIPLEY J. R. Sodium benzoate and benzoic acids. In: DAVIDSON; P. M.; BRANEN A. L. **Antimicrobial in foods**. 2<sup>o</sup> ed. New York: Marcel Dekken, 1993. Cap 2 p.11-48.
22. CONNER, D. E.; BEUCHAT, L.R. Heat resistance of ascospores of *Neosartorya fischeri* as affected by sporulation and heating medium. **International Journal of Food Microbiology**, v.4, p.303-312, 1987a.

23. CONNER, D. E.; BEUCHAT, L.R. Efficacy of media for promoting ascospore formation by *Neosartorya fischeri*, and the influence of age and culture temperature on heat resistance of ascospores. **Food Microbiology**, v. 4, p.229-238, 1987b.
24. CONNER, D. E.; BEUCHAT, L.R. Age – related changes in ultrastructure and chemical composition associated with changes in heat resistance of *Neosartorya fischeri* ascospores. **Trans. British Mycological Society**, v.89, n.4, p.539-550, 1987c.
25. DELGADO, D. A. Ação esporicida do peróxido de hidrogênio sobre bolores isolados em laminado para embalagens assépticas. Campinas, 2001. 232p. Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
26. EIROA, M. N. U. Ocorrência de espécies de *Byssochlamys* em hortas, pomares e vinhedos na região de Campinas. **Coletânea ITAL**, Campinas, v15, p.61-70, 1985.
27. ENILGL, D. C.; KING Jr., A. D.; TOROK, T. *Talaromyces trachyspermus*, a heat resistant mold isolated from fruit juice. **Journal of Food Protection**, v.56, n.12, p.1039-1042, 1993.
28. FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. Filamentous fungi in food and feeds: ecology, spoilage and micotoxin production. In: ARORA, D.K.; MUKERJI, K.G. & MARTH, E.H. **Handbook of Applied Mycology – Food and Feeds**. New York: Marcel Dekker Inc., 1991, v.3, cap.2, p.31-68.

29. GOMEZ, M.M.; BUSTA, F.F. & PFLUG, I.J. Effects of the post dry heat treatment temperature on the recovery of ascospores of *Neosartorya fischeri*. **Letters Applied Microbiology**, v.8, p.59-62, 1989.
30. GRESSONI, I. APPCC Base para sucos processados asépticamente. Campinas, 2002. Tese de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
31. GRICE, K. G. Manufacture of UHT fruit juices. **Food Australia**, v.45, n.9, p.445-447, 1993.
32. GUMERATO, H. F. Desenvolvimento de um programa de computador para identificação de alguns fungos comuns em alimentos e determinação da resistência térmica de *Neosartorya fischeri* isolado de maçãs. Campinas, 1995. 106p. Tese de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
33. HUIS n't VELD, J. H. J. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. **International Journal of Food Microbiology**, v.33, p.1-18, 1996.
34. HEINZ, V.; ALVAREZ, I.; ANGERSBACH, <sup>a</sup>; KNORR, D.; Preservation of liquid foods by pulsed electric fields - basic concepts for process design. **Food Science & Technology**, v.12, p.103-111, 2002.
35. JESENKA, Z.; PEIKOVÁ, E.; BERNAT, D. Heat resistance of fungi from soil. **International Journal of Food Microbiology**, v.19, p.187-192, 1993.
36. JESENKA, Z.; PEIKOVÁ, E.; SEPTICOVÀ, J. Thermoresistant propagules of *Neosartorya fischeri* some ecologic considerations. **Journal of Food Protection**, Ames, v.54 n.8, p.582-584, 1991.

37. KING Jr., A. D.; MICHENER, H. D.; ITO, K. A. Control of *Byssochlamys* and related heat resistant fungi in grape products. **Applied Microbiology**, v.18, p.166-173, 1979.
38. KING Jr., A. D.; HALBROOK, W. U. Ascospore heat resistance and control measures for *Talaromyces flavus* isolated from juice concentrate. **Journal of Food Science**, Chicago, v.52 n.5, 1987.
39. KING Jr., A. D.; WHITEHAND, L. C. Alterations of *Talaromyces flavus* heat resistance by growth conditions and heat medium composition. **Journal of Food Science**, v.62, n.2, p.830-832/836, 1990.
40. KOTZEKIDOU, P. Heat resistance of *Byssochlamys nivea*, *Byssochlamys fulva* and *Neosartorya fischeri* isolated from canned potato paste. **Journal of Food Science**, Chicago, v.62, n.2, p.410-412, 437, 1997.
41. LOVETT, J.; PEELER, J. T.; Effects of pH on the thermal destruction kinetics of patulin in aqueous solutions. **Journal of Food Science**, v. 38, p. 1094, 1973
42. L'ÚBOMÍR, V.; PIECHOVÁ, E. Growth modeling of heat-resistant fungi: the effect of water activity. **International Journal of Food Microbiology**, v.63, p. 11-17, 2001.
43. MALLETROIT, V.; GUINARD, J. X.; KUNKEE, R. E.; LEWIS, M. J.; Effects of pasteurization on microbiological and sensory quality of white grape juice and wine. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.15, p.19-29, 1991.
44. MAGGI, A.; GOLA, S.; SPOTI, E.; ROVERE, P.; MUTTI, P. Trattamenti ad alta pressione di ascospore di muffe termoresistenti e di patulina in nettare di albicocca in acqua. **Industria Conserve**, Parma, 69, n.1, p. 26-29, 1994.

45. MAUNDER, D. T. Spoilage problems caused by molds of the *Byssochlamys*, *Paecilomyces*. New York State Agric. Exp. Stn., Geneva. *Byssochlamys* Semin. Abstr. Res. Circ. n.20 p. 12-16.
46. MISLIVEC, P. B.; BECHAUT L. R.; COUSIN, M. A. Detection and enumeration of heat resistant molds. In: VANDERZANT, C. & SPLISTOESSER, D. F. (Eds.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3<sup>o</sup> ed., Washington: A. P. H. A., 2001. Cap 17, p. 251-253.
47. NIELSEN, K. B.; NIELSEN, P. V.; Fungicidal effect of 15 disinfectants against 25 fungal contaminants commonly found in bread and cheese manufacturing. **Journal of Food Protection**, Ames, v.59, n.3, p.268-275, 1995.
48. NIELSEN, P. V.; BEUCHAT, L. R.; FRISVAD, J.C. Growth and fumitremorgin production by *Neosartorya fischeri* as affected by temperature, light and water activity. **Applied Environmental Microbiology**, v.54, n.6, p.1504-1510, 1988.
49. NIELSEN, P. V.; BEUCHAT, L. R.; FRISVAD, J.C. Growth and fumitremorgin production by *Neosartorya fischeri* as affected by food preservatives and organic acids. **Journal of Food Applied Bacteriology**, v.66, p.197-207, 1989a.
50. NIELSEN, P. V.; BEUCHAT, L. R.; FRISVAD, J .C. Influence of atmospheric oxygen content on growth and fumitremorgin production by a heat resistant mold, *Neosartorya fischeri*. **Journal of Food Science**, v.54, p.679-682, 1989b.
51. NIELSEN, P. V.; SAMSON R. A. Differentiation of food borne taxa of *Neosartorya*. In: SAMSON, R. A.; HOCKING, A.D.; PITT, J. I.; KING, D. A. Modern methods in food mycology. Amsterdam: Elsevier, 1992. p.159-168.

52. OGAWA, H.; FUKUHISA, K.; KUBO, Y.; FUKUMOTO, H.; Pressure inactivation of yeasts, molds and pectinesterase in Satsuma mandarin juice: effects of juice concentration, pH, and organic acids, and comparison with heat sanitation. **Agricultural Biological Chemistry**, v.54, n.5, p.1219-1225, 1990.
53. OLLIVER, M.; RENDLE, T. A new problem in fruit preservation. Studies of *Byssochlamys fulva* and its effect on the tissues of processed fruit. **Journal of Society Chem. Ind.**, v.53. p.166-172, 1934.
54. PACHECO, C.P. Validação do processo de esterilização para polpa de tomate em unidade UHT. Campinas, 2001. Tese de Mestrado apresentado à Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas.
55. PARTSCH, G.; ALTMANN, H.; Radio resistance of *Byssochlamys fulva* ascospores as shown by storage testes. **Journal of Food Science**, v.35, 251-252, 1970.
56. PERERA, K. P. W. C.; DAY, J.B.; MANTLE, P.G.; RODRIGUES, L.; Metabolism of verruculogen in rats. **Applied Environmental Microbiology**, v. 43, p.503, 1982.
57. PITT, J. I. The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. London: Academic Press, 1979.
58. PITT, J. I. & HOCKING, A. D. Food spoilage fungi, heat resistant mold. **Food Research**, v.44p.73, 1984.
59. PITT, J. I. & HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. Sydney: Academic Press, 1985, 413p.

