

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**ESTUDO DA OCORRÊNCIA DE FUNGOS
FILAMENTOSOS TERMORESISTENTES EM
POLPA DE TOMATE ENVASADA
ASSEPTICAMENTE**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por FLÁVIO BAGLIONI aprovada pela Comissão Julgadora em 10 de março de 1998.

Campinas, 10 de março de 1998.

Pilar R. de Massaguer
Profa. Dra. PILAR RODRIGUEZ
DE MASSAGUER

Presidente da Banca

Flávio Baglioni
(Engenheiro de Alimentos)

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos na Universidade de Engenharia de Alimentos para obtenção do Título de Mestre em Ciência dos Alimentos

Orientadora : Profa Dra. Pilar Rodriguez de Massaguer

Campinas
Fevereiro / 1998



BANCA EXAMINADORA

Pilar Rodríguez de Massaguer
Profa. Dra. Pilar Rodríguez de Massaguer
(Orientadora)

Mirtha Nelly Uboldi Eiroa
Profa. Dra. Mirtha Nelly Uboldi Eiroa
(Membro)

Hilary Castle de Menezes
Profa. Dra. Hilary Castle de Menezes
(Membro)

Prof. Dr. José Luiz Pereira
(Suplente)

“ É triste falhar na vida; porém mais triste ainda é não tentar vencer ”

(ROOSEVELT)

“ As nossas esperanças não devem ser depositadas nos outros, mas sim em nós próprios ”

(TREMONT)

AGRADECIMENTOS

- À Profa. Dra. Pilar Rodriguez de Massaguer pela orientação e incentivo.
- Ao pessoal das empresas participantes pelo suporte técnico e financeiro.
- À CAPES pelo suporte financeiro.
- Aos membros da banca examinadora pelas sugestões.
- Ao pesquisador Homero Ferracini Gumerato e à bolsista auxiliar de pesquisa Neuma Cristiane Tiekko Aoki pela parte de identificação dos fungos.
- Ao pessoal do laboratório de termobacteriologia da UNICAMP pela convivência e ajuda no que foi preciso. Em especial, devo citar a técnica Rosa Maria Tavares Andrasso Tosello (“Rosinha”) e a aluna de doutorado Maria Aparecida de Souza Vieira (“Cida”).
- A todos os outros que me ajudaram direta ou indiretamente.
- A meus pais Oswaldo e Maria Helena.
- **A DEUS PELA FORÇA PARA CONCLUIR ESTE TRABALHO.**

MUITO OBRIGADO !

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS.....	I
LISTA DE FIGURAS.....	II
NOMENCLATURA.....	III
RESUMO.....	IV
ABSTRACT.....	VI
I - INTRODUÇÃO.....	1
II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
1. DETERIORAÇÃO DE ALIMENTOS POR FUNGOS TERMORESISTENTES.3	
1.1 Principais espécies de fungos termoresistentes.....	3
1.1.1 Características gerais.....	3
a) <i>Byssochlamys fulva</i> e <i>Byssochlamys nivea</i>	3
b) <i>Neosartorya fischeri</i>	3
c) <i>Talaromyces flavus</i>	4
1.1.2 Distribuição e Fontes de Contaminação.....	4
1.1.3 Ocorrência em Alimentos.....	5
1.1.4 Produção e Ativação de ascosporos.....	7
1.1.5 Fatores que afetam a resistência térmica dos ascosporos.....	11
a) Variação da resistência térmica entre cepas de fungos termoresistentes.....	11
b) Influência da natureza do meio de aquecimento.....	12
c) Influência da adição de conservantes no meio de aquecimento.....	16
d) Outros fatores que afetam a resistência dos ascosporos.....	17
1.1.6 Fatores que afetam o crescimento.....	21
1.1.7 Efeitos da Contaminação.....	24
1.1.8 Produção de Metabólitos.....	25
1.1.8.1 Produção de Enzimas.....	25
1.1.8.2 Produção de Micotoxinas.....	26
1.2 Outras espécies de fungos termoresistentes.....	28
1.3 Cinética de Inativação.....	30
1.4 Controle da deterioração por fungos termoresistentes.....	31
1.5 O uso de altas pressões na inativação de ascosporos de fungos termoresistentes.....	33
1.6 Estabelecimento de níveis aceitáveis para fungos termoresistentes.....	34
1.7 Detecção e enumeração de fungos termoresistentes em alimentos.....	35
2. ASPECTOS GERAIS SOBRE A DETERIORAÇÃO MICROBIOLÓGICA DOS DERIVADOS DE TOMATE.....	36
2.1 Deterioração por bactérias esporogênicas.....	37
2.1.1 <i>Bacillus coagulans</i>	37

2.1.2 <i>Bacillus polymixa</i> e <i>Bacillus macerans</i>	37
2.1.3 <i>Clostridium pasteurianum</i> e <i>Clostridium butyricum</i>	37
2.2 Deterioração por bactérias não esporogênicas.....	38
2.2.1 Bactérias lácticas.....	38
2.2.2 Enterobactérias.....	38
2.2.3 Bactérias Acéticas.....	38
2.3 Deterioração por fungos e leveduras.....	39
2.3.1 Fungos filamentosos.....	39
2.3.2 Leveduras.....	41
III - MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
1. Amostragem.....	42
1.1 Número de amostragens e obtenção das amostras.....	42
1.2 Período de safra do tomate.....	42
1.3 Período de entressafra do tomate.....	42
2. Detecção e enumeração de fungos termoresistentes.....	42
2.1 Preparo das amostras.....	43
2.2 Determinação do tempo de subida da temperatura.....	43
2.3 Procedimento de enumeração dos fungos termoresistentes.....	43
3. Isolamento e estocagem dos fungos termoresistentes.....	44
3.1 Isolamento.....	44
3.2 Estocagem.....	44
4. Seleção do isolado mais termoresistente.....	45
4.1 Esporulação.....	45
4.2 Coleta dos esporos.....	46
4.3 Aplicação dos choques térmicos para seleção do isolado mais termoresistente.....	46
5. Identificação dos isolados mais importantes.....	46
6. Ensaio com a cepa de fungo selecionada como mais termoresistente.....	47
6.1 Produção e coleta dos ascosporos de diferentes idades.....	47
6.2 Determinação das condições ótimas de ativação dos ascosporos.....	47
6.3 Ensaio de termoresistência dos ascosporos em polpa de tomate (8°BRIX).....	48
6.4 Avaliação do tipo de deterioração causada pelo fungo mais termoresistente na polpa de tomate (8°BRIX).....	48
IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
1. Enumeração de fungos filamentosos termoresistentes em polpa de tomate de 8°BRIX.....	51
2. Fungos isolados em cada lote e seleção da cepa mais termoresistente.....	52
3. Ativação ótima dos ascosporos do isolado mais termoresistente.....	59
4. Avaliação do tipo de deterioração causada pelo fungo mais termoresistente na polpa de tomate.....	60

5. Resistência térmica do fungo isolado mais termoresistente (<i>N. fischeri</i>).....	61
V - CONCLUSÕES.....	76
VI - SUGESTÕES.....	77
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
APÊNDICES	
Apêndice 1 - Meios de cultura e soluções utilizadas.....	89
Apêndice 2 - Aplicação do teste de Tukey para comparar a contaminação por fungos termoresistentes em início, pico e fim de safra.....	90
Apêndice 3 - I26L4PPF - Características de identificação.....	91
Apêndice 4 - Fungo selecionado como mais termoresistente (I16L4PAB, I29L5PAB, I45L8PAB) - Características de identificação.....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ocorrência de fungos termoresistentes em frutas e derivados.....	7
Tabela 2 - Choques térmicos aplicados (temperatura/tempo) aos fungos isolados.....	45
Tabela 3 - Média da enumeração de fungos termoresistentes (UFC / 100 ml de amostra) durante o período de safra do tomate (Julho/96 à Novembro/96).....	51
Tabela 4 - Média da enumeração de fungos termoresistentes (UFC / 100 ml de amostra) durante o período de entressafra do tomate (Janeiro/97 à Abril/97).....	51
Tabela 5 - Número de fungos isolados por lote.....	53
Tabela 6 - Código dos fungos termoresistentes, procedência e limite de sobrevivência.....	53
Tabela 7 - Sobrevivência de 50 isolados submetidos a diferentes choques térmicos.....	56
Tabela 8 - Fungos mais termoresistentes dentro de cada lote de produção de polpa de tomate.....	57
Tabela 9 - Contagem direta dos ascosporos (Câmara de Neubauer).....	59
Tabela 10- Recuperação dos ascosporos com 1 mês de idade e a % de ascosporos ativados em relação à contagem direta.....	59
Tabela 11- Recuperação dos ascosporos com 3 meses de idade e a % de ascosporos ativados em relação à contagem direta.....	59
Tabela 12- Ativação ótima dos ascosporos.....	60
Tabela 13- Contagem do número de sobreviventes com o tempo de aquecimento em polpa de tomate 8°BRIX, pH 4.3 de ascosporos de <i>N. fischeri</i> com 1 mês de idade.....	62
Tabela 14- Contagem do número de sobreviventes com o tempo de aquecimento em polpa de tomate 8°BRIX, pH 4.3 de ascosporos de <i>N. fischeri</i> com 3 meses de idade.....	63
Tabela 15- Valores do parâmetro "a".....	63
Tabela 16- Valores de resistência térmica para ascosporos com 1 mês de idade para cada temperatura.....	63
Tabela 17- Valores de resistência térmica para ascosporos com 3 meses de idade para cada temperatura.....	64
Tabela 18- Valores de Z* para ascosporos de diferentes idades e respectivos coeficientes de correlação.....	64
Tabela 19- Aumento da resistência térmica com a idade dos ascosporos nas temperaturas testadas.....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma de elaboração da polpa de tomate 8°BRIX (período de safra).....	49
Figura 2 - Fluxograma de elaboração da polpa de tomate 8°BRIX (período de entressafra).....	50
Figura 3 - Distribuição (%) dos isolados de fungos de acordo com a origem.....	67
Figura 4 - Distribuição (%) de sobrevivência dos isolados de fungos aos choques térmicos.....	68
Figura 5 - Curvas de ativação à 85°C.....	69
Figura 6 - Curvas de inativação térmica - ascospores de <i>N. fischeri</i> com 1 mês.....	70
Figura 7 - Curvas de inativação térmica - ascospores de <i>N. fischeri</i> com 3 meses.....	71
Figura 8 - Determinação do valor de “a”.....	72
Figura 9 - Curvas de linearização da inativação térmica de <i>N. fischeri</i> - ascospores com 1 mês.....	73
Figura 10- Curvas de linearização da inativação térmica de <i>N. fischeri</i> - ascospores com 3 meses.....	74
Figura 11- Determinação de Z*.....	75

NOMENCLATURA

CYA = Ágar Czapeck Extrato de Malte

MEA = Ágar Extrato de Malte

PDA = Ágar Batata Dextrose

TDT = Tubos de Morte Térmica

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo principal determinar a ocorrência de fungos filamentosos termoresistentes durante o processamento asséptico de polpa de tomate (8°BRIX). Durante o período de safra de tomate foram feitas amostragens em 9 lotes (3 no início, 3 no pico e 3 em fim de safra) e no período de entresafra em 5 lotes. Foi feita a enumeração de fungos termoresistentes nas amostras coletadas durante o processo asséptico em cada lote. Foram obtidas contagens médias relativamente baixas, variando entre <1 e 8 UFC / 100 ml de amostra. As maiores contagens foram obtidas na matéria prima e na água de pré lavagem e transporte .

Cinquenta linhagens de fungos termoresistentes detectadas no procedimento de enumeração foram isoladas, codificadas e estocadas . Os esporos de cada isolado com 1 mês de idade foram submetidos a diferentes choques térmicos para selecionar a linhagem de fungo mais termoresistente. O isolado de fungo mais termoresistente (sobrevivência ao choque à 100°C / 25 minutos) foi identificado como *Neosartorya fischeri*.

A partir desta cepa de fungo selecionada como mais termoresistente foram produzidas suspensões de ascosporos com 1 e 3 meses de idade e feitos os ensaios de ativação dos ascosporos, avaliação da deterioração em polpa de tomate (8°BRIX) e resistência térmica. As curvas de ativação construídas (à 85°C) mostraram que os tempos ótimos foram 10 e 20 minutos para ascosporos com 1 e 3 meses de idade respectivamente . A avaliação da deterioração por *Neosartorya fischeri* mostrou perda total de viscosidade da polpa, elevação do pH até 9 e escurecimento do produto como efeitos principais.

Para os ensaios de resistência térmica utilizando o método de tubo TDT fechado com ascosporos suspensos em polpa de tomate 8°BRIX (1:9 v/v), foram empregadas as temperaturas 90, 92 e 94°C para os ascosporos de diferentes idades. Todas as curvas de sobreviventes obtidas mostraram um ombro inicial, seguido de taxa de morte acelerada. Para o cálculo dos parâmetros cinéticos foi feita a linearização das curvas pelo método de ALDERTON & SNELL (1970). Os valores de "1/k" (parâmetro equivalente a "D") obtidos para ascosporos com 1 mês foram 6.14, 4.72 e 2.62 minutos para 90, 92 e 94°C respectivamente e para ascosporos com 3 meses foram 10.2, 6.31 e 4.59 minutos para as mesmas respectivas temperaturas. Os valores de Z* (parâmetro equivalente ao coeficiente térmico Z) foram 10.8 e 11.6°C para ascosporos com 1 e 3 meses, respectivamente. A comparação da resistência térmica de *Neosartorya fischeri* (ascosporos com 3 meses) com a de *Bacillus coagulans* revelou que a resistência desta bactéria é superior e o tratamento térmico desenhado para destruir *Bacillus coagulans* deverá ser suficiente para

destruir a população inicial de fungos termoresistentes encontrada na linha de produção, caso a maioria dos esporos estivessem na forma de ascosporos livres. Porém não se deve descartar a possibilidade de que a resistência de *Neosartorya fischeri* pode ser mais alta, considerando a origem e a idade dos ascosporos e ascos desta espécie de fungo encontrados na natureza.

ABSTRACT

This work aimed at determining the occurrence of heat resistant molds during the aseptic processing of tomato pulp (8°BRIX). During the tomato harvest, 9 batches were sampled (3 at the beginning, 3 at the apex and 3 at the end of harvest) and another 5 batches between harvest. For each batch, the enumeration of heat resistant molds was carried out in samples collected during the aseptic process. The mean count of heat resistant molds was relatively low, ranging from <1 to 8 CFU / 100 ml of sample. The highest count was observed in the raw material and the pre-wash and transportation water.

Fifty strains of heat resistant molds detected in the enumeration procedure were isolated, codified and stocked. One month old spores of each isolate were submitted to different heat shocks to select the most heat resistant mold. The most heat resistant isolated strain (survived 100°C/25 minutes) was identified as *Neosartorya fischeri*.

Suspensions of 1 and 3 month old ascospores were prepared using the most heat resistant strain and activation, spoilage evaluation and heat resistance in tomato pulp (8°BRIX) determined. Activation curves at 85°C showed that the optimal activation times were 10 and 20 minutes for 1 and 3 month old ascospores respectively. *Neosartorya fischeri* spoilage evaluation showed a total loss of pulp viscosity, elevation of pH up to 9 and darkening as the main effects.

For the heat resistance assays using the closed TDT tubes method with ascospores suspended in 8°BRIX tomato pulp (1:9 v/v), temperatures of 90, 92 and 94°C were employed for both ascospore ages. All the survival curves showed an initial shoulder followed by an accelerated death rate. For the kinetic parameter calculations, linearization curves using the ALDERTON & SNELL (1970) method were prepared. The "1/k" values ("D" equivalent parameter) obtained for one month old ascospores were 6.14, 4.72 and 2.62 minutes at 90, 92 and 94°C respectively and, for three month old ascospores these values were 10.2, 6.31 and 4.59 minutes for the same respective temperatures. The "Z*" values (Equivalent parameter to the temperature coefficient "Z") were 10.8 and 11.6°C for 1 and 3 month old ascospores respectively. A comparison of the heat resistance of *Neosartorya fischeri* (3 month old ascospores) with that of *Bacillus coagulans* revealed that the resistance of this bacteria is greater and that the heat treatment designed to eliminate *Bacillus coagulans* should be sufficient to eliminate the initial population of heat resistant molds found in the production line if the majority of the ascospores were in the free form. However, the possibility that the resistance of *N. fischeri* could be greater should not be discarded, considering the origin, ascospore and asci ages of this mold specie found free in nature.

I - INTRODUÇÃO

Na sua maioria, os fungos filamentosos são pouco resistentes ao calor, uma vez que este destrói facilmente conídios e hifas. As poucas espécies que possuem a termoresistência como característica produzem esclerócios ou ascosporos, sendo que a maior parte das deteriorações em alimentos provocadas por estas são devidas à sobrevivência de ascosporos ao tratamento de pasteurização (SPLITTSTOESSER 1991). A pasteurização normalmente aplicada a produtos vegetais ácidos ativa ascosporos dormentes, com posterior germinação e crescimento dos fungos termoresistentes, ocasionando deterioração no produto final (BEUCHAT 1986; ENIGL *et al.* 1993).

As espécies de fungos termoresistentes mais comumente envolvidas na deterioração de alimentos são *Byssochlamys fulva*, *Byssochlamys nivea*, *Neosartorya fischeri* e *Talaromyces flavus* (SPLITTSTOESSER 1991; MAGGI *et al.* 1994; TOURNAS 1994). Entre as menos comumente relatadas podem ser citadas espécies pertencentes ao gênero *Eupenicillium* (HOCKING & PITT 1984; TOURNAS 1994).

O primeiro relato extensivo sobre deterioração por fungos termoresistentes foi feito por OLLIVER & RENDLE (1934) que reconheceram ser *B. fulva* o agente causador da deterioração em frutas processadas na Inglaterra. Hoje é reconhecida a distribuição mundial de fungos termoresistentes e vem sendo feitos estudos sistemáticos sobre fontes de contaminação, ocorrência, resistência térmica, crescimento, avaliação da deterioração e produção de metabólitos destes microorganismos, principalmente no que se refere às espécies que ocorrem mais frequentemente.

Embora frutas e seus produtos processados sejam os mais incriminados em deteriorações por fungos termoresistentes, existem relatos provando que vegetais e suas conservas (YATES & FERGUSON 1963; SPOTTI *et al.* 1992; KOTZEKIDOU 1997), leite e derivados (ENGEL & TEUBER 1991) também podem ser deteriorados por estes.

O tomate é a hortaliça mais industrializada no Brasil e possivelmente no mundo, tendo grande valor tanto em termos de produção quanto econômico (MINAMI 1982; BERNHARDT 1994). No Brasil, tem sido constatado nos últimos dez anos nos principais derivados de tomate envasados assepticamente em embalagens cartonadas a contaminação eventual dos produtos por fungos, em circunstâncias e condições diversas que não têm permitido uma clara identificação da origem do problema (FERNANDES 1995), não devendo ser confundido com o aparecimento de colônias de fungos durante a estocagem do produto em geladeira. Este tipo de contaminação se evidencia na abertura da embalagem e, apesar de não representativa em termos

estatísticos, pelo fato de representar um aspecto extremamente desagradável e repulsivo aos olhos dos consumidores, pode vir a prejudicar a imagem de tais produtos junto ao mercado consumidor e também junto aos órgãos de fiscalização.

O mercado de produtos derivados de tomates no Brasil atinge um valor de R\$ 240.000/tonelada/ano e a participação no mercado brasileiro de derivados de tomate envasados assepticamente tem sido de 39 % nos últimos quatro anos. Dada a importância do tomate e de seus produtos termoprocessados, o uso crescente de embalagens cartonadas para produtos de tomate e, levando em conta o número reduzido de estudos relacionando fungos termoresistentes com estes alimentos, foram objetivos deste trabalho : 1) Determinar a ocorrência de fungos termoresistentes durante o processamento asséptico da polpa de tomate envasada em embalagem cartonada; 2) Selecionar a cepa mais termoresistente de fungo detectada; 3) Determinar a resistência térmica em polpa de tomate desta cepa de fungo e comparação com a de *Bacillus coagulans* (alvo comum no estabelecimento do processamento térmico de derivados de tomate) e 4) Avaliar a deterioração que este fungo poderia causar em polpa de tomate.

II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. DETERIORAÇÃO DE ALIMENTOS POR FUNGOS TERMORESISTENTES

1.1 Principais espécies de fungos termoresistentes

1.1.1 Características gerais

- a) *Byssochlamys fulva* e *Byssochlamys nivea* : Os fungos do gênero *Byssochlamys* (sub reino Ascomicotina) são caracterizados pela ausência de cleistotécio, gimnotécio ou qualquer outro corpo que envolvam os ascos durante o desenvolvimento. Os ascos em *Byssochlamys* são produzidos em cachos irregulares abertos, contendo geralmente oito ascosporos em associação (mas não envolvidos) por fragmentos de hifas brancas. Duas espécies de *Byssochlamys* são significantes na deterioração de alimentos : *Byssochlamys fulva* e *Byssochlamys nivea* (PITT & HOCKING 1985). Os ascos usualmente permanecem intactos a menos que sejam submetidos a um tratamento mecânico (SPLITTSTOESSER 1991). O estágio imperfeito (anamorfo) do gênero *Byssochlamys* é constituído pelo gênero *Paecilomyces*, sendo *Paecilomyces fulvus* e *Paecilomyces niveus* os estágios imperfeitos de *B. fulva* e *B. nivea* respectivamente. Existem algumas características que podem ser usadas para distinguir *B. nivea* de *B. fulva* : *Byssochlamys nivea* geralmente forma colônias brancas em Ágar Extrato de Malte (MEA) ou Ágar Czapeck Extrato de Levedura (CYA); é capaz de produzir clamidosporos; seus ascos e ascosporos são de dimensões menores que os de *B. fulva*. Por sua vez, *Byssochlamys fulva* produz colônias marrom amareladas nestes meios e não produz clamidosporos.
- b) *Neosartorya fischeri* : Os ascos em fungos do gênero *Neosartorya* (sub reino Ascomicotina) são produzidos em ascocarpos (cleistotécios) dando à colônia uma aparência granular. A única espécie significativa e reconhecida como deterioradora de alimentos é *Neosartorya fischeri* (PITT & HOCKING 1985). Os ascos podem sofrer ruptura espontânea, de modo que só ascosporos livres são observados (SPLITTSTOESSER 1991). *Neosartorya fischeri* se caracteriza por apresentar colônias de cor branca creme em Ágar Extrato de Malte (MEA), fase anamorfa é do gênero *Aspergillus* (*A. fischeri*) e ascosporos que podem ser lisos ou espinhosos possuindo duas cristas equatoriais (SPLITTSTOESSER 1991). Existem três variedades da espécie *N. fischeri* : *N. fischeri* var. *fischeri*, *N. fischeri* var. *glabra* e *N. fischeri* var. *spinosa* distinguidas pelas ornamentações nos ascosporos. As variedades *glabra* e *spinosa* são comumente isoladas de produtos ácidos termoprocessados, ao contrário da variedade *fischeri* que só é comum no solo (KAVANAGH *et al.* 1963; NIELSEN 1991).

c) *Talaromyces flavus* : O gênero *Talaromyces* (sub reino Ascomicotina) é caracterizado pela produção de gimnotécios brancos ou amarelos em associação com o estado anamórfico característico de *Penicillium*, *Paecilomyces* ou *Geosmithia*. Gimnotécio é o ascocarpo (onde os ascos são produzidos), composto por hifas finas entrelaçadas resultando em uma 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 devido à pigmentação tanto do micélio como dos gimnotécios, todavia existem linhagens que desenvolvem coloração avermelhada. Os ascosporos têm forma elipsoidal e paredes espinhosas. O seu estágio imperfeito é reconhecido como *Penicillium dangeardii*. (PITT & HOCKING 1985; SPLITTSTOESSER 1991). São duas as variedades de *T. flavus* : *T. flavus* var. *flavus* e *T. flavus* var. *macrosporus* sendo que esta última apresenta ascosporos de tamanho maior e menos elipsoidais na forma além de resistência térmica superior (SAMSON 1989).

1.1.2 Distribuição e Fontes de Contaminação

O primeiro estudo sobre incidência de fungos termoresistentes foi realizado na Inglaterra nos anos 30 (OLLIVER & RENDLE 1934) e dirigido às espécies do gênero *Byssochlamys*, reconhecidas unicamente como termoresistentes desde então. Os resultados mostraram que campos e pomares eram a fonte de contaminação inicial de frutas processadas. Uma pesquisa mais extensiva para determinar fontes de contaminação e maneiras de controlar a deterioração de frutas processadas foi executada por HULL (1939) que constatou a presença de *Byssochlamys fulva* em 33 % das folhas e frutos de morangueiro. Ameixas mumificadas, resíduos de framboesa e de frutas presentes em caixas de madeira usadas na colheita também estavam contaminadas com ascosporos de *B. fulva*. Durante muito tempo, pensou-se que *Byssochlamys* estava restrito à Inglaterra. Mais tarde, com o surgimento de relatos de incidência em outros países como Estados Unidos (SPLITTSTOESSER *et al.* 1971), Holanda (PUT 1964), Alemanha (ERCKARDT & AHRENS 1977), Canadá (YATES 1974), Austrália (SPURGIN 1964) foi verificada a distribuição mundial deste gênero de fungo.

Em levantamento sobre a incidência de fungos termoresistentes em pomares e hortas de Nova York, SPLITTSTOESSER *et al.* (1971) encontraram que as maiores populações destes microorganismos estavam no solo e em materiais colhidos do chão, sendo *B. fulva* a espécie mais frequentemente isolada e que, embora não fosse o contaminante dominante de alguns materiais, foi recuperado de todos os tipos de amostras. Entretanto, no hemisfério sul, estudos sobre a incidência de fungos termoresistentes na Nigéria (OKAGBUE 1989; UGWUANY & OBETA 1991) indicaram a predominância de *Neosartorya fischeri*, diferindo, assim, de relatos como os de SPLITTSTOESSER *et al.* (1971) e BEUCHAT & RICE (1979) que mostram

Byssochlamys fulva e *Byssochlamys nivea* como predominantes em países de clima temperado. De acordo com JESENKA *et al.* (1991), ascosporos de *N. fischeri* encontram-se em quantidades significativas no solo, sendo isolado em diferentes partes do mundo.

FRAVEL & ADAMS (1986) realizaram um trabalho de estimativa da distribuição de *Talaromyces flavus* nos Estados Unidos e em países de diferentes partes do mundo. *Talaromyces flavus* foi isolado de solos de 22 entre 33 estados norte-americanos e nos outros 16 países onde foi feita esta investigação. Concluiu-se que *T. flavus* tem uma distribuição mundial tanto em áreas temperadas como subtropicais.

No Brasil, EIROA & AMSTALDEN (1985) estudaram a incidência de *Byssochlamys* em hortas, pomares e vinhedos da região de Campinas. Neste trabalho, foram examinadas duzentas e vinte amostras compreendendo folhas e frutos de laranjeira, tangerina, figueira, pessegueiro, videira, pepino; flores e frutos de morangueiro e amostras de solo. Foram isoladas espécies de *Byssochlamys* de 17.1 % do total de amostras do solo e 1.4 % do total de amostras e 1.4 % do total de amostras de folhas examinadas. Embora não se tenha isolado *Byssochlamys* de frutos e flores, sugeriu-se que sua presença no solo representa um risco potencial para a indústria de produtos ácidos de origem vegetal.

Os estudos sobre incidência de fungos termoresistentes evidenciam que o solo é a principal fonte de contaminação. Assim sendo, frutas e vegetais que têm contato direto com o solo são particularmente mais susceptíveis à contaminação por estes microorganismos.

1.1.3 Ocorrência em alimentos

Fungos termoresistentes vem sendo isolados sistematicamente de alimentos ácidos tanto *in natura* como processados, na sua maioria frutas e produtos derivados. A primeira investigação da ocorrência de fungos termoresistentes foi feita por OLLIVER & RENDLE (1934), onde a deterioração de uma série de produtos de fruta foi atribuída a *B. fulva* como agente causador. Mais tarde, foi detectada a presença de outras espécies de fungos termoresistentes causadoras de deterioração em produtos vegetais ácidos, além de *B. fulva* e *B. nivea*, sendo que *N. fischeri* foi isolada inicialmente de morangos enlatados por KAVANAGH *et al.* (1963) e *Talaromyces flavus* de suco de maçã por VAN DER SPUY *et al.* (1975).

Na Austrália, as matérias primas e respectivos produtos mais contaminados por esporos de fungos termoresistentes são de maracujá e morango, seguidas de abacaxi e manga, ao contrário de produtos cítricos que são raramente incriminados. A

susceptibilidade à contaminação destas frutas se deve ao contato com o solo, uma vez que maracujás são colhidos depois de caírem enquanto que morangos e abacaxis estão próximos do solo e podem ser contaminados através de respingos deste durante as chuvas (HOCKING & PITT 1984).

JESENKA *et al.* (1991) relataram o recebimento em 1989 (Tchecoslováquia) de conservas de frutas deterioradas por fungos que foram fornecidas pelo laboratório de uma planta de processamento para ser feita a identificação destes microorganismos. As cepas mais frequentemente isoladas foram de *Neosartorya fischeri*, *Byssochlamys nivea* e *Talaromyces flavus* correspondendo a 49.2 %, 16.4 % e 20.9 % do total de cepas isoladas respectivamente. SPOTTI *et al.* (1992) realizaram um estudo sobre contaminação de frutas frescas e congeladas no mercado com esporos de fungos termoresistentes. Neste exame, foram isoladas as quatro espécies mais comuns de fungos termoresistentes (*Byssochlamys fulva*, *Byssochlamys nivea*, *Neosartorya fischeri* e *Talaromyces flavus*). As mais altas contaminações por esporos de fungos termoresistentes (13 - 20 esporos / Kg de fruta) foram encontradas nas frutas menores. Entre as frutas congeladas, as cerejas foram as que apresentaram o mais alto nível de contaminação (23 esporos / Kg de fruta). Este estudo foi ainda estendido a produtos semi-processados de frutas e sucos de frutas comerciais, onde foi detectado *Byssochlamys nivea* nos produtos semi processados a níveis superiores a 3 esporos / Kg como em 3 dos 11 sucos examinados nos quais a contaminação mais alta foi de 1 esporo / litro. A tabela 1 mostra algumas referências sobre a ocorrência de fungos termoresistentes em frutas e seus produtos processados.

Os ingredientes de produtos de fruta que tiveram contato com o solo também podem apresentar uma contaminação significativa com esporos de fungos termoresistentes. Como exemplo, pode ser citada a farinha de mandioca que pode ser usada como espessante em pudins de fruta e recheios de torta, frequentemente contém ascosporos de *Byssochlamys* (SPLITTSTOESSER 1991).

Os relatos sobre detecção de fungos termoresistentes em alimentos, além de frutas e derivados, são escassos. YATES & FERGUSON (1963) isolaram *Byssochlamys nivea* de conserva de pepino; SPOTTI *et al.* (1992) isolaram *B. nivea*, *B. fulva* e *T. flavus* de **tomate *in natura***; ENGEL & TEUBER (1991) isolaram *B. nivea* de leite cru, queijo e leite pasteurizado integral; KOTZEKIDOU (1997) isolaram *B. fulva*; *B. nivea* e *N. fischeri* de **massa de tomate**.