60. PITT, J. I.; HOCKING, A. D.; SAMSON, R.A.; KING, A.D. Recommendations from the closing session of SMMEF II. In: **Modern Methods in Food Mycology**. Amsterdam: Elsevier, 1992, p.359-368.
61. PORRETA, S. Il controllo della stabilità microbiologica dei derivati del pomodoro. In: **Il controllo della stabilità microbiologica dei derivati del pomodoro**. Parma: Stazione Sperimentale per l'industria delle conserve alimentari, 1992, p. 204-212.
62. RAJASHEKHARA, E.; SURESH, E. R.; ETHIRAJ, S. Influence of different heating media on thermal resistance of *Neosartorya fischeri* isolated from papaya fruit. **Journal of Applied Bacteriology**, v.81, p.337-340, 1996.
63. RAJASHEKHARA, E.; SURESH, E. R.; ETHIRAJ, S. Thermal death rate of ascospores of *Neosartorya fischeri* ATCC200957 in presence of organic acids and preservatives in fruit juice. **Journal of Food Protection**, v.61, n.10, p.1358-1362, 1998.
64. RAJASHEKHARA, E.; SURESH, E. R.; ETHIRAJ, S. Modulation of thermal resistance of ascospores of *Neosartorya fischeri* by acidulants and preservatives in mango and grape juice. **Food Microbiology**, v.17, p.269-275, 2000.
65. RICE, S. L. Patulin production by *Byssosclamyces spp.* in canned grape juice. **Journal of Food Science**, v.45, p.485-489, 1980.
66. RIZZON, L.A.; MIELE, A. Características analíticas de sucos de uva elaborados no Rio Grande do Sul. **Boletim SBCTA**, v.29, n.2, p.129-133, 1995.

67. ROLAND, J. O.; BEUCHAT, L. R. Biomass and Patulin production by *Byssochlamys nivea* in apple juice as affected by sorbate, benzoate, SO<sub>2</sub> and temperature. **Journal of Food Science**, v.49, p.402-406, 1984.
68. ROLAND, J. O.; BEUCHAT, L.R.; WORTHINGTON & HITCHCOCK. Effects of sorbate, benzoate, sulfur dioxide and temperature on growth and patulin production by *Byssochlamys nivea* in grape juice. **Journal of Food Protection**, v.47, p.237-241, 1984.
69. ROLLER, S.; COVILL, N. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. **International Journal of Food Microbiology**, v.47 p.67-77, 1999.
70. SALOMÃO, B.C.M. Isolamento, identificação e estudo de resistência térmica de fungos filamentosos em produtos de fruta. Florianópolis, 2002. Tese de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina.
71. SAMSON, R. A.; VAN REENEN-HOEKSTRA, E. S. **Introduction to food-born fungi**. Netherlands: Centralbureau voor Schimmelcultures, 1988.
72. SCOTT, P. M.; SOMERS, E.; Stability of patulin and penicilic acid in fruit juice and flour. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.16, p. 483, 1968.
73. SOFOS I. N.; BUSTA, F. F. Sorbic acid and sorbates. In: DAVIDSON; P. M.; BRANEN, A. L. **Antimicrobial in foods**. 2<sup>o</sup> ed. New York: Marcel Dekken, 1993. Cap 3, p.49-94.

74. SPLITSTOESSER, D. F.; CHUREY, J. J. Reduction of heat resistance of *Neosartorya fischeri* ascospores by sulfur dioxide. **Journal of Food Science**, v.56, p.876-877, 1991.
75. SPLITSTOESSER, D. F.; NIELSEN, P. V.; CHREY, J.J. Detection of viable ascospore of *Neosartorya*. **Journal of Food Protection**, v 56, n.7, p. 599-603, 1993.
76. SPLITSTOESSER, D. F.; KUSS, W. H.; PREST, D. B. Incidence of heat resistant molds in eastern orchards and vineyards. **Applied Microbiology**, v.21, n.2, p.335-337, 1970
77. SPLITSTOESSER, D. F & SPLITSTOESSER, C. M. Ascospores of *Byssochlamys* compared with those of heat resistant *Aspergillus*. **Journal of Food Science**, v. 42, p.685-688, 1977.
78. SPLITSTOESSER, D. F.; WILKINSON, M.; HARRISON, W. Heat activation of *Byssochlamys fulva* ascospore. **Journal Milk Food Technology**, Ames, v.35, n.7, p. 399-401, 1972.
79. STUMBO, C.R. Thermobacteriology in Food Processing, 2<sup>o</sup> ed. Academic Press, New York, 1973.
80. SURESH, E. R.; ETHIRAJ, S.; JAYARAM, H. L. Heat resistance of *Neosartorya fischeri* isolated from grapes. **Journal Food Science Technology**, v.33 n.1 p.76-78, 1996.
81. SWEENEY, M. J.; DOBSON, A. D. W. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology**, v.43, p. 414-158, 1998.

82. TETRPAK; Informações sobre dados de consumo de suco de uva pronto para beber (embalagens cartonadas), 2002.
83. TOURNAS, V. Heat-resistant fungi of importance to the food and beverage industry. **Critical Reviews in Microbiology**, v.20, n.4, p.243-263, 1994.
84. TOURNAS, V.; TRAXLER, R. W. Heat resistance of *Neosartorya fischeri* strain isolated from pineapple juice frozen concentrate. **Journal of Food Protection**, v. 57, n.9, p.814-816, 1994.
85. VAN DER RIET, W. B.; PINCHES, S. E. Control of *Byssochlamys fulva* in fruit juice by means of intermittent treatment with dimethyldicarbonate. **Lebensm. Wiss. U.Technol.** v.24, p.501-503, 1991.
86. VAN DER RIET, W. B.; VAN DER WALT, W.H.; Effects of ionizing radiation on ascospores of strains of *Byssochlamys fulva* in apple juice. **Journal of Food Protection**, v.48, n.12, p.1016-1018, 1985.
87. VOGEL, A. I. **Análise química quantitativa**. Ed Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1992.
88. YATES, A. R; FERGUSON, W. E. Observation on *Byssochlamys nivea* isolated from cucumber brine. **Canadian Journal of Botany**, v.41, p.1599-1601, 1963.
89. YATES, A. R.; SEAMAN, A.; WOODBINE, M. Growth of *Byssochlamys nivea* in various carbon dioxide atmospheres. **Canadian Journal of Microbiology**, v.13, 1967.

90. YEOM, H.W.; STREAKER, C.B.; ZHANG, Q.H.; MIN, D.B.; Effects of pulsed electric fields on the activities of microorganisms and pectin methyl esterase in orange juice. **Food Microbiology and Safety**, v. 65, n.8, p.1359-1363, 2000.



## **Anexo I**

**(Dados das contagens de bolores e leveduras  
comuns em bebida de uva)**



**Tabela 1:** Contagem de bolores e leveduras comuns obtidas nas análises do lote 1, a partir de bebida de uva

Contagem de Bolores comuns e leveduras		Produto: Bebida de uva				Safr - safra 2002					
Lote -1	Data: 26/01/02 (TQ,TP1,TAC)	Data da análise: 27/01/02 (TQ,TP1,ATC)									
Pontos	21/03/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)	22/03/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)									
	Diluição	Amostra								Média	Desvio padrão
		1		2		3		4			
TQ	-5	110	106	117	110	106	114	11	99	1,09E+7	3,57E+05
	-6	18	17	15	16	17	19	16	14		
	UFC/mL	1,08E+07	1,14E+07	1,10E+07	1,05E+07	1,09E+07	1,05E+07	1,09E+07	1,05E+07		
TP1	-2	47	39	52	43	49	41	44	35	4,38E+03	3,38E+02
	-3	5	4	5	4	6	4	3	4		
	UFC/mL	4,3E+03	4,75E+03	4,5E+03	3,95E+03	4,38E+03	3,95E+03	4,38E+03	3,95E+03		
TAC	-2	0	1	3	8	31	21	6	4	9,25E+02	1,14E+03
	-3	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	5,00E+01	5,50E+02	2,60E+03	5,00E+04	9,25E+02	1,14E+03	9,25E+02	1,14E+03		
TAA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+00	
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00		
TT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+00	
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00		
TF	0	1	1	165	206	81	72	tntc	166	9,25E+02	1,38E+03
	-1	106	119	10	43	20	34	0	0		
	UFC/mL	3,0E+03	2,65E+02	2,7E+02	1,66E+02	9,25E+02	1,38E+03	9,25E+02	1,38E+03		
TP3	0	1	1	10	3	8	6	1	1	3,88E+00	3,33E+00
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	1,00E+00	6,50E+00	7,00E+00	1,00E+00	3,88E+00	3,33E+00	3,88E+00	3,33E+00		
Amost		1		2		3		4		5	
TPF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+00	
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00		
TPF90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+00	
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00		

**Tabela 2:** Contagem de bolores e leveduras comuns obtidas nas análises do lote 2, a partir de bebida de uva

Contagem de Bolores comuns e leveduras		Produto: Bebida de uva				Safra - safra 2002					
Lote -2		Data: 26/01/02 (TQ,TP1,TAC)				Data da análise: 27/01/02 (TQ,TP1,ATC)					
Pontos		21/03/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)				22/03/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)					
	Diluição	Amostra								Média	Desvio padrão
		1		2		3		4			
TQ	-5	103	183	190	107	105	180	117	149	1,42E+7	6,44E+05
	-6	7	20	10	18	9	15	11	14		
	UFC/mL	1,43E+07	1,49E+07	1,43E+07	1,33E+07						
TP1	-2	5	6	4	5	6	4	3	6	4,88E+02	4,79E+01
	-3	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	5,5E+02	4,50E+02	5,00E+02	4,50E+02						
TAC	-2	2	2	1	2	29	19	0	0	6,68E+02	1,14E+01
	-3	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	2,0E+02	1,5E+02	2,40E+03	0,0E+00						
TAA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+00	
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00						
TT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+00	
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00						
TF	0	2	0	1	0	5	1	2	0	1,88E+03	1,67E+03
	-2	26	20	39	40	0	0	25	0		
	UFC/mL	2,30E+03	3,95E+03	3,00E+00	1,25E+03						
TP3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+00	
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00						
Amost		1		2		3		4		5	
TPF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+00	
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00						
TPF90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+00	
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00						

**Tabela 3:** Contagem de bolores e leveduras comuns obtidas nas análises do lote 3, a partir de bebida de uva

Contagem de Bolores comuns e leveduras		Produto: Bebida de uva				Safr - safra 2002					
Lote -3		Data: 26/01/02 (TQ,TP1,TAC)				Data da análise: 27/01/02 (TQ,TP1,ATC)					
Pontos		07/05/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)				08/05/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)					
	Diluição	Amostra								Média	Desvio padrão
		1		2		3		4			
TQ	-5	36	37	32	35	37	36	31	35	3,49E+06	1,89E+05
	-6	3	4	4	3	5	3	2	3		
	UFC/mL	3,65E+06		3,35E+06		3,65E+06		3,30E+06			
TP1	-2	2	3	3	1	4	2	3	2	2,50E+02	4,04E+01
	-3	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	2,50E+02		2,00E+02		3,00E+02		2,50E+02			
TAC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+00	
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+00		0,0E+00		0,0E+00		0,0E+00			
TAA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+00	
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+00		0,0E+00		0,0E+00		0,0E+00			
TT	-0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+00	
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+00		0,0E+00		0,0E+00		0,0E+00			
TF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+00	
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+00		0,0E+00		0,0E+00		0,0E+00			
TP3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+00	
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+00		0,0E+00		0,0E+00		0,0E+00			
Amost		1		2		3		4		5	
TPF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+00	
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+00		0,0E+00		0,0E+00		0,0E+00			
TPF90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+00	
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+00		0,0E+00		0,0E+00		0,0E+00			

**Tabela 4:** Contagem de bolores e leveduras comuns obtidas nas análises do lote 4, a partir de bebida de uva

Contagem de Bolores comuns e leveduras		Produto: Bebida de uva				Entressafra -2002					
Lote -4		Data: 01/03/02 (TQ,TP1,TAC)				Data da análise: 02/03/02 (TQ,TP1,ATC)					
Pontos		07/05/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)				08/05/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)					
	Diluição	Amostra								Média	Desvio padrão
		1		2		3		4			
TQ	-5	89	51	80	63	75	57	77	50	6,78E+06	3,66E+05
	-6	9	4	8	6	8	7	9	6		
	UFC/mL	7,00E+06	7,15E+06	6,60E+06	6,35E+06	6,78E+06	3,66E+05				
TP1	0	83	80	47	30	28	27	118	99	6,40E+01	3,77E+01
	-1	9	6	2	4	1	5	6	9		
	UFC/mL	8,15E+01	3,85E+01	2,75E+01	1,09E+02	6,40E+01	3,77E+01				
TAC	-1	64	54	62	56	60	58	55	62	5,89E+02	2,50E+01
	-2	1	4	3	5	4	2	5	3		
	UFC/mL	5,90E+02	5,90E+02	5,90E+02	5,85E+02	5,89E+02	2,50E+01				
TAA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+00	
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00		
TT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+00	
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00		
TF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+00	
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00		
TP3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+00	
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00		
Amost		1		2		3		4		5	
TPF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+00	
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00		
TPF90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+00	
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00		

**Tabela 5:** Contagem de bolores e leveduras comuns obtidas nas análises do lote 5, a partir de bebida de uva

Contagem de Bolores comuns e leveduras		Produto: Bebida de uva				Entressafra - 2002					
Lote -5	Data: 01/03/02 (TQ,TP1,TAC)	Data da análise: 02/03/02 (TQ,TP1,ATC)									
Pontos	06/06/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)	07/06/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)									
	Diluição	Amostra								Média	Desvio padrão
		1		2		3		4			
TQ	-5	56	52	54	55	57	50	53	58	5,44E+06	8,54E+04
	-6	1	3	5	6	6	7	4	6		
	UFC/mL	5,40E+06	5,45E+06	5,35E+06	5,55E+06						
TP1	0	42	46	4	10	29	31	102	104	4,60E+01	4,09E+01
	-1	4	6	0	1	2	1	10	4		
	UFC/mL	4,40E+01	7,00E+00	3,00E+01	1,03E+02						
TAC	-1	23	29	22	28	20	31	25	34	2,65E+01	2,40E+00
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	2,60E+01	2,50E+01	2,55E+01	2,95E+01						
TAA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+00	
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00		
TT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+00	
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00		
TF	-1	0	0	0	0	1	0	0	0	8,76E+01	1,75E+02
	-2	0	0	0	0	4	3	0	0		
	UFC/mL	0,0E+00	0,0E+00	3,50E+00	0,0E+00						
TP3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+00	
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00		
Amost		1		2		3		4		5	
TPF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+00	
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00		
TPF90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+00	
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00		

**Tabela 6:** Contagem de bolores e leveduras comuns obtidas nas análises do lote 6, a partir de bebida de uva

Contagem de Bolores comuns e leveduras		Produto: Bebida de uva				Entressafra - 2002					
Lote -6		Data: 01/03/02 (TQ,TP1,TAC)				Data da análise: 02/03/02 (TQ,TP1,ATC)					
Pontos		06/06/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)				07/06/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)					
	Diluição	Amostra								Média	Desvio padrão
		1		2		3		4			
TQ	-5	53	35	55	40	51	34	49	37	4,43E+06	2,25E+05
	-6	3	3	4	3	3	5	2	5		
	UFC/mL	4,40E+06	4,75E+06	4,25E+06	4,30E+06	4,43E+06	2,25E+05				
TP1	0	28	45	156	145	46	51	13	15	6,24E+01	6,05E+01
	-1	2	1	20	21	4	7	0	1		
	UFC/mL	3,65E+01	1,51E+02	4,85E+01	1,40E+01	6,24E+01	6,05E+01				
TAC	0	3	6	4	8	3	7	4	7	5,25E+00	6,45E-01
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	4,50E+00	6,00E+00	5,00E+00	5,50E+00	5,25E+00	6,45E-01				
TAA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+00	
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00				
TT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+00	
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00				
TF	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+00	
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00				
TP3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+00	
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00				
Amost		1		2		3		4		5	
TPF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+00	
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00				
TPF90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+00	
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00				