Tabela 1 - Ocorrência de fungos termoresistentes em frutas e derivados

Espécie	Produto	Referência
<i>B. fulva</i>	Suco de Maracujá	CARTWRIGHT & HOCKING (1984)
<i>B. nivea</i> <i>N. fischeri</i> <i>T. flavus</i>	Polpa de Morango	ARAGÃO (1989)
<i>B. nivea</i> <i>B. fulva</i> <i>N. fischeri</i>	Polpa de Framboesa	SAMSON <i>et al.</i> (1992)
<i>N. fischeri</i>	Suco de Maçã	SCOTT & BERNARD (1987)
<i>N. fischeri</i> <i>T. flavus</i>	Suco de Abacaxi	ENIGL <i>et al.</i> (1993)
<i>N. fischeri</i>	Concentrado de Abacaxi	TOURNAS & TRAXLER (1994)
<i>N. fischeri</i>	Polpa de Maçã	GUMERATO (1995)
<i>N. fischeri</i>	Mamão	RAJASHEKHARA <i>et al.</i> (1996)
<i>T. flavus</i>	Concentrado de Abacaxi	KING & HALBROOK (1987); ENIGL <i>et al.</i> (1993)

1.1.4 Produção e Ativação de ascosporos

A produção e ativação de ascosporos de fungos termoresistentes são dependentes tanto de fatores genéticos (linhagem do microorganismo) quanto de fatores externos (tempo, temperatura, meio de crescimento ou aquecimento).

A susceptibilidade de alimentos ácidos (suco de frutas e vegetais) como meio de produção de ascosporos de *B. fulva* foi testada por SPLITTSTOESSER *et al.* (1969). Amostras de sucos, isentos de conservantes, foram inoculadas com ascosporos de *B. fulva* e incubadas à 30°C por 32 dias. Todos os sucos favoreceram uma boa ascosporogênese, sendo que os sucos de uva Concord (pH 3.3), ameixa seca (pH 3.9) e abacaxi (pH 3.4) apresentaram uma maior produção de ascosporos ao final do teste. Inversamente, obteve-se para o suco de oxicoco (pH 2.7) a menor contagem de ascosporos entre todos os sucos, provavelmente devido à presença de ácido benzóico, constituinte natural dos oxicocos. A esporulação mais rápida ocorreu no suco de tomate (pH 4.4), no qual a contagem aumentou dos iniciais 400 ascosporos / ml para 51000 ascosporos / ml em apenas 3 dias, enquanto que as contagens mais altas em suco de maçã, laranja e chucrute só foram constatadas no último dia de incubação. Em relação ao suco de oxicoco, BEUCHAT & TOLEDO (1977) constataram que, embora o crescimento micelial de *B. nivea* neste suco tenha sido limitado, a ascosporogênese foi semelhante à obtida com outros sucos de frutas na temperatura de incubação de

30°C por um período de 12 semanas, indicando não haver relação direta entre crescimento micelial e produção de ascósporos por *B. nivea*.

De acordo com BEUCHAT & RICE (1979), as temperaturas de incubação entre 28 e 35°C são ótimas para crescimento e produção de ascósporos de *Byssoschlamys*, mas existem isolados que, se forem incubados abaixo de 30°C em um meio sintético, perdem irreversivelmente a capacidade de formar ascos. PITT & HOCKING (1985) sugerem que é necessária a incubação de culturas de *Byssoschlamys* à 30°C em laboratório para a observação de ascos e ascósporos, já que alguns isolados não produzem ascos à 25°C e 37°C. ENGEL & TEUBER (1991) testaram a influência da temperatura de incubação na produção de ascósporos de *B. nivea* em Ágar Extrato de Malte (MEA) por 21 dias. Encontraram que, nas temperaturas 20°C e 37°C, a produção de ascósporos foi bem menor em relação à produção em 25°C e 30°C, obtendo-se em 30°C o maior número de ascósporos.

CONNER & BEUCHAT (1987a) testaram 7 meios de crescimento e duas temperaturas de incubação (21 e 30°C) quanto à capacidade de produção de ascósporos de três linhagens de *Neosartorya fischeri*. No meio Ágar Acetato de Fowell, cuja única fonte de energia é o acetato de sódio, obteve-se um crescimento muito limitado para as três linhagens do fungo. Entretanto houve ascosporogênese, com ausência ou presença ocasional de fase anamorfa, indicando que a deficiência de nutrientes pode estimular a produção de ascósporos. Nos meios contendo suco de frutas (Ágar suco de maçã e ágar suco de uva), houve crescimento abundante e produção de ascósporos, sendo que em duas linhagens predominou a fase teleomórfica. Nos demais meios, ricos em nutrientes, os fungos produziram crescimento abundante, mas não ocorreu ascosporogênese, apresentando só a fase anamorfa. Verificou-se que a produção de ascósporos é mais rápida à 30°C. A influência do meio de esporulação na ascosporogênese de *T. flavus* foi investigada por BEUCHAT (1988b). Foi verificado que os meios ricos em carboidratos é que favorecem maior produção de ascósporos e que variações na ascosporogênese são dependentes da linhagem do fungo. KING Jr. & WHITEHAND (1990) constataram uma produção de ascósporos abundante para *T. flavus* em ágar extrato de malte (MEA) a 25, 30 e 35°C, mas que era limitada à 20°C.

Uma vez que os ascósporos de fungos termoresistentes são formados, estes desenvolvem uma dormência com o tempo que pode ser quebrada por um tratamento térmico sub-letal chamado de ativação, permitindo a germinação e crescimento em condições favoráveis (BEUCHAT & RICE 1979; BEUCHAT 1986; CONNER & BEUCHAT 1987a; BEUCHAT 1988b; SPLITTSTOESSER *et al.* 1993).

A influência da natureza do meio de aquecimento sobre a taxa de ativação de ascósporos de fungos termoresistentes foi verificada por SPLITTSTOESSER & SPLITTSTOESSER (1977). Neste estudo foi comparado suco de uva 5 °BRIX e água destilada como meios de aquecimento na ativação de *B. fulva* e *Aspergillus (Neosartorya) fischeri*. Os resultados indicaram uma ativação mais rápida com suco de uva para ambos os fungos, sendo mais acentuada para *N. fischeri* na comparação entre os dois meios de aquecimento. Testes posteriores com a mesma linhagem de *N. fischeri* mostraram que o suco de maçã e suco de tomate apresentaram o mesmo efeito estimulante na ativação de ascósporos. SPLITTSTOESSER *et al.* (1993) também constataram uma taxa de ativação maior quando ascósporos de *N. fischeri* eram aquecidos em suco de uva, comparando com água destilada. Da mesma forma que SPLITTSTOESSER & SPLITTSTOESSER (1977), também KOTZEKIDOU (1997) encontrou que a ativação de ascósporos de *N. fischeri* é maior em suco de tomate (16 % sólidos solúveis, pH 4.2) que em tampão fosfato (0.1 M, pH 7).

Em estudo sobre ativação desenvolvido por KATAN (1985), ascósporos de *T. flavus* de diferentes linhagens foram expostos às temperaturas de 50, 53, 70 e 80°C em diferentes tempos no meio caldo batata dextrose. Obteve-se uma boa recuperação de ascósporos à 53°C com o tempo variando entre 15 minutos a 6 horas e 70°C entre 30 minutos e 1 hora de exposição. Já à 50°C foi necessário um tempo mínimo de 3 horas para haver ativação. A exposição à 80°C nos tempos testados (20 e 30 minutos) foi letal para os ascósporos. Foi observado também que os tratamentos de ativação não reduziram a germinação dos ascósporos não dormentes.

BEUCHAT (1986) executou procedimento para se determinar a ativação ótima (tempo / temperatura de aquecimento onde se obtém a recuperação máxima de ascósporos) para *Byssochlamys*, *Neosartorya* e *Talaromyces* em um meio específico de aquecimento. No experimento, foram testadas três linhagens de *T. flavus*, três linhagens de *N. fischeri*, duas linhagens de *B. nivea* e uma linhagem de *B. fulva*. Cem mililitros de tampão fosfato (meio de aquecimento utilizado), ajustado a 70, 75, 80 ou 85°C foi inoculado com 1,0 ml de suspensão de ascósporos determinada. A cada 15 minutos, foram retiradas amostras do meio de aquecimento inoculado sob agitação contínua dentro de um intervalo de 120 minutos. Cada amostra retirada foi diluída em tampão fosfato e plaqueada em superfície no meio Plate Count Ágar contendo corante rosa de bengala (25 µg / ml) e o antibiótico cloranfenicol (100 µg / ml). As placas foram incubadas à 30°C por 4 dias e as colônias contadas e calculadas por ml de tampão fosfato (UFC / ml). Assim, para cada temperatura de aquecimento e cepa de fungo termoresistente foram construídas curvas plotando-se log (UFC /ml) *versus* tempo de aquecimento. Constatou-se que o tempo e temperatura para ativação ótima varia com a linhagem do microorganismo, sendo então, particular para cada cepa testada. As cepas mais termoresistentes de *T. flavus* e *N. fischeri* apresentaram

ativação ótima em 85°C / 15 minutos e 85°C / 15-105 minutos respectivamente. As linhagens de *B. fulva* e *B. nivea* testadas exibiram menor termoresistência que cepas de *N. fischeri* e *T. flavus*, precisando de 70 / 75°C por 30 minutos para ativação, não sobrevivendo aos primeiros 15 minutos à 85°C, ao contrário de outras linhagens de *Byssochlamys* que suportaram este tratamento (BEUCHAT & RICE 1979).

RAJASHEKHARA *et al.*(1996) determinaram a combinação (tempo / temperatura) para a ativação ótima de ascósporos de uma cepa de *N. fischeri* isolada de mamão deteriorado. Cinco frascos de três bocas contendo 100 ml de tampão fosfato (0.1 M, pH 7) sob agitação contínua, ajustados nas temperaturas 70, 75, 80, 85 e 90°C respectivamente, foram inoculados com 1 ml de suspensão de ascósporos deste fungo. A cada intervalo de 15 minutos (dentro de um período total de 75 minutos), amostras eram retiradas e resfriadas imediatamente; diluídas adequadamente e plaqueadas em profundidade com meio PDA. Após 5 dias de incubação à 30°C, as colônias do fungo foram contadas e o número de ascósporos ativados expressos em UFC/ml. A partir destes dados, foi construído o gráfico log(UFC/ml) versus tempo para cada temperatura. A combinação tempo/temperatura que correspondeu a uma maior recuperação dos ascósporos (ativação ótima) foi à 80°C / 30 minutos.

A variação da ativação requerida entre diferentes linhagens de fungos termoresistentes para um determinado meio de aquecimento tem sido demonstrada em diferentes relatos. KING & HALBROOK (1987) encontraram parâmetros de ativação ótimos que eram diferentes para três linhagens de *Talaromyces flavus* em um meio sintético : 12-15 minutos/80°C; 6-8 minutos/85°C e 1-2 minutos/90°C. Segundo SPOTTI *et al.*(1992), não é possível individualizar uma combinação tempo / temperatura de ativação que seja ótima para todas as cepas de fungos termoresistentes isoladas de um alimento.

GOMEZ *et al.*(1989) realizaram um estudo sobre o efeito do tratamento térmico por calor seco na recuperação de ascósporos de *N. fischeri* submetidos à 95°C, 50% de U.R. por 30 e 60 minutos. Os resultados mostraram que o processo de rehidratação dos ascósporos é afetada pela temperatura do meio de recuperação, sendo que à medida que esta temperatura é aumentada, maior é o número de ascósporos recuperados. BEUCHAT (1992) investigou a recuperação de ascósporos de *N. fischeri* e *T. flavus* a partir de frutas em pó ($a_w = 0.23$) em função de tratamentos para ativação térmica (nenhum, 75°C por 15 minutos e 75°C por 30 minutos). Foi observada uma alta viabilidade de ambos os fungos e verificou-se que ascósporos de *N. fischeri* permanecem ativados após processo de secagem e que não necessitam posterior tratamento térmico, ao contrário de ascósporos de *T. flavus* onde a necessidade de ativação diminui à medida que se aumenta o tempo de estocagem evidenciando uma perda de dormência durante este período.

1.1.5 Fatores que afetam a resistência térmica dos ascosporos

A resistência ao calor das espécies de fungos termoresistentes é dependente de vários fatores; entre eles estão a cepa em exame, a natureza do meio de aquecimento, o tratamento térmico aplicado, a idade dos ascosporos, o meio de esporulação entre outros.

a) Variação da resistência térmica entre cepas de fungos termoresistentes

A variação da termoresistência entre linhagens de uma mesma espécie de fungo foi demonstrada para *Byssochlamys fulva* (BAYNE & MICHENER 1979; BEUCHAT & RICE 1979; HATCHER *et al.* 1979; BEUCHAT 1986; KOTZEKIDOU 1997), *Byssochlamys nivea* (BEUCHAT & RICE 1979 ; BEUCHAT 1986; ENGEL & TEUBER 1991; SPOTTI *et al.* 1992; KOTZEKIDOU 1997), *Neosartorya fischeri* (BEUCHAT 1986; CONNER & BEUCHAT 1987a; SPOTTI *et al.* 1992; KOTZEKIDOU 1997) e *Talaromyces flavus* (BEUCHAT 1986; KING & HALBROOK 1987; BEUCHAT 1988a,b ; KING Jr. & WHITEHAND 1990; SPOTTI *et al.* 1992).

Já, a comparação da resistência entre espécies de fungos termoresistentes a um determinado tratamento térmico em um meio de aquecimento definido depende das cepas em estudo. BEUCHAT (1986) encontrou que *T. flavus* é mais resistente que *N. fischeri* e *B. fulva / nivea* nos cinco produtos de fruta testados como meio de aquecimento. HOCKING & PITT (1984) relataram que *N. fischeri* é a espécie fúngica mais termoresistente depois de *B. fulva* e *B. nivea*. SCOTT & BERNARD (1987), comparando a resistência térmica de uma linhagem de *N. fischeri* e uma linhagem de *T. flavus* , constataram que o último era mais termoresistente. ARAGÃO (1989) comparou a resistência térmica de *B. nivea*, *N. fischeri* e *T. flavus* e verificou que *B. nivea* era mais termoresistente. SPOTTI *et al.* (1992) fizeram um estudo preliminar da termoresistência de cepas de *B. nivea*, *N. fischeri* e *T. flavus* isoladas de diversos tipos de fruta. Os resultados mostraram que as linhagens de *N. fischeri* eram mais termoresistentes, seguidas pelas linhagens de *T. flavus* e *B. nivea*. KOTZEKIDOU (1997) comparou a resistência térmica de *B. nivea* (2 linhagens), *B. fulva* (3 linhagens) e *N. fischeri* (4 linhagens). Não foi estabelecido qual era a espécie mais termoresistente, mas que a resistência térmica pode variar muito com a linhagem do fungo.

b) Influência da natureza do meio de aquecimento

A natureza do meio de aquecimento, que compreende pH, teor de sólidos solúveis, tipos de ácidos orgânicos presentes, etc afeta a sensibilidade de ascosporos de fungos termoresistentes à temperaturas elevadas.

O efeito do pH sobre a resistência térmica de ascosporos de fungos termoresistentes vem sendo estudado. SPLITTSTOESSER *et al.* (1974) mostraram que ascosporos de *B. fulva* apresentaram menor sobrevivência para valores de pH abaixo de 3.0, na faixa de 1.4 a 6.0. SPLITTSTOESSER & SPLITTSTOESSER (1977) estudaram o efeito do pH na resistência térmica de *B. fulva* e *N. fischeri* usando suco de uva como meio de aquecimento, com pH ajustado utilizando hidróxido de sódio e ácido tartárico. Encontraram que, em pH 2.5, ambos os fungos apresentaram baixa resistência; *Byssochlamys fulva* mostrou resistência máxima na faixa de pH de 3 a 4 e, acima de 4, este ficou sensível ao calor. Já *Neosartorya fischeri* não mostrou variação significativa de resistência térmica entre 3 a 5.5. BAYNE & MICHENER (1979) constataram que ascosporos de cinco linhagens de *B. fulva* suspensos em meio padrão definido com pH 5 eram mais resistentes que no mesmo meio com pH 3.6. Foi testado também o meio em pH próximo à neutralidade para uma linhagem de *B. fulva*, ocorrendo rápida inativação. CONNER & BEUCHAT (1987a) relataram aumento de resistência térmica para *Neosartorya fischeri* com a elevação do pH do meio de aquecimento. KING Jr. & WHITEHAND (1990) executaram testes de resistência térmica com *T. flavus* em meios de aquecimento sintéticos (glucose 16°B / Ácido Tartárico 0.033M) ajustado a pH 3.6, 5.0 e 6.6. Foi verificado um aumento de resistência com o aumento do pH.

Uma maior quantidade de sólidos solúveis (açúcares, etc) no meio de aquecimento pode exercer um efeito protetor sobre ascosporos de fungos termoresistentes. SPLITTSTOESSER *et al.* (1974) aqueceram ascosporos de *B. fulva* a 85°C por 2 horas em suco de uva Concord de diferentes concentrações de sólidos solúveis. Os sucos de 52°BRIX e 5°BRIX, ambos em pH 4, apresentaram as % de sobreviventes ao final do teste de 60 e 28 % respectivamente. Este mesmo fenômeno foi relatado por SPLITTSTOESSER & SPLITTSTOESSER (1977) para ascosporos de *B. fulva* e *N. fischeri*, sendo que o aumento da resistência térmica em um teor mais elevado de sólidos solúveis foi mais acentuado para *N. fischeri*. BEUCHAT & TOLEDO (1977) relataram que ascosporos de *B. nivea* eram protegidos contra inativação pelo calor quando aquecidos em suco de uva suplementado com sacarose e que esta proteção era proporcional à quantidade de sacarose adicionada. Foi sugerido por estes pesquisadores que a razão do efeito protetor de açúcares não é clara, mas que o diferencial de pressão osmótica entre o meio de aquecimento e os ascosporos aparentemente favorece a resistência à inativação térmica. BEUCHAT (1988b) observou uma proteção de ascosporos de *T. flavus* contra inativação térmica quando

estes eram aquecidos em suco de maçã suplementado com açúcares em concentrações suficientes para reduzir a A_w para 0.96 (60 % de sacarose, 34.5 % de glicose e frutose). Também foi observado que este efeito protetor não era influenciado pelo tipo de açúcar. KING Jr. & WHITEHAND (1990) constataram um aumento de resistência térmica de ascósporos de *T. flavus* à medida que se elevava a quantidade de açúcar em meio sintético.

TOURNAS & TRAXLER (1994) encontraram que ascósporos de *N. fischeri* apresentavam maior resistência térmica em concentrado de abacaxi em comparação com suco de abacaxi, quando ambos eram usados como meio de aquecimento em todas as temperaturas testadas, indicando um efeito protetor no concentrado, possivelmente devido à alta % de sólidos solúveis. RAJASHEKHARA *et al.* (1996) executaram ensaio de termoresistência de ascósporos de *N. fischeri* em suco de manga e suco de uva nas concentrações 10°BRIX (sucos diluídos) e 45°BRIX (sucos concentrados), ambos em pH 4. Em concordância com relatos anteriores, os resultados mostraram uma maior termoresistência do fungo nos sucos concentrados.

A tolerância de ascósporos de fungos termoresistentes aos ácidos orgânicos durante a exposição a altas temperaturas depende do tipo de ácido, da concentração da forma não dissociada deste e do pH do meio de aquecimento.

SPLITTSTOESSER *et al.* (1974) aqueceram ascósporos de *B. fulva* em diferentes soluções de ácidos orgânicos (0.05 M, pH 3) e água destilada (controle) a 85°C durante 3 horas. Os resultados mostraram que os ácidos tartárico, málico e cítrico protegem os ascósporos, ao contrário dos ácidos acético, láctico e fumárico que exercem efeito de sensibilização ao calor. Em teste similar com a mesma espécie de fungo, SPLITTSTOESSER & SPLITTSTOESSER (1977) obtiveram os mesmos resultados. Entretanto, no mesmo teste para *Aspergillus* (*N. fischeri*) não foi encontrada influência dos ácidos orgânicos. Esta última constatação entra em contraste com o relato de CONNER & BEUCHAT (1987a) que verificaram um aumento da inativação térmica de ascósporos de *N. fischeri* com a adição no meio de aquecimento do ácido fumárico, seguido do ácido cítrico, málico e tartárico. Para *T. flavus*, BEUCHAT (1988a) encontrou que os ácidos fumárico, sórbico e benzóico têm efeito letal sobre os ascósporos deste fungo e que os ácidos málico, cítrico e tartárico não são letais, portanto não exercem influência significativa sobre a inativação térmica dos ascósporos. Já, KING Jr. & WHITEHAND (1990) testando a resistência térmica dos ascósporos de *T. flavus* em ácidos cítrico, málico ou tartárico (0.033 M) em meio de aquecimento definido (solução glicose 16°BRIX, pH 5) constataram que as diferenças de ação sobre a inativação térmica para cada ácido não eram estatisticamente significantes.

O pH do meio de aquecimento tem marcada influência na ação de cada tipo de ácido sobre a inativação de ascosporos dos fungos termoresistentes. SPLITTSTOESSER & SPLITTSTOESSER (1977) mostraram que 0.05 % de solução de ácido fumárico em pH 3 produz máxima sensibilização de ascosporos de *B. fulva* quando aquecidos à 85°C por 2 horas, enquanto que é preciso cinco vezes mais deste ácido para produzir o mesmo efeito quando o pH é 3.5 . Este resultado indica que a forma não dissociada é que afeta a resistência térmica . Outros relatos (CONNER & BEUCHAT 1987a, BEUCHAT 1988a) demonstraram que a letalidade produzida por ácidos orgânicos é influenciada simultaneamente pelo pH e pelo tipo e concentração da forma não dissociada do ácido orgânico . Existe também a verificação de que a inativação térmica aumenta à medida que se diminui o pH do meio de aquecimento, independente do ácido utilizado . A adição de ácido fumárico tem a maior influência sobre a inativação térmica de ascosporos de *Byssochlamys nivea/fulva* (SPLITTSTOESSER *et al.*1974; SPLITTSTOESSER & SPLITTSTOESSER 1977), *Neosartorya fischeri* (CONNER & BEUCHAT 1987a) e *Talaromyces flavus* (BEUCHAT 1988a) quando comparado com os outros ácidos orgânicos .

A interação dos fatores pH e concentração de sólidos solúveis na inativação térmica de *Byssochlamys fulva* foi investigada por SPLITTSTOESSER *et al.*(1974). Ascosporos de *B. fulva* foram aquecidos à 85°C por 2 horas em suco de uva Concord nas concentrações 5 e 50 °BRIX ajustados em pH variando entre 1.4 a 6 . Foi verificado nos valores menores de pH (1.4 a 3), resistências térmicas baixas nas duas concentrações, havendo maior sensibilização dos ascosporos no suco concentrado . Entre os valores de pH de 4 a 6, observou-se um aumento de resistência, onde se obteve 34-41 % e 84-88 % de sobreviventes para os sucos à 5 e 50°BRIX respectivamente, nesta faixa mais alta de pH. Em um estudo posterior, foi examinada a resistência térmica dos ascosporos de *B. fulva*, que foram submetidos ao mesmo tratamento térmico usando suco de uva Concord com pH fixo em 3, mas com concentrações de sólidos solúveis variando entre 5 e 54°BRIX. Até 34°BRIX , obteve-se resistências térmicas comparáveis (34-42 % de sobreviventes). Acima desta concentração, entretanto, foi observado um número baixo de sobreviventes. Para explicar estes resultados, os autores sugeriram que deve existir alguma substância no suco de uva Concord que sensibiliza os ascosporos ao calor. O fato deste efeito ser constatado apenas nos sucos mais concentrados levou à hipótese de haver um nível crítico desta substância que influencia a resistência dos ascosporos. Do ponto de vista prático, foi feita a observação de que, quando o pH do suco é aproximadamente 3, os ascosporos de *Byssochlamys* são mais rapidamente eliminados na pasteurização do suco concentrado que no suco simples.

Este tipo de efeito em pH 3 observado para *B. fulva* por SPLITTSTOESSER *et al.*(1974) não ocorre para o fungo *N. fischeri*. SPLITTSTOESSER &

SPLITTSTOESSER (1977) verificaram uma diminuição da inativação térmica para *N. fischeri* em suco de uva Concord com pH aproximadamente 3, à medida que se aumentava a concentração de sólidos solúveis (°BRIX) do suco. Em concordância com este resultado, TOURNAS & TRAXLER (1994) relataram uma maior resistência de *N. fischeri* em suco de abacaxi concentrado (pH 3.4, 42.7°BRIX) que em suco de abacaxi simples (pH 3.45, 12.6°BRIX). Portanto para *N. fischeri*, no caso do pH do suco estar por volta de 3, os ascosporos são mais rapidamente eliminados na pasteurização do suco simples, ao contrário do que foi sugerido por SPLITTSTOESSER *et al.* (1974) para *Byssochlamys*.

Comparações de resistência térmica de ascosporos de fungos termoresistentes em diferentes meios de aquecimento, quando submetidos ao mesmo tratamento térmico foram feitas em diferentes trabalhos. SPLITTSTOESSER *et al.* (1974) encontraram que, após tratamento térmico de 85°C por 3 horas, o número de sobreviventes em suco de maçã (pH 3.2), suco de uva Concord (pH 3.4) e suco de tomate (pH 4.2) eram aproximadamente mil vezes maiores que em suco de uva Vinífera e água destilada. Para *N. fischeri*, SPLITTSTOESSER & SPLITTSTOESSER (1977) obtiveram, após tratamento térmico de 85°C/1 hora, 14, 11, 12 e 0.61 % de sobreviventes em suco de uva Concord (5°BRIX, pH 3.5), suco de maçã (11°BRIX, pH 3.4), suco de tomate (6.6 °BRIX, pH 4.1) e água destilada (controle), respectivamente, indicando que os sucos de frutas e vegetais exercem efeito protetor contra a inativação térmica dos ascosporos. Na comparação da resistência térmica (à 85°C) de *N. fischeri* em tampão fosfato (pH 7) e vários sucos de frutas, RAJASHEKHARA *et al.* (1996) também verificaram uma maior termoresistência nos sucos. KOTZEKIDOU (1997) realizou um estudo de resistência térmica para diferentes linhagens de *B. fulva*, *B. nivea* e *N. fischeri* em tampão fosfato (0.1 M, pH 7) e suco de tomate (16 % sólidos solúveis, pH 4.2) à 85 e 90°C. Observou que a inativação térmica dos ascosporos destes fungos era mais rápida em tampão fosfato que em suco de tomate (sobretudo à 90°C), indicando que certos constituintes do suco de tomate protegem os ascosporos contra o calor.

BEUCHAT (1986) realizou uma investigação da resistência térmica de três linhagens de *Talaromyces flavus*, *Neosartorya fischeri* e *Byssochlamys fulva / nivea* em 5 tipos de recheios de fruta (vacínio, cereja, pera, framboesa e morango). Os dados obtidos mostraram que, entre os produtos, houve pouca diferença de resistência térmica destes fungos, embora as taxas de inativação no produto de vacínio tenham sido levemente inferiores. Considerando os cinco produtos, os valores de D (91°C) para 2 linhagens de *T. flavus* variaram entre 2.9 e 5.4 minutos e, os valores de D (88°C) entre 7.1 e 22.3 minutos. Ascosporos de *N. fischeri* foram considerados menos termoresistentes, apresentando valores de D (91°C) menores que 2.0 minutos e valores de D (88°C) entre 4.2 e 16.2 minutos. As duas linhagens de *B. nivea* e a linhagem de

B. fulva testadas eram consideravelmente menos termoresistentes, uma vez que valores de D maiores que 2.0 só foram obtidos em temperaturas abaixo de 77°C, não sendo, portanto, submetidos a estudos extensivos de resistência térmica da maneira que foi feita para as cepas de *T. flavus* e *N. fischeri*.

CONNER & BEUCHAT (1987a) verificaram uma maior resistência térmica de ascósporos de *N. fischeri* em suco de maçã (12.3°BRIX, pH 3.8) que em suco de uva Concord (16.6°BRIX, pH 3.4) nos diferentes tratamentos térmicos aplicados. SPLITTSTOESSER *et al.* (1974) compararam a resistência térmica de *B. fulva* em suco de uva 5°BRIX e solução 5 % de glicose. O aquecimento à 85°C por 2 horas resultou em 100 % de sobreviventes no suco (nenhuma inativação) e 30 % na solução de glicose. A adição de pequenas quantidades de ácidos orgânicos (tartárico / málico na solução de glicose 5 % aumentou levemente a inativação térmica. Estes estudos demonstram que o efeito protetor de ascósporos ao calor está associado a outros componentes do suco ou produto de fruta, além de açúcares e ácidos orgânicos.

c) Influência da adição de conservantes no meio de aquecimento

A presença de conservantes no meio de aquecimento tende a aumentar os efeitos letais do calor (BEUCHAT & RICE 1979). BEUCHAT (1976) observou que a adição de sorbato de potássio nas concentrações de 50 e 100 ppm em suco de uva estimulou a ativação de ascósporos de *B. nivea* para um tratamento térmico de 70°C por 1 hora enquanto que concentrações mais altas tiveram um efeito letal sobre a resistência térmica de ascósporos. BEUCHAT (1988a) realizou experimento para se determinar os efeitos da adição de sorbato de potássio ou benzoato de sódio sobre ascósporos de duas linhagens de *T. flavus* utilizando-se como meio de aquecimento um produto de vacínio comercial contendo vacínios, açúcar, água, goma lacusta, pectina e cloreto de cálcio (pH 3.46 ; 27.8 % p/v de sólidos solúveis). Para a linhagem menos termoresistente do fungo, observou-se que a presença de sorbato (0.05 %) ou benzoato (0.02 %) e um tratamento térmico de 75°C por 60 minutos agem sinergisticamente na inativação. A adição de 0.10 % de benzoato e aquecimento a 75°C por 30 minutos foi suficiente para inativar todos os ascósporos de *T. flavus* desta linhagem. A outra linhagem, inversamente, não foi afetada pela presença de sorbato ou benzoato em concentrações acima de 0.10 % no meio de vacínio e tratamento de 85°C por mais de uma hora, verificando-se uma ativação dos ascósporos semelhante a que foi observada no controle (sem conservante).

KING *et al.* (1969) investigaram a eficácia da adição de dióxido de enxofre (SO₂) em suco de uva para inativação de ascósporos de *B. fulva*. Encontraram que os valores de redução decimal (D) à 88°C foram 4.5 e 1.6 minutos correspondentes à adição de 90 e 250 ppm de SO₂ respectivamente. Por sua vez, o controle (sem adição

de SO₂) apresentou D (88°C) igual a 8.8 minutos, indicando que o uso de SO₂ influencia significativamente na inativação térmica de ascosporos. Mais tarde, BEUCHAT (1976) observou que SO₂ em concentrações muito baixas (50 ppm) reduziram a termoresistência de *B. nivea*.