## **Anexo II**

**(Dados da contagem de bolores e termoresistentes em bebida de uva)**



**Tabela 1:** Contagem de bolores termoresistentes obtidas nas análises do lote 1, a partir de bebida de uva

Contagem de Bolores Termoresistentes		Produto: Bebida de uva				Safr a - safr a 2002	
Lote -1	Data: 26/01/02 (TQ,TP1,TAC)	Data da análise: 27/01/02 (TQ,TP1,ATC)					
Pontos	21/03/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)	22/03/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)					
	Contagem (dias)	Amostra				Média	Desvio padrão
		1	2	3	4		
TQ	15	3	2	3	2	2,8	0,50
	30	3	3	3	2		
TP1	15	2	2	3	2	2,3	0,50
	30	2	1	3	2		
TAC	15	2	1	3	2	2,0	0,82
	30	2	1	3	2		
TAA	15	0	0	0	0	0	
	30	0	0	0	0		
TT	15	0	0	0	0	0	
	30	0	0	0	0		
TF	15	0	0	0	0	0	
	30	0	0	0	0		
TP3	15	0	0	0	0	0	
	30	0	0	0	0		
Amost		1	2	3	4	5	
TPF	15	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	
TPF90	15	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	

**Tabela 2:** Contagem de bolores termoresistentes obtidas nas análises do lote 2, a partir de bebida de uva

Contagem de Bolores comuns e leveduras		Produto: Bebida de uva				Safra - safra 2002	
Lote -2	Data: 26/01/02 (TQ,TP1,TAC)	Data da análise: 27/01/02 (TQ,TP1,ATC)					
Pontos	21/03/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)	22/03/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)					
	Contagem (dias)	Amostra				Média	Desvio padrão
		1	2	3	4		
TQ	15	4	3	4	3	4,40	1,50
	30	4	3	6	6		
TP1	15	2	3	3	2	2,50	0,58
	30	2	3	3	2		
TAC	15	3	2	2	2	2,80	0,96
	30	4	2	3	2		
TAA	15	0	0	0	0	0	
	30	0	0	0	0		
TT	15	0	0	0	0	0	
	30	0	0	0	0		
TF	15	0	0	0	0	0	
	30	0	0	0	0		
TP3	15	0	0	0	0	0	
	30	0	0	0	0		
Amost		1	2	3	4	5	
TPF	15	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	
TPF90	15	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	

**Tabela 3:** Contagem de bolores termoresistentes obtidas nas análises do lote 3, a partir de bebida de uva

Contagem de Bolores comuns e leveduras		Produto: Bebida de uva				Safr - safra 2002	
Lote -3	Data: 26/01/02 (TQ,TP1,TAC)	Data da análise: 27/01/02 (TQ,TP1,ATC)					
Pontos	07/05/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)	08/05/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)					
	Contagem (dias)	Amostra				Média	Desvio padrão
		1	2	3	4		
TQ	15	3	2	4	3	3,50	0,58
	30	3	3	4	4		
TP1	15	2	3	2	3	3,00	0,00
	30	3	3	3	3		
TAC	15	1	2	2	2	2,30	0,50
	30	2	2	2	3		
TAA	15	0	0	0	0	0	
	30	0	0	0	0		
TT	15	0	0	0	0	0	
	30	0	0	0	0		
TF	15	0	0	0	0	0	
	30	0	0	0	0		
TP3	15	0	0	0	0	0	
	30	0	0	0	0		
Amost		1	2	3	4	5	
TPF	15	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	
TPF90	15	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	

**Tabela 4:** Contagem de bolores termoresistentes obtidas nas análises do lote 4, a partir de bebida de uva

Contagem de Bolores comuns e leveduras		Produto: Bebida de uva				Entressafra –2002	
Lote -4		Data: 01/03/02 (TQ,TP1,TAC)				Data da análise: 02/03/02 (TQ,TP1,ATC)	
Pontos		07/05/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)				08/05/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)	
	Contagem (dias)	Amostra				Média	Desvio padrão
		1	2	3	4		
TQ	15	0	1	0	0	0,30	0,50
	30	0	1	0	0		
TP1	15	0	0	0	0	0	
	30	0	0	0	0		
TAC	15	0	0	0	0	0	
	30	0	0	0	0		
TAA	15	0	0	0	0	0	
	30	0	0	0	0		
TT	15	0	0	0	0	0	
	30	0	0	0	0		
TF	15	0	0	0	0	0	
	30	0	0	0	0		
TP3	15	0	0	0	0	0	
	30	0	0	0	0		
Amost		1	2	3	4	5	
TPF	15	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	
TPF90	15	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	

**Tabela 5:** Contagem de bolores termoresistentes obtidas nas análises do lote 5, a partir de bebida de uva

Contagem de Bolores comuns e leveduras		Produto: Bebida de uva				Entressafra – 2002	
Lote -5		Data: 01/03/02 (TQ,TP1,TAC)				Data da análise: 02/03/02 (TQ,TP1,ATC)	
Pontos		06/06/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)				07/06/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)	
	Contagem (dias)	Amostra				Média	Desvio padrão
		1	2	3	4		
TQ	15	0	1	1	1	0,80	0,50
	30	0	1	1	1		
TP1	15	1	0	0	0	0,30	0,50
	30	1	0	0	0		
TAC	15	0	0	0	0	0	
	30	0	0	0	0		
TAA	15	0	0	0	0	0	
	30	0	0	0	0		
TT	15	0	0	0	0	0	
	30	0	0	0	0		
TF	15	0	0	0	0	0	
	30	0	0	0	0		
TP3	15	0	0	0	0	0	
	30	0	0	0	0		
Amost		1	2	3	4	5	
TPF	15	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	
TPF90	15	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	

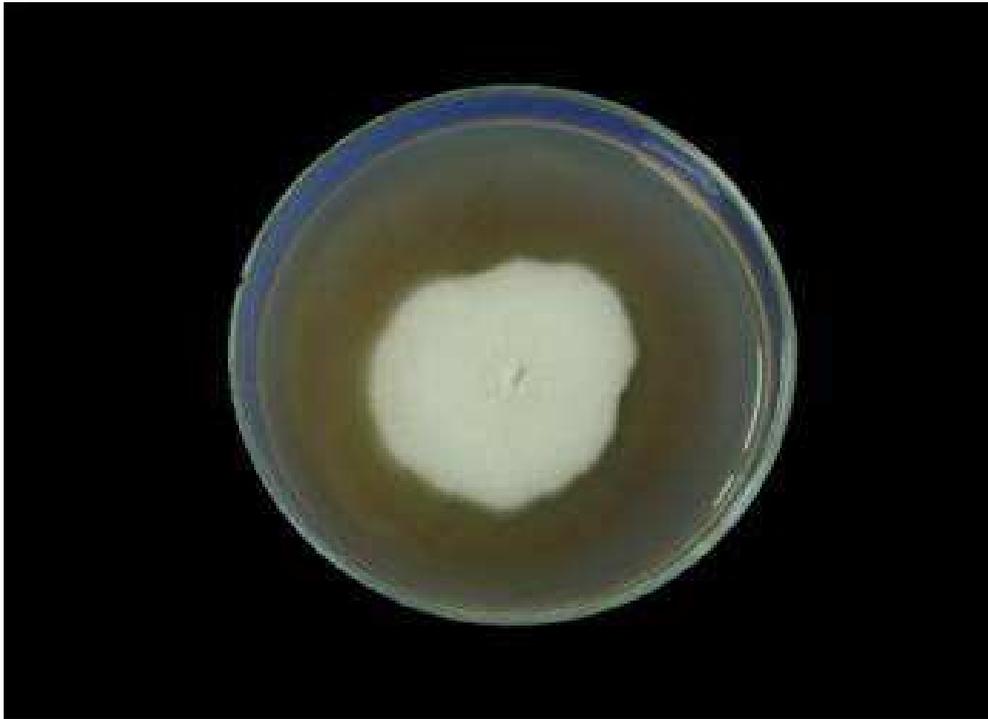
**Tabela 6:** Contagem de bolores termoresistentes obtidas nas análises do lote 6, a partir de bebida de uva

Contagem de Bolores comuns e leveduras		Produto: Bebida de uva				Entressafra – 2002	
Lote -6		Data: 01/03/02 (TQ,TP1,TAC)				Data da análise: 02/03/02 (TQ,TP1,ATC)	
Pontos		06/06/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)				07/06/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)	
	Contagem (dias)	Amostra				Média	Desvio padrão
		1	2	3	4		
TQ	15	0	1	0	0	0,50	1,00
	30	0	2	0	0		
TP1	15	0	0	0	0	0	
	30	0	0	0	0		
TAC	15	0	0	0	0	0	
	30	0	0	0	0		
TAA	15	0	0	0	0	0	
	30	0	0	0	0		
TT	15	0	0	0	0	0	
	30	0	0	0	0		
TF	15	0	0	0	0	0	
	30	0	0	0	0		
TP3	15	0	0	0	0	0	
	30	0	0	0	0		
Amost		1	2	3	4	5	
TPF	15	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	
TPF90	15	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	

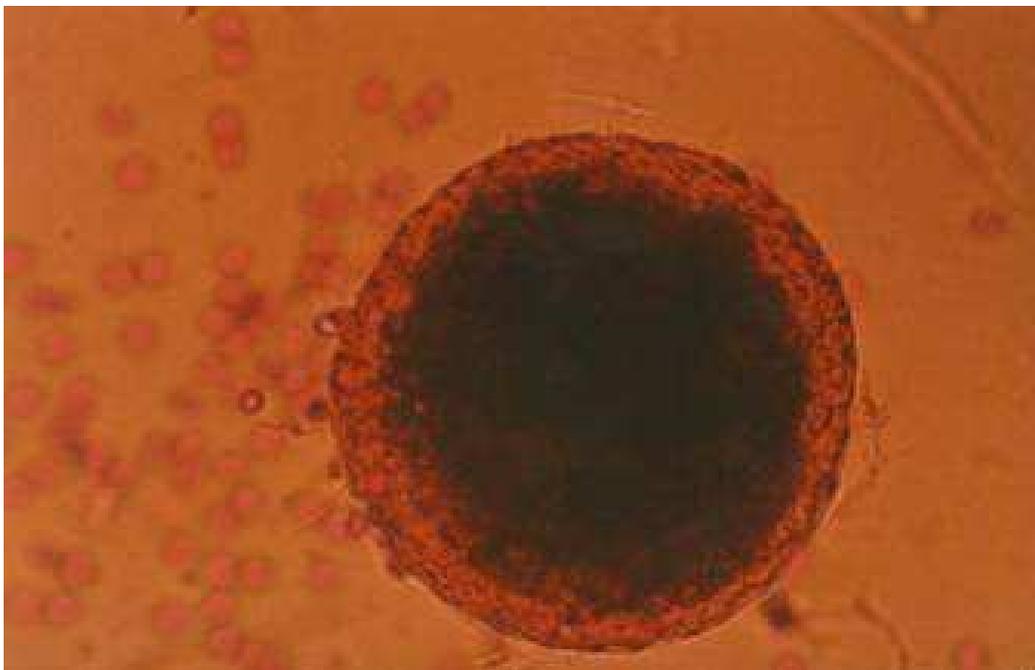
## **Anexo III**

**(Fotos de estruturas fúngicas macroscópicas  
e microscópicas dos Isolados I22FL5TQ e  
I5FL1TQ)**



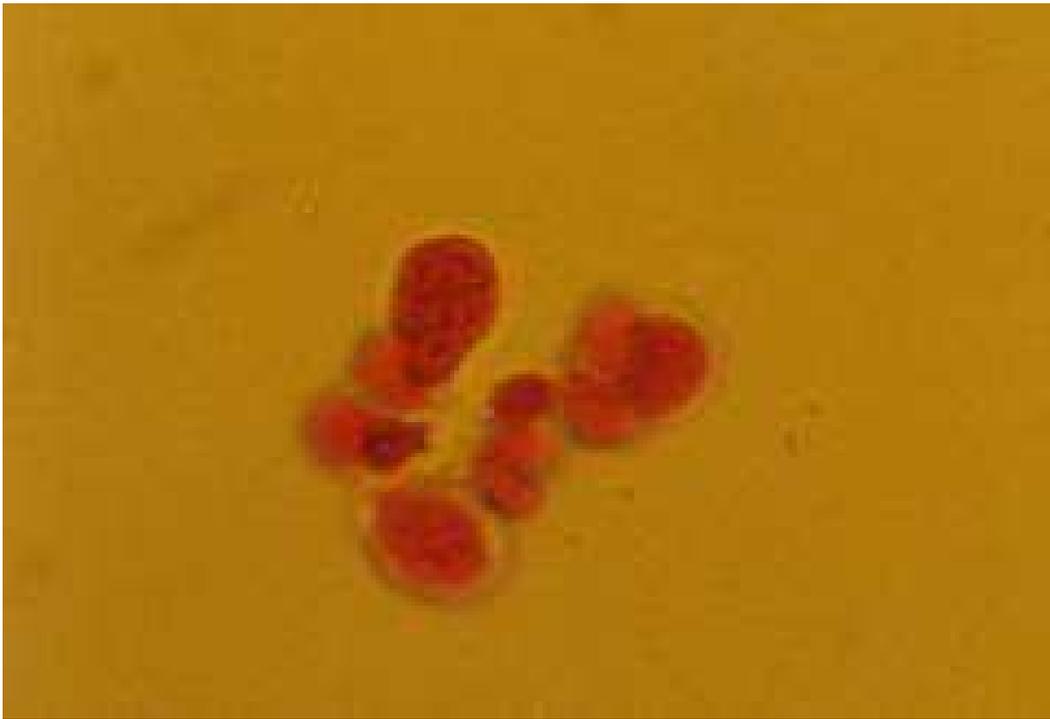


**Figura 1:** Colônia do Isolado I22FL5TQ, cultivado em meio MEA, 30°C durante 7 dias

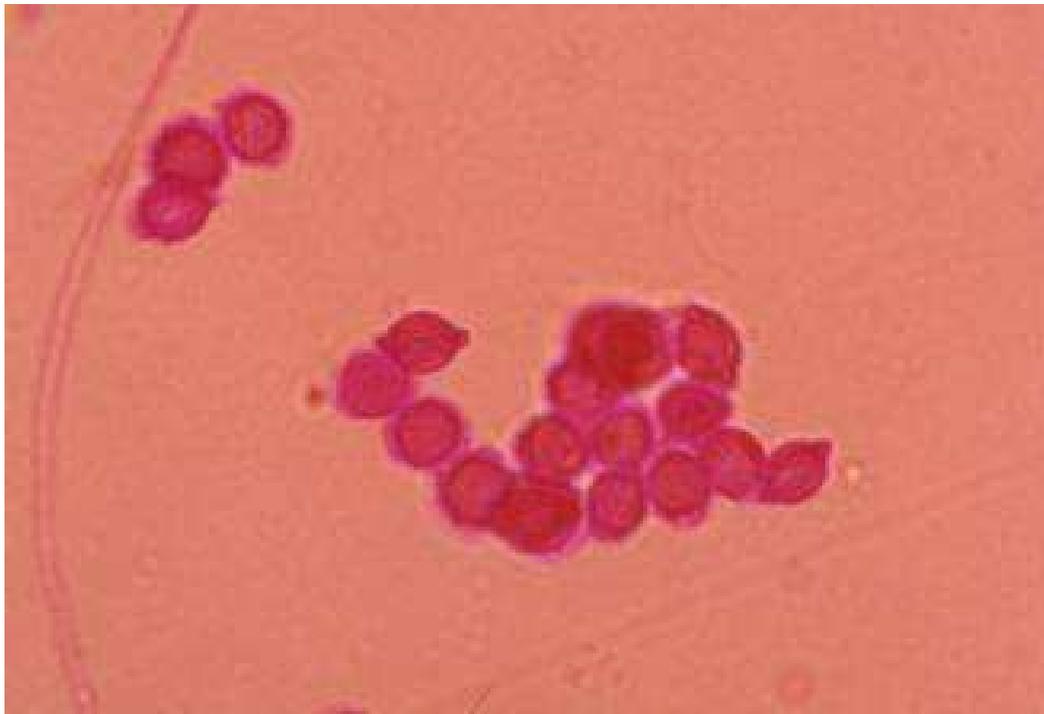


**Figura 2:** Ascomata do Isolado I22FL5TQ, aumento de 400 vezes.



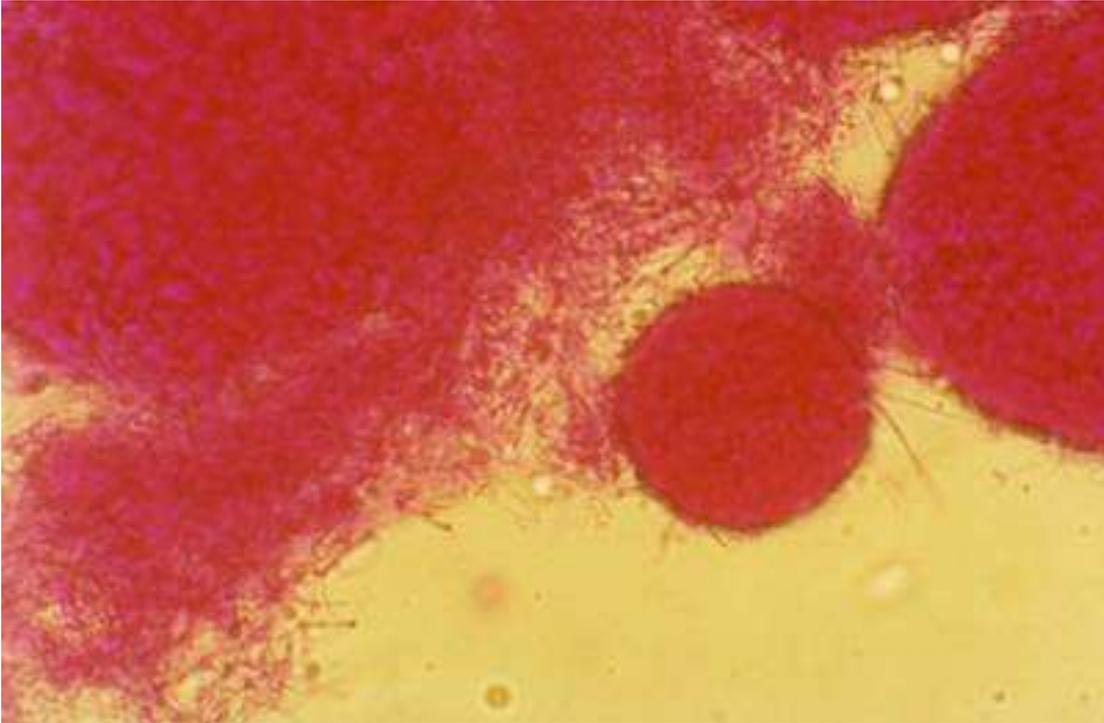