SPLITTSTOESSER & CHUREY (1991) mostraram que ascosporos de *Neosartorya fischeri* também são afetados de maneira similar quando aquecidos na presença de baixas concentrações de SO₂. Estes pesquisadores obtiveram que, em solução de ácido tartárico 0.05 M (pH 3.3), a adição de 0, 5, 50 e 100 ppm de SO₂ resultou em D (80°C) de 123, 75, 8.5 e 6.1 minutos respectivamente. Todavia, quando executaram teste semelhante utilizando-se suco de frutas, o efeito do SO₂ foi consideravelmente menor, sendo que, os valores de D à 85°C em sucos livres de SO₂ variaram entre 7.8 e 14 minutos e, 100 ppm de SO₂ nestes, reduziram os valores de D de 50 a 75 %. Para explicar a maior resistência em suco de frutas quando comparada com a obtida em solução de ácido tartárico, foi sugerida a influência de compostos protetores como os açúcares e a possibilidade da presença nos sucos de compostos com o grupo carbonila, que reagem com o SO₂ livre. Dentro deste mesmo trabalho, foi testada a resistência de ascosporos de *N. fischeri* em dois meios de aquecimento (solução de ácido tartárico 0.05 M e suco de uva 5°BRIX) com pH aumentado para 5. Verificou-se que o efeito da sensibilização produzido pelo SO₂ em conjunto com o calor foi pequeno, indicando a grande influência do pH sobre a letalidade do SO₂. Este resultado mostrou também que a forma não dissociada do SO₂ é a responsável pela sensibilização de ascosporos de *N. fischeri* ao calor, uma vez que aumentando o pH para 5, a forma não dissociada do SO₂ é reduzida para 0.059%, aproximadamente.

d) Outros fatores que afetam a resistência dos ascosporos

A influência do meio de esporulação, tempo e temperatura de incubação sobre a formação e resistência térmica dos ascosporos de fungos vem sendo estudada. CONNER & BEUCHAT (1987a) estudaram a influência de três meios de esporulação (Ágar Acetato de Fowell, Ágar suco de uva e Ágar suco de maçã), utilizando-se temperatura de incubação de 30°C sobre a resistência térmica de ascosporos de duas linhagens de *N. fischeri*. Os testes de termoresistência com os ascosporos obtidos a partir destes meios indicaram não haver influência do tipo de meio de esporulação sobre a resistência térmica de ascosporos de *N. fischeri*, embora a produção de ascosporos tenha sido maior em ágar suco de maçã e ágar suco de uva que em ágar acetato de Fowell.

Mais tarde, BEUCHAT (1988b) investigou a influência de nove meios de esporulação e três temperaturas de incubação (21, 25 e 30°C) sobre a resistência térmica de ascosporos de três linhagens de *T. flavus*. Os ascosporos, colhidos após 15

dias de incubação, foram submetidos ao aquecimento de 75°C por 30 minutos em tampão fosfato (pH 7). Em contraste com CONNER & BEUCHAT (1987a), foi verificada a influência do meio de esporulação e temperatura de incubação sobre a termoresistência dos ascósporos formados, sendo que em ágar farelo de aveia e ágar extrato de malte foi produzida a formação mais abundante de ascósporos com a mais alta resistência ao estresse térmico (75°C / 30 minutos).

KING Jr & WHITEHAND (1990) realizaram uma investigação para saber se o crescimento de fungos termoresistentes em meio sólido (neste experimento foi usado ágar extrato de malte) ou líquido (o mesmo meio sem o ágar) influencia na resistência térmica dos ascósporos de *T. flavus* formados. Constataram que a resistência térmica dos ascósporos quando *T. flavus* cresceu em meio sólido era maior que quando cresceu em meio líquido. Foi sugerido pelos autores que esta descoberta pode ser importante porque os fungos termoresistentes que contaminam um produto podem variar em termoresistência dependendo se é na superfície de um líquido, em uma superfície de contato ou no tecido vegetal antes do processamento que estes microorganismos crescem e produzem ascósporos. Em outro teste dentro deste mesmo trabalho, foi verificado o efeito da temperatura de incubação sobre a resistência térmica de ascósporos de *T. flavus*. Para uma das linhagens, testou-se quatro temperaturas de incubação (20, 25, 30 e 35°C). Os resultados mostraram que, nas temperaturas extremas testadas (20 e 35°C) foram produzidos ascósporos mais termoresistentes que nas temperaturas intermediárias sendo que, em 25°C obteve-se ascósporos com resistência térmica mais baixa. Para outras duas linhagens de *T. flavus*, foi feito o mesmo teste para 25 e 30°C, obtendo-se efeito semelhante (maior termoresistência à 30°C). O fato de se ter encontrado uma resistência térmica superior em ascósporos de *T. flavus* produzidos a uma temperatura mais baixa (20°C) contrasta com o relato de BEUCHAT (1988b), que constatou resistência térmica menor para ascósporos da mesma espécie de fungo produzidas à 21°C quando comparadas com temperaturas mais altas (25 e 30°C).

A influência da temperatura de incubação na resistência térmica de ascósporos de *B. nivea* foi demonstrada por ENGEL & TEUBER (1991). Os ascósporos de *B. nivea* foram produzidos nas temperaturas de 20, 25, 30 e 37°C em ágar extrato de malte por 21 dias, sendo verificada uma maior resistência em ascósporos produzidos à 30°C.

CONNER & BEUCHAT (1987b) realizaram um estudo de resistência térmica de ascósporos de *N. fischeri* tendo como variáveis o tempo e a temperatura de incubação. Neste estudo, foi usado como meio de crescimento ágar suco de uva e temperaturas de incubação de 18, 21, 25 e 30°C. Para cada uma destas temperaturas, os ascósporos foram coletados em vários intervalos dentro de 114 dias e testados

quanto à sua resistência térmica, utilizando-se tampão fosfato (pH 7) como meio de aquecimento e tratamentos térmicos de 70, 80 e 85°C nos tempos 30 e 60 minutos. Nas temperaturas 25 e 30°C, observou-se um tempo de maturação menor dos ascosporos (13 dias) além de maior resistência ao decorrer do tempo de incubação. Uma vez que ocorreu a maturação dos ascosporos, os dados obtidos evidenciaram um desenvolvimento de dormência e um aumento de resistência térmica com o tempo de incubação, sendo estes fenômenos constatados em um tempo de incubação mais curto nas temperaturas mais altas (25 e 30°C), seguido por 21°C e mais lentamente em 18°C. No período final (114 dias), o tratamento mais severo (85°C/60 minutos) não conseguiu inativar os ascosporos formados em 21, 25 e 30°C.

O aumento da resistência térmica com o tempo de incubação foi observado para *T. flavus* em estudo feito por BEUCHAT (1988b), que utilizou Ágar Farelo de Aveia e Ágar Extrato de Malte como meios de crescimento para este fungo. O cultivo foi feito à 30°C e os ascosporos foram coletados em 10, 14, 21, 30 e 58 dias. Os resultados indicaram um aumento da resistência térmica ao decorrer do tempo de incubação, sendo obtidos ascosporos mais termoresistentes em Ágar Farelo de Aveia mesmo no período final de teste (58 dias). Um detalhe importante neste caso é que ascosporos de *T. flavus* se desenvolvem mais rapidamente em Ágar Farelo de Aveia, podendo explicar parcialmente a resistência térmica superior obtida neste meio.

TOURNAS & TRAXLER (1994) examinaram o efeito da idade dos ascosporos de *N. fischeri* sobre a resistência térmica. *Neosartorya fischeri* cresceu e produziu ascosporos no meio Ágar Czapeck Extrato de Levedura (CYA) à 30°C durante 1,2,3 e 6 meses de incubação. Em cada um destes tempos de incubação, os ascosporos foram coletados e aquecidos à 88°C em água deionizada por mais de uma hora, sendo retiradas amostras a cada 5 minutos, diluídas apropriadamente, plaqueadas em Ágar Czapeck Extrato de Levedura (CYA), incubadas à 30°C por 10 dias e as colônias contadas. Com estes dados, foram construídas curvas de sobrevivência e calculados os valores de D à 88°C. Foi evidenciado um aumento do valor de D (maior resistência) com o tempo de incubação, em concordância com os estudos de CONNER & BEUCHAT (1987a). Obteve-se, com o tratamento térmico de ascosporos de *N. fischeri* de diferentes idades em água deionizada, valores de D à 88°C entre 7.4 (1 mês de idade) e 15.5 minutos (6 meses de idade).

Existem trabalhos que procuraram correlacionar as características morfológicas e químicas dos ascosporos de fungos com resistência ao calor. BANNER *et al.* (1979) determinaram e compararam a composição química de ascosporos de duas linhagens de *B. fulva* com resistências térmicas diferentes. Encontraram que a linhagem mais termoresistente apresentava uma quantidade superior de ácidos graxos com mais de 20 carbonos. Foi sugerido que a presença de ácidos graxos de cadeia longa nos

ascosporos de *Byssochlamys* pode explicar em parte sua alta resistência, uma vez que estes ácidos graxos não foram anteriormente detectados em esporos de fungos comuns. HATCHER *et al.* (1979) constataram que ascos de culturas mais velhas de *Byssochlamys* têm uma maior espessura de parede, podendo esta característica estar associada com uma resistência térmica mais alta.

A investigação das diferenças morfológicas e de composição química entre ascosporos de *N. fischeri* com diferentes idades foi realizada por CONNER *et al.* (1987). Neste trabalho, foram utilizados ascosporos com 11 e 25 dias de idade, sendo confirmada a maior resistência dos ascosporos mais velhos (25 dias) através de um teste preliminar. Os exames de microscopia eletrônica revelaram que não existem diferenças externas significativas entre ascosporos nas diferentes idades. Todavia, foram constatadas algumas diferenças internas entre eles, particularmente na região de iniciação do tubo de germinação. As determinações de composição química também demonstram que o processo de maturação continua ao decorrer do tempo de incubação, podendo ser relacionado com o aumento progressivo da resistência térmica. A análise de proteínas mostrou que a parte proteica dos ascosporos com 11 dias consistem basicamente de pequenos peptídeos ou aminoácidos, ao contrário dos ascosporos com 25 dias, onde são encontradas proteínas de alto peso molecular. Foi sugerido por estes pesquisadores, então, que ocorre uma síntese proteica com a idade dos ascosporos. A composição de lipídeos e ácidos graxos foi considerada similar, mas não foram encontrados ácidos graxos com mais de 24 carbonos, em contraste com o relato de BANNER *et al.* (1979) sobre a composição química dos ascosporos de *Byssochlamys*. Os níveis de glicerol, manitol e trehalose são maiores nos ascosporos mais termoresistentes, indicando que o abaixamento da atividade de água interna ou estabilização da membrana contribuem parcialmente para o aumento da resistência térmica.

BEUCHAT (1988a) comparou micrografias de ascosporos de três linhagens de *T. flavus* com resistências térmicas diferentes e colhidos entre 11 e 51 dias de incubação. Observou-se que ascosporos da linhagem menos termoresistente desta espécie de fungo eram menores e mais elipsoidais na forma, além de apresentar um grau menor de ornamentação. Na comparação dos ascosporos quanto à idade, não foram evidenciadas diferenças externas entre eles. De acordo com PITT & HOCKING (1985), ascosporos de *T. flavus* com dimensões relativamente pequenas podem ser consideradas de menor resistência térmica e que portanto, *T. flavus* var. *macrosporus*, reconhecido por produzir ascosporos maiores que 5.0 μm , são mais termoresistentes que a variedade *flavus* desta espécie de fungo.

1.1.6 Fatores que afetam o crescimento

O tratamento térmico dado a um alimento deve ser adequado para destruir os fungos termoresistentes sem, contudo, afetar a sua qualidade. Quando isto não é possível deve-se tomar medidas que previnam o desenvolvimento destes microorganismos e a consequente deterioração provocada por eles. Logo, torna-se importante o conhecimento de fatores que afetam o crescimento, sendo que fatores como a atividade de água (a_w), tensão de oxigênio na embalagem e temperatura na qual os produtos vão ser estocados, podem ser manipulados para que seja desfavorecido o crescimento destas espécies de fungos (BEUCHAT & RICE 1979; TOURNAS 1994).

A composição química do substrato influencia a taxa de desenvolvimento dos fungos termoresistentes. RICE *et al.* (1979a) demonstraram que existe uma relação entre variedade e maturidade de pêssegos sobre as atividades metabólicas de *B. fulva*. Estes pesquisadores verificaram que *B. fulva* cresce mais rápido em pêssego maduro da variedade "Babygold", sendo esta constatação relacionada com sua baixa acidez e pH levemente mais alto. BEUCHAT & RICE (1979) consideram, entretanto, que o controle da deterioração pela escolha da matéria prima com uma determinada composição química não é uma boa medida do ponto de vista prático.

O retardamento da germinação e crescimento dos fungos termoresistentes pelo abaixamento da atividade de água (a_w) do meio de crescimento através da adição de solutos específicos como os açúcares é reconhecido através de diferentes estudos. A atividade de água mínima para que o crescimento e as atividades metabólicas destes microorganismos ocorram depende de uma série de fatores como disponibilidade de nutrientes, pH, temperatura de incubação, cepa do fungo e natureza do soluto utilizado para controle (BEUCHAT & RICE 1979; NIELSEN *et al.* 1988; TOURNAS 1994).

BEUCHAT & TOLEDO (1977) investigaram a influência da atividade de água sobre a germinação e crescimento de *B. nivea* em sucos e nectares de frutas suplementados com diferentes concentrações de sacarose nas temperaturas de incubação de -30, 7, 21 e 30°C. Nenhum crescimento foi observado em -30 e 7°C no período teste de incubação (12 semanas). Foi constatado que, a menor atividade de água para crescimento de *B. nivea* nos produtos suplementados com sacarose foi de 0.90. Obteve-se esta atividade de água em néctar de pêssego e suco de ameixa seca pela adição de 40 g de sacarose por 100 ml de produto. A germinação dos ascosporos e o desenvolvimento das colônias de *B. nivea* ocorreu bem mais rápido em 30°C que 21°C. Em um outro teste, foi adicionada sacarose em ágar suco de uva a uma taxa de 10 g/100 ml (0-60 g/100 ml). As placas com estes meios suplementados com sacarose foram inoculadas com ascos de *B. nivea* ativados à 70°C por 1 hora e incubados à 30°C por um período de 12 dias. Nos meios com até 30 g de sacarose adicionada por

100 ml, o número de colônias obtidas foi praticamente o mesmo no fim do período de incubação. Com 40 g de sacarose / 100 ml, a formação de colônias foi reduzida em 80 % e, com 60 g de sacarose / 100 ml, nenhuma colônia foi detectada em 12 dias de incubação.

OLLIVER & RENDLE (1934) fizeram uma estimativa da quantidade máxima de sacarose tolerada por *B. fulva* em Ágar Batata Dextrose, Ágar Czapeck 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 substituição de sacarose por maltose, glucose ou frutose. Por outro lado, NIELSEN *et al.* (1988) verificaram que, a uma dada a_w , sacarose produz um efeito inibitório maior que glucose ou frutose no crescimento de *N. fischeri* em Ágar Czapeck à 25°C.

O menor valor de atividade de água relatado para crescimento de *Byssochlamys spp.* é 0.84 (BEUCHAT & RICE 1979; CORRY 1987; FRISVAD & SAMSON 1991; TOURNAS 1994). No caso de *Neosartorya fischeri* é 0.915. Uma atividade de água relativamente baixa em um alimento susceptível aos fungos termoresistentes aumenta a sua preservação. Produtos com a_w s mais altas devem ser estocados à temperaturas baixas, talvez menores que 10°C para evitar que ascósporos sobreviventes ao tratamento de pasteurização germinem. O abaixamento da atividade de água e a utilização de temperaturas baixas de estocagem têm ação sinérgica na conservação de alimentos termoprocessados (BEUCHAT & RICE 1979; NIELSEN *et al.* 1988).

A faixa de pH em que os fungos termoresistentes podem crescer em um dado meio é bastante ampla. *Byssochlamys spp.* cresce em substratos nutrientes com pH variando entre 2 e 9, sendo que o pH ótimo para crescimento está por volta de 3. *Neosartorya fischeri* cresce bem em pHs entre 3 e 7.95. Portanto, a manipulação do pH como medida para inibir o crescimento destes fungos nos produtos alimentícios seria inviável pois só em valores extremos de pH (não adequados para alimentos) isto ocorre (TOURNAS 1994).

Uma característica inerente às espécies de *Byssochlamys* e *N. fischeri* é a capacidade de sobreviver em baixas tensões de oxigênio. KING *et al.* (1969) relataram que houve o crescimento de *B. fulva* em meio sintético sob uma atmosfera contendo 0.27% de O₂, mas não em condições estritas de anaerobiose. Outros pesquisadores (YATES & FERGUSON 1963; YATES *et al.* 1967) revelaram que *B. nivea* era capaz de se desenvolver em baixos níveis de O₂ e em atmosferas com altos teores de CO₂. NIELSEN *et al.* (1989) avaliaram o crescimento de *N. fischeri* em atmosferas com níveis de O₂ variando entre 0.0095 e 20.9 %, usando-se como meio Ágar Czapeck ajustado nos pHs 3.5 e 7 e incubado à 25°C no período de 38 dias. Os resultados mostraram que *N. fischeri* é capaz de crescer na presença de atmosferas com 0.10 %

de O₂ . Não ocorreu crescimento em 0.0095 % de O₂ ou em puro Nitrogênio (menos de 10 ppm de O₂) dentro de 38 dias de incubação . Em pH 7, a taxa de crescimento deste fungo foi maior que no meio com pH 3.5 . Estes resultados contrastam com afirmações feitas por CARTWRIGHT & HOCKING (1984) e PITT & HOCKING (1985) que atribuíram somente a *Byssochlamys spp.* a capacidade desenvolvimento em baixas tensões de O₂ . KING Jr. & WHITEHAND (1990) demonstraram que *Talaromyces flavus* é menos tolerante a baixos níveis de oxigênio que *Byssochlamys spp.* e *N. fischeri*. Em uma câmara com gás nitrogênio fluente, (presença de 250 ppm de O₂, à 25°C) não houve crescimento de *T. flavus* após 56 dias, enquanto que *Byssochlamys fulva* e *Neosartorya fischeri* desenvolvem colônias sob as mesmas condições.

Atmosferas com níveis de oxigênio que impedem o desenvolvimento de fungos termoresistentes não são letais para estes microorganismos, uma 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).

A influência da temperatura sob o desenvolvimento de fungos termoresistentes vem sendo investigada . OLLIVER & RENDLE (1934) relataram que a temperatura ótima para crescimento de *Byssochlamys* estava entre 30 e 37°C, em concordância com ROLAND *et al.*(1984) e ROLAND & BEUCHAT (1984). Verificou-se também que a estocagem à temperaturas baixas (-12 à -7°C) inibe o crescimento mas não mata *Byssochlamys* . ERCKARDT & AHRENS (1977) estudaram a sobrevivência de conídios e ascósporos de *B. fulva* em água destilada à -18°C durante 34 semanas . Foi observado um efeito letal sobre os conídios mas não sobre os ascósporos . Sobre o comportamento de ascósporos de *B. nivea* em sucos e néctares suplementados com sacarose, BEUCHAT & TOLEDO (1977) sugeriram que as temperaturas 7 e -30°C que foram testadas têm um efeito letal sobre os ascósporos de *B. nivea* , mas a adição de sacarose nestes produtos de fruta tendem a proteger os ascósporos da morte .

BEUCHAT (1986) executou um estudo de vida de prateleira ("Shelf Life") em recheios de fruta que foram inoculados com *N. fischeri* e *T. flavus* e incubados nas temperaturas 10 e 25°C . Na temperatura de 25°C, foram encontradas colônias de ambos os fungos nos produtos em 3 dias de incubação . Quando os recheios de fruta foram estocados à 10°C, foi observado crescimento de *T. flavus* após 28 dias de incubação, enquanto que colônias de *N. fischeri* apareceram somente após 65 dias . Trabalhando com *N. fischeri*, NIELSEN *et al.* (1988) também verificaram que a diminuição da temperatura de incubação ou estocagem prolonga a fase lag e diminui a taxa de crescimento . Placas com Ágar Czapeck foram inoculadas com este fungo e

incubadas à 15, 21, 25, 30 e 37°C. As temperaturas ótimas para crescimento (maior produção de biomassa) foram encontradas como sendo 30 e 37°C.

O crescimento de fungos termoresistentes pode ser controlado através da estocagem de alimentos a baixas temperaturas ; todavia a inativação dos ascosporos a estas temperaturas não é assegurada (BEUCHAT & RICE 1979; TOURNAS 1994). A seleção de uma temperatura de refrigeração para controle da deterioração causada por estes microorganismos depende da vida de prateleira requerida para o produto, custos referentes à estocagem nesta temperatura, entre outros fatores (BEUCHAT 1986).

1.1.7 Efeitos da Contaminação

As alterações provocadas por fungos termoresistentes em produtos processados caracterizam-se principalmente pela eventual presença de micélio e desintegração progressiva no caso de substrato sólido . Na ocasional produção de gases por estes microorganismos, pode ocorrer um leve estufamento das embalagens .

Os primeiros estudos sobre os efeitos da contaminação de alimentos por fungos termoresistentes foram realizados por OLLIVER & RENDLE (1934), que examinaram polpas e conservas de frutas infectadas por *Byssochlamys fulva* . O sinal mais evidente da deterioração por este fungo era o amolecimento da fruta com posterior desintegração . Verificou-se que as conservas de frutas alteradas tinham uma aparência que sugeria um superprocessamento (cozimento excessivo) ou a utilização de frutas muito maduras como matéria prima, sendo detectado odores desagradáveis e leve acidificação dos produtos. A constatação da alteração de frutas processadas só pode ser feita com a abertura das embalagens, uma vez que a eventual produção de gás não produziu estufamento nas mesmas .

Em experimento desenvolvido por RICE *et al.*(1977a), pêssegos enlatados de duas variedades e diferentes graus de maturidade foram inoculados com *B. fulva* e incubados à 30°C por 2, 5, 8 e 16 dias, sendo feitas determinações de sólidos solúveis, sólidos totais, pH, acidez, pectina solúvel e textura em cada um destes períodos. Os dados obtidos indicaram que *B. fulva* é capaz de crescer neste produto, causando mudanças significativas na sua composição. O pH e a acidez das conservas de pêsego variaram pouco durante o teste. O aumento da pectina solúvel ao longo do período de incubação foi correlacionado com o amolecimento progressivo dos frutos . Para explicar o decréscimo de sólidos solúveis e totais nas conservas após 4 dias de incubação, sugeriu-se que o fungo utiliza a sacarose e converte constituintes do pêsego em substâncias voláteis. Mudanças na textura foram verificadas nos pêsegos inoculados quando comparados com os controles. O crescimento e a taxa de

deterioração foram mais aceleradas em pêssegos maduros, que tinham a acidez mais baixa e a % inicial de sólidos solúveis mais alta.

Em produtos solidificados como géis de frutas, os fungos termoresistentes causam deterioração pelo crescimento (produção de colônias visíveis) na superfície do produto e pela solubilização da pectina ou amido do substrato. Mas, em algumas situações, a quantidade de crescimento fúngico é tão limitada que colônias ou mesmo fragmentos miceliais não podem ser detectados. Por exemplo, em um caso de deterioração provocada por *Byssochlamys* em recheio de torta de limão, houve a solubilização do gel de amido, mas nenhum micélio tinha sido encontrado (HOCKING & PITT 1984; SPLITTSTOESSER 1991).

Em embalagens contendo baixos níveis de oxigênio atmosférico, também ocorre o amolecimento extensivo das frutas processadas pela ação de *Byssochlamys*, embora haja a formação de pequena quantidade de micélio (OLLIVER & RENDLE 1934). No caso de produtos líquidos infectados com este gênero de fungo e sob baixas tensões de oxigênio, a fermentação aparentemente ocorre, com produção de CO₂, causando visível estufamento nas embalagens e deterioração. (HOCKING & PITT 1984).

ARAGÃO (1989) avaliou a deterioração em suco de morango causada por *B. nivea*, *N. fischeri* e *T. flavus*. Tubos de ensaio contendo suco de morango foram inoculados com ascósporos ativados de *B. nivea*, *N. fischeri* e *T. flavus* e incubados à 30°C por 6 semanas, sendo que o teste foi realizado em duplicata, com dois tubos com uma camada de vaspar estéril e dois tubos sem a adição de vaspar para cada espécie de fungo. Em condições de aerobiose (tubos abertos) foi observado o crescimento destes fungos (presença de micélio) em 3 dias de incubação. A única espécie que apresentou crescimento em tubo selado e produção de gás foi *B. nivea*. Nenhuma das espécies produziu alterações de pH no suco e a alteração de cor deste só foi constatada para *B. nivea* e *T. flavus*.

1.1.8 Produção de Metabólitos

1.1.8.1 Produção de Enzimas

Os fungos termoresistentes excretam vários tipos de enzimas, estando entre elas as enzimas pectinolíticas e amilolíticas, relacionadas com o efeito de desintegração progressiva produzidas em frutos deteriorados por estes microorganismos (BEUCHAT & RICE 1979; TOURNAS 1994). A produção de outros tipos de enzimas como lipases (CHANDLER & KLOSTMEYER 1983; KU & HANG 1994) e enzimas proteolíticas semelhantes à renina (REPS *et al.* 1969; CHU *et al.* 1973) também foram relatados.

A primeira demonstração da produção de enzimas pectinolíticas por *Byssochlamys spp.* foi feita por OLLIVER & RENDLE (1934), sendo mais tarde verificada a produção de diferentes tipos de enzimas pectinolíticas por este gênero de fungo e que, esta produção varia com o substrato e isolado utilizados. Existem suspeitas de que *T. flavus* e *N. fischeri* também produzem estas enzimas, uma vez que frutos contaminados com estes fungos sofrem a desintegração textural (TOURNAS 1994).

HANG & WOODAMS (1993, 1994) relataram que *B. fulva* e *T. flavus* produzem a enzima glucoamilase. *Talaromyces flavus* excretou glucoamilase que exibiu atividade máxima à 50°C na faixa de pH de 4.0 à 4.8. A glucoamilase produzida por *B. fulva* exibiu atividade máxima na mesma temperatura e faixa de pH semelhante (50°C; pH 4.0 à 5.2).

A aplicação industrial de enzimas secretadas por fungos termoresistentes tem sido sugerida por diferentes pesquisadores. KOTZEKIDOU (1991), estudando a produção de enzimas pectinolíticas por uma linhagem de *B. fulva* em meios fermentativos definidos, detectou apenas atividade da enzima polygalacturonase, indicando uma possível aplicação em casos onde apenas um tipo de enzima pectinolítica é necessária. HANG & WOODAMS (1993) sugeriram que a glucoamilase produzida por *T. flavus* pode ter valor comercial na conversão da suspensão de amido em xaropes com alto teor de glucose à temperaturas elevadas evitando, assim, o risco de contaminação microbiana. KU & HANG (1994) examinaram a produção e algumas propriedades da lipase excretada por *B. fulva* e, através dos resultados obtidos, concluíram que existe um potencial para o uso de lipase produzida por este fungo na transformação de lípidos de baixos custos em ácidos graxos livres, que são de grande valor comercial.

1.1.8.2 Produção de Micotoxinas

Além de provocarem alterações em alimentos, os fungos termoresistentes podem produzir diferentes metabólitos secundários tóxicos, entre os quais estão a patulina, o ácido bisoclâmico, byssotoxina A, assimetrina e variotina (*Byssochlamys fulva* / *Byssochlamys nivea*); terreína, verruculogena, fumitremorginas A, B, C, fischerina (*Neosartorya fischeri*). O estudo com animais de laboratório demonstram que todas estas substâncias são altamente tóxicas e algumas vezes carcinogênicas. Contudo, os riscos à saúde do homem pela ingestão de alimentos contaminados por estas não foram extensivamente investigados (NIELSEN *et al.* 1988; TOURNAS 1994).

A patulina é uma micotoxina produzida por espécies do gênero *Aspergillus* (*A. clavatus*, *A. terreus*), *Penicillium* (*P. urticae*, *P. expansum*) e *Byssochlamys* (*B. fulva*,

B. nivea) (TOURNAS 1994). Os ensaios toxicológicos feitos com animais tem mostrado que este composto apresenta propriedades mutagênicas, carcinogênicas e teratogênicas. Entretanto a susceptibilidade do homem a esta micotoxina não está totalmente esclarecida (HOPKINS 1993).

RICE *et al.* (1977b) avaliaram a capacidade de 10 linhagens de *B. fulva* e 3 linhagens de *B. nivea* quanto à produção de patulina em um meio sintético. Encontraram que duas linhagens de *B. fulva* e todas as três linhagens de *B. nivea* produzem esta micotoxina. Dentro deste mesmo trabalho, 13 sucos de frutas processados foram inoculados com uma das linhagens de *B. fulva* produtora de patulina e incubados à 25°C por 14 dias, quando foram feitas as determinações quantitativas deste composto nos sucos. Os resultados mostraram que foi produzida patulina em todos os sucos testados, com exceção do suco de ameixa seca (pH 3.88, 18.3 % Sólidos Solúveis) e de tomate (pH 4.22, 4.8 % Sólidos Solúveis), quando foi levantada a hipótese de instabilidade da micotoxina nestes dois sucos. O fato de não se ter encontrado patulina no suco de tomate confirma os resultados de FRANK *et al.*(1977) que não detectaram produção de patulina em tomate infectado por *Byssochlamys nivea*.

A produção de patulina por *Byssochlamys* é favorecida em temperaturas relativamente baixas, independente da quantidade de biomassa produzida. RICE *et al.*(1977b) estudaram o efeito da temperatura de incubação sobre o crescimento e produção de patulina por *B. fulva* em suco de uva Concord. As temperaturas de incubação testadas foram 18, 25, 30 e 38°C com análises de produção de patulina em vários períodos. A maior quantidade de patulina foi produzida à 18°C, após 25 dias aproximadamente, enquanto que as maiores produções de biomassa foram constatadas à 25 e 30°C. Resultados semelhantes foram obtidos por outros pesquisadores (ROLAND & BEUCHAT 1984; ROLAND *et al.*1984) que encontraram maior produção de patulina por *B. nivea* em suco de maçã e de uva à 21°C (máxima concentração atingida em 20 dias) que em 30 e 37°C. À 37°C, a quantidade máxima de patulina foi atingida em 6 dias, havendo logo depois um declínio.

Algumas linhagens de *Neosartorya fischeri* são capazes de produzir fumitremorginas (A,B,C) e verruculogena, compostos estes causadores de tremores, convulsões e morte em animais de laboratório, sendo a verruculogena o composto considerado de maior toxicidade (NIELSEN *et al.*1988; TOURNAS 1994).