**Figura 3:** Ascósporos de Isolado I22FL5TQ, aumento de 1000 vezes.

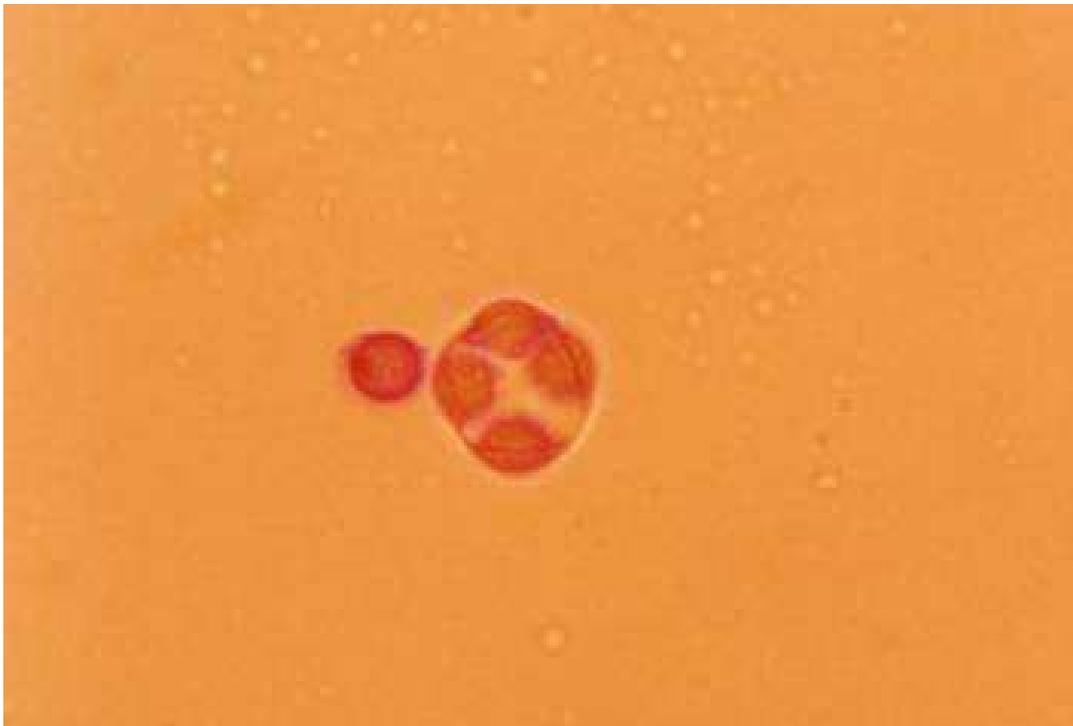


**Figura 4:** Ascósporos mostrando fenda equatorial típica de *N. fischeri*, pertencentes ao Isolado I22FL5TQ aumentado em 1000 vezes





**Figura 5:** Ascomata do isolado I5FL1TQ, com aumento de 200 vezes.



**Figura 6:** Asco do isolado I5FL1TQ em aumento de 1000 vezes.



## **Anexo IV**

**(Dados da medição de pH em bebida de uva)**



**Tabela 1:** Medida de pH em todos os pontos de amostragem de bebida de uva

Medida de pH		Produto: Bebida de uva Safra - safra 2002					
Lote -1	Data: 26/01/02 (TQ,TP1,TAC)	Data da análise: 27/01/02 (TQ,TP1,ATC)					
Pontos	21/03/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)	22/03/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)					
	Amostra				Média	Desvio padrão	
	1	2	3	4			
TQ	2,95	2,95	2,95	2,95	2,95	0	
TP1	2,79	2,79	2,79	2,79	2,79	0	
TAC	2,93	3,00	2,85	2,88	2,92	0,066	
TAA	2,87	2,86	2,87	2,84	2,86	0,014	
TT	2,93	2,93	2,94	2,94	2,94	0,006	
TF	2,87	2,89	2,91	2,90	2,89	0,017	
TP3	2,88	2,88	2,81	2,89	2,89	0,014	
Amost	1	2	3	4	5		
TPF	2,92	2,89	2,89	2,90	2,88		2,90
TPF90	2,73	2,72	2,72	2,72	2,72	2,72	0,004