A influência das condições ambientais sobre a produção de fumitremorginas A e C e verruculogena por *N. fischeri* em Ágar Czapeck Extrato de Levedura (CYA) foi investigada por NIELSEN *et al.*(1988). Verificou-se que o crescimento do fungo está sempre associado à produção destas micotoxinas, sendo que verruculogena foi produzida em maior quantidade, seguida por fumitremorgina A e fumitremorgina C. As

temperaturas ótimas para a produção de verruculogena e fumitremorginas A e C (em CYA, pH 7.0) foram 25, 30 e 37°C respectivamente. A presença de luz aumenta a produção de fumitremorginas (em CYA, pH 7.0, 25°C), entretanto, não se compara ao aumento significativo produzido pela adição de açúcares como glucose, frutose ou sacarose ao meio de crescimento (CYA, pH 3.5, 25°C). A atividade de água ótima e mínima para crescimento do fungo e produção de fumitremorginas varia com o soluto empregado para controle, sendo que, a uma dada atividade de água, sacarose exerceu maior efeito inibitório quando comparado com glucose e frutose.

Posteriormente, NIELSEN *et al.* (1989a) investigaram o efeito simultâneo do pH (2.5, 3.5 e 4.5) e presença de ácidos orgânicos normalmente presente em frutas (ácidos tartárico, málico, cítrico) em diferentes concentrações (em meio CYA, 25°C) sobre a produção de fumitremorginas A e C e verruculogena por *N. fischeri*. Foi demonstrado que o pH, tipo e concentração de ácido orgânico geralmente têm influência sobre a quantidade de micotoxinas produzidas. Em pH 2.5, a síntese de micotoxinas foi promovida pelos três ácidos testados. Em um outro trabalho (NIELSEN *et al.* 1989b) foi examinada a formação de micotoxinas por *N. fischeri* (CYA, 25°C) em atmosferas com diferentes tensões de oxigênio. Foi constatada uma produção de fumitremorginas A e C e verruculogena em atmosferas contendo 3.0 % e 20.9 % de O₂ (ar). Entretanto esta produção foi significativamente reduzida nas tensões mais baixas de O₂ (1.0 % e 0.10 %).

1.2 Outras espécies de fungos termoresistentes

Outras espécies de fungos termoresistentes podem, ocasionalmente, estarem envolvidas na deterioração de alimentos. Entre estas espécies estão incluídas *Eupenicillium spp.*, *Talaromyces trachyspermus*, *Talaromyces wortmanii*, *Talaromyces emersonii*, *Eurotium herbariorum*, espécies de *Penicillium* formadoras de esclerócios e *Aspergillus fumigatus*. Da mesma maneira que os fungos termoresistentes mais frequentemente isolados, o solo é a principal fonte de contaminação de vegetais no campo.

Eupenicillium se caracteriza pela produção de cleistotécios macroscópicos (100 - 500 µm), de forma esférica a ovóide, com paredes lisas e, frequentemente de cor brilhante, estando em associação com um anamorfo do gênero *Penicillium*. Em muitas espécies, os cleistotécios tornam-se rígidos assim que se desenvolvem, podendo permanecer desta maneira por várias semanas ou meses até a maturação a partir do centro fornecendo grande número de ascos com oito ascosporos cada (HOCKING & PITT 1984; TOURNAS 1994). De acordo com o experimento de SAMSON *et al.* (1992), houve dificuldades quanto ao cultivo e identificação de isolados pertencentes ao gênero *Eupenicillium* devido a uma baixa produção de ascosporos ou mesmo a ausência em um tempo de incubação superior a 6 semanas. São escassos os

relatos sobre a ocorrência de fungos deste gênero em alimentos; entretanto podem ser destacados os seguintes isolamentos : *Eupenicillium javanicum* e *Eupenicillium euglaucum* isolados de polpa de morango (ARAGÃO 1989), *Eupenicillium brefeldianum* e *Eupenicillium lapidosum* de polpa de framboesa (SAMSON *et al.* 1992), *Eupenicillium brefeldianum* de suco de maçã (VAN DER SPUY *et al.* 1975), *Eupenicillium spp.* de suco de frutas (HOCKING & PITT 1984; PITT & HOCKING 1985).

Ao contrário de *T. flavus*, outras espécies de *Talaromyces* raramente são incriminadas como contaminantes ou deterioradoras de alimentos. Todavia, como exemplos de ocorrência destas espécies podem ser citados : *T. bacillisporus* em sucos de frutas (PITT & HOCKING 1985), *T. trachyspermus* e *T. wortmanii* em polpa de morango (ARAGÃO 1989), *T. emersonii* em polpa de framboesa (SAMSON *et al.* 1992), *T. trachyspermus* em suco de abacaxi (ENIGL *et al.* 1993).

SPLITTSTOESSER *et al.* (1989) investigaram a termoresistência de um fungo filamentoso xerofílico isolado de geleia de uva, que foi identificado como *Eurotium herbariorum*. Segundo este estudo, *E. herbariorum* tem um crescimento ótimo em meio contendo 40 a 60 % de sacarose e, como no caso de outros fungos termoresistentes, os seus ascosporos necessitam de ativação térmica para germinar e se desenvolver em um dado substrato. O aumento da quantidade de sólidos solúveis no meio de aquecimento protegem os ascosporos contra inativação térmica . Em suco de uva 5°BRIX , os valores de D (70°C) e Z foram 2.5 minutos e 9.1°C enquanto que em suco de uva 65°BRIX os valores de D(70°C) e Z foram 5.2 minutos e 7.1°C. O efeito do aumento de resistência térmica dos ascosporos com a idade é bem menor em comparação com outros fungos termoresistentes. A adição de concentrações baixas de ácido sórbico e ácido fumárico no meio de aquecimento afetam pouco a resistência térmica dos ascosporos .

A sobrevivência de fungos ao tratamento de pasteurização devido à formação de esclerócios foi constatada por WILLIAMS *et al.* (1941), que relataram a deterioração de vacinio enlatado por *Penicillium lapidosum* . Mais tarde, foi verificada que esta espécie era capaz de produzir uma fase perfeita (*Eupenicillium*) (HOCKING & PITT 1984).

Uma outra espécie que merece destaque é *Aspergillus fumigatus*, isolado ocasionalmente de alimentos *in natura* ou processados. Existe a hipótese de que algumas linhagens de *A. fumigatus* sejam linhagens de *Neosartorya fischeri* que perderam a capacidade de formar ascos (SPLITTSTOESSER *et al.* 1971). ARAGÃO (1989) encontrou que, 13.3 % do total de cepas de fungos termoresistentes isoladas de polpa de morango pertenciam à espécie *Aspergillus fumigatus* . Em exame de amostras de conservas e sucos de frutas deterioradas por fungos em 1989, JESENKA

et al.(1991) constataram uma frequência de isolamento para *A. fumigatus* de 1.5 %. GUMERATO (1995) isolou *A. fumigatus* de polpa de maçã.

1.3 Cinética de inativação

Grande parte dos microorganismos apresentam uma taxa de inativação térmica logarítmica, ou seja, é obtida uma linha reta quando se constroi a curva de morte plotando-se logaritmo do número de sobreviventes *versus* tempo de aquecimento a uma dada temperatura (KING Jr. *et al.* 1979). A curva de inativação térmica exibida pelos fungos termoresistentes é não logarítmica, apresentando um “ombro” no início, seguido de uma taxa de morte acelerada (parte logarítmica da curva). À medida que a temperatura de inativação aumenta, a fase “lag” ou “ombro” vai diminuindo, ficando a curva semelhante a uma reta (KING Jr. *et al.* 1979; BAYNE & MICHENER 1979; KING & HALBROOK 1987; KING Jr. & WHITEHAND 1990; KOTZEKIDOU 1997).

A medida da resistência térmica de microorganismos (células ou esporos) que seguem uma taxa de morte logarítmica é feita pela determinação dos parâmetros “D” (tempo requerido a uma dada temperatura para destruir 90 % da população de microorganismos em um meio de aquecimento definido) e “Z” (graus de temperatura requeridos para ocasionar uma variação de 10 vezes no valor de D). ALDERTON & SNELL (1970) introduziram uma metodologia de linearização para o mesmo tipo de curva de morte daquela exibida pelos fungos termoresistentes, permitindo que se calcule parâmetros análogos a “D” e “Z” da curva logarítmica.

Grande parte dos dados referentes a parâmetros cinéticos para fungos termoresistentes existentes na literatura foram calculados tomando-se a porção linear da curva de morte, obtendo-se assim, D e Z pelo método utilizado para uma curva logarítmica. Entretanto, BAYNE & MICHENER (1979) e ARAGÃO (1989) 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 se emprega o método de linearização da curva (ALDERTON & SNELL 1970) para obtenção dos parâmetros cinéticos, em uma comparação com o cálculo utilizando somente a porção linear da curva.

Pelo método de ALDERTON & SNELL (1970), a linearização da curva de sobreviventes é dada pela seguinte equação :

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

onde :

N_0 = número inicial de ascosporos / ml

N = número de sobreviventes após um tempo t de tratamento térmico a uma temperatura definida

a = expoente para linearização

k = constante de taxa de morte (coeficiente angular da curva linearizada)

C = constante e intercepto da curva linearizada.

O valor de “ 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 e podendo ser aplicado na linearização das demais curvas. Se a taxa de morte seguir exatamente a equação 1 e não houver erros experimentais, “ C ” seria zero. Assim, o valor de “ $1/k$ ” é derivado da equação 2 :

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

Esta, por sua vez, é similar à equação da curva logarítmica, quando $a = 1$ (equação 3) :

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

Por analogia das equações 2 e 3, “ $1/k$ ” é um parâmetro equivalente a “ D ”. O parâmetro equivalente a “ Z ” (Z^*) pode ser obtido invertendo-se o valor do coeficiente angular da curva - $(\log k)$ versus Temperatura.

1.4 Controle da deterioração por fungos termoresistentes

Para o controle de fungos termoresistentes em produtos derivados de vegetais é fundamental a adoção de boas práticas de higiene e sanificação da planta, sabendo que os principais veículos de contaminação por estes microorganismos são o solo e matéria prima já em decomposição que pode contaminar frutos sadios (EIROA & AMSTALDEN 1985; EIROA 1989; MAGGI *et al.* 1994). Então, os mais importantes pontos críticos no controle de fungos termoresistentes são matéria prima e as primeiras fases do processamento (lavagem e seleção) (SPOTTI *et al.* 1992).

Segundo HOCKING & PITT (1984), a etapa de lavagem de frutos lisos deve ser feita cuidadosamente com solução de hipoclorito (aproximadamente 100 ppm). Já frutos rugosos (onde é mais difícil a eliminação de ascosporos) devem ser destinados à elaboração de produtos que serão mantidos sob refrigeração, não havendo deterioração por fungos termoresistentes devido à baixa temperatura de estocagem.

JESENKA *et al.* (1991) fizeram as seguintes recomendações para o controle de *Neosartorya fischeri* e, por extensão, de outros fungos termoresistentes na indústria de processamento vegetal : 1) Os equipamentos da planta devem estar protegidos do

contato com o solo e a poeira; 2) A matéria prima deve ser cuidadosamente limpa (removidos os resíduos do solo); 3) Após lavagem, a água de lavagem deve ser imediatamente removida; 4) Toda atenção deve ser voltada para qualquer fator (no sentido de evitá-lo) que possa influir em uma possível contaminação da matéria prima e áreas do processamento por solo e poeira.

Particularmente no caso de derivados de frutas, a adição de pequenas quantidades de conservantes (normalmente benzoato de sódio e/ou sorbato de potássio) nas suas formulações aumenta a efetividade da pasteurização (aumenta taxa de inativação dos ascosporos) e retarda a germinação de ascosporos que possam vir a sobreviver com posterior crescimento do fungo, ou seja, a vida de prateleira destes produtos é aumentada (BEUCHAT 1986).

ROLAND & BEUCHAT (1984) investigaram os efeitos do benzoato de sódio, sorbato de potássio e SO₂ em diferentes concentrações sobre o crescimento e produção de patulina por *Byssochlamys nivea* em suco de maçã nas temperaturas 21, 30 e 37°C. O crescimento do fungo nestas temperaturas (dentro de um período de incubação de 25 dias) é retardado de forma significativa por 75 ppm de SO₂, 150 ppm de sorbato de potássio e 500 ppm de benzoato de sódio. Foi constatado que o SO₂ foi mais efetivo entre os três conservantes (inibição do fungo em concentração menor). No caso do mesmo teste usando-se suco de uva (ROLAND *et al.* 1984), resultados semelhantes foram obtidos.

KING & HALBROOK (1987) estudaram a eficácia dos conservantes sorbato de potássio e benzoato de sódio para inibir o crescimento de *T. flavus*, tendo como variáveis o pH do meio de crescimento, concentração dos conservantes e diferença entre linhagens desta espécie de fungo. Foram testadas 4 linhagens de *T. flavus*; Ágar Batata Dextrose Acidificado (pH 3.5) e Ágar Extrato de Malte (pH 5.4) como meios de crescimento e concentrações dos conservantes entre 0 e 600 µg / ml de meio de crescimento. Observou-se uma eficiência maior dos conservantes em pH 3.5, uma vez que a concentração de 100 µg/ml para ambos os conservantes inibiu *T. flavus* nas quatro linhagens testadas. Em pH 5.4 entretanto, foram necessárias concentrações maiores para inibição, sendo que no caso do benzoato, 600 µg/ml de meio foi insuficiente para evitar o crescimento do fungo e para o sorbato de potássio foi preciso para inibição utilizar diferentes concentrações no meio (300 a 500 µg/ml), dependendo da linhagem. Concluíram que a forma não dissociada dos conservantes é a forma antifúngica efetiva, acontecendo em pH 3.5, onde as formas não dissociadas dos ácidos benzóico e sórbico correspondem a 83 e 95 % respectivamente.

Em experimento com as três variedades de *N. fischeri* (var. *glabra*, var. *spinosa* e var. *fischeri*), NIELSEN (1991) avaliou como esta espécie de fungo é afetada simultaneamente por tamanho do inóculo, pH, benzoato de sódio, sorbato de potássio

e SO₂ em meio sintético (designado para conter mistura de açúcares da maioria das frutas), utilizando-se método impedimétrico. Os resultados indicaram : 1) Que o tempo de detecção do fungo é inversamente proporcional ao tamanho do inóculo, pH e temperatura; 2) A forma não dissociada dos preservativos é a efetiva contra o fungo; 3) A resistência aos conservantes varia com a linhagem de *N. fischeri* ; 4) Para inibir a variedade *glabra* foi necessária maior concentração de conservantes, indicando maior resistência desta variedade aos conservantes.

1.5 O uso de altas pressões na inativação de ascosporos de fungos termoresistentes

O emprego de pressões hidrostáticas elevadas (500 - 10000 bar) em alimentos para destruir microorganismos deteriorantes e inativar enzimas, vem sendo estudado e utilizado recentemente. De forma diferente daquela que ocorre com o tratamento térmico, onde a penetração de calor é função do tempo e da geometria da embalagem, a transmissão de pressão ocorre de forma isostática, ou seja, instantânea e uniformemente por todo alimento, sendo possível a preservação de nutrientes e compostos responsáveis pelo aroma e sabor (BUTZ *et al.*1996; ROSENTHAL & SILVA 1997).

São poucos os relatos sobre o uso de altas pressões na inativação de ascosporos de fungos termoresistentes. MAGGI *et al.* (1994) avaliaram o efeito de altas pressões sobre ascosporos de fungos termoresistentes em néctar de apricot e água. Foram testadas as espécies *B. fulva*, *B.nivea*, *N. fischeri* e *T. flavus*. Suspensões de ascosporos destes fungos foram ativadas (70°C/15 minutos) e inoculadas em néctar de apricot e água (concentração final de 10² - 10⁴ ascosporos / ml). Vinte mililitros das amostras inoculadas com cada espécie de fungo separadamente foram colocadas em embalagens de polietileno (7X12 cm) e submetidas à pressão entre 6000 e 9000 bar na temperatura ambiente (20°C) ou depois de serem aquecidas até 50 e 60°C em banho termostático. A primeira evidência é que os ascosporos são mais sensíveis à alta pressão em água que no néctar, indicando que há uma certa proteção contra a inativação neste. No néctar de apricot (tratamento de 9000 bar / 20 minutos) à 20°C , *T. flavus* se mostrou mais sensível, sendo os seus ascosporos inativados rapidamente ; ascosporos de *N. fischeri* foram reduzidos em 2 ciclos logaritimicos enquanto que para *B. fulva* e *B. nivea* não houve nenhuma inativação (mais resistentes à pressão). Entretanto, no pré-aquecimento à 50°C e tratamento à 8000 bar / 1-4 minutos e pré-aquecimento à 60°C e 7000 bar / 1-2 minutos todas as quatro espécies foram inativadas demonstrando que o tratamento à alta pressão para destruição dos ascosporos só é efetivo se a etapa anterior for um aquecimento do produto até uma temperatura branda .

BUTZ *et al.*(1996) investigaram a resposta de algumas espécies de fungos termoresistentes (*B. nivea*, *B. fulva*, *Eurotium spp*, *Eupenicillium spp* e *Paecilomyces*

spp.) frente a um tratamento combinado alta pressão - temperatura. As formas vegetativas (conídios/hifas) foram destruídas pelo tratamento mais brando (300 MPa / 25°C). Os ascósporos de *B. nivea* se mostraram mais baroresistentes sendo necessárias pressões acima de 600 MPa para inativação, ao contrário do que ocorreu para as outras espécies testadas que foram destruídas com tratamentos mais brandos. Em testes com ascósporos de *B. nivea*, descobriram que é mais efetivo a aplicação da alta pressão (700 MPa / 60°C) antes do tratamento térmico (80°C / 30 minutos) que o inverso, indicando que a pressão sensibilizou os ascósporos, facilitando a ação inativadora do calor. Ainda em teste com *B. nivea* foi constatada uma inativação maior dos ascósporos em suco de uva que em solução salina fisiológica (tratamento de 700 MPa / 70°C) contrastando com MAGGI *et al.* (1994) onde a resistência à pressão era maior em néctar de apricot em relação à água destilada. Em verificação feita por BUTZ *et al.* (1996) dentro do mesmo trabalho, observou-se com o auxílio da microscopia eletrônica que a alta pressão rompe ascos e danifica parede dos ascósporos (*B. nivea*, tratamento de 700 MPa / 70°C, tempo suficiente para inativação total dos ascósporos).

1.6 Estabelecimento de níveis aceitáveis para fungos termoresistentes

Para se estabelecer níveis aceitáveis de ascósporos de fungos termoresistentes em um dado alimento, deve-se levar em consideração : 1) Se a matéria prima é o ingrediente principal ou não; 2) Se o produto final conterá conservantes ou não; 3) O tratamento térmico utilizado; 4) O eventual emprego de operações de concentração e/ou congelamento (HOCKING & PITT 1984; EIROA 1989; BEUCHAT & PITT 1992).

Uma contagem de 5 ascósporos por 100 g (ml) do produto em uma etapa imediatamente anterior ao tratamento térmico constitui um sério problema (BEUCHAT & PITT 1992). Para suco de maracujá, os resultados práticos têm mostrado que um nível de contaminação menor que 2 ascósporos por 100 ml tem um efeito insignificante sobre o produto final. Contudo, níveis de contaminação maiores que 2 ascósporos por 100 ml são frequentemente inaceitáveis (HOCKING & PITT 1984). Em alguns produtos como "blends" de sucos de frutas que serão processados pelo sistema UHT e que não contém conservantes químicos, só será aceito um nível de contaminação inicial mais baixo que os relatados acima. Por exemplo, um produtor de suco de fruta pasteurizado tem como especificação a ausência de *Byssochlamys* em 100 ml de amostra retirada de 200 litros de matéria prima (CARTWRIGHT & HOCKING 1984; BEUCHAT & PITT 1992).

1.7 Detecção e Enumeração de Fungos Termoresistentes em alimentos

Todos os métodos já desenvolvidos para a detecção e enumeração de fungos termoresistentes incluem um choque térmico para destruir as formas termosensíveis e ativar os ascósporos de fungos termoresistentes. Por causa da baixa incidência de fungos termoresistentes em alimentos, é recomendável o uso de amostras grandes nas análises (BEUCHAT & PITT 1992; TOURNAS 1994).

MURDOCK & HATCHER (1978) desenvolveram um método simples para detecção de fungos termoresistentes em sucos de frutas e concentrados. Tal método consiste das seguintes etapas : 1) Colocar 50 gramas de amostra em uma garrafa medicinal estéril (8 oz.) ou frasco de cultura de tecido (250 ml); 2) Adicionar 50 ml de água estéril; 3) Em um banho termostático, aplicar um choque térmico de 77°C por 30 minutos (começar a contagem do tempo quando a mistura atingir esta temperatura); 4) Resfriar imediatamente; 5) Distribuir 30 a 40 ml entre 4 ou 5 placas de petri, adicionar ágar simples (2 %) e misturar ; 6) Incubar as placas e a garrafa contendo o restante do produto à 30°C; 7) Examinar as placas e as garrafas semanalmente para verificar crescimento dos fungos e, se após 30 dias nenhum crescimento tiver ocorrido, estes devem ser descartados. Quando são testados produtos com menos de 35°BRIX, deve-se omitir a etapa de diluição.

O método de plaqueamento de MURDOCK & HATCHER (1978) foi adaptado para amostras maiores, sendo descrito por HOCKING & PITT (1984) e PITT & HOCKING (1985): Duas amostras de 50 ml são colocadas em tubos de 200 X 30 mm, sendo em seguida aquecidas por 30 minutos quando as amostras atingem 80°C em banho termostático; logo após são resfriadas rapidamente. Cada amostra de 50 ml deve ser distribuída entre 4 placas de petri de 150 mm e misturada com Ágar Batata Dextrose (PDA) 1.5 vezes concentrado . As placas de petri devem ser envolvidas por um saco plástico para evitar ressecamento e incubadas à 30°C por um período de até 30 dias, devendo ser examinadas semanalmente para verificar crescimento. Se a amostra a ser testada tiver mais de 35°BRIX, esta deve ser diluída (1:1) com água peptonada (0.1 %) ou em um diluente similar. Para amostras muito ácidas, como o suco de maracujá (pH 2) deve-se ajustar o pH para 3.4 - 3.6 com NaOH .

Uma outra variação do método de plaqueamento foi recomendada por PITT *et al.*(1992) : Cem gramas de produto (preferencialmente divididas em duas porções de 50 ml) devem ser aquecidas à 75°C por 30 minutos efetivos, resfriados, misturados na proporção 1: 1 com Ágar Batata Dextrose (PDA) ou outro ágar nutriente com dupla concentração e distribuídas em placas de petri. Incubar à 30°C e examinar 7 dias depois. Caso não tenha ocorrido crescimento, examinar após um longo período (até 30 dias).

O maior problema associado com o método de plaqueamento é a possibilidade de contaminação aérea . O aparecimento de colônias verdes de *Penicillium* ou colônias de espécies comuns de *Aspergillus* como *A. flavus* ou *A. niger* são evidências claras de contaminação. Este tipo de colônia deve ser ignorada quando for feita a enumeração. Para minimizar este problema, o plaqueamento deve ser feito, preferencialmente, em câmara de fluxo laminar (HOCKING & PITT 1984; PITT & HOCKING 1985; BEUCHAT & PITT 1992; PITT *et al.* 1992).

Se o produto contiver um grande número de esporos bacterianos (como espécies de *Bacillus*), antibióticos devem ser adicionados ao ágar batata dextrose ou outro ágar nutriente utilizado. A adição de 100 p.p.m. de cloranfenicol é suficiente para evitar o crescimento destas bactérias. A acidificação do meio não é recomendada, uma vez que os ascosporos podem estar "estressados" pelo tratamento térmico (HOCKING & PITT 1984, 1992; PITT & HOCKING 1985; BEUCHAT & PITT 1992). O longo tempo de incubação (até 30 dias) permite que os ascosporos debilitados ou injuriados pelo calor tenham um tempo adicional para a formação de colônias (MURDOCK & HATCHER 1978; BEUCHAT & PITT 1992).

Existe um método mais direto para a detecção de fungos termoresistentes, indicado para polpa de frutas e outros materiais semisólidos, tem a vantagem de evitar problemas de contaminação aérea, além de minimizar perdas de mistura. Frascos medicinais contendo 50 ml de amostra são aquecidos em banho termostático na posição perpendicular durante 30 minutos à 80°C, resfriados e incubados à 30°C por 30 dias na posição horizontal, permitindo a formação de uma grande superfície para o crescimento dos fungos. O uso de recipientes de maior volume, como as garrafas de Roux permitem que se utilize quantidades maiores de amostra (HOCKING & PITT 1984; PITT & HOCKING 1985; BEUCHAT & PITT 1992; GUMERATO 1995).

2. ASPECTOS GERAIS SOBRE A DETERIORAÇÃO MICROBIOLÓGICA DOS DERIVADOS DE TOMATE

A deterioração microbiológica em produtos de tomate é causada por microorganismos capazes de se desenvolver em valores de pH ≤ 4.6 . Entre estes microorganismos podem ser citadas bactérias esporogênicas (geralmente associadas a um tratamento térmico insuficiente ou resfriamento inadequado), bactérias não esporogênicas , fungos filamentosos e leveduras (geralmente associados a uma recontaminação pós processo). Uma matéria prima excessivamente contaminada por microorganismos do solo também pode resultar em um produto final deteriorado, embora o tratamento térmico aplicado seja correto (LEITÃO 1973; FIGUEIREDO 1974; PAISANO 1974; VICINI 1984,1986; PORRETTA 1992).

2.1 Deterioração por bactérias esporogênicas

2.1.1 *Bacillus coagulans*

É a mais importante espécie deterioradora de produtos de tomate entre as bactérias esporogênicas aeróbias-anaeróbias facultativas. Possui elevada resistência térmica, sendo o microorganismo alvo no estabelecimento do tratamento térmico em derivados de tomate. Apresenta atividade fermentativa sobre carboidratos, sem produção de gás (Deterioração "flat sour"). É uma bactéria gram positiva na forma de bastonete longo; o pH ótimo de crescimento é 5, mas cresce até 4 dependendo da população inicial de esporos contaminantes e da linhagem; a temperatura ótima de crescimento é 45°C com ampla faixa de temperatura de crescimento, variando entre 30 e 55°C (bactéria termófila facultativa). A causa da deterioração por esta bactéria é geralmente devida a um tratamento térmico insuficiente ou resfriamento inadequado. Estão entre as medidas de controle desta bactéria : um processamento térmico e resfriamento adequados, boas práticas de higiene e sanificação da planta, boas práticas de lavagem/seleção/manuseio da matéria prima, devendo esta última ser de boa qualidade (LEITÃO 1973; FIGUEIREDO 1974; PAISANO 1974; FONSECA 1982; VICINI 1984,1986; PORRETTA 1992). Estima-se que os níveis de contaminação por esporos desta bactéria são $3,5 \cdot 10^5$ esporos / g e 65-1100 esporos/g no solo e tomates não lavados, respectivamente (ALSKOG 1995).

2.1.2 *Bacillus polymixa* e *Bacillus macerans*

Considerados menos importantes que *Bacillus coagulans* na deterioração de produtos ácidos como os derivados de tomate, constituem exceções entre as bactérias do gênero *Bacillus*, uma vez que estas apresentam atividade fermentativa intensa acompanhada da produção de gases . *Bacillus polymixa* apresenta fermentação butileno glicólica com a produção dos ácidos acético e láctico, butileno glicol, CO₂ e H₂. Os principais produtos da fermentação feita por *Bacillus macerans* são a acetona e o álcool etílico. A causa da deterioração por estas bactérias pode ser vazamento (recontaminação pela água de resfriamento) ou tratamento térmico insuficiente (LEITÃO 1973; FIGUEIREDO 1974; PAISANO 1974; VICINI 1984,1986; PORRETTA 1992).

2.1.3 *Clostridium pasteurianum* e *Clostridium butyricum*

São microorganismos anaeróbios estritos, mesófilos, apresentam intensa atividade fermentativa sobre carboidratos com produção enorme de gases (CO₂ e H₂) e ácido butírico. Provoca estufamento da embalagem e odor butírico no produto. Têm uma faixa de temperatura de crescimento entre 28 e 32°C e se desenvolve em pH > 3.7

(principalmente em pH > 4, como no caso dos derivados de tomate). A causa principal da deterioração por estas bactérias é um tratamento térmico insuficiente (LEITÃO 1973; FIGUEIREDO 1974; PAISANO 1974; FONSECA 1982; VICINI 1984,1986; PORRETTA 1992).

2.2 Deterioração por bactérias não esporogênicas

2.2.1 Bactérias lácticas

Entre as bactérias não esporogênicas deterioradoras de produtos de tomate, o grupo das bactérias lácticas é o mais importante. Este grupo compreende os gêneros *Lactobacillus* (homofermentativo ou heterofermentativo), *Leuconostoc* (homofermentativo), *Streptococcus* (homofermentativo) e *Pediococcus* (homofermentativo). Os microorganismos que são heterofermentativos produzem gás (CO₂) no derivado de tomate, mas é possível encontrar bactérias lácticas que produzem estufamento de embalagens e que são homofermentativas *in vitro*. São microaerófilas, diminuem o pH do derivado de tomate, podem produzir estufamento da embalagem ou não. A grande maioria das bactérias lácticas tem baixa resistência ao calor sendo facilmente destruídas exceto as bactérias do gênero *Streptococcus* (*S. faecalis*, *S. thermophilus*, etc) que são termodúricas. A causa principal da deterioração por bactérias lácticas é a recontaminação pós processo. No caso de concentrado de tomate pode ser também insuficiente tratamento térmico (LEITÃO 1973; FIGUEIREDO 1974; PAISANO 1974; VICINI 1984,1986; PORRETTA 1992).

2.2.2 Enterobactérias

A deterioração causada por enterobactérias é devido à recontaminação pós processo, sendo que só os coliformes se adaptam ao ambiente dos derivados não concentrados de tomate. Os gêneros *Enterobacter* e *Klebsiella* se desenvolvem em produtos de tomate com produção de gases (CO₂ e H₂) provocando estufamento da embalagem. A deterioração causada por este tipo de bactéria é muito mais comum no processamento asséptico, comparando-se com o processamento tradicional (VICINI 1984, 1986; PORRETTA 1992).

2.2.3 Bactérias Acéticas

Ligadas à recontaminação pós processo, as bactérias do gênero *Gluconobacter* e *Acetobacter* diminuem o pH de derivados de tomate não concentrados em virtude da produção de ácido acético, não havendo alteração da embalagem (VICINI 1984,1986).

2.3 Deterioração por fungos e leveduras

2.3.1 Fungos filamentosos

A maioria dos fungos filamentosos são pouco resistentes ao calor, com exceção dos fungos termoresistentes que sobrevivem ao tratamento térmico de pasteurização. Estes microorganismos são importantes na pré contaminação da matéria prima, podendo aparecer na planta de processamento de tomate devido à falta de higiene (PAISANO 1974; FIGUEIREDO 1974). A causa principal da deterioração de produtos de tomate por fungos é a recontaminação pós processo, mas pode ser também insuficiente tratamento térmico no caso do concentrado de tomate. No caso de recontaminação pós processo, estão incluídos como deterioradores os fungos cujos esporos são resistentes à água oxigenada, ocorrendo contaminação durante o envase asséptico (VICINI *et al.* 1983; VICINI 1984, 1986; BULGARELLI & BRACKETT 1992; PORRETTA 1992).