**Tabela 2:** Medida de pH em todos os pontos de amostragem de bebida de uva

Medida de pH		Produto: Bebida de uva Safra - safra 2002					
Lote -2	Data: 26/01/02 (TQ,TP1,TAC)	Data da análise: 27/01/02 (TQ,TP1,ATC)					
Pontos	21/03/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)	22/03/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)					
	Amostra				Média	Desvio padrão	
	1	2	3	4			
TQ	2,90	2,90	2,90	2,90	2,90	0,00	
TP1	2,79	2,79	2,79	2,79	2,79	0,00	
TAC	2,86	2,91	2,95	2,96	2,92	0,045	
TAA	3,12	3,13	3,11	3,11	3,12	0,010	
TT	3,04	3,03	3,00	3,00	3,02	0,021	
TF	2,89	2,91	2,93	2,90	2,91	0,017	
TP3	2,92	2,91	2,94	2,91	2,92	0,014	
Amost	1	2	3	4	5		
TPF	2,89	2,87	2,89	2,89	2,88		2,88
TPF90	2,73	2,73	2,73	2,72	2,72	2,73	0,004

**Tabela 3: Medida de pH em todos os pontos de amostragem de bebida de uva**

Medida de pH		Produto: Bebida de uva					Safr - safra 2002	
Lote -3	Data: 26/01/02 (TQ,TP1,TAC)	Data da análise: 27/01/02 (TQ,TP1,ATC)						
Pontos	07/05/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)	08/05/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)						
	Amostra					Média	Desvio padrão	
	1	2	3	4	5			
TQ	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	0,00	
TP1	2,88	2,88	2,88	2,88	2,88	2,88	0,00	
TAC	2,97	2,95	2,98	2,99	2,99	2,97	0,017	
TAA	3,00	2,94	2,95	2,93	2,93	2,96	0,031	
TT	3,03	3,02	3,04	3,04	3,04	3,03	0,010	
TF	3,00	2,93	3,06	3,03	3,03	3,01	0,056	
TP3	2,98	3,00	3,01	3,00	3,00	3,00	0,013	
Amost	1	2	3	4	5			
TPF	2,99	3,00	3,00	3,00	2,99	3,00	0,005	
TPF90	3,56	3,56	3,55	3,56	3,55	3,56	0,005	

**Tabela 4: Medida de pH em todos os pontos de amostragem de bebida de uva**

Medida de pH		Produto: Bebida de uva					Entressafra -2002	
Lote -4	Data: 01/03/02 (TQ,TP1,TAC)	Data da análise: 02/03/02 (TQ,TP1,ATC)						
Pontos	07/05/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)	08/05/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)						
	Amostra					Média	Desvio padrão	
	1	2	3	4	5			
TQ	3,17	3,19	3,16	3,17	3,17	3,17	0,013	
TP1	3,20	3,19	3,22	3,20	3,20	3,20	0,013	
TAC	3,25	3,20	3,23	3,26	3,26	3,24	0,026	
TAA	3,00	2,96	2,98	2,94	2,94	2,97	0,026	
TT	2,97	3,08	3,01	3,04	3,04	3,03	0,047	
TF	3,02	2,98	2,97	2,98	2,98	2,99	0,022	
TP3	2,99	2,99	2,98	3,00	3,00	2,99	0,008	
Amost	1	2	3	4	5			
TPF	3,00	3,01	2,98	3,00	2,99	3,00	0,011	
TPF90	3,56	3,56	3,56	3,56	3,56	3,56	0,00	

**Tabela 5:** Medida de pH em todos os pontos de amostragem de bebida de uva

Medida de pH		Produto: Bebida de uva Entressafra - 2002				
Lote -5	Data: 01/03/02 (TQ,TP1,TAC)	Data da análise: 02/03/02 (TQ,TP1,ATC)				
Pontos	06/06/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)	07/06/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)				
	Amostra				Média	Desvio padrão
	1	2	3	4		
TQ	3,15	3,17	3,19	3,16	3,17	0,017
TP1	3,22	3,19	3,20	3,24	3,21	0,022
TAC	3,20	3,23	3,25	3,26	3,24	0,026
TAA	3,28	3,29	3,31	3,32	3,30	0,018
TT	3,41	3,41	3,41	3,41	3,41	0,00
TF	3,41	3,43	3,39	3,38	3,40	0,022
TP3	3,38	3,40	3,37	3,36	3,38	0,017
Amost	1	2	3	4	5	
TPF	3,25	3,27	3,28	3,26	3,27	0,011
TPF90	2,75	2,76	2,75	2,75	2,76	0,005

**Tabela 6:** Medida de pH em todos os pontos de amostragem de bebida de uva

Medida de pH		Produto: Bebida de uva Entressafra - 2002				
Lote -6	Data: 01/03/02 (TQ,TP1,TAC)	Data da análise: 02/03/02 (TQ,TP1,ATC)				
Pontos	06/06/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)	07/06/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)				
	Amostra				Média	Desvio padrão
	1	2	3	4		
TQ	3,19	3,17	3,24	3,19	3,20	0,030
TP1	3,22	3,18	3,24	3,20	3,21	0,026
TAC	3,26	3,21	3,18	3,24	3,22	0,035
TAA	3,32	3,30	3,31	3,32	3,31	0,010
TT	3,42	3,39	3,41	3,40	3,41	0,013
TF	3,39	3,41	3,44	3,41	3,41	0,021
TP3	3,36	3,35	3,35	3,36	3,36	0,006
Amost	1	2	3	4	5	
TPF	3,26	3,26	3,25	3,28	3,27	0,011
TPF90	2,73	2,73	2,74	2,75	2,73	0,009



## **Anexo V**

**(Dados da medição de °Brix em bebida de uva)**



**Tabela 1: Medida de °Brix em todos os pontos de amostragem de bebida de uva**

Medida de °Brix		Produto: Bebida de uva Safra - safra 2002					
Lote -1	Data: 26/01/02 (TQ,TP1,TAC)	Data da análise: 27/01/02 (TQ,TP1,ATC)					
Pontos	21/03/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)		22/03/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)				
	Amostra				Média	Desvio padrão	
	1	2	3	4			
TQ	8,10	8,10	8,10	8,10	8,10	0,00	
TP1	15,30	15,30	15,30	15,30	15,30	0,00	
TAC	14,10	14,00	14,50	14,50	14,28	0,263	
TAA	11,00	11,00	10,80	11,00	10,95	0,100	
TT	11,00	11,00	10,80	11,00	10,95	0,100	
TF	14,60	14,20	14,00	14,00	14,20	0,283	
TP3	13,80	14,00	13,80	13,80	13,85	0,100	
Amost	1	2	3	4	5		
TPF	13,60	13,80	13,80	14,00	14,00	13,84	0,167
TPF90	13,80	13,80	14,00	14,00	14,00	13,92	0,110

**Tabela 2: Medida de °Brix em todos os pontos de amostragem de bebida de uva**

Medida de °Brix		Produto: Bebida de uva Safra - safra 2002					
Lote -2	Data: 26/01/02 (TQ,TP1,TAC)	Data da análise: 27/01/02 (TQ,TP1,ATC)					
Pontos	21/03/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)		22/03/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)				
	Amostra				Média	Desvio padrão	
	1	2	3	4			
TQ	13,00	13,00	13,00	13,00	13,00	0,00	
TP1	16,70	16,70	16,70	16,70	16,70	0,00	
TAC	15,10	14,90	15,10	15,10	15,05	0,100	
TAA	11,80	12,00	11,80	11,80	11,85	0,100	
TT	11,00	10,80	11,00	11,00	10,95	0,100	
TF	14,00	14,00	14,00	14,00	14,00	0,00	
TP3	13,80	13,80	13,80	13,80	13,80	0,00	
Amost	1	2	3	4	5		
TPF	14,00	14,00	14,00	14,00	14,00	14,00	0,00
TPF90	14,00	14,00	14,00	14,00	14,00	14,00	0,00

**Tabela 3: Medida de °Brix em todos os pontos de amostragem de bebida de uva**

Medida de °Brix		Produto: Bebida de uva					Safrã – safrã 2002		
Lote -3	Data: 26/01/02 (TQ,TP1,TAC)	Data da análise: 27/01/02 (TQ,TP1,ATC)							
Pontos	07/05/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)	08/05/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)							
	Amostra				Média	Desvio padrão			
	1	2	3	4					
TQ	16,80	16,80	16,80	16,80	16,80	0,00			
TP1	9,80	9,80	9,80	9,80	9,80	0,00			
TAC	15,10	15,10	14,90	15,00	15,03	0,096			
TAA	13,80	13,80	13,60	13,80	13,75	0,100			
TT	18,00	17,80	18,20	18,00	18,00	0,163			
TF	14,00	14,00	14,00	14,00	14,00	0,00			
TP3	14,00	14,00	14,00	14,00	14,00	0,00			
Amost	1	2	3	4	5				
TPF	14,00	14,00	14,00	14,00	14,00	14,00	0,00		
TPF90	14,60	14,40	14,60	14,20	14,40	14,44	0,167		