Além de provocar mudanças organolépticas nos produtos de tomate, o crescimento de fungos nestes pode favorecer o desenvolvimento de microorganismos típicos de produtos de baixa acidez, através de um aumento de pH. Este fenômeno é conhecido como metabiosis, sendo constatado por diferentes pesquisadores (HUTHNEN *et al.* 1976; MUNDT 1978; ODLAUG & PFLUG 1979; MUNDT & NORMAN 1982; DRAUGHON *et al.* 1988). MUNDT (1978) investigou o efeito provocado pela contaminação por diferentes espécies de fungos sobre o pH do suco de tomate. Tubos contendo suco de tomate esterilizado foram inoculados com 58 espécies de fungos diferentes e incubados à temperatura ambiente (22°C) por 35 dias. Após este tempo de incubação, os tubos foram aquecidos em vapor para destruir os fungos e medidos os valores de pH resultantes de cada tubo homogeneizado. Os resultados mostraram que todos os fungos estudados (com exceção de 2 espécies) aumentaram o pH de 4.1 (inicial) para pHs iguais ou maiores que 4.9 (havendo casos de pH acima de 9) dependendo de cada espécie de fungo. Entre os fungos testados, estavam duas espécies que já foram incriminadas como termoresistentes em alimentos: *Aspergillus fumigatus* (constou do grupo de fungos que aumentou o pH do suco de tomate para um valor dentro da faixa 5.1 - 6.0) e *Aspergillus (Neosartorya) fischeri* esteve dentro do grupo que aumentou o pH para um valor dentro da faixa 8.1 - 9.0. ODLAUG & PFLUG (1979) demonstraram que em suco de tomate um fungo do gênero *Aspergillus (Aspergillus gracilis)* cria um ambiente favorável ao crescimento e produção de toxina por *Clostridium botulinum* nas proximidades ou diretamente abaixo do crescimento micelial. Em uma unidade não hermética, onde inoculou-se os dois microorganismos (fungo e bactéria) em suco de tomate, houve abundante crescimento do fungo com o desenvolvimento de um gradiente de pH abaixo do micélio, permitindo crescimento do *Cl. botulinum* e produção de toxina botulínica. No mesmo experimento com uma unidade hermética, houve um crescimento bem reduzido do fungo sem ocorrência de

um gradiente de pH, entretanto, crescimento de *Cl. botulinum* e baixos níveis de toxina ainda foram produzidos. Os resultados sugeriram que o crescimento de *A. gracilis* no suco de tomate cria um microambiente abaixo do micélio (pH provavelmente maior que 4.6) no qual esporos de *Cl. botulinum* possam germinar, haver reprodução e formação da toxina botulínica.

Existem casos de deterioração por fungos em derivados de tomate, tipicamente ligados ao envase asséptico. VICINI *et al.* (1983) examinaram embalagens cartonadas estufadas contendo suco de tomate. Constataram as seguintes alterações no produto (suco): presença de micélio esbranquiçado, leve aroma alcoólico, sem alteração de pH e predominância de CO₂. O fungo deteriorador foi identificado como sendo *Mucor spinescens*, com o qual foi feita uma série de testes, de onde se obteve que este tem baixa resistência térmica, produz uma grande quantidade de CO₂, tem uma resistência ao U.V. pequena, tem uma elevada resistência à água oxigenada 30 %, é completamente inibido por 4 ppm de pimaricina ou por ácido benzóico (200 ppm em pH 4 / 400 ppm em pH 5) ou por 500 ppm de sorbato de potássio (pH 4). Foi investigado também a capacidade de outras espécies de fungos estufarem embalagens com produto de tomate. Encontrou-se que, após 3 semanas à 25°C, produziram este efeito as espécies: *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus nigricans* e *Mucor racemosus*. PORRETTA (1992) cita ainda outras espécies capazes de produzirem estufamento em embalagens cartonadas e outras embalagens flexíveis contendo derivado de tomate: *Acremonium roseogriseum*, *Geotrichum candidum*, *Mucor javanicus*.

A contagem de filamentos de fungos em produtos de tomate pelo método de Howard vem sendo empregada para determinar o grau de limpeza e os cuidados no processamento. A baixa contagem por este método não assegura que o processamento tenha sido adequado, entretanto, a contagem alta sempre indica deficiência no processamento (YOKOYA 1976; PAISANO 1974; FONSECA 1982). O número de filamentos de fungos nos derivados de tomate podem ser controlados por uma lavagem e seleção eficiente da matéria prima e higienização dos equipamentos, ou seja, toda a superfície que entra em contato com o tomate devem estar convenientemente limpas (PAISANO 1974; FONSECA 1982). Entretanto, existe uma relação direta entre contagem Howard em tomates *in natura* e Umidade Relativa (UR %), ou seja, quanto maior a UR, maior a contagem Howard nos frutos (FERNANDES 1995). YOKOYA (1976) descreveu brevemente os principais gêneros de fungos encontrados em tomates e seus produtos: 1) *Alternaria*; 2) *Colletotrichum phomoides* que causa antracnose; 3) *Oidium*; 4) *Mucor* e *Rhizopus*; 5) *Fusarium*; 6) *Penicillium* e 7) *Aspergillus*. Este autor enfatiza que tanto fungos como bactérias penetram no tomate por rompimentos existentes na casca, que podem ser causados por chuvas excessivas, variação de umidade, insetos, pássaros, manipulação inadequada, etc. Só no caso da antracnose, o fungo pode penetrar no tomate intacto. Encontram-se estes fungos na indústria quando a limpeza é deficiente. A tolerância máxima de contagem Howard (% de campos

positivos) em derivados de tomate varia com o país, como : EUA (40 %), Itália (50 - 60 %), Chile (40-60 %), Brasil (40 %) (FERNANDES 1995).

2.3.2 Leveduras

Raramente estão envolvidas em casos de deterioração de produtos de tomate devido à sua baixa resistência térmica. A causa principal da deterioração por este grupo de microorganismos é a recontaminação pós processo, porém, no caso da elaboração do concentrado de tomate, pode ser também por tratamento térmico deficiente. Os produtos principais da fermentação feitas por leveduras em produtos de tomate são o CO₂ e o etanol, provocando estufamento da embalagem. As leveduras podem estar associadas às bactérias lácticas em deteriorações dos derivados de tomate (FIGUEIREDO 1974; VICINI 1984,1986 ; PORRETTA 1992).

III - MATERIAIS E MÉTODOS

1. Amostragem

1.1 Número de amostragens e obtenção das amostras

No período de safra de 1996 do tomate, foram feitas 9 amostragens (correspondendo 3 ao início, 3 ao pico e 3 ao fim de safra) e 5 no período de entresafra. As amostras foram obtidas diretamente da linha de processamento asséptico de polpa de tomate de uma indústria localizada no Estado de São Paulo. A quantidade coletada / amostra foi de 3.5 ± 0.5 Kg, sendo mantidas sob refrigeração (com exceção do produto final) até o momento da análise (Ítem 2). Os pontos de amostragem escolhidos estão indicados nos fluxogramas simplificados do processamento da polpa de tomate com teor de sólidos solúveis de 8°BRIX, nos períodos de safra e entresafra (figuras 1 e 2, respectivamente).

1.2 Período de safra do tomate

Durante o período de safra do tomate (Julho - Novembro 1996), foram coletadas os seguintes tipos de amostras : 1) Matéria-Prima (tomate após chegada na indústria); 2) Água de transporte e pré-lavagem da matéria prima ; 3) Produto imediatamente antes da esterilização (no tanque de equilíbrio); 4) Produto final embalado em envase em embalagem cartonada (520 g) e 5) Produto final estocado durante 3 meses em temperatura ambiente.

1.3 Período de entresafra do tomate

Durante o período de entresafra (Janeiro - Abril 1997), foram coletados os seguintes tipos de amostras : 1) Concentrado de tomate com teor de sólidos solúveis de 29 °BRIX (matéria prima na entresafra); 2) Produto imediatamente antes da esterilização; 3) Produto final embalado em envase em embalagem cartonada (520 g) e 4) Produto final estocado durante 3 meses em temperatura ambiente.

2. Deteccção e Enumeração de fungos termoresistentes

Foi utilizado o método de plaqueamento (HOCKING & PITT 1984, PITT & HOCKING 1985, BEUCHAT & PITT 1992, PITT *et al.* 1992, SAMSON *et al.* 1992) para a deteção de fungos termoresistentes nas amostras, uma vez que testes preliminares mostraram que este método recupera maior quantidade de esporos quando comparado com o método de incubação direta (HOCKING & PITT 1984, PITT & HOCKING 1985, BEUCHAT & PITT 1992). Ensaios preliminares mostraram também que, no método de plaqueamento utilizando a concentração de

cloranfenicol recomendada no meio de cultura (100 mg/l), houve grande interferência de actinomicetos na contagem de bolores termoresistentes. Para diminuir esta interferência foi feita a acidificação do meio de crescimento com solução de ácido tartárico 10% p/v (para pH final = 3.5) e adição de cloranfenicol na concentração final de 2 g/l.

2.1 Preparo das amostras

A matéria-prima foi desintegrada e homogenizada em triturador metálico estéril. Cem gramas do homogenizado resultante foram distribuídos, excepcionalmente, entre 4 tubos com tampa rosqueável de 25X200 mm (25 ml de amostra/tubo). O uso de uma quantidade maior de tubos se justifica pelo fato do homogenizado de tomate se separar em fases (polpa/soro) durante choque térmico e dilatar o seu volume. Assim, é mais fácil e seguro aplicar o choque térmico em quantidades menores deste homogenizado dentro dos tubos com tampa rosqueável. As amostras de concentrado de tomate foram diluídas com água peptonada 0.1 % (1:2)p/v antes da aplicação do choque e homogenizadas em triturador estéril. Para os outros tipos de amostras (água de pré lavagem e transporte, produto antes da esterilização e produto final) foi seguida normalmente a metodologia a seguir (item 2.3) não sendo necessário um preparo prévio (uso direto das amostras).

2.2 Determinação do tempo de subida da temperatura

Tubos com tampa rosqueável 25X200 mm foram preenchidos com a quantidade adequada de amostra (25 ou 50 ml); inseriu-se um termometro estando o seu bulbo no centro do volume ocupado pela amostra. Este conjunto assim montado foi colocado em um banho termostático ajustado à 80°C, acionando-se no mesmo instante o cronômetro. Quando a amostra atingiu 80°C (monitoramento através do termômetro) registrou-se o tempo marcado pelo cronômetro (tempo de subida).

2.3 Procedimento de enumeração dos fungos termoresistentes

Cem gramas (ml) de amostra foram transferidas assepticamente para dois tubos com tampa rosqueável 25X200 mm (50 ml em cada tubo) e submetidos a um choque térmico em banho termostático (HAAKE, precisão de $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$) regulado à 80°C. Quando a amostra atingiu 80°C (tempo de subida previamente determinado conforme item 2.2), foi iniciada a contagem do tempo de choque térmico (20 minutos) (BEUCHAT & PITT 1992). Terminado o tempo de choque térmico, os tubos foram resfriados até cerca de 45-50°C e o conteúdo destes (100 ml), transferidos para um erlenmeyer contendo 100 ml de ágar batata dextrose (PDA, DIFCO) com 50 mg/l de rosa de bengala e 4 g/l de cloranfenicol (meio em concentração dupla). O conteúdo resultante foi acidificado com solução de ácido tartárico 10 % p/v (pH final =3.5),

misturado bem e distribuído em 8 placas de Petri de 90 mm de diâmetro. Todo este procedimento foi feito em câmara de fluxo laminar. Após solidificação da mistura nas placas, estas foram envolvidas por um saco plástico (para evitar ressecamento) e incubadas à 30°C por 1 mês. Para cada amostra, este procedimento foi feito em triplicata.

3. Isolamento e Estocagem dos fungos termoresistentes

3.1 Isolamento

Cada colônia de fungo que se desenvolveu nas placas de enumeração (Ítem 2.3) foi isolada em placas contendo 25 ml de PDA (pH 5.6, DIFCO) transferindo-se com o auxílio de uma alça em "L", 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 (de acordo com a sequência de isolamento, lote e origem ou tipo de amostra). Como exemplo, tem-se que o décimo fungo isolado da matéria prima pertencente ao lote 2, recebeu o código I10L2PMP.

3.2 Estocagem

Os fungos isolados e codificados foram estocados em sílica gel de acordo com a metodologia descrita por MURO & LUCHI (1989) e GUMERATO (1995). A prévia preparação do material que foi utilizado consistiu de : 1) Foram preenchidos frascos tipo penicilina (10 ml) até cerca da metade do seu volume com sílica-gel (4-8 mm partícula), tampados com algodão e colocados em um recipiente metálico para ser esterilizado em calor seco (180°C / 4 horas). Após o período de esterilização, deixou-se esfriar e acondicionou-se o material estéril sob refrigeração; 2) Foi preparada uma solução de leite desnatado 5 % e esterilizada por 121°C/10 minutos e 3) Foram esterilizadas as tampas de borracha a serem utilizadas no fechamento dos frascos tipo penicilina (121°C/15 minutos).

O procedimento de estocagem seguiu basicamente as seguintes etapas (operações em câmara de fluxo laminar) : 1) Foram transferidos 8 ml da solução de leite desnatado 5 % estéril para a placa contendo o fungo cultivado (Ítem 3.1) ; 2) Foram retirados levemente os esporos da superfície do fungo com o auxílio de uma bagueta ou alça estéril; 3) Foi transferido gradualmente para o frasco tipo penicilina (material previamente preparado) cerca de 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 o mais uniforme possível e, após esta operação, este foi colocado imediatamente em banho de gelo por cerca de 5 minutos; 4) Foi retirado o tampão de algodão e fechado o frasco com tampa de borracha estéril e 5) Foi

lacrado o frasco tipo penicilina com selo de alumínio . Este procedimento foi realizado em duplicata para cada fungo codificado.

4. Seleção do isolado mais termoresistente

A suspensão de esporos (com 1 mês de idade) de cada isolado codificado de fungo foi submetido a diferentes choques térmicos , variando entre 80°C / 20 minutos e 100°C/ 25 minutos , se necessário, para definir o isolado mais termoresistente dentro de cada lote e entre todos os lotes. A tabela 1 mostra todos os choques térmicos aplicados neste item.

Tabela 1 - Choques térmicos aplicados (Temperatura / tempo) aos fungos isolados

Temperatura (°C)	Tempo (minutos)
80	20
85	15
90	10
95	5 10 20
100	5 10 20 22* 25*

* Choques térmicos utilizados na definição do fungo mais termoresistente

4.1 Esporulação

Garrafas de Roux contendo 200 ml de Ágar Extrato de Malte (MEA, formulado segundo PITT 1979) foram inoculadas com 0.5 ml de suspensão previamente preparada de cada cepa de fungo termoresistente. A prévia preparação desta suspensão consistiu em transferir, com o auxílio de uma alça em "L" estéril, um fragmento do fungo para um tubo com tampa rosqueável de 13X100 mm contendo 2 ml de solução 0.05 % de Tween 80 (para dispersar os esporos), seguido de agitação. O procedimento de inoculação nas garrafas de Roux foi feito em duplicata para cada isolado de fungo termoresistente codificado, com incubação das garrafas à 30°C por 1 mês, para permitir a esporulação e desenvolvimento de resistência dos ascosporos.

4.2 Coleta dos esporos

Após o período de incubação de 1 mês, vinte e cinco mililitros de água estéril foram transferidos para cada garrafa contendo os fungos cultivados por 1 mês e, a superfície do fungo raspada levemente com o auxílio de uma bagueta estéril. A suspensão recém preparada foi filtrada através de camadas de gaze estéril e recolhida em um tubo estéril com tampa rosqueável de 25X200 mm, sendo estocado sob refrigeração (4°C).

4.3 Aplicação dos choques térmicos para seleção do isolado mais termoresistente

Para cada fungo, foram utilizados tubos com tampa rosqueável (16X150 mm) com 9 ml de polpa de tomate 8°BRIX estéril (meio de aquecimento), sendo cada tubo inoculado com 1 ml da suspensão de esporos filtrada (seguido da homogenização da mistura resultante), para cada choque. Os choques planejados são mostrados na tabela 1 (um por vez), e aplicados em duplicata, conforme a necessidade.

Utilizando um banho termostático (Polystat ®, precisão $\pm 0,1^\circ\text{C}$), foi aplicado o choque térmico aos tubos com tampa rosqueável com polpa de tomate inoculada, de acordo com o binômio tempo/temperatura especificado, sendo o tempo de choque iniciado após o tempo de subida em cada temperatura definida (como descrito no item 2.2). Após o choque térmico, os tubos foram resfriados imediatamente.

Em seguida, o conteúdo de cada tubo foi transferido para placas de Petri respectivas, sendo que estas receberam aproximadamente igual volume de Ágar Batata Dextrose (concentração dupla) seguido de homogenização. Após solidificação da mistura, as placas foram incubadas à 30°C por até 7 dias. O crescimento do fungo após este período foi um indicativo de resistência ao choque térmico.

5. Identificação do isolados mais importantes

A identificação do isolado de fungo mais termoresistente e do isolado proveniente do produto final foi feita por um programa de computador (FUNG.HOM) com base em 63 características macro e micromorfológicas do fungo (GUMERATO 1995), pelo pesquisador Homero Ferracini Gumerato (GUMERATO 1996).

6. Ensaio com a cepa de fungo selecionada como mais termoresistente

6.1 Produção e Coleta dos ascosporos de diferentes idades

A cepa de fungo selecionada foi inoculada (como no item 4) em 10 garrafas de Roux contendo 200 mililitros de MEA, sendo 5 garrafas incubadas à 30°C por 1 mês e 5 garrafas incubadas à 30°C por 3 meses (produção de 2 lotes de esporos com diferentes idades).

Para coletar os ascosporos, 25 ml de água destilada foi transferida para cada garrafa e a superfície do fungo raspada levemente com o auxílio de uma bagueta de vidro estéril. A suspensão resultante foi filtrada através de camadas de gaze estéril e lã de vidro para remover fragmentos de hifas, submetida ao ultrassom a 0-4°C com incrementos de 2 minutos até a obtenção de ascosporos livres (verificação microscópica) e centrifugada à 5°C por 15 minutos à 10000 rpm (TOURNAS & TRAXLER 1994). Foi feita a lavagem do precipitado com duas centrifugações em água estéril. A suspensão final foi preparada ressuspensando o precipitado em um volume de água estéril suficiente para que a concentração de ascosporos (avaliada através da contagem em Câmara de Neubauer) estivesse na ordem entre 10^6 e 10^7 ascosporos / ml. A suspensão assim tratada foi estocada sob refrigeração (4°C) até uso em frasco com pérolas de vidro.

6.2 Determinação das condições ótimas de ativação dos ascosporos

Para determinar as condições ótimas de ativação dos ascosporos foi usada a temperatura de 85°C (BEUCHAT 1986) e os tempos 0 (Controle), 5, 10, 15, 20 e 25 minutos. O tempo em que foi obtido maior recuperação dos ascosporos (à 85°C), foi considerado o tempo ótimo para ativação.

Tubos TDT estéreis foram preenchidos com 1.8 ml de polpa de tomate de 8°BRIX estéril e inoculados com 0.2 ml da suspensão de ascosporos preparada (item 5.1), seguido de homogenização. Os tubos TDT foram selados em maçarico O₂ / acetileno e colocados em banho termostático (Polystat® com $\pm 0,1^\circ\text{C}$ de precisão), ajustado à 85°C, para receber os choques térmicos. O tempo de subida até a temperatura desejada foi determinado previamente, utilizando termopar flexível para monitorar a temperatura em tubo TDT preenchido com polpa de tomate 8°BRIX. Em cada tempo de aquecimento definido, os tubos foram retirados do banho e resfriados imediatamente.

Estes tubos foram abertos assepticamente, em seguida feitas as diluições em série respectivas; foi feito o plaqueamento em profundidade com MEA (formulado,

segundo PITT 1979) (duplicata). As placas foram incubadas à 30°C e a leitura do número de colônias formadas, feitas a partir do terceiro até o sétimo dia de incubação. A contagem foi expressa em UFC / ml.

6.3 Ensaio de termoresistência dos ascosporos em polpa de tomate (8°BRIX)

Para o ensaio de termoresistência, foram utilizadas as temperaturas 90, 92 e 94°C, as quais estão compreendidas na faixa de temperatura utilizada para pasteurização na indústria de derivados de tomate, em diferentes tempos de aquecimento, empregando o método dos tubos TDT selados .

Os tubos TDT foram preparados como descrito em 6.2 . Estes tubos foram colocados em banho termostático indicado acima, ajustado nas temperaturas definidas e, em cada tempo de aquecimento específico mais o atraso térmico (determinado no item 6.2), os tubos foram retirados do banho e resfriados imediatamente.

Como em 6.2, foram feitas as diluições em série respectivas e o plaqueamento com MEA (formulado, segundo PITT 1979) em profundidade (duplicata) para cada tempo específico em cada temperatura. As placas foram incubadas à 30°C e a leitura do número de colônias formadas, feitas à partir do terceiro até o sétimo dia de incubação. A contagem do número de sobreviventes foi expressa em UFC/ml. Sabendo o número de sobreviventes e o tempo de aquecimento respectivo, foram construídas as curvas de morte para cada temperatura. Como as curvas de morte apresentaram comportamento não logarítmico nas temperaturas empregadas, foi utilizado o método de linearização de ALDERTON & SNELL (1970) determinando-se os parâmetros equivalentes a "D" (1/k) e a partir destes e das temperaturas, o parâmetro equivalente a "Z" (Z*).

6.4 Avaliação do tipo de deterioração causada pelo fungo mais termoresistente na polpa de tomate (8°BRIX)

Em um tubo com tampa rosqueável de 16X150 mm, 9 ml de polpa de tomate estéril (8°BRIX) foi inoculada com 1 ml de suspensão de ascosporos com idade de 1 mês, o conteúdo homogenizado e submetido ao choque de ativação ótima definido no item 5.2, seguido de resfriamento. A mistura polpa/suspensão contida no tubo foi adicionada em um Erlenmeyer contendo cerca de 150 ml de polpa de tomate estéril e homogenizado. Esta polpa de tomate contendo o inóculo de ascosporos ativados foi incubada à 30°C por 30 dias. Após este período, foram observadas as alterações ocorridas na polpa (cor, odor, pH, consistência da polpa), bem como as características da colônia de fungo crescida em polpa de tomate.

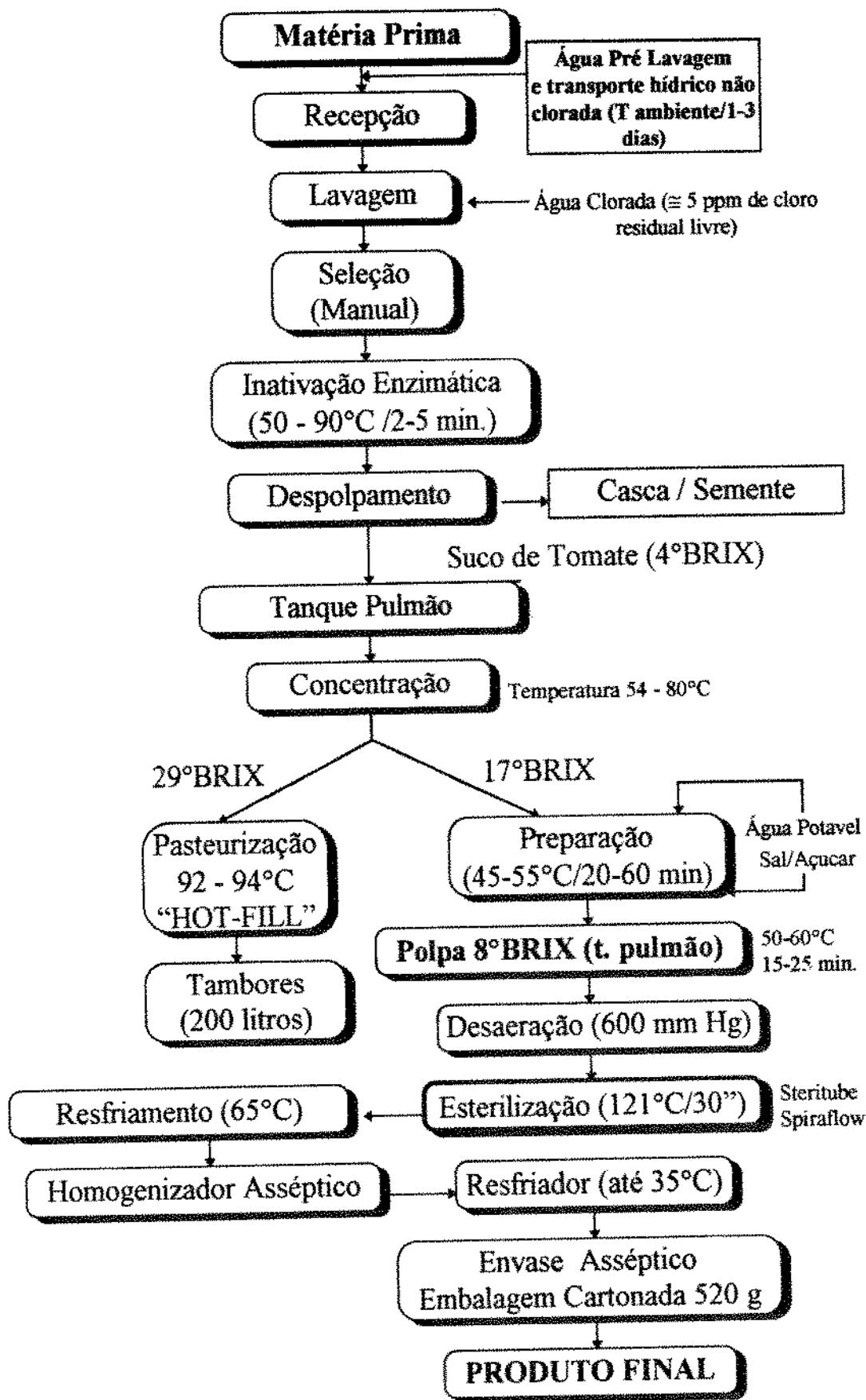


Figura 1 - Fluxograma de elaboração da polpa de tomate 8°BRIX (período de safra)

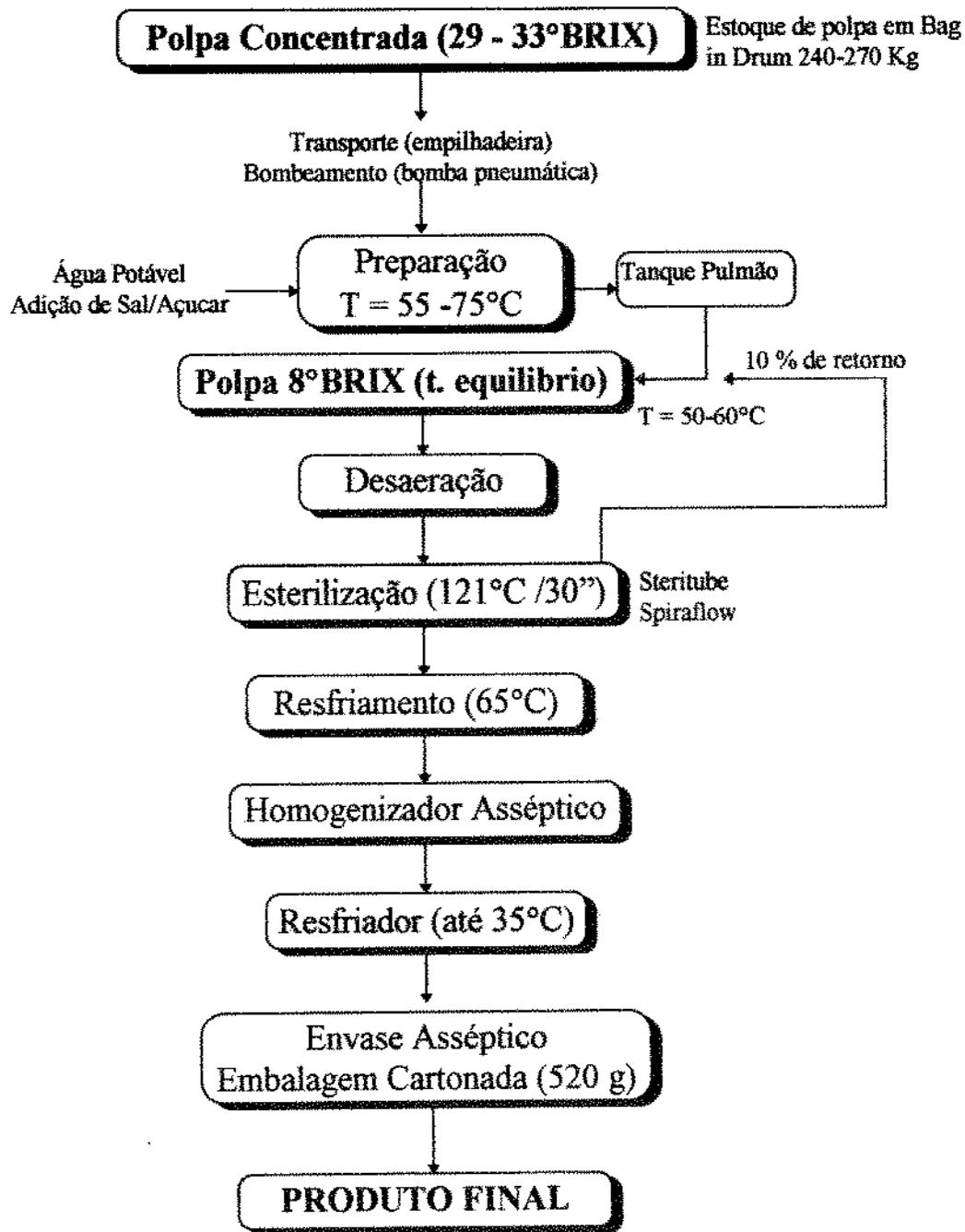


Figura 2 - Fluxograma de elaboração da polpa de tomate 8°BRIX (período de entressafra)

IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Enumeração de fungos filamentosos termoresistentes em polpa de tomate de 8°BRIX

As tabelas 3 e 4 mostram a enumeração de fungos termoresistentes (contagem média em UFC / 100 ml) em amostras procedentes de diferentes pontos do processo e dentro de cada lote no processamento asséptico da polpa de tomate, nos períodos de safra e entresafra do tomate, respectivamente .

TABELA 3-Média da enumeração de fungos termoresistentes (UFC/100 ml de amostra) durante o período de safra do tomate (Julho/96 à Novembro/96)

LOTE	Matéria Prima	Água Pré-Lavagem e Transporte Hídrico	Produto antes da esterilização	Produto Final	Produto Final 3 meses após processo
#1	2	1	<1	<1	<1
#2	1	1	<1	<1	<1
#3	<1	1	1	<1	<1
#4	8	4	<1	1	<1
#5	1	3	1	<1	<1
#6	1	1	<1	<1	<1
#7	1	1	<1	<1	<1
#8	2	1	<1	<1	<1
#9*	1*	-	<1	<1	<1

* No lote 9, excepcionalmente, foi utilizado concentrado de tomate proveniente do tambor como matéria prima para o preparo da polpa (enumeração da polpa diluída 1:2 p/v)

TABELA 4-Média da enumeração de fungos termoresistentes (UFC/100 ml de amostra) durante o período de entresafra do tomate (Janeiro/97 à Abril/97)

LOTE	Concentrado de Tomate (29°BRIX)	Produto antes da Esterilização	Produto Final	Produto Final 3 meses após processo
#10	<1	<1	<1	<1
#11	<1	<1	<1	<1
#12	<1	<1	<1	<1
#13	<1	<1	<1	<1
#14	<1	<1	<1	<1

Observando-se a tabela 3, nota-se uma contagem relativamente baixa de fungos termoresistentes e que matéria prima e água de pré-lavagem e transporte hídrico forneceram as maiores contagens, permitindo uma maior recuperação posterior destes microorganismos. Este fato já era esperado, já que matéria prima (tomate *in natura*) e água de pré-lavagem e transporte hídrico estão no início da linha de processamento, não recebendo nenhum tratamento térmico, além do que a água de transporte hídrico não é clorada e recebe as sujidades da matéria prima recém chegada. Estas constatações também foram feitas por GRAJALES (1996) que realizou a contagem de fungos termoresistentes em amostras durante a elaboração do concentrado de tomate. Esta autora verificou que só houve contagem na matéria prima (tomate na recepção e tomate na seleção) e que esta contagem era baixa (contagem entre <1 e 15 UFC / 100 ml de amostra). Entretanto, deve-se ressaltar que GRAJALES (1996) empregou um choque térmico de 70°C/1 hora e acidificação até 3,5 sem o uso de antibióticos.

A maior contagem obtida entre todos os lotes ocorreu na matéria prima do lote 4 (8 UFC / 100 ml), provavelmente devido à utilização de um tomate de baixa qualidade para processamento, seguido da água de pré-lavagem e transporte hídrico no mesmo lote (4 UFC / 100 ml). A contagem em pico de safra foi mais alta, sendo significativamente diferente ao nível de 5% em relação a início e fim de safra (Ver apêndice 2).

Nos pontos produto antes da esterilização e produto final (no período de coleta e 3 meses após processo) geralmente não houve contagem de fungos termoresistentes, com exceção da enumeração no produto antes da esterilização no lote 3 (1 UFC / 100 ml), lote 5 (1 UFC / 100 ml) e produto final no lote 4 (1 UFC/100 ml). No período de entressafra não foi possível a recuperação de fungos termoresistentes. Porém, não se deve excluir a possibilidade da existência de ascosporos de fungos termoresistentes no concentrado de tomate, visto que algumas linhagens destes podem sobreviver ao tratamento empregado para pasteurização da polpa concentrada (92°C, com posterior enchimento à quente dos tambores metálicos), conforme será constatado no item 2.

2. Fungos isolados em cada lote e seleção da cepa mais termoresistente

Durante o levantamento da contaminação da safra e entressafra de 1996, foram obtidos um total de 50 isolados de fungos termoresistentes, cujos esporos com 1 mês de idade foram submetidos a diferentes choques térmicos que variaram entre 80°C / 20 minutos e 100°C / 25 minutos para selecionar o isolado mais termoresistente. As tabelas 5 a 8 exibem dados e resultados sobre os isolados de fungos termoresistentes, a relação com a procedência (origem e lote) e limites de sobrevivência aos choques térmicos.

TABELA 5 - Número de fungos isolados por lote

LOTE	Número de cepas diferentes de fungos termoresistentes	Número de cepas diferentes confirmadas como termoresistentes
#1	9	9
#2	3	2
#3	2	2
#4	12	9
#5	8	7
#6	2	1
#7	5	4
#8	7	6
#9	2	1
#10	-	-
#11	-	-
#12	-	-
#13	-	-
#14	-	-

TABELA 6 - Códigos dos fungos termoresistentes, procedência e limite de sobrevivência

CÓDIGO FUNGO	ORIGEM	SOBREVIVÊNCIA ATÉ
I1L1PMP	Matéria Prima	100°C / 5 minutos
I2L1PMP	Matéria Prima	100°C / 10 minutos
I3L1PMP	Matéria Prima	100°C / 22 minutos
I4L1PAB	Água Pré Lavagem e Transporte	95°C / 20 minutos
I5L1PMP	Matéria Prima	80°C / 20 minutos
I6L1PAB	Água Pré Lavagem e Transporte	80°C / 20 minutos
I7L1PAB	Água Pré Lavagem e Transporte	95°C / 5 minutos
I8L1PMP	Matéria Prima	100°C / 5 minutos
I9L1PAB	Água Pré Lavagem e Transporte	85°C / 15 minutos
I10L2PMP	Matéria Prima	100°C / 5 minutos

Continuação da tabela 6...

I11L2PAB	Água Pré Lavagem e Transporte	< 80°C / 20 minutos ⁽¹⁾
I12L2PAB	Água Pré Lavagem e Transporte	100°C / 10 minutos
I13L3PAB	Água Pré Lavagem e Transporte	80°C / 20 minutos
I14L4PMP	Matéria Prima	100°C / 5 minutos
I15L4PMP	Matéria Prima	100°C / 22 minutos
I16L4PAB	Água Pré Lavagem e Transporte	100°C / 25 minutos
I17L4PAB	Água Pré Lavagem e Transporte	100°C / 10 minutos
I18L4PMP	Matéria Prima	< 80°C / 20 minutos ⁽¹⁾
I19L4PMP	Matéria Prima	80°C / 20 minutos
I20L4PAB	Água Pré Lavagem e Transporte	85°C / 15 minutos
I21L4PAB	Água Pré Lavagem e Transporte	80°C / 20 minutos
I22L4PAB	Água Pré Lavagem e Transporte	85°C / 15 minutos
I23L3PPA	Produto antes da esterilização	90°C / 10 minutos
I24L4PMP	Matéria Prima	< 80°C / 20 minutos ⁽¹⁾
I25L4PMP	Matéria Prima	80°C / 20 minutos
I26L4PPF	Produto Final	< 80°C / 20 minutos ⁽¹⁾
I27L5PMP	Matéria Prima	100°C / 22 minutos
I28L5PAB	Água Pré Lavagem e Transporte	90°C / 10 minutos
I29L5PAB	Água Pré Lavagem e Transporte	100°C / 25 minutos

Continuação da tabela 6...

I30L5PAB	Água Pré Lavagem e Transporte	85°C / 15 minutos
I31L5PAB	Água Pré Lavagem e Transporte	100°C / 22 minutos
I32L5PAB	Água Pré Lavagem e Transporte	90°C / 10 minutos
I33L5PAB	Água Pré Lavagem e Transporte	100°C / 10 minutos
I34L5PPA	Produto antes da esterilização	< 80°C / 20 minutos ⁽¹⁾
I35L6PMP	Matéria Prima	< 80°C / 20 minutos ⁽¹⁾
I36L6PAB	Água Pré Lavagem e Transporte	95°C / 10 minutos
I37L7PAB	Água Pré Lavagem e Transporte	95°C / 10 minutos
I38L7PMP	Matéria Prima	< 80°C / 20 minutos ⁽¹⁾
I39L7PMP	Matéria Prima	80°C / 20 minutos
I40L7PMP	Matéria Prima	100°C / 20 minutos
I41L7PAB	Água Pré Lavagem e Transporte	90°C / 10 minutos
I42L8PMP	Matéria Prima	80°C / 20 minutos
I43L8PMP	Matéria Prima	100°C / 20 minutos
I44L8PAB	Água Pré Lavagem e Transporte	< 80°C / 20 minutos ⁽¹⁾
I45L8PAB	Água Pré Lavagem e Transporte	100°C / 25 minutos
I46L8PMP	Matéria Prima	100°C / 22 minutos
I47L8PMP	Matéria Prima	90°C / 10 minutos
I48L8PMP	Matéria Prima	90°C / 10 minutos
I49L9PCT	Concentrado Tomate	<80°C / 20 minutos ⁽¹⁾

Continuação da tabela 6...

I50L9PCT	Concentrado Tomate	80°C / 20 minutos
----------	-----------------------	-------------------

(1) Os isolados que não sobreviveram ao choque inicial (80°C/20 minutos) estão indicados na tabela acima como sobrevivência menor que 80°C/20 minutos

TABELA 7 - Sobrevivência de 50 isolados submetidos a diferentes choques térmicos

CHOQUES	Sobrevivência (%)
80°C / 20 min.	82.0
85°C / 15 min.	64.0
90°C / 10 min.	56.0
95°C / 5 min.	46.0
95°C / 10 min.	44.0
95°C / 20 min.	38.0
100°C / 5 min.	36.0
100°C / 10 min.	28.0
100°C / 20 min.	22.0
100°C / 22 min.	18.0
100°C / 25 min.	6.0

A primeira coluna da tabela 5 mostra o número de fungos termoresistentes diferentes isolados por lote. Todavia, após isolamento, cultivo em meio sintético (MEA) por 1 mês com posterior coleta dos esporos e aplicação de diferentes choques térmicos (etapa de seleção do isolado mais termoresistente), pôde-se observar (segunda coluna da mesma tabela) que nem todos os isolados obtidos sobreviveram ao mesmo choque aplicado no procedimento de enumeração (80°C / 20 minutos), ou seja, não houve confirmação de sobrevivência destes ao choque inicial. Este fato leva às seguintes hipóteses : o isolado produz um esporo menos termoresistente no meio sintético ou o isolado não produz a forma termoresistente no meio sintético dentro do tempo de incubação estipulado. Esta última hipótese foi relatada por SAMSON *et al.*(1992), que em estudo com linhagens de *Eupenicillium spp.*, constataram que algumas destas não produziram ascósporos, mesmo dentro de um tempo de incubação de 6 semanas.

TABELA 8 - Fungos mais termoresistentes dentro de cada lote de produção de polpa de tomate

LOTE	CÓDIGO FUNGO	ORIGEM	Sobrevivência até ...
#1	I3L1PMP	Matéria Prima	100°C/22 minutos
#2	I12L2PAB	Água Pré-Lavagem e Transporte Hídrico	100°C/10 minutos
#3	I23L3PPA	Produto antes da esterilização	90°C/10 minutos
#4	I16L4PAB	Água Pré-Lavagem e Transporte Hídrico	100°C/25 minutos
#5	I29L5PAB	Água Pré-Lavagem e Transporte Hídrico	100°C/25 minutos
#6	I36L6PAB	Água Pré-Lavagem e Transporte Hídrico	95°C/10 minutos
#7	I40L7PMP	Matéria Prima	100°C/20 minutos
#8	I45L8PAB	Água Pré-Lavagem e Transporte Hídrico	100°C/25 minutos
#9	I50L9PCT	Concentrado Tomate	80°C/20 minutos

A verificação de que ascósporos de fungos termoresistentes presentes originalmente nas amostras podem apresentar termoresistência diferente (maior ou menor) em relação aos ascósporos das mesmas linhagens de fungos obtidos *in vitro*, foi feita por JESENKA *et al.* (1993) que, examinando amostras de solo, compararam a resistência térmica de ascósporos de fungos termoresistentes procedentes destas amostras através de dois experimentos : (a) Choques térmicos sucessivos (60 - 90°C, a cada 10 minutos) diretamente nas amostras (verificação da resistência térmica dos ascósporos originários do solo); (b) Choques térmicos sucessivos (70 - 90°C/10-60 minutos) em ascósporos dos fungos isolados em (a) obtidos *in vitro* (a partir de culturas puras cultivadas em meio sintético / ascósporos com 1-2 meses de idade).

Observaram que os ascosporos se mostraram mais termoresistentes no experimento (a) ou (b), dependendo da espécie testada. Como exemplos, o fungo *Neosartorya fischeri* sobreviveu até 90°C/40 minutos pelo experimento (a) e pelo experimento (b) até 80°C/60 minutos; indicando maior termoresistência dos ascosporos presentes no solo. Em contrapartida, para *Talaromyces flavus* aconteceu a situação inversa : sobrevivência até 70°C/60 minutos pelo experimento (a) e pelo experimento (b) até 90°C/10 minutos, indicando maior termoresistência dos ascosporos obtidos *in vitro* .

De acordo com a figura 3, a maior porcentagem de isolados vem da água de pré lavagem e transporte (46 %), seguido da matéria prima (44 %) A tabela 6 exhibe o limite de sobrevivência de cada isolado aos choques e nesta pode-se notar que o único fungo isolado de produto final (I26L4PPF) não sobreviveu ao choque inicial (80°C/20 minutos). Este fungo foi identificado como *Penicillium implicatum* (Ver características de identificação no apêndice 3). Na literatura não consta que esta espécie seja termoresistente (PITT & HOCKING 1985). Entretanto , existe a possibilidade de que esta linhagem de *P. implicatum* em particular produza forma termoresistente na natureza, mas perca esta capacidade quando cultivada *in vitro* .

A tabela 7 mostra a distribuição (%) de sobrevivência dos isolados aos choques térmicos . Deve ser observado na tabela 5 que 82,0 % dos isolados sobreviveram ao choque inicial ; que 46,8 % podem sobreviver à 95°C / 5 minutos (possível sobrevivência ao tratamento de pasteurização da polpa concentrada) e que isolados altamente resistentes ao calor (sobrevivência à 100°C / 5 minutos) representam 36,0 % do total de isolados. A figura 4 ilustra esta distribuição (%) mostrada na tabela 7.

O fungo selecionado como o mais termoresistente foi I16L4PAB (sobrevivência à 100°C / 25 minutos). Os isolados I29L5PAB e I45L8PAB (mesmo indicativo de resistência, segundo tabela 8), coincidiram macro e micromorfológicamente com este, tratando-se, então, do mesmo fungo. O isolado do fungo selecionado foi identificado como sendo *Neosartorya fischeri* (ver características de identificação no apêndice 4) sendo encontrado tanto na água de pré-lavagem e transporte hídrico quanto na matéria prima (tomate).

A ocorrência do fungo *N. fischeri* em frutas e seus produtos vem sendo relatada constantemente nos últimos dez anos (SCOTT & BERNARD 1987; ARAGÃO 1989; SAMSON *et al.*1992; ENIGL *et al.*1993; TOURNAS & TRAXLER 1994; GUMERATO 1995; RAJASHEKHARA *et al.*1996). Entretanto, só recentemente foi reportada a presença de *N. fischeri* em produto de tomate (KOTZEKIDOU 1997).

3. Ativação ótima dos ascosporos do isolado mais termoresistente

Os resultados dos ensaios de ativação ótima dos ascosporos do isolado mais termoresistente (*N. fischeri*), à 85°C, estão exibidos nas tabelas de 9 a 12 e na figura 5 (curvas de ativação). As tabelas 10 e 11 mostram o número de ascosporos recuperados por cada choque e a % de ascosporos ativados (em polpa de tomate, 8°BRIX), tomando-se como referência a contagem direta dos ascosporos feita com o auxílio da câmara de Neubauer (Tabela 9). Os tempos (à 85°C) onde se obteve maior recuperação de ascosporos (maior % de ascosporos ativados) para os ascosporos com 1 mês e 3 meses de idade foram, respectivamente, 10 e 20 minutos (sintetizados na tabela 12).

TABELA 9 - Contagem direta dos ascosporos (Câmara Neubauer)

Suspensão de Ascosporos	Ascosporos / ml de suspensão
com 1 mês de idade	$7,6 \cdot 10^6$
com 3 meses de idade	$3,9 \cdot 10^7$

TABELA 10 - Recuperação dos ascosporos com 1 mês de idade e a % de ascosporos ativados em relação à contagem direta

Choque Térmico	Ascosporos/ml de suspensão	% de ascosporos ativados
85°C/5min.	$3,0 \cdot 10^6$	39.5
85°C/10 min.	$7,5 \cdot 10^6$	98.7
85°C/15 min.	$6,5 \cdot 10^6$	85.5
85°C/20 min.	$3,5 \cdot 10^6$	46.1
85°C/25 min.	$1,5 \cdot 10^6$	19.7

TABELA 11 - Recuperação dos ascosporos com 3 meses de idade e % de ascosporos ativados em relação com a contagem direta

Choque Térmico	Ascosporos/ml de suspensão	% de ascosporos ativados
85°C/5min.	$4,0 \cdot 10^6$	10.3
85°C/10 min.	$9,3 \cdot 10^6$	23.9
85°C/15 min.	$1,6 \cdot 10^7$	41.0
85°C/20 min.	$3,1 \cdot 10^7$	79.5
85°C/25 min.	$1,9 \cdot 10^7$	48.7

TABELA 12 - Ativação ótima dos ascosporos

Ascosporos	Choque Térmico para ativação ótima
Com 1 mês	85°C/10 minutos
Com 3 meses	85°C/20 minutos

Pela tabela 9, pode-se observar que a maior obtenção de ascosporos (para um mesmo procedimento de preparação da suspensão) ocorreu para a cultura do fungo em questão com 3 meses de idade (cerca de 5.1 vezes maior em relação a de um mês), indicando um aumento da produção de ascosporos com o tempo de incubação do fungo, podendo ser explicado pela observação feita por CONNER & BEUCHAT (1987a) no estudo do fungo *N. fischeri*, onde o esgotamento de nutrientes estimula a ascosporogênese. Assim sendo, o maior número de ascosporos após 3 meses de incubação em relação aos de 1 mês, poderia estar associada ao esgotamento gradual de nutrientes no meio de crescimento com o tempo de incubação.

Pelas tabelas 10 e 11, nota-se que a combinação tempo/temperatura para ativação ótima dos ascosporos recuperou uma maior % de ascosporos com 1 mês (98.7 %) comparando aos de 3 meses (79.5 %). Além disso, as tabelas 10, 11 e 12 mostram, para uma mesma temperatura (85°C), um maior tempo requerido para ativação ótima de ascosporos com 3 meses (20 minutos), já que, para os de 1 mês o tempo é de 10 minutos. Estes 2 fatos sugerem que os ascosporos de *N. fischeri* desenvolvem uma maior dormência com o tempo de incubação, estando de acordo com os relatos de CONNER & BEUCHAT (1987b) e CONNER *et al.* (1987).

BEUCHAT (1986) construiu curvas de ativação à 85°C (utilizando tampão fosfato 0.1 M, pH 7 como meio de aquecimento) para três linhagens diferentes de *N. fischeri* (ascosporos 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 ensaio semelhante para 1 linhagem de *N. fischeri* (ascosporos com 1 mês de idade) obteve que a ativação ótima à 85°C para esta linhagem era 5 minutos, utilizando água destilada como meio de aquecimento. Portanto, os tempos encontrados para ativação ótima à 85°C no presente experimento (10 e 20 minutos, para ascosporos com 1 e 3 meses respectivamente) estão dentro da faixa reportada em trabalhos anteriores.

4. Avaliação do tipo de deterioração causada pelo fungo mais termoresistente na polpa de tomate

O aspecto da colônia da linhagem de fungo mais termoresistente (*N. fischeri*) que cresceu sob a polpa de tomate era na forma de casca, sendo amarela clara

arenosa, com produção de exudado marrom na superfície. Esta colônia tornou-se visível três dias após a inoculação.

A polpa de tomate (8°BRIX) sofreu as seguintes alterações, após o período de 1 mês de incubação : 1) Escurecimento devido à produção de pigmento escuro pelo fungo; 2) Separação de fases (soro/polpa); 3) Grande diminuição na viscosidade da polpa; 4) Forte alcalinização da polpa, uma vez que o pH subiu de 4,30 (inicial) para 8,99 (final); 5) Odor levemente amoniacal.

A ocorrência da separação de fases e grande diminuição na viscosidade da polpa de tomate são fortes indicativos da produção e ação de pectinases, sendo que esta evidência para *N. fischeri* é citada por TOURNAS (1994). O aumento de pH em produtos de tomate provocado por fungos filamentosos é reconhecido em vários trabalhos (HUTHNEN *et al.*1976; MUNDT 1978; ODLAUG & PFLUG 1979; MUNDT & NORMAN 1982; DRAUGHON *et al.*1988). Para *Neosartorya fischeri* em particular, MUNDT (1978) constatou que esta espécie de fungo pode aumentar o pH inicial do suco de tomate (4.1) para a faixa de 8.1 - 9.0 (final). Assim, o valor de pH encontrado neste ensaio (8.99) está dentro da faixa de pH apresentada pelo autor acima. Ainda, pode-se dizer que o fenômeno de alcalinização da polpa e a presença de odor amoniacal sugerem a liberação de NH₃ (amônia) pelo fungo na polpa de tomate.

5. Resistência Térmica do fungo isolado mais termoresistente (*N. fischeri*)

Foram feitas as determinações de resistência térmica dos ascosporos com 1 mês de idade e com 3 meses de idade, sendo os parâmetros calculados de resistência térmica comparados apropriadamente. As tabelas 13 e 14 mostram as contagens do número de sobreviventes com o tempo de aquecimento para ascosporos com 1 mês e 3 meses de idade, respectivamente, nas temperaturas 90, 92 e 94°C.

Uma vez que as curvas de inativação térmica se apresentaram não logarítmicas (figuras 6 e 7) de acordo com os relatos de KING Jr. *et al.*(1979); BAYNE & MICHENER (1979); KING & HALBROOK (1987); ARAGÃO (1989); KING Jr. & WHITEHAND (1990); KOTZEKIDOU (1997), foi aplicado o método de ALDERTON & SNELL (1970) para linearização das curvas, comprovado por BAYNE & MICHENER (1979) e ARAGÃO (1989) como mais adequado para o cálculo destes parâmetros (maior proximidade com dados experimentais). A linearização da curva por este método segue a equação 1 (Ítem 1.3 - Revisão Bibliográfica).

TABELA 13 - Contagem do número de sobreviventes com o tempo de aquecimento em polpa de tomate 8°BRIX, pH 4.3 de ascosporos de *N. fischeri* com 1 mês de idade

TEMPERATURA : 90°C	
Tempo de aquecimento (min.)	Número de sobreviventes (UFC/ml)
0	$7,5 \cdot 10^6$
3	$5,0 \cdot 10^6$
6	$1,2 \cdot 10^6$
9	$9,1 \cdot 10^4$
12	$1,0 \cdot 10^2$
TEMPERATURA : 92°C	
Tempo de aquecimento (min.)	Número de sobreviventes (UFC/ml)
0	$7,5 \cdot 10^6$
2	$4,0 \cdot 10^6$
4	$2,0 \cdot 10^5$
6	$1,5 \cdot 10^4$
8	$3,0 \cdot 10^2$
TEMPERATURA : 94°C	
Tempo de aquecimento (min.)	Número de sobreviventes (UFC/ml)
0	$7,5 \cdot 10^6$
1	$3,0 \cdot 10^6$
2	$2,8 \cdot 10^5$
3	$5,0 \cdot 10^4$
4	$3,5 \cdot 10^2$

A figura 8 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. As figuras 9 e 10 mostram as curvas de linearização pelo método de ALDERTON & SNELL (1970) para ascosporos de 1 e 3 meses, respectivamente. A figura 11 (-Log k versus Temperatura) refere-se à obtenção do parâmetro Z^* para os ascosporos de diferentes idades. Os valores e parâmetros de resistência térmica para os ascosporos de *N. fischeri* estão sintetizados nas tabelas 15 à 19.

TABELA 14 - Contagem do número de sobreviventes com o tempo de aquecimento em polpa de tomate 8°BRIX, pH 4.3 de ascosporos de *N. fischeri* com 3 meses de idade

TEMPERATURA : 90°C	
Tempo de aquecimento (min.)	Número de sobreviventes (UFC/ml)
0	$3,1 \cdot 10^7$
5	$2,1 \cdot 10^7$
10	$8,5 \cdot 10^6$
15	$2,8 \cdot 10^4$
20	$2,5 \cdot 10^2$
TEMPERATURA : 92°C	
Tempo de aquecimento (min.)	Número de sobreviventes (UFC/ml)
0	$3,1 \cdot 10^7$
3	$1,7 \cdot 10^7$
6	$7,3 \cdot 10^6$
9	$1,6 \cdot 10^4$
12	$1,5 \cdot 10^2$
TEMPERATURA : 94°C	
Tempo de aquecimento (min.)	Número de sobreviventes (UFC/ml)
0	$3,1 \cdot 10^7$
2	$1,1 \cdot 10^7$
4	$5,4 \cdot 10^6$
6	$1,3 \cdot 10^4$
8	$1,0 \cdot 10^2$

TABELA 15 - Valores do parâmetro "a"

ASCOSPOROS	"a"	R ² (1)
1 mês	0.4272	0.993
3 meses	0.3911	0.966

(1) R² : Coeficientes de correlação das curvas log (log No - log N) versus log t à 90°C

TABELA 16 - Valores de resistência térmica para ascosporos com 1 mês de idade para cada temperatura

TEMPERATURA (°C)	k (min. ⁻¹)	C	R ² (2)	1/k (min.)
90	0.1629	-0.0539	0.988	6.14
92	0.2120	0.2399	0.971	4.72
94	0.3817	0.3216	0.983	2.62

TABELA 17 - Valores de resistência térmica para ascosporos com 3 meses de idade para cada temperatura

TEMPERATURA (°C)	k (min. ⁻¹)	C	R ² (2)	1/k (min.)
90	0.0984	-0.0469	0.971	10.2
92	0.1584	0.0471	0.960	6.31
94	0.2178	0.2073	0.950	4.59

(2) R² : Coeficientes de correlação das curvas (log N₀ - log N)^a versus tempo para determinação de k e C (Quadros 14 e 15)

TABELA 18 - Valores de Z* para ascosporos de diferentes idades e respectivos coeficientes de correlação

ASCOSPOROS	Z* (°C)	R ² (3)
1 mês	10.8	0.954
3 meses	11.6	0.987

(3) R² = coeficiente de correlação para curvas - log k versus Temperatura para determinação de Z*.

TABELA 19 - Aumento da resistência térmica com a idade dos ascosporos nas temperaturas testadas

TEMPERATURA (°C)	Nº de vezes em que o valor de 1/k para ascosporos com 3 meses é maior que os de 1 mês
90	1.7
92	1.3
94	1.8

Comparando as figuras 6 e 7 (Número de sobreviventes versus tempo de aquecimento, para ascosporos com 1 e 3 meses respectivamente) observa-se no caso de 3 meses de incubação (figura 7) uma fase lag (“ombro”) muito mais acentuada, além de um tempo maior de aquecimento requerido para inativação destes ascosporos, sendo que estas constatações indicam que a constituição de ascosporos com maior idade dificultam a penetração de calor nestes. De acordo com CONNER *et al.*(1987), o processo de maturação de ascosporos de *N. fischeri* continua com o decorrer do tempo de incubação podendo ser relacionado com o aumento progressivo da resistência térmica e que este processo de maturação está relacionada com uma síntese proteica e abaixamento da atividade de água interna pelo aumento dos níveis de glicerol, manitol e trehalose.

O fenômeno de aumento da resistência térmica com a idade dos ascosporos de *N. fischeri* foi constatada nos trabalhos de CONNER & BEUCHAT (1987a); CONNER *et al.* (1987); TOURNAS & TRAXLER (1994). O quadro 17 mostra a faixa de aumento do valor $1/k$ de ascosporos com 3 meses em relação aos de 1 mês (1.3 - 1.8 vezes). Os valores encontrados estão coerentes com TOURNAS & TRAXLER (1994) que determinaram o D (88°C) para ascosporos de *N. fischeri* (aquecidos em água deionizada) com 1 e 3 meses de idade, obtendo uma relação de aumento entre eles de 1.7, valor este coincidente com o aumento de $1/k$ encontrado à 90°C no presente trabalho. O valor de Z encontrado por estes autores para ascosporos de *N. fischeri* com 3 meses de idade foi 9.1°C , valor este inferior ao encontrado aqui para ascosporos com a mesma idade ($Z^* = 11.6^{\circ}\text{C}$).

Os parâmetros de morte térmica de *N. fischeri* obtidos neste estudo são superiores aos obtidos por ARAGÃO (1989), que calculou $1/k$ (90°C) = 5.5 minutos e $Z^* = 6.17^{\circ}\text{C}$ usando suco de morango (15°BRIX, pH 2.9) como meio de aquecimento. Entretanto, o valor obtido $1/k$ (90°C) para ascosporos com 1 mês (6.14 minutos) está dentro da faixa de $1/k$ à 90°C (4.4 - 6.6 minutos) estabelecida por KOTZEKIDOU (1997) para ascosporos de *N. fischeri* com a mesma idade, utilizando suco de tomate (16 % de sólidos solúveis, pH 4.2) como meio de aquecimento. Em relação a trabalhos onde os parâmetros cinéticos de inativação térmica são calculados tomando-se apenas a porção linear da curva de morte (D e Z), os valores dos parâmetros calculados aqui são superiores a todos estes.

Como *Bacillus coagulans* é a mais importante espécie de bactéria deterioradora de produtos de tomate por causa da sua elevada resistência térmica (alvo no processamento térmico destes alimentos), é verificado aqui se o tratamento comercial aplicado na indústria de derivados de tomate (para controle de *B. coagulans*) controla também fungos termoresistentes :

Para *B. coagulans* :

D (121°C) = 2 segundos (ALSKOG 1995)

Para 12 reduções decimais $\Rightarrow F_0 = 12D_{121^{\circ}\text{C}} = 12.2 = 24$ segundos (coloca-se uma margem de segurança de 6 segundos) ou seja, o tratamento térmico comercial utilizado para polpa de tomate é de **30 segundos à 121°C** .

Para *N. fischeri* :

Valor de k (121°C) = $46.11 \text{ minutos}^{-1}$ (calculado por extrapolação dos dados obtidos para ascosporos com 3 meses de idade). Considerando que a população inicial da

polpa antes do tratamento térmico seja 1 esporo/ 100 ml (a situação de maior contaminação antes da esterilização verificada nos lotes 3 e 5), então N_0 (população/embalagem) será 5 ascosporos / embalagem

Se : $t = 30$ segundos (0.5 minutos)
 $C = 0.8$ (estimado para 121°C)

O valor de N_F (população final após o processo) será :

- Partindo-se da equação de linearização de ALDERTON & SNELL (1970) :

$$(\log N_0 - \log N_F)^a = kt + C \rightarrow \log N_0 - \log N_F = (kt + C)^{1/a} \quad (\text{eq. 4})$$

$$\rightarrow \log N_F = \log N_0 - (kt + C)^{1/a} \rightarrow N_F = 10^{\log N_0 - (kt + C)^{1/a}} \quad (\text{eq. 5})$$

$$\text{Aplicando os valores : } N_F = 10^{\log 5 - (46,11 \cdot 0,5 + 0,8)^{1/0,3911}} \rightarrow N_F < 10^{-9}$$

∴ É insignificante o valor de N_F quando se utiliza 30 segundos à 121°C .