**Tabela 4: Medida de °Brix em todos os pontos de amostragem de bebida de uva**

Medida de °Brix		Produto: Bebida de uva					Entressafrã -2002		
Lote -4	Data: 01/03/02 (TQ,TP1,TAC)	Data da análise: 02/03/02 (TQ,TP1,ATC)							
Pontos	07/05/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)	08/05/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)							
	Amostra				Média	Desvio padrão			
	1	2	3	4					
TQ	16,40	16,40	16,20	16,40	16,35	0,100			
TP1	16,80	17,00	16,80	16,80	16,85	0,100			
TAC	16,20	16,00	16,20	16,00	16,10	0,115			
TAA	18,00	17,80	18,20	18,00	18,00	0,163			
TT	12,00	11,80	12,00	12,00	11,95	0,100			
TF	14,00	14,00	14,00	14,00	14,00	0,00			
TP3	14,00	14,00	14,00	14,00	14,00	0,00			
Amost	1	2	3	4	5				
TPF	14,00	14,00	14,00	14,00	14,00	14,00	0,00		
TPF90	14,80	14,60	14,60	14,80	14,80	14,72	0,110		

**Tabela 5: Medida de °Brix em todos os pontos de amostragem de bebida de uva**

Medida de °Brix		Produto: Bebida de uva Entressafra - 2002					
Lote -5	Data: 01/03/02 (TQ,TP1,TAC)	Data da análise: 02/03/02 (TQ,TP1,ATC)					
Pontos	06/06/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)	07/06/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)					
	Amostra				Média	Desvio padrão	
	1	2	3	4			
TQ	15,80	15,60	15,80	15,80	15,75	0,100	
TP1	17,20	17,00	17,00	17,00	17,05	0,100	
TAC	15,80	16,00	15,80	15,80	15,85	0,100	
TAA	11,80	11,80	11,80	11,60	11,75	0,100	
TT	11,60	11,60	11,60	11,40	11,55	0,100	
TF	14,00	14,00	14,00	14,00	14,00	0,00	
TP3	14,00	14,00	14,00	14,00	14,00	0,00	
Amost	1	2	3	4	5		
TPF	14,00	14,00	14,00	14,00	14,00	14,00	0,00
TPF90	14,00	14,20	14,20	14,20	14,20	14,16	0,089

**Tabela 6: Medida de °Brix em todos os pontos de amostragem de bebida de uva**

Medida de °Brix		Produto: Bebida de uva Entressafra - 2002					
Lote -6	Data: 01/03/02 (TQ,TP1,TAC)	Data da análise: 02/03/02 (TQ,TP1,ATC)					
Pontos	06/06/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)	07/06/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)					
	Amostra				Média	Desvio padrão	
	1	2	3	4			
TQ	16,80	16,80	17,00	16,80	16,85	0,100	
TP1	17,40	17,20	17,40	17,40	17,35	0,100	
TAC	15,80	16,00	15,80	16,00	15,90	0,115	
TAA	11,60	12,60	11,80	12,00	12,00	0,432	
TT	11,40	11,60	12,00	12,20	11,80	0,365	
TF	14,00	14,00	14,00	14,00	14,00	0,00	
TP3	14,00	14,00	14,00	14,00	14,00	0,00	
Amost	1	2	3	4	5		
TPF	14,00	14,00	14,00	14,00	14,00	14,00	0,00
TPF90	14,00	14,20	14,40	14,,00	14,00	14,20	0,179



## **Anexo VI**

**(Meios de Cultura, corantes e soluções  
utilizadas durante as análises  
microbiológicas)**



### 1) Água Peptonada

Peptona Bacteriológica.....0.1g

Água Destilada.....100ml

Modo de Preparar: pesar a peptona bacteriológica em balança analítica, dissolvê-la com água destilada e esterilizar normalmente a 121°C/15min.

### 2) Corante Lacto-fucsina 0,1%

Ácido Fucsínico..... 0.1g

Ácido Láctico 85% de pureza..... 100ml

Modo de Preparar: dissolver o ácido fucsínico em ácido láctico com grau de pureza de 85% ou superior a isso. Este corante é utilizado na coloração de estruturas fúngicas e não há necessidade de esterilização.

### 3) Concentrado Czapek

NaNO<sub>3</sub>.....30g

KCl.....5g

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O.....5g

FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O.....0.1g

Água Destilada.....100ml

Modo de Preparar: pesar todos os reagentes e homogeneizar bem. Guardar em garrafa bem tampada, este produto poderá ser estocado indefinidamente sem esterilização.

#### 4) Meio CYA (Identificação de fungos)

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1.0g
Czapek concentrado.....	10ml
Extrato de Levedura em pó.....	5g
Sacarose.....	30g
Água destilada.....	1litro
Ágar Bacteriológico.....	15g

Modo de Preparar: pesar todos os produtos, acrescentar água, fazer prévio aquecimento para dissolução do Agar, levar a autoclave 121°C/15min.

#### 5) Meio G25N (Identificação de fungos)

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0.75g
Czapek concentrado.....	7.5ml
Extrato de Levedura em pó.....	3.7g
Glicerol ( Grau Analítico).....	250ml
Ágar Bacteriológico.....	12g
Água Destilada .....	750ml

Modo de Preparar: pesar todos os produtos, por último adicionar água destilada. Esterilizar em autoclave 121°C/15min.

6) Agar Extrato de Malte (MEA)

Extrato de Malte.....	6g
Glicose .....	6g
Ágar Bacteriológico .....	6g
Peptona Bacteriológica .....	0.3g
Água Destilada .....	300ml

Modo de Preparo: pesar todos os produtos e por último adicionar a água destilada, não dissolver previamente o ágar. Esterilizar em autoclave 121°C/15min.

7) Agar Batata Dextrose (PDA) (OXOIDE)

Agar Batata Dextrose .....	3.9g
Água Destilada .....	100ml

Modo de Preparar: pesar o produto, adicionar água destilada Esterilizar em autoclave 121°C/15min.

8) Ágar Batata Dextrose Dupla Concentração

Agar Batata Dextrose .....	3.9g
Ágar Bacteriológico .....	1.5g
Água Destilada .....	100ml

Modo de Preparar: pesar todos os produtos, por último adicionar água destilada. Esterilizar em autoclave 121°C/15min.

9) Ágar Batata Dextrose Dupla Concentração com Cloranfenicol

Ágar Batata Dextrose .....	3.9g
Ágar Bacteriológico .....	1.5g
Cloranfenicol .....	0.4g
Água Destilada .....	100ml

Modo de Preparar: pesar todos os produtos, por último adicionar água destilada.  
Esterilizar em autoclave 121°C/15min.

10) Solução de Ácido Tartárico 10% (p/v)

Ácido Tartárico .....	10g
Água Destilada .....	100ml

Modo de Preparar: pesar todos os produtos, por último adicionar água destilada.  
Esterilizar em autoclave 121°C/15min.

11) Solução de Leite Desnatado 5% (p/v)

Leite Desnatado .....	5g
Água Destilada .....	100ml

Modo de Preparar: pesar todos os produtos, por último adicionar água destilada.  
Esterilizar em autoclave 121°C/10min para que se evite uma possível caramelização do leite.

12) Solução de Tween 80

Tween 80 ..... 0.05g

Água Destilada ..... 100ml

Modo de Preparar: pesar o produto, adicionar água destilada. Esterilizar em autoclave 121°C/15min.

13) Solução de Rosa de Bengala

Rosa de Bengala..... 0.084g

Água Destilada ..... 100ml

Modo de Preparar: pesar o produto, adicionar água destilada. Esterilizar em autoclave 121°C/10min, assim que for retirado da autoclave cobrir com papel alumínio para que o sal não seja oxidado na presença da luz, manter sob refrigeração.