- No caso de utilizar a probabilidade de sobrevivência de 1 ascosporo de *N.fischeri* em 1 milhão de embalagens :

Para $N_0 = 5$ ascosporos / embalagem

$$N_F = 1 \text{ ascosporo} / 10^6 \text{ embalagem} = 10^{-6}$$

tem-se que o tempo de processo à 121°C seria :

$$t = (\log N_0 - \log N_F)^a \cdot C/k = (\log 5 - \log 10^{-6})^{0,3911} \cdot 0,8/46,11 = 0,0283 \text{ minutos ou } 1,7 \text{ segundos !}$$

∴ Se for considerado apenas ascosporos livres, 30 segundos à 121°C seriam suficientes, porém na polpa de tomate podem existir ascosporos e ascos . Considerando o ensaio de diferentes choques (Ítem 2) foi utilizada uma suspensão que continha ascos e ascosporos livres e este fungo (*N. fischeri*) suportou um choque térmico de $100^\circ\text{C}/25$ minutos ! Deve-se levar também em conta o fato de que os ascosporos e ascos desta linhagem de *N. fischeri* que ocorrem na natureza podem ser mais resistentes em comparação com os mesmos obtidos *in vitro*.

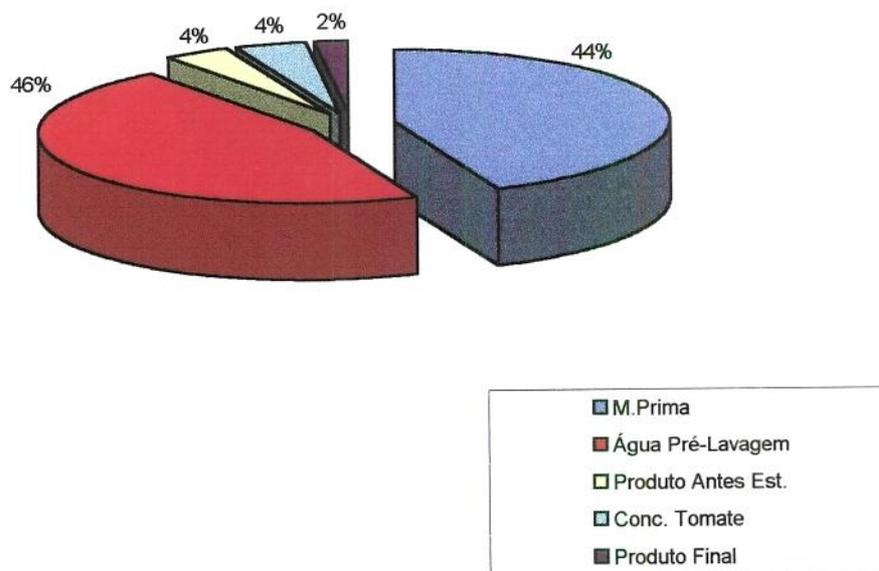


Figura 3 - Distribuição (%) dos isolados de fungos de acordo com a origem

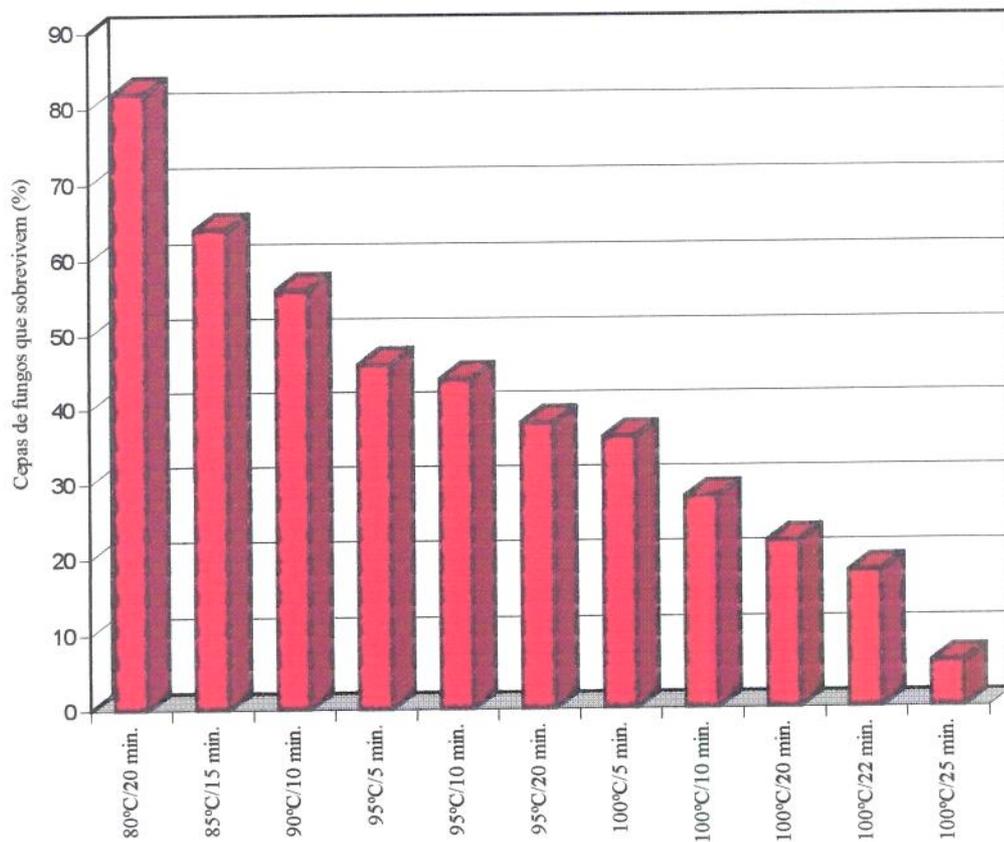


Figura 4 - Distribuição (%) de sobrevivência dos isolados de fungos aos choques térmicos

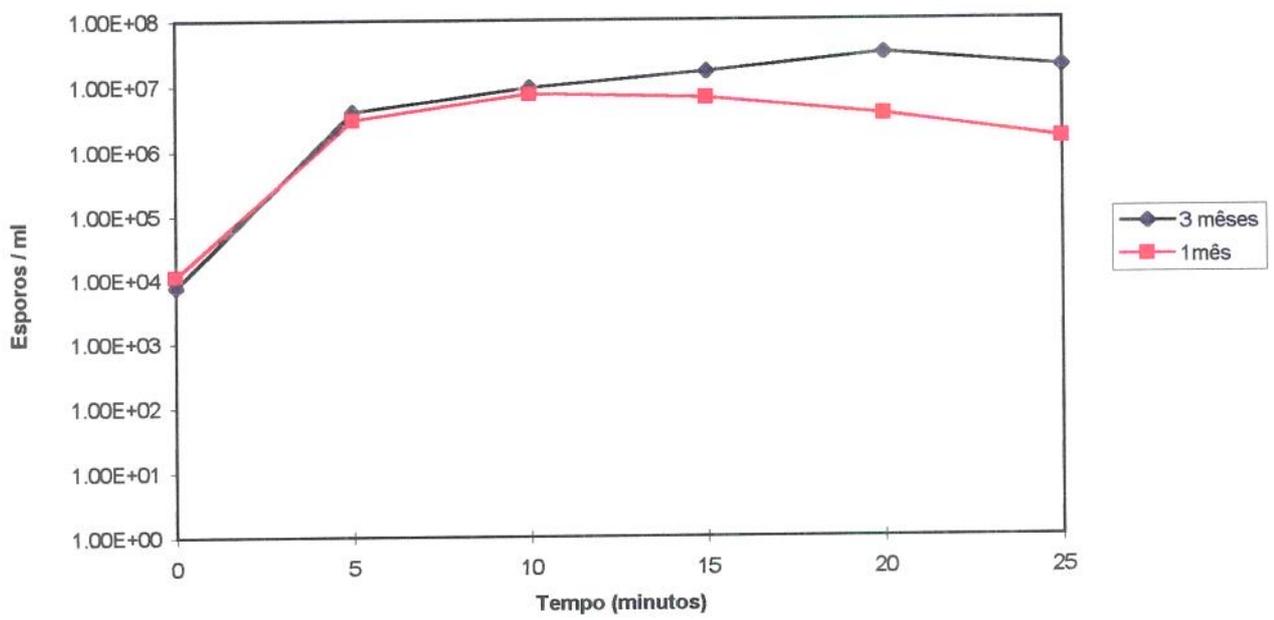


Figura 5 - Curvas de ativação à 85°C

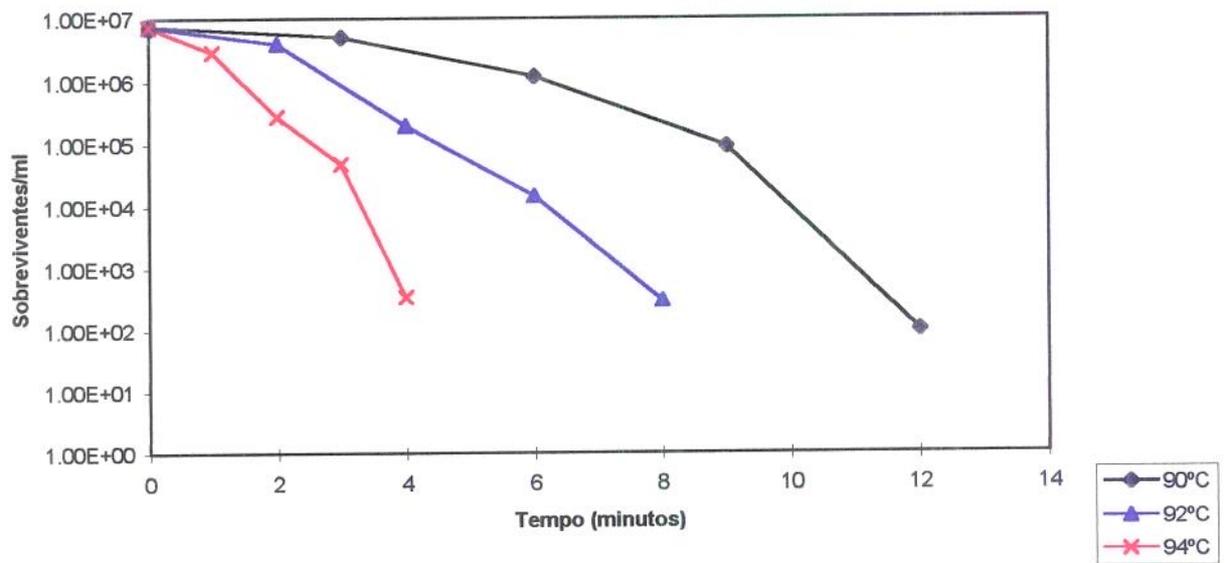


Figura 6 - Curvas de Inativação Térmica - Ascosporos de *N. fischeri* com 1 mês

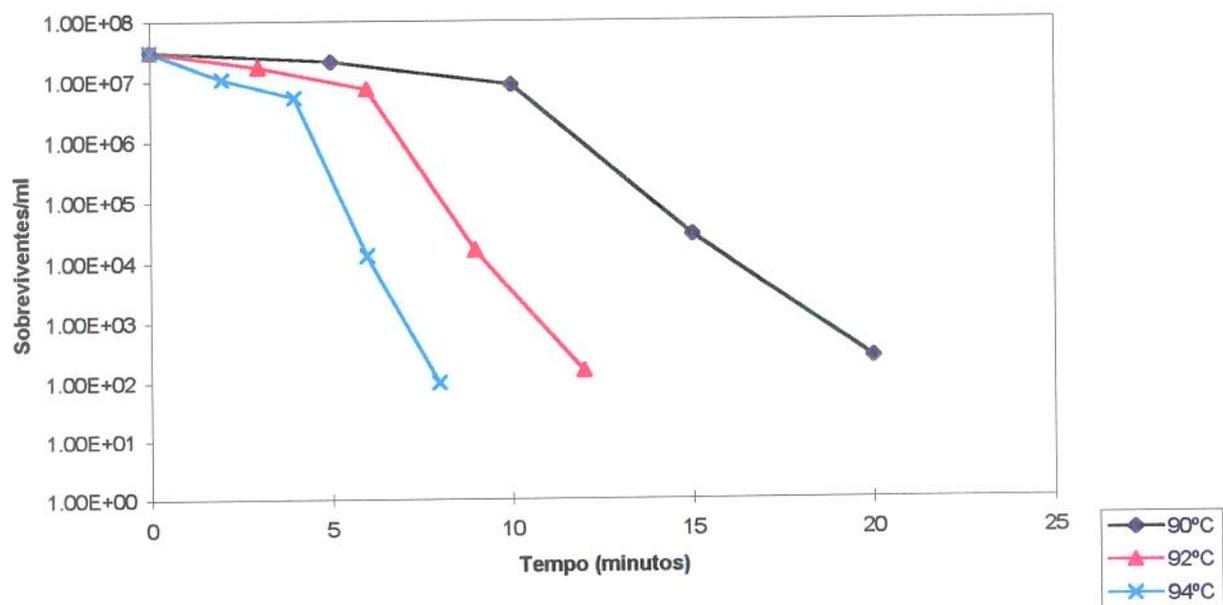


Figura 7 - Curvas de Inativação Térmica - Ascosporos de *N. fischeri* com 3 meses

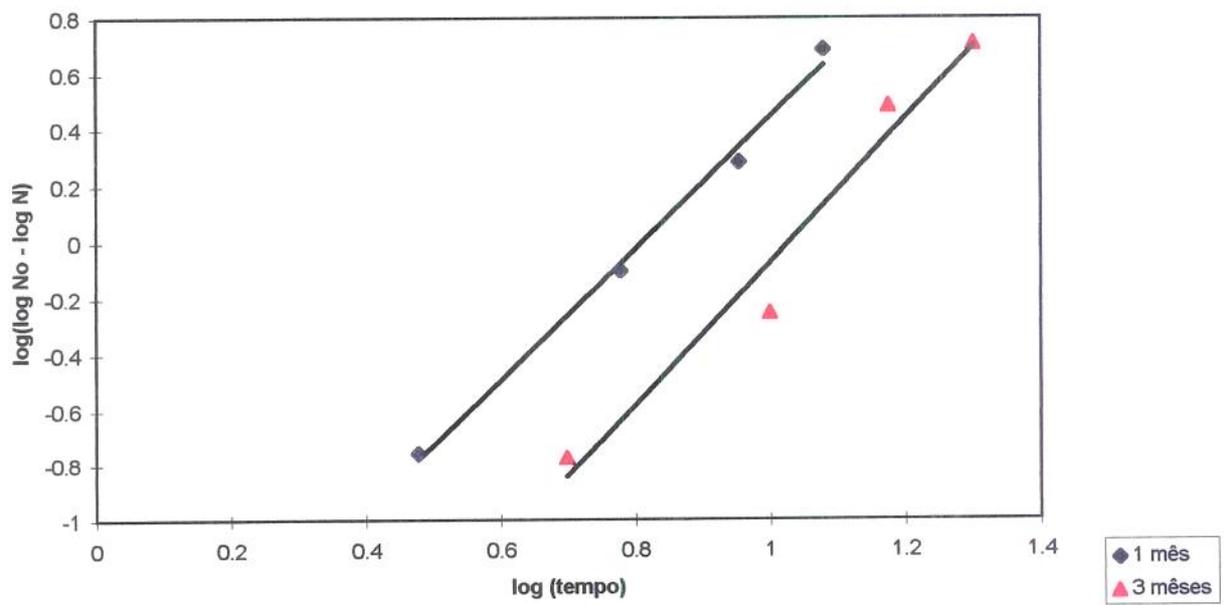


Figura 8 - Determinação do valor de "a"

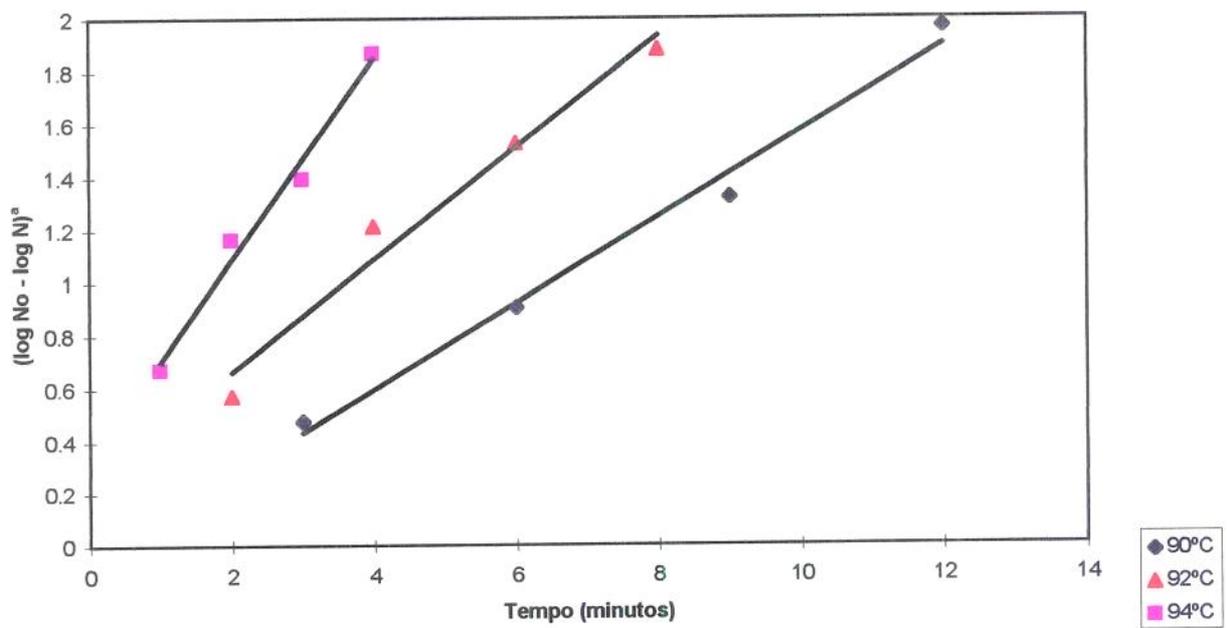


Figura 9 - Curvas de linearização da inativação térmica de *N. fischeri* - ascospores com 1 mês

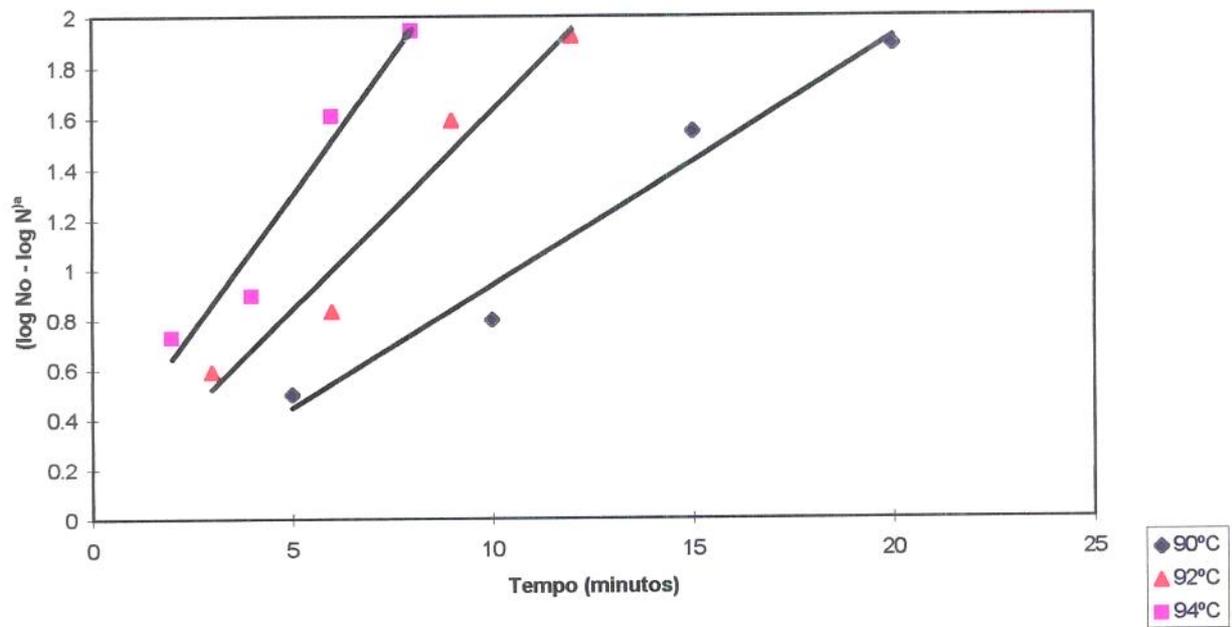


Figura 10 - Curvas de linearização da inativação térmica de *N. fischeri* - ascosporos com 3 meses

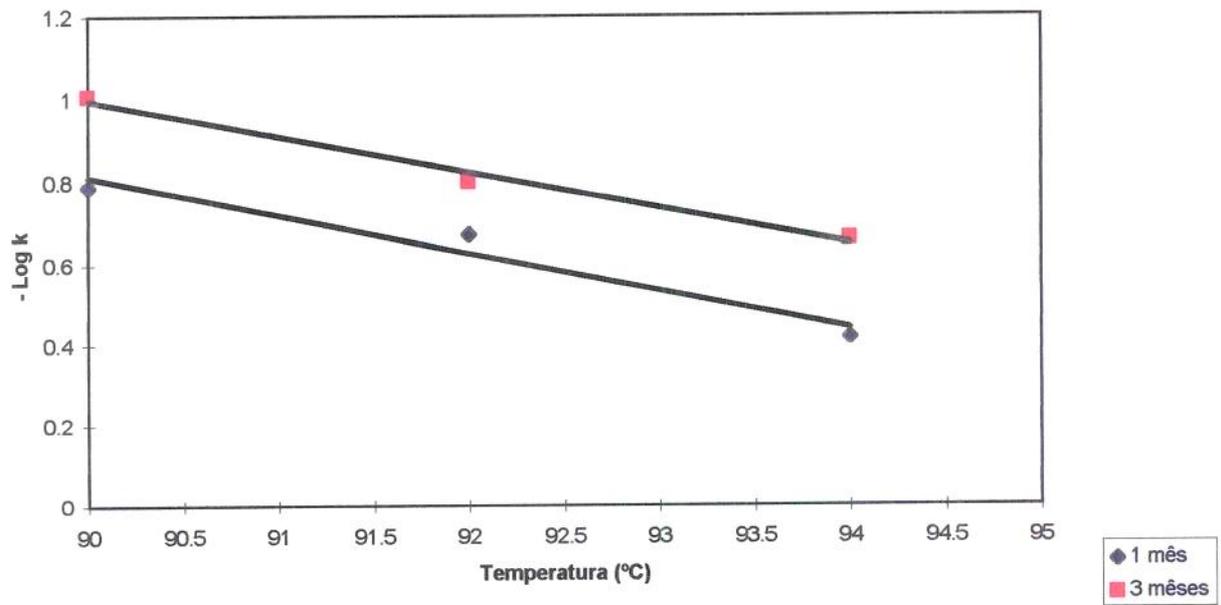


Figura 11 - Determinação de Z^*

V - CONCLUSÕES

1. A incidência de fungos termoresistentes nas amostras da safra 1996 analisadas foi baixa. A contaminação mais alta ocorreu na matéria prima e água de transporte e pré lavagem.
2. A ausência de fungos termoresistentes nas amostras durante o período de entresafra não implica necessariamente na inexistência destes microorganismos nestas amostras.
3. Com base nos resultados sobre incidência e resistência dos fungos, incluindo a comparação da resistência de *B. coagulans*, pode-se dizer que a maior probabilidade de contaminação de produto final (em embalagens assépticas) é que ocorra após o processamento térmico, sendo que neste caso podem ocorrer fungos comuns (não termoresistentes) como contaminantes. Entretanto, não deve ser ignorada a possibilidade da linhagem mais termoresistente de fungo encontrada (pertencente à espécie *N. fischeri*) sobreviver ao tratamento térmico de esterilização aplicado para polpa de tomate na indústria (121°C/30 segundos), levando-se em conta a acentuada fase "lag" das curvas de inativação térmica (principalmente no caso de ascosporos de maior idade), a eventual presença de ascos íntegros no produto antes da esterilização e a hipótese de que os ascosporos deste fungo presentes no solo podem ser mais termoresistentes que estes produzidos *in vitro*.
4. O ensaio de avaliação do tipo de deterioração provocada pelo fungo *N. fischeri* em polpa de tomate revelou que podem ocorrer profundas alterações no produto. O fenômeno de elevação de pH na polpa pode propiciar ambiente para o desenvolvimento de outros microorganismos (que crescem em pH > 4.6), incluindo bactérias patogênicas, como o *Clostridium botulinum*.
5. O uso de uma matéria prima de boa qualidade, a lavagem e seleção adequada desta matéria prima, a sanificação e condições assépticas das áreas de processamento e embalagem são medidas de controle tanto de fungos termoresistentes quanto de fungos comuns na planta de processamento de tomate.

VI - SUGESTÕES

A nível de processamento industrial, sugerimos :

1. Não deixar que a água de pré-lavagem e transporte entre na planta de processamento. A separação dos tomates desta água poderá ser feita por meio de elevadores de canecas.
2. Deixar o mínimo tempo possível os tomates imersos na piscina de recepção encurtando o tempo de espera dos tomates para processamento para no máximo 2 horas.
3. Realizar uma lavagem mais completa : duas etapas de lavagem por imersão dos tomates e uma etapa de lavagem por aspersão . As etapas de imersão são feitas em tanques com água clorada (6-8 ppm), onde os tomates são agitados por ar comprimido e a etapa de aspersão com uma série de aspersores de água clorada à alta pressão (cerca de 8 atm), que retiram a água suja e restos de sujidades e impurezas que ainda estejam aderidas.
4. Seleção mais apurada dos tomates : remoção dos tomates com mais de 25 % de área danificada.
5. Registro e controle do tempo de residência e temperatura do esterilizador.
6. Rigor no que se refere à higiene na sala de envase, incluindo a higiene dos operadores que aí trabalham e a estocagem do material de embalagem em local adequado.
7. Acompanhamento rigoroso do funcionamento da máquina de envase (condição e ajuste de mandíbula de selagem, tempo e temperatura do banho de peróxido) controle da hermeticidade da embalagem, assim como da manutenção e esterilização desta.

V - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALDERTON, J. & SNELL, N. Chemical states of bacterial spores : heat resistance and its kinetics at intermediate water activity. **Applied Microbiology**, v.19, p.565-572, 1970.
2. ALSKOG, L. Thermal treatment of tomato products. In : SEMINÁRIO INTERNACIONAL DA ATUALIZAÇÃO DA TECNOLOGIA DO PROCESSAMENTO E ENVASE ASÉPTICO DE PRODUTOS DERIVADOS DE TOMATE. **Anais**. São Paulo, 1995.
3. ARAGÃO, G.M.F. **Identificação e determinação da resistência térmica de fungos filamentosos termoresistentes isolados da polpa de morango**. Campinas, 1989, 139 p. Tese de Mestrado - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.
4. BANNER, M.J.; MATTICK, L.R. & SPLITTSTOESSER, D. F. Chemical composition of the ascospores of *Byssochlamys fulva*. **Journal of Food Science**, v.44, n.2, p.545-548, 1979.
5. BAYNE, H.G. & MICHENER, H.D. Heat resistance of *Byssochlamys* ascospores. **Applied Environmental Microbiology**, v.37, n.3, p.449-453, 1979.
6. BERNHARDT, L.W. Enlatamento de hortaliças naturalmente ácidas. In : PASCHOALINO, J.E. (Ed.) **Processamento de Hortaliças**. Campinas : Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1994, p.18-32. (Manual Técnico, 4).
7. BEUCHAT, L.R. Effectiveness of various food preservatives in controlling the outgrowth of *Byssochlamys nivea* ascospores. **Mycopathologia** , v.59, n.3, p.175-178, 1976. Apud: 13.
8. _____ Extraordinary heat resistance of *Talaromyces flavus* and *Neosartorya fischeri* ascospores in fruit products. **Journal of Food Science**, v.51, n.6, p.1506-1510, 1986.
9. _____ Thermal tolerance of *Talaromyces flavus* ascospores as affected by growth medium, age and sugar content in the inactivation. **Transactions of British Mycological Society**, v.90, n.3, p.359-364, 1988a .

10. _____ Influence of organic acids on heat resistance characteristics of *Talaromyces flavus* ascospores. **International Journal of Food Microbiology**, v.6, p.97-105, 1988b.
11. _____ Survival of *Neosartorya fischeri* and *Talaromyces flavus* ascospores in fruit powders. **Letters of Applied Microbiology**, v.14, p.238-240, 1992.
12. _____ & PITT, J.I. Detection and enumeration of heat resistant molds. In : VANDERZANT, C. & SPLITTSTOESSER, D. F. (Eds.) **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 3^a ed., Washington : A.P.H.A., 1992. Cap. 17, p. 251-253.
13. _____ & RICE, S.L. *Byssochlamys spp.* and their importance in processed fruits . **Advances in Food Research** , v.25, p.237-289, 1979.
14. _____ & TOLEDO, R.T. Behaviour of *Byssochlamys nivea* ascospores in fruit syrups. **Transactions of British Mycological Society**, v.68, n.1, p.65-71, 1977.
15. BULGARELLI, M.A. & BRACKETT, R.E. The importance of fungi in vegetables. In : ARORA, D.K., MUKERJI, K.G. & MARTH, E.H. (Eds.) **Handbook of Applied Mycology - Foods and Feeds**. New York : Marcel Dekker Inc., 1991. V.3, Cap.6, p.179-199.
16. BUTZ, P.; FUNTENBERGER, S.; HABERDITZL, T. & TAUSCHER, B. High pressure inactivation of *Byssochlamys nivea* ascospores and other heat resistant moulds. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v.29, p.404-410, 1996.
17. CARTWRIGHT, P. & HOCKING, A.D. *Byssochlamys* in fruit juice. **Food Technology**, v.36, n.5, p.210-211, 1984.
18. CHANDLER, H. & KLOSTMEYER, H. Production of lipase by *Byssochlamys fulva*. **Journal of Food Protection**, v.46, n.8, p.707-709, 1983.
19. CHU, F.S & CHANG, C.C. Proteolytic enzymes of eight *Byssochlamys fulva* isolates. **Mycologia**, v.65, p.920, 1973. Apud 99.
20. 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 .

21. _____ 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.
22. _____ & CHANG, C.J. Age related changes in ultrastructure and chemical composition associated with changes in heat resistance of *Neosartorya fischeri* ascospores . **Transactions of British Mycological Society**, v.89, n.4, p.539-550, 1987.
23. CORRY, J.E.L. Relationships of water activity to fungal growth. In : BEUCHAT, L.R. (Ed.) **Food and Beverage Mycology**. 2^a ed. New York : AVI Publ., 1987, Cap.2, p.51-99.
24. DRAUGHON, F.A.; CHEN, S. & MUNDT, J.O. Metabiotic association of *Fusarium*, *Alternaria* e *Rhizoctonia* with *Clostridium botulinum* in fresh tomatoes. **Journal of Food Science**, v.53, n.1, p.120-123, 1988.
25. ECKARDT, C. & AHRENS, E. Investigations about *Byssochlamys fulva* Olliver & Smith as a potential spoilage agent in canned strawberries. Part A. Occurrence and growth of *Byssochlamys fulva*. **Chemical Microbiologie und Technologie Lebensmittel** , v.5, p.71-75, 1977.
26. EIROA, M.N.U. Microorganismos deteriorantes de suco de frutas e medidas de controle. **Boletim SBCTA** , Campinas, v.23, n.3/4, p.141-160, 1989.
27. _____ & AMSTALDEN, V.C. Ocorrência de espécies de *Byssochlamys* em hortas, pomares e vinhedos da região de Campinas, **Coletânea ITAL**, Campinas, v.15, p.61-70, 1985.
28. ENGEL, G. & TEUBER, M. Heat resistance of *Byssochlamys nivea* in milk and cream. **International Journal of Food Microbiology**, v.12, p.225-234, 1991.
29. ENIGL, 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.
30. FERNANDES, M. S. Contaminação fúngica e a legislação vigente no Brasil e outros países. In : SEMINÁRIO INTERNACIONAL DA ATUALIZAÇÃO DA TECNOLOGIA DO PROCESSAMENTO E ENVASE ASSÉPTICO DE PRODUTOS DERIVADOS DE TOMATE. **Anais**. São Paulo, 1995.

31. FIGUEIREDO, M.C.L. Fabricação de Extrato de Tomate . In : YOKOYA, F. (Ed.) **Microbiologia de processos e produtos alimentícios**. Campinas : Publicação FTPT, 1974, p.57-77.
32. FONSECA, H. Tecnologia de transformação - Parte C. In : MINAMI, K. & FONSECA, H. (Eds.) **Tomate - Produção, Pré-Processamento e Transformação Agroindustrial** . Série Extensão Agroindustrial, nº 8, 1982.
33. FRANK, H.K.; ORTH, R. & FIGGE, A. Patulin in foods of plant origin. II. Several kinds of fruits and vegetables products. **Z. Lebensmittel Unters. Forsch.**, v.163, p.111, 1977. Apud 99.
34. FRAVEL, D.R. & ADAMS, P.B. Estimation of United States and world distribution of *Talaromyces flavus*. **Mycologia** , v.78, n.4, p.684-686, 1986.
35. FRISVAD, J.C. & SAMSON, R.A. Filamentous fungi in foods and feeds : Ecology, Spoilage and Micotoxin production. In : ARORA, D.K.; MUKERJI, K.G. & MARTH, E.H. (Eds.) **Handbook of Applied Mycology - Foods and Feeds**. New York : Marcel Dekker Inc., 1991. V.3, Cap.2, p.31-68.
36. GRAJALES, G.M.A. **Avaliação microbiológica do concentrado de tomate em diferentes pontos da linha de processamento**. Campinas, 1996, 137 p. Tese de Mestrado - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.
37. GOMEZ, M.M.; BUSTA, F.F. & PFLUG, I.J. Effect of the post dry heat treatment temperature on the recovery of ascospores of *Neosartorya fischeri*. **Letters Applied Microbiology**, v.8, p.59-62, 1989.
38. 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, 98 p. Tese de Mestrado - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.
39. _____ **Comunicação Pessoal** , 1996.
40. HANG, Y.D. & WOODAMS, E.E. Thermophilic glucoamilase from *Talaromyces flavus*. **Letters Applied Microbiology**, v.17, p.156-157, 1993.
41. _____ Amylolytic activity of *Byssoschlamys fulva* . **Letters Applied Microbiology**, v.18, p.77-78, 1994.

42. HATCHER, W.S.; WEIHE, J.L.; MURDOCK, D.I.; FOLLINAZZO, J.F.; HILL, E.C. & ALBRIGO, L.G. Growth requirements and thermal resistance of fungi belonging to genus *Byssochlamys*. **Journal of Food Science**, v.44, n.1, p.118-122, 1979.
43. HOCKING, A.D. & PITT, J.I. Food spoilage fungi. II. Heat Resistant Fungi. **CSIRO Food Research Quaterly**, v.44, n.4, p. 73-82, 1984.
44. _____ Introduction and summary of the First International Workshop of Standardisation of the methods for the mycological examination of foods. In : SAMSON, R.A.; HOCKING, A.D.; PITT, J.I. & KING, A.D. (Eds.) **Modern Methods in Food Mycology**. Amsterdam : Elsevier, 1992, Cap.1, p.3-7.
45. HOPKINS, J. The toxicological hazards of patulin. **Food Chemical Toxicology**, v.31, n.6, p.455-456, 1993.
46. HULL, R. Studies of *Byssochlamys fulva* and control measures in processed fruits. **Ann. Applied Biology**, v.26, p.800-822, 1939. Apud 13.
47. HUTHNEN, C.N.; NAGSKI, J.; CUSTER, C.S. & RUSSELL, R.W. Growth and toxin production by *Clostridium botulinum* in moldy tomato juice. **Applied Enviromental Microbiology**, v.32, n.5, p.711-715, 1976.
48. JESENKA, Z.; PIECKOVA, E. & BERNAT, D. Heat resistance of fungi from soil. **International Journal of Food Microbiology**, v.19, p.187-192, 1993.
49. _____ & SEPTIKOVA, J. Thermoresistant propagules of *Neosartorya fischeri* : Some ecologic considerations. **Journal of Food Protection**, v.54, n.8, p.582-584, 1991.
50. KATAN, T. Heat activation of dormant ascospores of *Talaromyces flavus*. **Transactions of British Mycological Society**, v.84, p.748-750, 1985.
51. KAVANAGH, J.; LARCHET, N. & STUART, M. Occurence of heat resistance species of *Aspergillus* in canned strawberries. **Nature**, v.198, p.1322, 1963. Apud 99.
52. KING, A.D. & HALBROOK, W.U. Ascospore heat resistance and control measures for *Talaromyces flavus* isolated from fruit juice concentrate . **Journal of Food Science**, v.52, p.1252-1254/ 1266, 1987.

53. KING Jr., A.D.; BAYNE, H.G. & ALDERTON, G. Nonlogarithmic death rate calculations for *Byssochlamys fulva* and other microorganisms. **Applied Environmental Microbiology**, v.37, n.3, p.596-600, 1979.
54. _____; MICHENER, H.D. & ITO, K.A. Control of *Byssochlamys* and related heat resistant fungi in grape products. **Applied Microbiology**, v.18, p.166-173, 1969.
55. _____; WHITEHAND, L.C. Alterations of *Talaromyces flavus* heat resistance by growth conditions and heat medium composition. **Journal of Food Science**, v.55, n.3, p.830-832/836, 1990.
56. KOTZEKIDOU, P. Heat resistance of *Byssochlamys nivea*, *Byssochlamys fulva* and *Neosartorya fischeri* isolated from canned tomato paste. **Journal of Food Science**, v.62, n.2, p.410-412/437, 1997.
57. _____ Production of polygalacturonase by *Byssochlamys fulva*. **Journal of Industrial Microbiology**, v.7, p.53-56, 1991.
58. KU, M.A. & HANG, Y.D. Lipolytic enzyme activity of *Byssochlamys fulva*. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v.27, p.390-391, 1994.
59. LEITÃO, M.F.F. Microbiologia de sucos de produtos ácidos. **Boletim ITAL**, v.33, p.9-42, 1973.
60. MAGGI, A.; GOLA, S.; SPOTTI, E.; ROVERE, P. & MUTTI, P. Trattamenti ad alta pressione di ascospore di muffe termoresistenti e di patulina in nettare di albicocca e in acqua. **Industria Conserve**, v.69, p.26-29, 1994.
61. MINAMI, K. Tecnologia de Produção - Parte A. In: MINAMI, K. & FONSECA, H. (Eds.) **Tomate - Produção, Pré-Processamento e Transformação Agroindustrial**. Série Extensão Agroindustrial, nº 8, 1982.
62. MUNDT, J.O. Effect of mold growth on the pH of tomato juice. **Journal of Food Protection**, v.41, n.4, p.267-268, 1978.
63. _____ & NORMAN, J.M. Metabiosis and pH of moldy fresh tomatoes. **Journal of Food Protection**, v.45, n.9, p.829-832, 1982.
64. MURDOCK, D.I.; HATCHER, W.S. A simple method to screen fruit juices and concentrates for heat resistant mold. **Journal of Food Protection**, v.41, p.254-256, 1978.

65. MURO, M.A. & LUCHI, M.R. Métodos de Preservação. In : _____ (Eds.) **Preservação de Microorganismos**. Campinas : Publicação F.T.P.T., 1989, Cap. I, p. 8-12.
66. NIELSEN, P.V. Preservative and temperature effect on growth of three varieties of the heat resistant mold, *Neosartorya fischeri*, as measured by an impedimetric method. **Journal of Food Science** , v.56, n.6, p.1735, 1991.
67. _____ ; 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.
68. _____ Growth and fumitremorgin production by *Neosartorya fischeri* as affected by food preservatives and organic acids. **Journal of Applied Bacteriology**, v.66, p.197-207, 1989a.
69. _____ 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.
70. ODLAUG, T.E. & PFLUG, I.J. *Clostridium botulinum* growth and toxin production in tomato juice containing *Aspergillus gracilis*. **Applied Environmental Microbiology**, v.37, p.496-504, 1979.
71. OKAGBUE, R. N. Heat resistant fungi in soil samples from Northern Nigeria . **Journal of Food Protection**, v.52, n.1, p.59-61, 1989.
72. OLLIVER, M. & RENDLE, T. A new problem in fruit preservation . Studies on *Byssochlamys fulva* and its effect on the tissues of processed fruit . **Journal of Society Chem. Ind.** , v.53, p.166T, 1934. Apud 13.
73. PAISANO, M. Suco de Tomate. In : YOKOYA, F. (Ed.) **Microbiologia de processos e produtos alimentícios**. Campinas : Publicação FTPT, 1974, p.81-90.
74. PITT, J. I. **The genus *Penicillium* and its Teleomorphic States *Eupenicillium* and *Talaromyces*** . London : Academic Press, 1979.
75. _____ & HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. Sydney : Academic Press, 1985, 413 p.

76. _____ ; SAMSON, R.A. & KING, A.D.
 Recomendations from the closing session of SMMEF II. In :
 _____ (Eds.) **Modern methods in food
 mycology**. Amsterdam : Elsevier, 1992, p.359-368.
77. PORRETTA, S. Il controllo della stabilità microbiologica dei derivati del
 pomodoro. In : _____ (Ed.) **Il controllo della qualità dei derivati del
 pomodoro**. Parma : Stazione Sperimentale per l'industria delle conserve alimentari,
 1992, p.204-212.
78. PUT, H.M.C. A selective method for cultivating heat resistant moulds, particularly
 those of genus *Byssochlamys* and their presence in Dutch Soil. **Journal of Applied
 Bacteriology**, v.27, n.1, p.59-64, 1964. Apud 13.
79. 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.
80. REPS, A.; POZNANSKI, S. & KOWALSKA, W. Characteristics and biological
 properties of the milk coagulating enzyme obtained from the mould *Byssochlamys
 fulva*. **Bulletim Acad. Pol. Science**, v.17, p.535, 1969. Apud 99.
81. RICE, S.L.; BEUCHAT, L.R. & HEATON, E.K. Changes in the composition and
 texture of canned peach halves infected with *Byssochlamys fulva*. **Journal of Food
 Science** , v.42, p.1562-1565, 1977a.
82. _____ & WORTHINGTON, R.E. Patulin production by
Byssochlamys spp. in fruit juices. **Applied Enviromental Microbiology**, v. 34, n.6,
 p.791-796, 1977b.
83. ROLAND, J.O & BEUCHAT, L.R. Biomass and patulin production by
Byssochlamys nivea in apple juice as affected by sorbate, benzoate, SO₂ and
 temperature . **Journal of Food Science** , v.49, p.402-406, 1984.
84. _____ ; WORTHINGTON, R.E. & HITCHCOCK,
 H.L. 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, n.3, p.237-241, 1984.
85. ROSENTHAL, A. & SILVA, J.L. Alimentos sob pressão. **Engenharia de
 Alimentos**, v.14, p.37-39, 1997.

86. SAMSON, R.A. Filamentous fungi in food and feed. **Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement**, v.18, p. 27S-35S, 1989.
87. _____; VAN REENEN HOEKSTRA, E.S. & HARTOG, B.J. Influence of pretreatment of raspberry pulp on the detection of heat resistant moulds. In : SAMSON, R.A.; HOCKING, A.D.; PITT, J.I. & KING, A.D. (Eds.) **Modern methods in food mycology**. Amsterdam : Elsevier, 1992, p. 155-158.
88. SCOTT, V.N. & BERNARD, D.T. Heat resistance of *Talaromyces flavus* and *Neosartorya fischeri* isolates from commercial fruit juices. **Journal of Food Protection**, v.50, n.1, p.18-20, 1987.
89. SPLITTSTOESSER, D. F. Fungi of importance in processed fruits. In : ARORA, D.K.; MUKERJI, K.G. & MARTH, E.H. (Eds.) **Handbook of Applied Mycology - Foods and Feeds**. New York : Marcel Dekker Inc., 1991. V.3, Cap.7, p.201-219.
90. _____; CADWELL, M.C. & MARTIN, M. Ascospore production by *Byssochlamys fulva*. **Journal of Food Science**, v.34, p.248-250, 1969.
91. _____ & CHUREY, J.J. Reduction of heat resistance of *Neosartorya fischeri* ascospores by sulphur dioxide. **Journal of Food Science**, v.56, p.876-877, 1991.
92. _____; EINSET, A.; WILKINSON, M.; PREZIOZE, J. Effect of food ingredients in heat resistance of *Byssochlamys fulva* ascospores. In : INTERNATIONAL CONGRESS OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY, 4, Madrid, **Proceedings... Vol.3**, p.79-85.
93. _____; KUSS, F.R.; HARRISON, W. & PREST, D.B. Incidence of heat resistant molds in Eastern Orchards and Vineyards. **Applied Microbiology**, v.21, n.2, p.335-337, 1971.
94. _____; LAMMERS, J.M.; DOWNING, D.L. & CHUREY, J.J. Heat resistance of *Eurotium herbariorum*, a xerophilic mold. **Journal of Food Science**, v.54, n.3, p.683-685, 1989.
95. _____; NIELSEN, P.V. & CHUREY, J.J. Detection of viable ascospores of *Neosartorya*. **Journal of Food Protection**, v.56, p.599-603, 1993.

96. _____ & SPLITTSTOESSER, C.M. Ascospores of *Byssochlamys* compared with those of a heat resistant *Aspergillus*. **Journal of Food Science**, v.42, p.685-688, 1977.
97. SPOTTI, E.; QUINTARALLA, S. & MUTTI, P. Contaminazione da spore fungine termoresistenti di frutta, pomodoro e loro derivati. **Industria Conserve**, v.67, p. 421-425, 1992.
98. SPURGIN, M.M. Suspected occurrence of *Byssochlamys fulva* in Queensland grown canned strawberries. **Queensl. Journal of Agricultural Anim. Science**, v.21, p.247-250, 1964. Apud 13.
99. TOURNAS, V. Heat Resistant Fungi of importance to the food and beverage industry. **Critical Review Microbiology**, v.20, n.4, p. 243-263, 1994.
100. _____ & TRAXLER, R.W. Heat resistance of a *Neosartorya fischeri* strain isolated from pineapple juice frozen concentrate. **Journal of Food Protection**, v.57, n.9, p. 814-816, 1994.
101. URWUANYI, J.O & OBETA, J.A.N. Incidence of heat resistant fungi in Nsukka, Southern Nigeria. **International Journal of Food Microbiology**, v.13, p.157-164, 1991.
102. VAN DER SPUY, J.E.; MATHEE, J.N. & CRAFFORD, D.J.A. The heat resistance of moulds *Penicillium vermiculatum* Dangeard and *Penicillium brefeldianum* Dodge in apple juice. **Phitophylactica**, v.7, p.105-108, 1975. Apud 99.
103. VICINI, E. Indagine sulle cause di alterazione microbiologica dei derivati del pomodoro negli anni 1969 - 1985. **Industria Conserve**, v.61, p.338-345, 1986.
104. _____ Note sulla microbiologia delle conserve alimentari acidi e dei derivati del pomodoro in particolare. **Industria Conserve**, v.59, p.22-25, 1984.
105. _____; BARBUTTI, S.; SPOTTI, E.; CAMPAGNINI, M.; CASTELARI, F.; GOLA, S; MANGANELLI, E. & CASOLARI, A. Alterazione di succhi di frutta determinata da muffe gasogene. **Industria Conserve**, v.58, p.238, 1983.
106. YATES, A. R. The occurrence of *Byssochlamys sp.* moulds in Ontario. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, p.7, n.2, p.148-150, 1974.

107. YATES, A.R. & FERGUSON, W.E. Observation on *Byssochlamys nivea* isolated from cucumber brine . **Canadian Journal of Botany**, v.41,p. 1599-1601, 1963.
108. _____ ; SEAMAN, A.; WOODBINE, M. Growth of *Byssochlamys nivea* in vários carbon dioxide atmosfers. **Canadian Journal of Microbiology**, v.13, p.1120-1123, 1967.
109. YOKOYA, F. Contagem de fungos nos produtos de tomate pelo método Howard. **Industria de Alimentos**, v.1, n.1, p.42-46, 1976.
110. WILLIAMS, C.C.; CAMERON, E.J. & WILLIAMS, D.B. A facultatively anaerobic mould of unusual heat resistance. **Food Research**, v.6,p.69-73, 1941. Apud 43.

Apêndice 1 - Meios de Cultura e soluções utilizadas

1) Ágar Batata Dextrose (PDA, DIFCO)

Infusão de Batatas.....200 g

Dextrose..... 20 g

Ágar..... 15 g

Água..... 1000 ml

pH final 5,6 . Esterilizar à 121°C / 15 minutos.

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

Rosa de bengala..... 0,5 g

Água.....10 g

Esterilizar à 121°C/10 minutos. Estocar sob refrigeração (4°C), fora do alcance da luz .

3) Solução de ácido tartárico 10 %

Ácido Tartárico.....10 g

Água..... 100 ml

Esterilizar à 121°C/10 minutos. Estocar sob refrigeração(4°C).

4) Solução de leite desnatado 5 %

Leite em pó desnatado..... 5 g

Água.....100 ml

Esterilizar à 121°C/10 minutos. Estocar sob refrigeração(4°C).

5) Ágar Extrato de Malte (MEA, PITT 1979)

Extrato de Malte..... 20 g

Glucose..... 20 g

Peptona..... 1 g

Ágar..... 20 g

pH final 5,5. Dissolver todos os componentes (à quente) e esterilizar à 121°C/15 minutos.

Apêndice 2 - Aplicação do teste de Tukey para comparar a contaminação por fungos termoresistentes em início, pico e fim de safra

Quadro - Análise de Variância (considerando apenas Matéria Prima e Água de Pré Lavagem e Transporte, pois são as amostras de maior contaminação)

Causas de Variação (C.V.)	Grau de Liberdade (GL)	Soma Quadrados (SQ)	Quadrado Médio (QM)	Fator F (QM/QM _{resíduo})
Período Safra	2	5,86	2,93	73,25
Amostras	1	0,76	0,76	19,00
Resíduo	2	0,08	0,04	-
Total	5	6,68	-	-

Comparação do F calculado (Quadro acima) e F tabelado ao nível de 5 % de significância → Se F calculado \geq F tabelado, há diferenças significativas

$$F(\text{Períodos de safra}) = 73,25$$

$$F(\text{tabelado, ao nível de 5\% de significância}) = 19,00$$

∴ Há diferença significativa

Teste de Tukey (Teste de Médias)

$$\Delta 5 \% = q \cdot (\text{QM}_{\text{resíduo}}/\text{GL})^{1/2}$$

$$q (\text{Tabelado}) = 4,50$$

$$\Delta 5 \% = 4,50(0,04/2)^{1/2} = 0,64 (\text{Valor Crítico})$$

Período Safra	Contagens Médias de fungos termoresistentes nos períodos
Início	1,25
Pico	3,20
Fim	0,99

Diferença das médias :

$$\text{Pico} - \text{Início} = 3,20 - 1,25 = 1,95 (\text{Maior que o valor crítico})$$

$$\text{Início} - \text{Fim} = 1,25 - 0,99 = 0,26$$

$$\text{Pico} - \text{Fim} = 3,20 - 0,99 = 2,21 (\text{Maior que o valor crítico})$$

∴ Em pico de safra, há diferença significativa ao nível de 5 %.

Apêndice 3 - I26L4PPF - Características de Identificação

FUNG-HOM program fungi identification output
 Unknown fungus "I26L4PPF" was identified like :
Penicillium implicatum with probability = 99.93%

No.	Micro and macro morphological characteristics	Readings results
1	Colony on CYA 25C Absent (+/-)	[-] Expected
2	Colony on CYA 25C convex (+/-)	[-] Expected
3	Colony on CYA 25C dense (+/-)	[-] Expected
4	Colony on CYA 25C very dense (+/-)	[-] Expected
5	Colony on CYA 25C low (+/-)	[-] Expected
6	Colony on CYA 25C mucoid (+/-)	[-] Expected
7	Colony on CYA 25C radially sulcate (+/-)	[+] Expected
8	Colony on CYA 25C strictly velutinous or velutinous (+/-)	[+] Expected
9	Colony on CYA 25C surface appearing powdery (+/-)	[-] Expected
10	Asci on CYA 25C [N]ot found or long (µm)	[N] Expected
11	Asci on CYA 25C width (µm)	[-] Expected
12	Ascospores on CYA 25C [N]ot found or long (µm)	[N] Expected
13	Ascospores on CYA 25C width (µm)	[-] Expected
14	Cleistothecia on CYA 25C [N]ot found or if spherical diam um	[N] Expected
15	Cleistothecia on CYA 25C [N]ot found or if elongate long um	[-] Expected
16	Gymnothecia on CYA 25C [N]ot found or diam um	[-] Expected
17	Conidia on CYA 25C [N]ot found or long (µm)	[3.1] Unexpected
18	Conidia on CYA 25C width (µm)	[3.1] Unexpected
19	Conidia on CYA 25C with rough walls (+/-)	[+] Unexpected
20	Conidia on CYA 25C with smooth walls (+/-)	[-] Unexpected
21	Conidia on CYA 25C with spinose walls (+/-)	[+] Unexpected
22	Conidia on CYA 25C with thick walls (+/-)	[+] Expected
23	Conidia on CYA 25C with thin walls (+/-)	[-] Expected
24	Conidia on CYA 25C barrel-shaped (+/-)	[-] Expected
25	Conidia on CYA 25C spherical or spheroidal or subspheroidal (+/-)	[+] Expected
26	Conidiogenesis on CYA 25C lighth (+/-)	[-] Expected
27	Conidiogenesis on CYA 25C moderate (+/-)	[-] Expected
28	Phialides per metulae on CYA 25C [N]ot found or number (1 to 99)	[8] Expected
29	Phialides on CYA 25C long (µm)	[9.6] Expected
30	Phialides on CYA 25C width (µm)	[2.3] Expected
31	Phialides on CYA 25C with smooth walls (+/-)	[+] Unexpected
32	Phialides on CYA 25C ampulliform (+/-)	[-] Expected
33	Metulae per verticil on CYA 25C [A]bsent or number (1 to 99)	[A] Expected
34	Metulae on CYA 25C long (µm)	[-] Unknown
35	Metulae on CYA 25C width (µm)	[-] Unknown
36	Vesicles on CYA 25C [N]ot found or if spherical diam (µm)	[N] Unexpected
37	Vesicles on CYA 25C spherical or spheroidal or subspheroidal (+/-)	[-] Expected
38	Stipes on CYA 25C [N]ot found or width (µm)	[3] Expected
39	Stipes on CYA 25C with smooth walls (+/-)	[+] Expected
40	Stipes on CYA 25C with thin walls (+/-)	[+] Expected
41	Penicilli on CYA 25C irregularly verticillate (+/-)	[-] Expected
42	Sclerotia on CYA 25C [N]ot found or long (µm)	[N] Unknown
43	Sclerotia on CYA 25C width (µm)	[-] Unknown
44	Asci on CYA 30C [N]ot found or diam (µm)	[-] Expected
45	Ascospores on CYA 30C [N]ot found or long (µm)	[N] Expected
46	Ascospores on CYA 30C width (µm)	[-] Expected
47	Ascospores on CY20S 25C [N]ot found or long (µm)	[N] Expected
48	Ascospores on CY20S 25C width (µm)	[-] Expected
49	Cleistothecia on CY20S 25C [N]ot found or diam (µm)	[-] Expected

FUNG-HOM program fungi identification output

Unknown fungus "I26L4PPF" was identified like :

Penicillium implicatum with probability = 99.93%

No.	Micro and macro morphological characteristics	Readings results
50	Conidia on CY20S 25C [N]ot found or long (µm)	[U] Missing datum
51	Conidia on CY20S 25C width (µm)	[U] Missing datum
52	Phialides on CY20S 25C [N]ot found or long (µm)	[U] Missing datum
53	Vesicles on CY20S 25C [N]ot found or diam (µm)	[U] Missing datum
54	Colony on G25N 25C Absent (+/-)	[-] Expected
55	Colony on G25N 25C dense (+/-)	[+] Unexpected
56	Colony on G25N 25C low (+/-)	[-] Expected
57	Colony on G25N 25C plane (+/-)	[-] Expected
58	Ascospores on G25N 25C [N]ot found or long (µm)	[N] Expected
59	Ascospores on G25N 25C width (µm)	[-] Expected
60	Cleistothecia on G25N 25C [N]ot found or diam (µm)	[N] Expected
61	Conidia on G25N 25 C [N]ot found or diam (µm)	[U] Missing datum
62	Phialides on G25N 25 C [N]ot found or long (µm)	[U] Missing datum
63	Vesicles on G25N 25 C [N]ot found or diam (µm)	[U] Missing datum

Matched expected pairs= 44
Matched unknown pairs= 4

Matched unexpected pairs= 8
Missing characteristics = 7



Apêndice 4 - Fungo selecionado como mais termoresistente (I16L4PAB, I29L5PAB, I45L8PAB) - Características de Identificação

FUNG-HOM program fungi identification output		
<i>Identification output data of Neosartorya fischeri with probability = 96.14% .</i>		
No.	Micro and macro morphological characteristics	Readings results
1	Colony on CYA 25C Absent (+/-)	[-] Expected
2	Colony on CYA 25C convex (+/-)	[-] Expected
3	Colony on CYA 25C dense (+/-)	[-] Expected
4	Colony on CYA 25C very dense (+/-)	[-] Expected
5	Colony on CYA 25C low (+/-)	[+] Unexpected
6	Colony on CYA 25C mucoid (+/-)	[-] Expected
7	Colony on CYA 25C radially sulcate (+/-)	[-] Expected
8	Colony on CYA 25C strictly velutinous or velutinous (+/-)	[-] Expected
9	Colony on CYA 25C surface appearing powdery (+/-)	[+] Unexpected
10	Asci on CYA 25C [N]ot found or long (um)	[10] Expected
11	Asci on CYA 25C width (um)	[10] Expected
12	Ascospores on CYA 25C [N]ot found or long (um)	[4.4] Unexpected
13	Ascospores on CYA 25C width (um)	[4] Expected
14	Cleistothecia on CYA 25C [N]ot found or if spherical diam um	[252] Expected
15	Cleistothecia on CYA 25C [N]ot found or if elongate long um	[N] Unknown
16	Gymnothecia on CYA 25C [N]ot found or diam um	[-] Expected
17	Conidia on CYA 25C [N]ot found or long (um)	[3] Expected
18	Conidia on CYA 25C width (um)	[2.5] Expected
19	Conidia on CYA 25C with rough walls (+/-)	[-] Expected
20	Conidia on CYA 25C with smooth walls (+/-)	[+] Expected
21	Conidia on CYA 25C with spinose walls (+/-)	[-] Expected
22	Conidia on CYA 25C with thick walls (+/-)	[-] Expected
23	Conidia on CYA 25C with thin walls (+/-)	[-] Expected
24	Conidia on CYA 25C barrel-shaped (+/-)	[-] Expected
25	Conidia on CYA 25C spherical or spheroidal or subspheroidal (+/-)	[+] Unexpected
26	Conidiogenesis on CYA 25C lighth (+/-)	[-] Expected
27	Conidiogenesis on CYA 25C moderate (+/-)	[+] Unexpected
28	Phialides per metulae on CYA 25C [N]ot found or number (1 to 99)	[1] Expected
29	Phialides on CYA 25C long (um)	[6] Expected
30	Phialides on CYA 25C width (um)	[2.2] Expected
31	Phialides on CYA 25C with smooth walls (+/-)	[+] Unexpected
32	Phialides on CYA 25C ampulliform (+/-)	[+] Unexpected
33	Metulae per verticil on CYA 25C [A]bsent or number (1 to 99)	[A] Expected
34	Metulae on CYA 25C long (um)	[-] Unknown
35	Metulae on CYA 25C width (um)	[-] Unknown
36	Vesicles on CYA 25C [N]ot found or if spherical diam (um)	[12] Expected
37	Vesicles on CYA 25C spherical or spheroidal or subspheroidal (+/-)	[+] Unexpected
38	Stipes on CYA 25C [N]ot found or width (um)	[5] Expected
39	Stipes on CYA 25C with smooth walls (+/-)	[+] Expected
40	Stipes on CYA 25C with thin walls (+/-)	[+] Expected
41	Penicilli on CYA 25C irregularly verticillate (+/-)	[-] Expected
42	Sclerotia on CYA 25C [N]ot found or long (um)	[N] Unknown
43	Sclerotia on CYA 25C width (um)	[-] Unknown
44	Asci on CYA 30C [N]ot found or diam (um)	[U] Missing datum
45	Ascospores on CYA 30C [N]ot found or long (um)	[U] Missing datum
46	Ascospores on CYA 30C width (um)	[U] Missing datum
47	Ascospores on CY20S 25C [N]ot found or long (um)	[U] Missing datum
48	Ascospores on CY20S 25C width (um)	[U] Missing datum
49	Cleistothecia on CY20S 25C [N]ot found or diam (um)	[U] Missing datum

FUNG-HOM program fungi identification output

Identification output data of *Neosartorya fischeri* with probability = 96.14% .

No.	Micro and macro morphological characteristics	Readings results
50	Conidia on CY20S 25C [N]ot found or long (um)	[U] Missing datum
51	Conidia on CY20S 25C width (um)	[U] Missing datum
52	Phialides on CY20S 25C [N]ot found or long (um)	[U] Missing datum
53	Vesicles on CY20S 25C [N]ot found or diam (um)	[U] Missing datum
54	Colony on G25N 25C Absent (+/-)	[-] Expected
55	Colony on G25N 25C dense (+/-)	[-] Expected
56	Colony on G25N 25C low (+/-)	[+] Unexpected
57	Colony on G25N 25C plane (+/-)	[-] Expected
58	Ascospores on G25N 25C [N]ot found or long (um)	[N] Unknown
59	Ascospores on G25N 25C width (um)	[-] Unknown
60	Cleistothecia on G25N 25C [N]ot found or diam (um)	[U] Missing datum
61	Conidia on G25N 25 C [N]ot found or diam (um)	[3] Unknown
62	Phialides on G25N 25 C [N]ot found or long (um)	[5] Unknown
63	Vesicles on G25N 25 C [N]ot found or diam (um)	[13] Unknown

Matched expected pairs = 33 Matched unexpected pairs = 9
Matched unknown pairs = 10 Missing characteristics = 11

----- // -----

Camera lucida image of *Neosartorya fischeri*:

