

ADRIANA PAULA SLONGO

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE DIFERENTES FATORES NA
TERMORRESISTÊNCIA DO FUNGO *NEOSARTORYA FISCHERI* EM
SUCOS TROPICAIS**

Florianópolis – SC
2004

ADRIANA PAULA SLONGO

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE DIFERENTES FATORES NA
TERMORRESISTÊNCIA DO FUNGO *NEOSARTORYA FISCHERI* EM
SUCOS TROPICAIS**

Dissertação submetida à Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do grau de mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gláucia Maria Falcão de Aragão

Florianópolis, dezembro de 2004

“Estudo da Influência de Diferentes Fatores na Termorresistência do Fungo *NEOSARTORYA FISCHERI* em Sucos Tropicais”

Por

Adriana Paula Slongo

Dissertação julgada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia de Alimentos**, área de **Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

Profa. Dra. Gláucia M. Falcão Aragão
Orientadora

Profa. Dra. Gláucia M. Falcão Aragão
Coordenadora da CPGEA

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Pilar Rodrigues de Massaguer

Prof. Dr. Amauri Rosenthal

Prof. Dr. José Carlos Cunha Petrus

Florianópolis, 14 de dezembro de 2004.

*Dedico esta obra a duas pessoas
que são meus maiores exemplos
de luta e de perseverança, meus
queridos e amáveis pais.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por sempre estar abrindo as portas do meu caminho.

Agradeço a duas pessoas que são meus eternos exemplos de lição de vida, pessoas a quem serei eternamente grata pelo amor, afeto, companheirismo e por tudo que conquistei até este momento: minha mãe ALEXANDRINA ÂNGELA DE CARLI SLONGO e meu pai GERALDO SLONGO.

À minha orientadora Professora Gláucia Maria Falcão Aragão, por ter me aceitado para fazer parte deste projeto, pela orientação, pela paciência, pelo apoio, pelas críticas e correções, pelo exemplo de garra e dentre outros, pela expressiva contribuição para minha formação profissional, especialmente no que diz respeito ao mundo microscópico.

Ao pesquisador da Embrapa CTAA-RJ, Amauri Rosenthal, Ph.D, por ter acreditado em minha capacidade e por ter me proporcionado à oportunidade de fazer parte deste projeto, cuja realização muito me gratificou.

Aos membros da banca examinadora: Pilar Rodriguez de Massaguer e José Carlos Cunha Petrus.

Ao meu namorado Bernardo, pelo amor, pelo apoio, pela paciência e compreensão e pelo incentivo sempre presente.

A todos os demais membros de minha família, obrigada pelo apoio especialmente nos momentos difíceis pelos quais passamos e pelos laços de amor que sempre são manifestados e estão sempre presentes mesmo de longe.

A Maria de Fátima Valentim Alberto, pessoa que não a considero somente amiga, mas um exemplo de amor, de companheirismo e que sempre esteve ao meu lado apoiando-me, mesmo que fisicamente distante; a você o meu eterno amor e afeto.

Às bolsistas Claudia Alves Costa e Suzane Miorelli, que sempre me ajudaram diretamente na execução desta pesquisa com muita disposição e sempre questionando e levantando dúvidas sobre a pesquisa desenvolvida.

À amiga Beatriz de Cássia Martins Salomão, que sempre me ajudou a entender o comportamento, às vezes, anormal dos fungos e, que me fez ver que mais imprevisível que a vida são os fungos.

Às amigas legais e saudáveis que nasceram no convívio das atividades do laboratório de Engenharia Bioquímica e com quem espero ter sempre contato: Fernanda Streit e Lilian Dutra Ferreira.

Às demais colegas que fiz no laboratório de Engenharia Bioquímica: Cíntia Maria, Érika, Vanessa, Renata, Ernandes, Adriane, Cristiane, Murilo, Renato, Denise, Rafael e Mônica.

Ao projeto PRODETAB, Tetra Pak e empresas processadoras de sucos, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS	III
NOMENCLATURA	IV
RESUMO	V
ABSTRACT	VII
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO	2
CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 – CONSUMO DE BEBIDAS À BASE DO ABACAXI	5
2.2 – A IMPORTÂNCIA DE FUNGOS EM ALIMENTOS	6
2.3 – FUNGOS FILAMENTOSOS TERMORRESISTENTES	7
2.3.1 – SUB-REINO ASCOMICOTINA	7
2.4 – PRINCIPAIS ESPÉCIES DE FUNGOS TERMORRESISTENTES E SUA OCORRÊNCIA	8
2.4.1 - NEOSARTORYA	9
2.4.2 – OUTROS FUNGOS TERMORRESISTENTES	11
2.5 – PRODUÇÃO DE ENZIMA E MICOTOXINAS POR FUNGOS TERMORRESISTENTES	13
2.6 – FATORES QUE AFETAM O CRESCIMENTO E O DESENVOLVIMENTO DE FUNGOS	15
2.6.1 – BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO (BPF)	16
2.6.2 – ATIVIDADE DE ÁGUA (AW)	17
2.6.3 – PH	17
2.6.4 – PRESENÇA DE ÁCIDOS ORGÂNICOS	18
2.6.5 – TEOR DE SÓLIDOS SOLÚVEIS	19
2.6.6 – MEIOS DE AQUECIMENTO	20
2.6.7 - ADIÇÃO DE CONSERVANTES	21
2.6.8 - TEMPO E TEMPERATURA DE PRODUÇÃO DOS ASCÓSPOROS	22
2.6.9 – ATMOSFERA (O ₂ , CO ₂ , N ₂)	23
2.7 – EFEITOS DA CONTAMINAÇÃO E DETERIORAÇÃO DE ALIMENTOS POR FUNGOS TERMORRESISTENTES	23
2.8 – PRODUÇÃO, ATIVAÇÃO E AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA TÉRMICA DE FUNGOS	25
2.8.1 – PRODUÇÃO DOS ASCÓSPOROS	25
2.8.2 – ATIVAÇÃO DOS ASCÓSPOROS	26
2.8.3 – DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE RESISTÊNCIA TÉRMICA	27
2.8.4 - MEIO DE RECUPERAÇÃO DOS ASCÓSPOROS APÓS ENSAIO DE RESISTÊNCIA TÉRMICA	28
2.9 - CINÉTICA DE INATIVAÇÃO TÉRMICA (MÉTODO DE LINEARIZAÇÃO DE ALDERTON & SNELL, 1970)	28
2.10 - PARÂMETROS DE RESISTÊNCIA TÉRMICA	30
CAPÍTULO III – MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 - ESCOLHA DO FUNGO TERMORRESISTENTE E MEIO DE AQUECIMENTO	34
3.2 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FRACIONÁRIO	34
3.3 – PRODUÇÃO DE ESPOROS	36

3.4 - COLETA DOS ASCÓSPOROS	36
3.5 - DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ DE SUCOS DE FRUTAS	37
3.6 - DETERMINAÇÃO DO °BRIX	37
3.7 - DETERMINAÇÃO DO <i>RATIO</i> (°BRIX / ACIDEZ)	37
3.8 – AJUSTE DOS VALORES DE <i>RATIO</i>	38
3.8.1 - BAIXOS VALORES DE <i>RATIO</i>	38
3.8.2 - ELEVADOS VALORES DE <i>RATIO</i>	38
3.9 - DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE ELEVAÇÃO DA TEMPERATURA	38
3.10 - DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE ATIVAÇÃO DOS ASCÓSPOROS	39
3.11 - DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA TÉRMICA	39
<u>CAPÍTULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÕES</u>	<u>42</u>
4.1 – INFLUÊNCIA DE DIFERENTES FATORES NO TRATAMENTO DE ATIVAÇÃO DE ASCÓSPOROS DE <i>NEOSARTORYA FISCHERI</i> EM SUCO DE ABACAXI E MAMÃO.	44
4.2 - INFLUÊNCIA DE DIFERENTES FATORES NA TERMORRESISTÊNCIA DE <i>NEOSARTORYA FISCHERI</i> EM SUCOS TROPICAIS.	57
4.2.1 - INFLUÊNCIA DE DIFERENTES FATORES NA TERMORRESISTÊNCIA DE <i>NEOSARTORYA FISCHERI</i> EM SUCO DE MAMÃO.	58
4.2.2 - INFLUÊNCIA DE DIFERENTES FATORES NA TERMORRESISTÊNCIA DE <i>NEOSARTORYA FISCHERI</i> EM SUCO DE ABACAXI.	73
CONCLUSÃO	83
4.2.3 - COMPARAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE DIFERENTES FATORES NA TERMORRESISTÊNCIA DE <i>NEOSARTORYA FISCHERI</i> EM SUCO DE MAMÃO E DE ABACAXI.	86
<u>CAPÍTULO V – CONCLUSÕES E SUGESTÕES</u>	<u>91</u>
<u>CAPÍTULO VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	<u>94</u>
<u>ANEXOS</u>	<u>101</u>
ANEXO I – ATIVAÇÕES	101
ANEXO II – CONTAGEM DO NÚMERO DE SOBREVIVENTES	106
ANEXO III – CURVAS DE SOBREVIVENTES	114
ANEXO IV – MEIOS UTILIZADOS	125

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Ciclo reprodutivo do ascomicetos.....	7
Figura A1 - Curvas de Ativação Térmica de ascósporos de <i>N. fischeri</i> utilizando como meio de aquecimento suco de abacaxi com diferentes valores de <i>ratio</i> nas condições de: (○) produção a 25°C por 1 mês e <i>ratio</i> 10, (□) produção a 25°C por 3 meses e <i>ratio</i> 10, (◆) produção a 25°C por 1 mês e <i>ratio</i> 38, (▲) produção a 25°C por 3 meses e <i>ratio</i> 38 e (●) produção a 30°C por 2 meses e <i>ratio</i> 24.	104
Figura A2 - Curvas de Ativação Térmica de ascósporos de <i>N. fischeri</i> utilizando como meio de aquecimento suco de abacaxi com diferentes valores de <i>ratio</i> nas condições de: (○) produção a 35°C por 1 mês e <i>ratio</i> 10, (□) produção a 35°C por 3 meses e <i>ratio</i> 10, (◆) produção a 35°C por 1 mês e <i>ratio</i> 38 e (▲) produção a 35°C por 3 meses e <i>ratio</i> 38.	104
Figura A3 - Curvas de Ativação Térmica de ascósporos de <i>N. fischeri</i> utilizando como meio de aquecimento suco de mamão com diferentes valores de <i>ratio</i> nas condições de: (○) produção a 25°C por 1 mês e <i>ratio</i> 26, (□) produção a 25°C por 3 meses e <i>ratio</i> 26, (◆) produção a 25°C por 1 mês e <i>ratio</i> 66, (▲) produção a 35°C por 3 meses e <i>ratio</i> 66 e (●) produção a 30°C por 2 meses e <i>ratio</i> 46.	105
Figura A4 - Curvas de Ativação Térmica de ascósporos de <i>N. fischeri</i> utilizando como meio de aquecimento suco de mamão com diferentes valores de <i>ratio</i> nas condições de: (○) produção a 35°C por 1 mês e <i>ratio</i> 26, (□) produção a 35°C por 3 meses e <i>ratio</i> 26, (◆) produção a 35°C por 1 mês e <i>ratio</i> 66 e (▲) produção a 35°C por 3 meses e <i>ratio</i> 66.	105
Figura A6 - Curvas de Inativação Térmica de ascósporos de <i>N. fischeri</i> produzidos a 25°C por 1 mês e utilizando suco de abacaxi como meio de aquecimento apresentando <i>ratio</i> (a) 10 e (b) 38 nas temperaturas de tratamento térmico: (◆) 80°C, (□) 85°C e (○) 90°C.	115
Figura A7 - Curvas de Inativação Térmica de ascósporos de <i>N. fischeri</i> produzidos a 25°C por 3 meses e utilizando suco de abacaxi como meio de aquecimento apresentando <i>ratio</i> (a) 10 e (b) 38 nas temperaturas de tratamento térmico(◆) 80°C, (□) 85°C e (○) 90°C.	115
Figura A8 - Curvas de Inativação Térmica de ascósporos de <i>N. fischeri</i> produzidos a 35°C por 1 mês e utilizando suco de abacaxi como meio de aquecimento apresentando <i>ratio</i> (a) 10 e (b) 38 nas temperaturas de tratamento térmico(◆) 80°C, (□) 85°C e (○) 90°C.	115
Figura A9 - Curvas de Inativação Térmica de ascósporos de <i>N. fischeri</i> produzidos a 35°C por 3 meses e utilizando suco de abacaxi como meio de aquecimento apresentando <i>ratio</i> (a) 10 e (b) 38 nas temperaturas de tratamento térmico(◆) 80°C, (□) 85°C e (○) 90°C.	116
Figura A10 - Curvas de Inativação Térmica de ascósporos de <i>N. fischeri</i> produzidos a 30°C por 2 meses e utilizando suco de abacaxi como meio de aquecimento apresentando <i>ratio</i> 24 nas temperaturas de tratamento térmico(◆) 80°C, (□) 85°C e (○) 90°C.	116
Figura A11 - Curvas para a determinação do parâmetro “a” à temperatura de 80°C para as condições de (◇) produção a 25°C por 1 mês e <i>ratio</i> 10, (□) produção a 25°C por 3 meses e <i>ratio</i> 10, (○) produção a 25°C por 1 mês e <i>ratio</i> 38, (▲) produção a 25°C por 3 meses e <i>ratio</i> 38 e (◆) produção a 30°C por 2 meses e <i>ratio</i> 24.	116
Figura A12 - Curvas para a determinação do parâmetro “a” à temperatura de 80°C para as condições de (◇) produção a 35°C por 3 meses e <i>ratio</i> 38, (□) produção a 35°C por 1 mês e <i>ratio</i> 10, (○) produção a 35°C por 1 mês e <i>ratio</i> 10 e (▲) produção a 25°C por 3 meses e <i>ratio</i> 10.	117
Figura A13 – Curvas de linearização da inativação térmica de ascósporos de <i>N. fischeri</i> produzidos a 25°C por 1 mês e aquecidos a 80, 85 e 90°C em suco de abacaxi com <i>ratio</i> 10 (a) e <i>ratio</i> 38 (b).	117
Figura A14 – Curvas de linearização da inativação térmica de ascósporos de <i>N. fischeri</i> produzidos a 25°C por 3 meses e aquecidos a 80, 85 e 90°C em suco de abacaxi com <i>ratio</i> 10 (a) e <i>ratio</i> 38 (b).	117
Figura A15 – Curvas de linearização da inativação térmica de ascósporos de <i>N. fischeri</i> produzidos a 35°C por 1 mês e aquecidos a 80, 85 e 90°C em suco de abacaxi com <i>ratio</i> 10 (a) e <i>ratio</i> 38 (b).	118
Figura A16 – Curvas de linearização da inativação térmica de ascósporos de <i>N. fischeri</i> produzidos a 35°C por 3 meses e aquecidos a 80, 85 e 90°C em suco de abacaxi com <i>ratio</i> 10 (a) e <i>ratio</i> 38 (b).	118
Figura A17 – Curvas de linearização da inativação térmica de ascósporos de <i>N. fischeri</i> produzidos a 30°C por 2 meses e aquecidos a 80, 85 e 90°C em suco de abacaxi com <i>ratio</i> 24.	118
Figura A18 - Determinação de Z* para <i>N. fischeri</i> (Curva TDT) nas condições de: (◇) produção a 25°C por 3 meses e <i>ratio</i> 10, (□) produção a 25°C por 1 mês e <i>ratio</i> 38, (○) produção a 25°C por 1 mês e <i>ratio</i> 10, (▲) produção a 25°C por 3 meses e <i>ratio</i> 38 e (◆) produção a 30°C por 2 meses e <i>ratio</i> 24.	119
Figura A19 - Determinação de Z* para <i>N. fischeri</i> (Curva TDT) nas condições de: (◇) produção a 35°C por 3 meses e <i>ratio</i> 10, (□) produção a 35°C por 1 mês e <i>ratio</i> 38, (○) produção a 35°C por 1 mês e <i>ratio</i> 38, (▲) produção a 35°C por 3 meses e <i>ratio</i> 38 e (◆) produção a 30°C por 2 meses e <i>ratio</i> 24.	119

Figura A20 - Curvas de Inativação Térmica de ascósporos de <i>N. fischeri</i> produzidos a 25°C por 1 mês e utilizando suco de mamão como meio de aquecimento apresentando ratio (a) 26 e (b) 66 nas temperaturas de tratamento térmico: (◇) 80°C, (□) 85°C e (○) 90°C.....	120
Figura A21 - Curvas de Inativação Térmica de ascósporos de <i>N. fischeri</i> produzidos a 25°C por 3 meses e utilizando suco de mamão como meio de aquecimento apresentando ratio (a) 26 e (b) 66 nas temperaturas de tratamento térmico: (◇) 80°C, (□) 85°C e (○) 90°C.....	120
Figura A22 - Curvas de Inativação Térmica de ascósporos de <i>N. fischeri</i> produzidos a 35°C por 1 mês e utilizando suco de mamão como meio de aquecimento apresentando ratio (a) 26 e (b) 66 nas temperaturas de tratamento térmico: (◇) 80°C, (□) 85°C e (○) 90°C.....	120
Figura A23 - Curvas de Inativação Térmica de ascósporos de <i>N. fischeri</i> produzidos a 35°C por 3 meses e utilizando suco de mamão como meio de aquecimento apresentando ratio (a) 26 e (b) 66 nas temperaturas de tratamento térmico: (◇) 80°C, (□) 85°C e (○) 90°C.....	121
Figura A24 - Curvas de Inativação Térmica de ascósporos de <i>N. fischeri</i> produzidos a 30°C por 2 meses e utilizando suco de mamão como meio de aquecimento apresentando ratio 46 nas temperaturas de tratamento térmico: (◇) 80°C, (□) 85°C e (○) 90°C.....	121
Figura A25 - Curvas para a determinação do parâmetro “a” à temperatura de 80°C para as condições de: (◇) produção a 25°C por 1 mês e ratio 66, (□) produção a 25°C por 3 meses e ratio 26, (○) produção a 25°C por 1 mês e ratio 26, (▲) produção a 25°C por 3 meses e ratio 66 e (●) produção a 30°C por 2 meses e ratio 24.....	121
Figura A26 - Curvas para a determinação do parâmetro “a” à temperatura de 80°C para as condições de: (◇) produção a 35°C por 1 mês e ratio 26, (□) produção a 35°C por 1 mês e ratio 26, (○) produção a 35°C por 1 mês e ratio 26 e (▲) produção a 35°C por 1 mês e ratio 26.....	122
Figura A27 – Curvas de linearização da inativação térmica de ascósporos de <i>N. fischeri</i> produzidos a 25°C por 1 mês e aquecidos a 80, 85 e 90°C em suco de abacaxi com ratio 26 (a) e ratio 66 (b).	122
Figura A28 – Curvas de linearização da inativação térmica de ascósporos de <i>N. fischeri</i> produzidos a 25°C por 3 meses e aquecidos a 80, 85 e 90°C em suco de abacaxi com ratio 26 (a) e ratio 66 (b).	122
Figura A29 – Curvas de linearização da inativação térmica de ascósporos de <i>N. fischeri</i> produzidos a 35°C por 1 mês e aquecidos a 80, 85 e 90°C em suco de abacaxi com ratio 26 (a) e ratio 66 (b).	123
Figura A30 – Curvas de linearização da inativação térmica de ascósporos de <i>N. fischeri</i> produzidos a 35°C por 3 meses e aquecidos a 80, 85 e 90°C em suco de abacaxi com ratio 26 (a) e ratio 66 (b).	123
Figura A31 - Determinação de Z* para <i>N. fischeri</i> (Curva TDT) nas condições de: (◇) produção a 25°C por 1 mês e ratio 26, (□) produção a 25°C por 3 meses e ratio 26, (○) produção a 25°C por 1 mês e ratio 66 e (▲) produção a 25°C por 3 meses e ratio 66.....	123
Figura A32 - Determinação de Z* para <i>N. fischeri</i> (Curva TDT) nas condições de: (◇) produção a 35°C por 1 mês e ratio 26, (□) produção a 35°C por 3 meses e ratio 26, (○) produção a 35°C por 1 mês e ratio 66, (▲) produção a 35°C por 3 meses e ratio 66 e (◆) produção a 30°C por 2 meses e ratio 46.....	124

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.2.1 – Níveis e fatores utilizados no planejamento experimental para suco de abacaxi.....	35
Tabela 3.2.2 - Ensaios do planejamento experimental 23 com triplicata no ponto central para suco de abacaxi.....	35
Tabela 3.2.3 – Níveis e fatores utilizados no planejamento experimental para suco de mamão.....	35
Tabela 3.2.4 - Ensaios do planejamento experimental 23 com triplicata no ponto central para suco de mamão.....	35
Tabela A1 - Recuperação (MEA profundidade) dos ascósporos de <i>N. fischeri</i> coletados a diferentes temperaturas e idades de produção, em suco de abacaxi apresentando diferentes <i>ratios</i> do meio de aquecimento à temperatura de 85°C.....	102
Tabela A2 - Recuperação (MEA profundidade) dos ascósporos de <i>N. fischeri</i> coletados a diferentes temperaturas e idades de produção, em suco de mamão apresentando diferentes <i>ratios</i> do meio de aquecimento à temperatura de 85°C.....	103
Tabela A3 - Contagem do número de ascósporos de <i>N. fischeri</i> que sobreviveram aos tratamentos térmicos a 80, 85 e 90°C em suco de abacaxi, tratados a diferentes temperaturas e idades de esporulação e diferentes <i>ratios</i> (relação °brix/acidez) do meio de aquecimento.....	107
Tabela A4 - Contagem do número de ascósporos de <i>N. fischeri</i> que sobreviveram aos tratamentos térmicos a 80, 85 e 90°C em suco de mamão, a diferentes temperaturas e idades de esporulação e diferentes <i>ratios</i> (relação °brix/acidez) do meio de aquecimento.....	110

NOMENCLATURA

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

MEA = Ágar Extrato de Malte

TDT = Tempo de morte térmica

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

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

F = valor de esterilização (segundos)

RESUMO

Os sucos de frutas tropicais processados termicamente, embalados assepticamente em garrafas de vidro ou de plástico, atualmente, estão sendo cada vez mais utilizados pelas famílias brasileiras considerando a praticidade de seu armazenamento por não requerer, necessariamente, refrigeração antes de ser utilizado e seu armazenamento. O estudo de fungos termorresistentes é de suma importância, pois os mesmos têm sido frequentemente associados à deterioração destes sucos, devido às características que possuem de sobreviverem à temperatura de pasteurização.

As condições do meio de aquecimento assim como a idade dos ascósporos e a temperatura em que ocorre a sua produção demonstraram uma grande variação na resistência térmica de fungos termorresistentes.

A presente pesquisa teve como objetivo principal estudar a influência de fatores relacionados à variação da resistência térmica do fungo *Neosartorya fischeri* em sucos de mamão e de abacaxi, usando o método de aquecimento tradicional, em tubos TDT, selados com maçarico. Através de um planejamento experimental, foi possível fazer a análise destes fatores e das interações entre eles. O planejamento experimental permitiu uma melhor constatação dos fatores que intensificaram a resistência térmica deste fungo.

Os ensaios foram realizados de acordo com a distribuição do planejamento experimental e, separadamente, para os dois sucos analisados. As temperaturas e idades de produção dos ascósporos foram iguais para ambos os sucos (25°C por 1 e 3 meses, 30°C por 2 meses e 35°C por 1 e 3 meses). Porém, o *ratio* do meio de aquecimento foi específico para cada suco (26, 46 e 66 para suco de mamão e 10, 24 e 38 para suco de abacaxi), de acordo com a faixa utilizada na indústria. Os ensaios de resistência térmica foram feitos às temperaturas de 80, 85 e 90°C. Para cada ensaio, determinou-se o tempo ótimo de ativação dos ascósporos e verificou-se a influência dos fatores analisados no tempo ativação destes.

Como as curvas de sobreviventes não apresentaram comportamento linear, foi então utilizado o método de linearização de Alderton & Snell, 1970. Este método fornece os parâmetros de resistência térmica $1/k$ (equivalente a D) e Z^* (equivalente a Z).

Os resultados dos parâmetros de todos os ensaios do planejamento experimental para suco de mamão e de abacaxi foram submetidos à análise de variância e estimativa dos efeitos através do *software* Statistica 6.0, onde se obteve a estimativa dos fatores que proporcionaram maior efeito na resistência térmica deste fungo. Nas resistências analisadas a 80°C, para o suco de mamão e suco de abacaxi, todos os fatores analisados apresentaram diferença significativa entre si proporcionaram um efeito de aumento da resistência térmica do fungo *N. fischeri* quando estes fatores variaram do nível inferior para o nível superior, correspondente a 45 % para o *ratio*, 23 % para a temperatura de produção dos ascósporos e 13 % para a idade de produção para o suco de mamão. Para o suco de abacaxi, o efeito de aumento da resistência térmica foi de 36 % para o *ratio*, seguido de 27 % para a idade de produção e de 19 % para a temperatura de produção dos ascósporos.

Nas temperaturas de 85°C e 90°C, para ambos os sucos, o aumento dos fatores apresentou um efeito pouco expressivo no aumento da resistência térmica. Os maiores valores de Z^* foram encontrados nos ensaios realizados nas menores temperaturas de produção e nos menores valores de *ratio* do meio de aquecimento (6,7°C). À medida que houve um aumento da temperatura de produção e do *ratio* do meio de aquecimento, os valores de Z^* se reduziram (5,7°C). Desta maneira, constatou-se que o aumento da *ratio* assim como da idade e temperatura de produção exercem influência na redução dos valores de Z^* .

O cálculo do valor de esterilização (F) foi feito para se verificar se o tratamento térmico comercial aplicado ao suco de mamão e ao suco de abacaxi é suficiente para

destruir os ascósporos do fungo *Neosartorya fischeri*. Para o suco de mamão, verificou-se que o tratamento aplicado pela indústria de sucos (100°C/30 segundos) é suficiente para se ter quatro reduções decimais. Para o suco de abacaxi, constatou-se que o tratamento aplicado na indústria (96°C/30 segundos) não está sendo suficiente para se ter o mesmo número de reduções decimais (4).

Palavras chave: resistência térmica, *Neosartorya fischeri*, *ratio* (°Brix/acidez), planejamento experimental, suco de fruta, idade dos ascósporos.

ABSTRACT

The heat treated tropical fruit juice aseptically packed in plastic or glass bottles is, becoming more and more popular among Brazilian families and its storage is convenient for not requiring refrigeration. The study of thermal resistant mould is of utmost importance since it has been frequently implied in the deterioration of these juices, mainly due to then ability to survive to the normal heat treatment applied in the juice industry.

The heating media conditions, the ascospore age as well as its production temperature lad to big thermal resistance differences in thermal resistant moulds.

The present research main objective was to study the influence of the factors related to the *Neosartorya fischeri* mould heat resistance in papaya and pineapple juices, using the traditional heating method in TDT stamped with blowpipe. Through an experimental planning, it was possible to evaluate the effect of those factors and the interactions between them. The experimental planning allowed a better visualization of the factors that cause the greatest effect in the mould thermal resistance.

The assays were carried out through in accordance with the experimental planning distribution, separately for the two analyzed juices. The ascospore production temperatures and ages were the same for both the juices (25°C for 1 and 3 months, 30°C for 2 months and 35°C for 1 and 3 months). However, the heating media ratio was specific for each juice (26, 46 and 66 for papaya juice and 10, 24 and 38 for pineapple juice), in accordance with the range used in the industry. The heat resistance assays were made at 80, 85 and 90°C. For each assay, the best activation time of the ascospores was determined and the influence of factors on their activation time was verified.

As the survivors curves did not present linear behavior, the Alderton & Snell, (1970), linearization method, was used. It provides the parameters of thermal resistance $1/k$ (equivalent to D) and Z^* (equivalent to Z). All the experimental planning assay parameter resulting for papaya and pineapple juices were submitted to variance analysis and to the effect estimative through Statistica 6.0 software, where by which the factors that caused greater effect in the mould thermal resistance, were estimated. At 80°C, for both juices, all the analyzed factors presented significant differences among them and provided increased *N. fischeri* mould thermal resistance when theses factors varied from inferior to superior level, at the level of 45 % for ratio, 23 % for the ascospore production temperature and 13 % for the ascospore production age for the papaya juice. The heat resistance increased 36

% for ratio, 19 % for the ascospore production temperature and 27 % for ascospore production age for pineapple juice.

At 85°C and 90°C, for both the juices, the factors increase presented a low meaning effect concerning the thermal resistance increase. The biggest Z^* values were found in the lowest incubation temperature and in the lowest heating media (6,7°C), ratio. As the incubation temperature and the heating media ratio increased, the Z^* values diminished (5,7°C). In this way, it was noticed that the increase in ratio, age as well as in incubation temperature exerted influence in the Z^* value reduction

The sterile value (F) calculation was made to verify if the commercial thermal treatment applied to papaya and pineapple juices is enough to destroy the *Neosartorya fischeri* moulds ascospore. For papaya juice, it was observed that the current heat treatment applied by the juice industry (100°C/30 seconds) is enough to obtain four decimal reductions. For pineapple juice, it was noticed that the thermal treatment applied by the industry (96°C/30 seconds) is not enough to obtain the same decimal reduction.

Keywords: thermal resistance, *Neosartorya fischeri*, ratio (°Brix/acidity), experimental planning, fruit juice and ascospore age.

***CAPÍTULO I –
INTRODUÇÃO***

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

O surgimento de demandas por produtos de melhor qualidade nutricional e com maior segurança alimentar, com características mais próximas ao produto "in-natura", tem levado à busca de processos capazes de preservar o produto contra os agentes deteriorantes como bactérias, fungos filamentosos e fungos filamentosos termorresistentes, sem acarretar os efeitos adversos ao produto final, mantendo a sua qualidade.

Na sua maioria, os fungos filamentosos são pouco resistentes ao calor. As poucas espécies que possuem termorresistência produzem esporos denominados ascósporos que não só sobrevivem, como também são ativados pelos processos de pasteurização normalmente aplicados aos produtos vegetais ácidos como as frutas (TOURNAS & TRAXLER, 1994).

A ocorrência de fungos termorresistentes tem sido freqüentemente detectada em linhas de processamento de sucos. Estes fungos, quando presentes, além de deteriorar os alimentos e causar perdas econômicas, podem produzir toxinas que são prejudiciais à saúde humana. As espécies de fungos termorresistentes mais importantes em processamento de frutas e hortaliças são: *Neosartorya fischeri*, *Byssochlamys nivea*, *Byssochlamys fulva*, *Talaromyces* sp. e *Eupenicillium* sp. (HOCHING & PITT, 1984; TOURNAS, 1994).

Vários são os fatores que podem afetar a resistência térmica de fungos filamentosos termorresistentes. Entre os principais destacam-se: pH, presença de ácidos orgânicos, teor de sólidos solúveis, atividade de água, tempo e temperatura de produção dos ascósporos, dentre outros.

A presente pesquisa visou à realização de um estudo de comparação de diferentes fatores influenciavam a resistência térmica do fungo *Neosartorya fischeri*. Foi utilizado suco de mamão e suco de abacaxi nesta pesquisa por estarem dentre as frutas mais consumidas no Brasil. Para o referido estudo foi feito um planejamento experimental para se obter a melhor constatação dos efeitos dos fatores na resistência térmica. Após a obtenção dos resultados das resistências térmicas de todos os ensaios, os mesmos foram submetidos à análise de variância e de estimativa dos efeitos dos fatores, evidenciando que

os fatores proporcionaram o maior efeito na resistência térmica através de superfícies de resposta e de curvas de níveis.

***CAPÍTULO II –
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA***

CAPÍTULO II –

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo, primeiramente, é apresentada uma revisão sobre o aumento do consumo de bebidas à base de frutas e, posteriormente, é apresentada uma revisão sobre as principais espécies de fungos termorresistentes e as enzimas e as micotoxinas por eles produzidas, sobre a sua ocorrência destes em alimentos, sobre os fatores que afetam o seu crescimento, e o seu desenvolvimento, sobre os efeitos causados por sua contaminação e por sua deterioração. São, ainda, apresentadas as etapas de produção, de ativação e de avaliação da resistência térmica destes fungos e a cinética de sua inativação térmica obtida pelo método de linearização de ALDERTON & SNELL, 1970.

2.1 – Consumo de bebidas à base do abacaxi

O abacaxi é a terceira mais importante fruta tropical cultivada no Brasil, e cuja indústria de processamento tem crescido fortemente, nesta década.

O aumento no consumo de frutas frescas pela população brasileira, verificado nos anos 90, deverá contribuir para a manutenção do crescimento da abacaxicultura brasileira, que poderá ser ainda mais significativo se acompanhado da instalação de indústrias capazes de processar *in-natura* o excedente do mercado (MATOS & SOUZA, 1998).

O abacaxi é uma fruta muito apreciada, não só pelas suas qualidades organolépticas, mas também pelo seu valor nutritivo, baseado, sobretudo, nos teores de açúcares (66% de sacarose e 34% de glicose e frutose), de vitaminas (A,B,C) e de sais minerais (particularmente, o potássio). A acidez, representada principalmente pelos ácidos cítrico e málico, é um componente determinante da qualidade (sabor) da fruta, sendo bastante influência da não só pelas condições ambientais, mas também pelas da própria planta (variedade, fase de maturação) e manejo da cultura (adubação) (CARVALHO & CUNHA, 1999; MEDINA et al., 1987).

Os frutos destinados à industrialização na forma de compotas devem se enquadrar em padrões definidos no que se refere ao tamanho (preferencialmente com diâmetros superiores a 12,7cm), à forma (preferencialmente cilíndrica), à coloração de polpa (amarela) e às características composicionais (teor de sólidos solúveis não inferior a 10,5°

Brix e de acidez não superior a 1,35%), de modo a proporcionar maior rendimento industrial e produtos de melhor qualidade. A cultivar utilizada e o grau de maturação são fatores que exercem influência acentuada na composição química do fruto e, conseqüentemente, na qualidade do produto processado. Os principais produtos processados do abacaxi são o fruto em calda (ou compota) e o suco (CARVALHO & CUNHA, 1999; MEDINA et al., 1987).

Os países que mais importam o suco de abacaxi brasileiro são os EUA, Holanda, Inglaterra, Itália e Espanha. Importam ainda quantidades significativas a França, Canadá, Alemanha, Portugal, Finlândia e Bélgica. A participação dos países do sul da Europa vem se fazendo presente, chegando a ultrapassar um importador tradicional, a Alemanha (SAVITCI, et al., 1995).

2.2 – A importância de fungos em alimentos

Os fungos estão amplamente distribuídos na natureza. Eles são encontrados no solo, em superfícies de animais, de vegetais, no ar e na água. Geralmente, encontra-se em maior quantidade nos vegetais, provocando doenças, especialmente em frutos. Em alimentos, são muito conhecidos por provocarem deteriorações (fungos filamentosos) e por produzirem micotoxinas (fungos filamentosos termorresistentes).

Segundo MISLVECET et al, (2001), devido à capacidade de adaptação a diferentes condições, os fungos e leveduras são freqüentemente encontrados como contaminantes em alimentos, em equipamentos que não sofreram processo de sanitização adequado, assim como em alimentos subprocessados, com exceção dos fungos termorresistentes. Este mesmo autor constatou, ainda, que os fungos e leveduras podem causar diferentes níveis de decomposição, variando conforme o grau de contaminação. Crescem em uma faixa de temperatura bem ampla, variando de 5 a 35°C, com espécies crescendo, inclusive, acima ou abaixo destes valores.

Os sucos de frutas raramente são deteriorados por leveduras, pois, o processo de pasteurização consegue inativa-las devido à sua baixa resistência térmica. Caso seja constatada a presença das mesmas, deve-se geralmente à recontaminação pós-processo ou a processos térmicos insuficientes. A fermentação das leveduras produz CO₂ e o etanol, tendo como principal conseqüência o estufamento de embalagens (PORRETA, 1992).

2.3 – Fungos Filamentosos Termorresistentes

2.3.1 – Sub-reino Ascomicotina

Os fungos deste reino são chamados de “Ascomicetos” por produzirem em suas estruturas reprodutivas, ascósporos dentro de um saco chamado asco.

Os fungos termorresistentes, em um certo ponto da vida de um ascomiceto, produzem núcleos diplóides por fusão nuclear. Estes núcleos sofrem meiose, seguida de mitose, ocorrendo diferenciação que dá origem a oito ascósporos haplóides que, ao amadurecerem, dão origem aos ascos que são liberados. Estes últimos são recobertos por grande corpo de frutificação que leva o nome geral de ascocarpo. Espécies termorresistentes produzem dois tipos diferentes de ascocarpo: o cleistotécio (membrana rígida, esférica, com parede lisa e completamente fechada) e o gimnóstecio (parede formada por um emaranhado de hifas). Tais espécies podem ainda produzir ascos sem ascocarpo como o gênero *Byssochlamys* (PITT & HOCKING, 1985). Estes organismos são saprófitas, não só infectam, mas diversamente de parasitas, também contaminam frutas que são cultivadas próximas da terra (TOURNAS, 1994) (Figura 2.1).

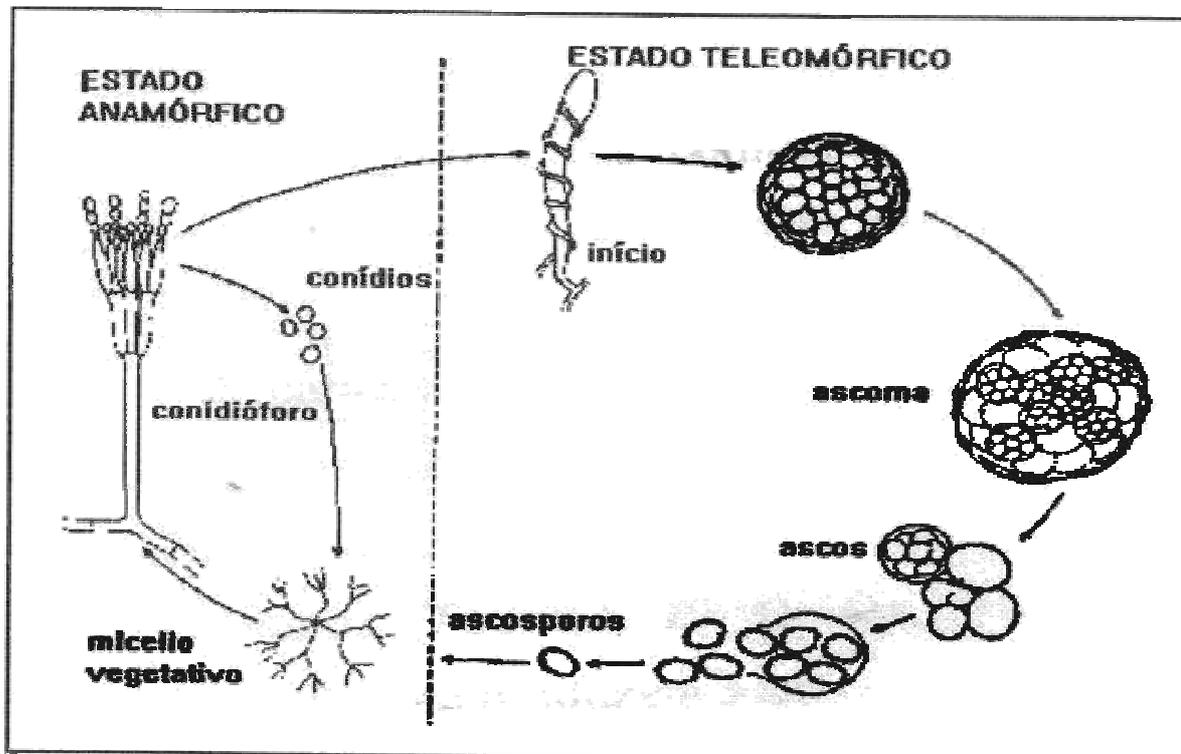


Figura 2.1 – Ciclo reprodutivo dos ascomicetos.

A ocorrência de deterioração de alimentos pela presença de ascósporos termorresistentes é muito comum devido à contaminação pelos gêneros *Neosartorya*, *Byssochlamys*, *Talaromyces* e *Eupenicillium* (TOURNAS 1994 e RAJASHEKHARA *et al.* 2000) que fazem parte do sub-reino ascomicotina. Os mesmos apresentam micélio vegetativo e haplóide, sendo os ascomatas as suas estruturas sexuais, onde estas abrigam ascos de formato globoso e subgloboso, e estes são ornamentados com ascósporos, o que explica o termo ascomiceto recebido pelo grupo (SAMSON & VAN REENEN-HOEKSTRA, 1988).

SAMSON & VAN REENEN-HOEKSTRA (1988) relataram ainda que o estado formador de ascos, conhecido como estado teleomórfico (fungo perfeito), vem sempre acompanhado de um ou mais estados assexuados que são denominados anamórfico. A maioria dos Deuteromicetos (fungos imperfeitos), é o ciclo de vida anamórfico dos Ascomicetos.

2.4 – Principais espécies de fungos termorresistentes e sua ocorrência

As primeiras citações referentes à incidência de fungos termorresistentes ocorreram nos anos 30 por OLIVER & RENDLE (1934), com estudos direcionados a espécies de *Byssochlamys*. Os resultados constataram que os campos e pomares eram as fontes de contaminação inicial de frutas processadas. Em 1939, HULL, realizou pesquisas com a finalidade de determinar as fontes de contaminação e as maneiras de controlar a deterioração de frutas processadas, constatando a presença de *Byssochlamys fulva* em 33 % das folhas e frutos de morangueiro. Posteriormente, mais tarde, constatou-se a incidência deste gênero por outros. SPLITTSTOESSER *et al.* (1971) relataram a ocorrência de fungos termorresistentes em pomares e hortas de Nova York, mostrando que mais de 70 % das amostras de frutas, de vegetais e de solo dos vinhedos e das hortas estavam contaminados por fungos termorresistentes, onde o gênero *Byssochlamys* destacou-se pela maior incidência. No Canadá, em um levantamento realizado por YATES (1974), detectou a presença de *Byssochlamys* em amostras de solos de pomares e de frutas colhidas no chão.

Na Nigéria, foram realizados estudos sobre a incidência de fungos termorresistentes, indicando a predominância de *Neosartorya fischeri*. Segundo JESENKA *et al.* (1991), ascósporos de *N. fischeri* encontram-se em quantidades significativas no solo, e são isolados em diferentes partes do mundo.

FRAVEL & ADAMS (1986), em estudo realizado para verificar a estimativa da distribuição de *Talaromyces flavus* em diferentes partes do mundo, isolaram este fungo do solo de 22, entre 33, estados norte americanos e nos outros 16 países onde foi feita esta investigação, estando o fungo, então, disseminado mundialmente.

No Brasil, EIROA & AMSTALDEN (1985) verificaram a incidência de *Byssochlamys* em hortas, pomares e vinhedos da região de Campinas, SP. Duzentas e vinte amostras de folhas e frutos de laranjeiras, tangerinas, figueiras, pessegueiros, videiras e pepinos, bem como, amostras de flores de frutos de morangueiro e amostras de solo foram examinadas. Foram isoladas espécies de *Byssochlamys* em 17,1 % do total das amostras de solo e em 1,4 % do total de amostras de folhas examinadas. Ainda que não se tenha tido nenhum isolamento de *Byssochlamys* em frutos e flores, foi considerado que a presença deste fungo em solos de plantações representa um risco potencial para a indústria de produtos ácidos de origem vegetal.

2.4.1 - *Neosartorya*

Os fungos deste gênero são caracterizados pelo aspecto granular da colônia devido à produção dos ascósporos ser desenvolvida nos ascos. Estes últimos podem sofrer ruptura instantânea, liberando os ascósporos. *Neosartorya fischeri* é a espécie que gera comprometimento, em termos de deterioração de alimentos. Suas variedades são: *N. fischeri* var. *fischeri*, *N. fischeri* var. *glabra* e *N. fischeri* var. *spinosa*, onde cada uma se distingue pela ornamentação dos ascósporos. As variedades *glabra* e *spinosa* têm sido isoladas em produtos à base de frutas, e a variedade *fischeri* é predominante de solo (NIELSEN, 1991; KAVANAGH et al., 1963; UGWUANYI & OBETA, 1991).

Este fungo, quando cultivado em meio MEA (Agar Extrato de Malte), apresenta colorações brancas, variando até creme, aspecto granular devido à grande concentração de ascomatas, com reverso creme. Microscopicamente, podem ser visualizados ascomatas com tamanho de 80-150 µm de diâmetro, contendo ascos globosos medindo 8-10 x 10-12 µm. Os ascos contém ascósporos que são biconvexos (6-7 x 4 µm), possuem uma fenda equatorial e caracterizam-se por sua superfície irregular (SAMSOM, et al., 1988; MARCOLINO, 2003).

O fungo *Neosartorya fischeri* cresce em uma faixa de temperatura de 10-52°C, sendo 26-45°C sua faixa ótima. Os ascósporos produzidos no estado teleomórfico são excepcionalmente termorresistentes (NIELSON et al, 1989). Estes ascósporos podem ainda

sobreviver aos processos térmicos comerciais de alguns produtos derivados de frutas e sucos, sendo então um fator preocupante, merecendo preocupação especial (SPLITTSTOESSER et al, 1993). Segundo JESENKÁ et al, (1991), o fungo *Neosartorya fischeri* pode sobreviver a temperaturas de 70°C por 120 minutos e 85°C por 60 minutos. Segundo PITT & HOCHING, (1985), ascósporos deste fungo podem sobreviver a tratamentos de 100°C por 12 minutos. BAGLIONI (1998) relatou em seus estudos que este mesmo fungo suportou um aquecimento de 100°C por 25 minutos.

BAGLIONI (1998) constatou que a maior contaminação por *Neosartorya* em linha de processamento deu-se na matéria-prima e na água de transporte e de pré-lavagem. Concluiu que o aparecimento deste fungo deve-se à falta de matéria-prima de boa qualidade, sanificação e condições assépticas das áreas de processamento e embalagens e procedimentos adequados de higienização. A recontaminação por *Neosartorya* do produto por fungos é a principal causa de deterioração, especialmente aspectos ligados à contaminação durante o envase. O autor observou que o fungo *Neosartorya fischeri* é uma das espécies com maior capacidade de elevar o pH dos produtos favorecendo a produção de toxinas por *Clostridium botulinum* nas proximidades ou abaixo do crescimento micelial. Contaminações como estas de *Neosartorya fischeri* podem causar alterações organolépticas no produto, favorecendo o desenvolvimento de outros microrganismos pelo aumento do pH do produto, causando um fenômeno conhecido como *metabiosis*, também constatado por GÓMEZ et al (1989).

RAJASHEKHARA et al (2000) realizaram um estudo com suco de uva e de manga, comparando as temperaturas de ativação de esporos termorresistentes de *Neosartorya fischeri*. Utilizando inóculos de 10⁴ esporos/ml, observaram que ascósporos de *N. fischeri* sobreviviam por mais de 300 minutos quando expostos à temperatura de 70, 75 e 80°C. Estes autores relataram ainda que a porcentagem de inativação térmica de ascósporos em suco de uva é menor do que em suco de manga, e a natureza protetora de determinados constituintes do suco de uva é que influencia este fenômeno, em especial os ácidos orgânicos.

JESENKA et al. (1991) constataram, o recebimento de conservas deterioradas por fungos provindos de uma planta de processamento. As cepas freqüentemente identificadas foram: *N. fischeri*, *B. nivea* e *T. flavus* correspondendo a 49,2 %, 16,4 % e 20,9 % respectivamente. O fungo *N. fischeri* foi inicialmente verificado em morangos enlatados (KAVANAGH et al., 1963).

SCOTT & BERNARD (1987), em pesquisa realizada com sucos comerciais, isolaram *N. fischeri*. Na Índia, foi constatada a ocorrência de *N. fischeri* isolada de mamão papaia por Rajashekhara et al (1996). Na Austrália, as frutas mais susceptíveis de contaminação por esporos termorresistentes foram o maracujá e o morango, assim como sucos e polpas de abacaxi e manga podem também ser fonte de contaminação, mas a laranja e outras frutas cítricas foram menos susceptíveis. O maracujá foi muito susceptível à contaminação pelo fato de usualmente ser colhido depois de cair no chão. O morango e o abacaxi foram muito susceptíveis devido ao fato de serem cultivados junto ao solo e puderam ser contaminados através de respingos de águas durante as chuvas (HOCHING & PITT, 1984). TOURNAS & TRAXLER (1994) isolaram cepas de *N. Fischeri*, a partir de concentrado de abacaxi.

UGWUANYI & OBETA (1991), em pesquisa realizada com o objetivo de verificar a presença de fungos termorresistentes, utilizaram vinte amostras de manga colhidas na Nigéria. Destas amostras, três estavam contaminadas por *Neosartorya spp.*

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

SPLITTSTOESSER (1991) relatou que ingredientes de produtos de frutas que tiveram contato com o solo, também podem apresentar uma contaminação significativa por fungos termorresistentes. A farinha de mandioca, que pode ser usada como espessante em pudins de frutas e em recheios de tortas, freqüentemente contém ascósporos de *Byssochlamys*.

2.4.2 – Outros fungos termorresistentes

O gênero *Byssochlamys* foi o primeiro fungo filamentoso termorresistente reconhecido como causador de deterioração em produtos engarrafados e enlatados à base de frutas, sendo identificado por OLLIVER & RENDLE, em 1934. Das espécies de *Byssochlamys* podemos destacar duas como sendo as de maior significância em alimentos: *Byssochlamys nivea* e *Byssochlamys fulva* (PITT & HOCHING, 1985). Os ascos deste gênero permanecem inalterados a menos que sejam submetidos a tratamento mecânico (SPLITTSTOESSER, 1991). O estágio imperfeito (anamorfo) do gênero *Byssochlamys* é constituído pelo gênero *Paecilomyces*, sendo *Paecilomyces fulva* e *Paecilomyces niveus* os estágios imperfeitos de *B. fulva* e *B. Nivea*, respectivamente.

O gênero *Byssochlamys*, por ser abundante no solo, facilmente contamina frutas como morango, ameixa, maçãs, entre outras, especialmente as colhidas próximas ao solo (OLLIVER & RENDLE, 1934). MAUNDER (1969), estudou a contaminação de sucos e de bebidas à base de frutas de maçã e de uva, concentrado de abacaxi, polpas de frutas, além de recheio para torta de amora e cereja e enlatados de amora e morango causada por *Byssochlamys*. YATES (1974), em estudos com suco de uva enlatado e concentrado de uva, isolou espécies de *Byssochlamys*. Nos Estados Unidos, contaminações de frutas enlatadas por *Byssochlamys* foram constatadas em 1967. Na Austrália, nos anos 60, foi constatada a contaminação de morangos por *Byssochlamys*.

São poucos os relatos de fungos filamentosos termorresistentes em outros produtos que não sejam frutas. ENGEL & TEUBER (1991), em pesquisa realizada com cepas de *Byssochlamys nivea*, isoladas de queijos frescos, de leite integral e de leite cru, utilizaram-nas para verificação da resistência térmica destes ascósporos, em leite e em creme de leite.

SALOMÃO (2002) conseguiu isolar uma cepa de *B. Fulva*, em análise realizada com suco de morango pasteurizado e preservado com benzoato de sódio e sorbato de potássio, demonstrando assim a resistência termoquímica que este microrganismo apresenta. MAUNDER (1969) e SPLITSTOESSER et al (1970) demonstraram a deterioração de *Paecilomyces varioti*, em sucos e em concentrados. MAUNDER (1969) constatou a presença deste fungo em três sucos pasteurizados e processados, dentre eles, sucos de uva, maçã e ameixa.

Segundo PIECKOVÁ (2000), o gênero *Paecilomyces* e algumas cepas de *Fusarium* possuem a capacidade de sobreviver a choques térmicos de 95°C por 10 a 20 segundos devido, principalmente, à constatação de estruturas de paredes grossas. Na indústria de enlatados esta espécie de fungo, ainda não foi devidamente investigada a sua termorresistência, embora já tenham sido encontradas espécies de *P. Varioti*, em alimentos em fase de degradação que sofreram tratamento de pasteurização de 93°C por 5 minutos. Este gênero é também sorbato resistente.

O gênero *Talaromyces* pertence ao sub-reino Ascomicotina e é caracterizado pela produção de gimnotécios brancos ou amarelos em associação com um estado anamorfo característico de *Penicillium*, *Paecilomyces* ou *Geosmithia*. Gimnotécio é o ascocarpo onde são produzidos os ascos e onde o seu corpo é formado por hifas finas entrelaçadas, resultando em uma estrutura de tamanho mais ou menos indeterminado. A espécie mais comumente isolada de alimentos ácidos termoprocessados é o *Talaromyces flavus*. *Talaromyces* é um gênero de aproximadamente 25 espécies, cuja maioria habita no solo

(PITT & HOCKING, 1985). O gênero *Talaromyces flavus* geralmente produz colônias amarelas em MEA devido à pigmentação tanto do micélio como dos gimnotécios, podendo existir espécies que desenvolvem coloração avermelhada (PITT & HOCKING 1985; SPLITTSTOESSER 1991; BAGLIONI 1998).

SALOMÃO (2002) constatou que o fungo *Talaromyces spp.* é um dos gêneros mais comumente encontrados em polpas comerciais congeladas de morango, estando estes resultados de acordo com os obtidos por ARAGÃO (1989), que considerou que o fungo *Talaromyces spp.* é o segundo mais importante no levantamento de contaminantes fúngicos, em polpa de morango.

O gênero *Eupenicillium* produz cleistotécio, podendo, em alguns casos, tornar-se rígido e até permanecer por semanas ou meses e, posteriormente, amadurecer para assim produzir numerosos ascos com oito ascósporos em seu interior. Em meio CYA (Czapek Yeast Agar), crescem rápido e de forma densa, com micélio amarelo e pouco exsudato sem cor, sendo seu reverso usualmente âmbar. A fase anamorfa deste gênero é o *Penicillium*. Tem como característica os ascósporos que são elipsoidais, com uma leve ruga longitudinal, além de apresentar superfície áspera. Já foram isoladas e identificadas 37 espécies de *Eupenicillium*, sendo que as mais comumente isoladas de alimentos são: *E. brefeldianum*, *E. cinnamopurpureum*, *E. hirayamae* e *E. javanicum* (PITT & HOCHING, 1985).

2.5 – Produção de enzima e micotoxinas por fungos termorresistentes

Os fungos termorresistentes produzem várias enzimas como: pectinases, amilases e proteinases; as últimas são em maior abundância (TOURNAS, 1994).

OLIVER & RENDLE relataram a primeira produção de enzimas pectinolíticas por *Byssochlamys* em 1934.

UGWUANYI & OBETA (1999) relataram a atividade de enzimas pectinolíticas e celulíticas produzidas por *Neosartorya spp.*, *Byssochlamys nivea* e *Paecilomyces varioti* em meio contendo pectina e outro, com tecido de manga. Estes autores verificaram o efeito de desintegração causada por essas enzimas nestes meios. Houve produção de hidrolases, liases e pectinase em todos os meios analisados. Constatou-se uma grande variedade de celulase produzida por *B. nivea*.

Os fungos são indesejáveis nos alimentos porque são capazes de produzir uma grande variedade de enzimas que, agindo sobre alimentos, provocam a sua deterioração.

Além disso, muitos fungos podem produzir metabólitos tóxicos quando estão se multiplicando nos alimentos. Estes metabólitos recebem a denominação genérica de “micotoxinas”, e correspondem a produtos metabólicos secundários que, quando ingeridos com os alimentos, causam alterações biológicas prejudiciais tanto no homem como nos animais (micotoxicoses).

FRISVAD & SAMSON (1991), em pesquisas, demonstraram que já foram identificados mais de 400 tipos de micotoxinas diferentes, sendo as de maior relevância as encontradas em sucos de uva.

Os sucos de uva, assim como os demais sucos, são passíveis de contaminação por fungos termorresistentes, sendo que, para suco de uva, o gênero *Byssochlamys* é o de maior interesse na produção de micotoxinas. Este gênero produz metabólitos como: Patulina, Ácido Byssochlâmico, Byssotoxina A, Asymetrina e Variotina como já constatado por BEUCHAT & RICE (1979) em suas pesquisas.

Algumas linhagens de *N. fischeri* são capazes de produzir toxinas como Fumitremorginas (A, B e C) e Verrucologena. Essas toxinas são capazes de atuar no sistema nervoso central e causar tremores, convulsões e morte em animais (TOURNAS, 1994). NIELSEN et al. (1988), em estudos realizados para verificar a produção de toxinas produzidas por *N. fischeri* em vários meios, observaram que a adição de glicose, frutose ou sacarose no meio aumentava a produção de fumitremorgina. A verrucologena foi produzida em todos os meios testados, em maior quantidade que as demais, seguida de fumitremorgina A e C.

A patulina é uma micotoxina proveniente do gênero *Aspergillus* (*A. clavatus*, *A. terreus*), *Penicillium* (*P. urticae*, *P. expansum*) e *Byssochlamys* (*B. fulva* e *B. nivea*), sendo que estes últimos têm demonstrado grande potencial para a produção desta micotoxina e que é considerada tóxica para microrganismos, plantas e animais, além de ser extremamente nociva à saúde humana (RICE et al., 1977; TOURNAS, 1994).

BEUCHAT & RICE (1979), em pesquisas realizadas com espécies de *B. fulva* e *B. nivea*, demonstraram que as mesmas são capazes de produzir patulina, especialmente quando o fungo se desenvolve em produtos armazenados à temperatura ambiente, sendo a maçã, o abacaxi, a uva e o morango as frutas mais atingidas.

SCOTT & SOMERS (1968), em pesquisa com diferentes sucos, estudaram a estabilidade térmica da patulina, utilizando temperaturas que variavam de 22 a 80°C e constataram que, utilizando concentrações de 4 mg/ml, após tratamento térmico de 80°C

por 10 minutos e por 20 minutos, uma concentração de 50 % e 45 %, respectivamente, em comparação com a concentração inicial.

LOVETT & PEELER (1973), em pesquisa com patulina, constataram que a mesma tem um comportamento estável quando aquecida a 100°C, por 15 minutos, e, posteriormente, torna-se mais resistente em uma faixa de pH de 3,5 a 5,5.

SILIHA & ASKAR (1999), em estudos realizados com suco de maçã e comida para bebê, revisaram a ação da patulina e, relataram que esta micotoxina tem se revelado como agente carcinogênico e de mutação. PRIETA et al. (1994) realizaram um estudo de detecção de patulina em 100 amostras de suco de maçã concentrado onde a toxina esteve presente em 82 % das amostras, sendo que em 75 % destas amostras, a concentração de patulina mostrou-se inferior a 10 µg/l. O limite máximo permitido para esta toxina é de 50 ppb, mas para dietéticos e “baby-foods”, este limite é mais drástico, sendo de 10 ppb.

LOPEZ-DIAZ et al. (1996), em análise realizada com amostras de suco de maçã, verificaram a presença de patulina abaixo dos valores recomendados, com exceção de uma que continha 184 µg/kg. BURDA (1999), em estudo realizado para a verificação da presença de patulina em 328 maçãs, pêras e produtos com misturas de frutas incluindo sucos, molhos, purês, geléias e polpas de maçã de 38 produtores australianos constatou que a presença de patulina nos limites de 5 a 50 µg/l, em 75 das 258 amostras de sucos e concentrados, e em 73 amostras foi verificada uma concentração de 51 a 1130 µg/l. As amostras que não eram de sucos houve detecção da patulina em 18 amostras de um total de 70, sendo que os níveis detectados se mostraram inferiores a 50 µg/kg.

As espécies de *Byssochlamys* produzem ainda o metabólito secundário ácido byssochlâmico. A presença deste foi detectada, após armazenagem do produto contaminado por 1 e 2 meses. Constatou-se também que a capacidade de formação de ácido byssochlâmico é aumentada pela adição de compostos como sacarose, galactose, ácido cítrico, maltose, frutose, ácido glucônico e glicerol no meio (TOURNAS, 1994).

2.6 – Fatores que afetam o crescimento e o desenvolvimento de fungos

A preservação dos produtos à base de frutas baseia-se principalmente no uso de processamento térmico (pasteurização e/ou esterilização), e na utilização de conservante químico. Geralmente, a deterioração destes produtos é devido à ação microbiológica. As temperaturas e tempos aplicados no processamento, geralmente eliminam bactérias e fungos filamentosos, porém são insuficientes para eliminação de fungos termorresistentes.

Industrialmente, vários são os fatores que contribuem para a sobrevivência e o aumento da resistência térmica de fungos termorresistentes, dentre eles, destaca-se a contaminação inicial que deve ser rigorosamente controlada. Os demais fatores são: atividade de água (a_w), pH, presença de ácidos orgânicos, teor de sólidos solúveis, tipos de meios de aquecimento, adição de conservantes, tempo e temperatura de produção dos ascósporos, atmosfera (O_2 , CO_2 , N_2), e devendo também ser, cuidadosamente, controlados. Se o grau de contaminação inicial for baixo, um tratamento térmico mais brando já estará assegurando um produto dentre dos limites aceitáveis. Porém, se a contaminação inicial for alta, serão necessários, além de temperaturas mais elevadas, tempos mais longos de processamento para que o produto seja aceitável (TOURNAS, 1994). O autor relata ainda que aquecimentos excessivos alteram características organolépticas e, conseqüentemente, alteram a qualidade nutricional do produto. O tratamento térmico deve destruir a maioria dos fungos termorresistentes, sem diminuir a qualidade do produto final. Com o objetivo de garantir a qualidade do produto final, algumas alternativas podem ser adotadas para se controlar o crescimento de fungos termorresistentes, conforme a seguir consideradas.

2.6.1 – Boas Práticas de Fabricação (BPF)

Devido ao fato de os fungos termorresistentes residirem no solo e, podendo contaminar as frutas e, posteriormente, as linhas de seu processamento, as BPF tornam-se imprescindíveis para obtenção de produtos com qualidade assegurada.

As BPF é um sistema de qualidade que assegura que os produtos sejam consistentemente produzidos e controlados, com padrões de qualidade apropriados para o uso pretendido e requerido pelo registro. As BPF, em linhas de processamento de sucos, consistem em: verificação de critérios adequados de lavagem, por aspersão (8 atm), para remoção das sujidades das frutas; utilização de 100 mg/l de cloro para lavagem de frutas lisas; transporte adequado para que não haja risco de rompimento das frutas, facilitando com isso a contaminação por fungos termorresistentes; lavagem e sanificação adequada das caixas utilizadas para o transporte das frutas; evitar contato dos equipamentos da planta de processo com terra ou poeira; remoção dos resíduos provenientes da matéria-prima de modo a não terem acesso à linha de produção. À água de lavagem das frutas deverá ser sempre desprezada (GRESSONI, 2002).

2.6.2 – Atividade de água (aw)

Os microrganismos necessitam de água, na forma disponível, para sua sobrevivência e multiplicação. A atividade de água mínima varia para cada microrganismo e ela é ainda influenciada por fatores do meio que a compõem. A atividade de água mínima para a germinação de *Byssochlamys* é de 0,84, segundo BEUCHAT & TOLEDO (1977); já para *Neosartorya fischeri*, era de 0,915, conforme (BAGLIONI, 1998). Foi estudada ainda a influência da atividade de água sobre o crescimento de *B. nivea*, em sucos e néctares de frutas suplementadas, com diferentes concentrações de sacarose. Os menores valores de atividade de água encontrados foram para o néctar de pêssego e para o suco de ameixa seca, adicionados de 40 % de sacarose (0,90), de acordo com BEUCHAT & TOLEDO (1977). Para que não haja a germinação de ascósporos sobreviventes do processo de pasteurização, produtos com alta atividade de água devem ser estocados em temperaturas baixas. A diminuição simultânea da temperatura de armazenamento e da atividade de água exerce ação sinérgica na conservação de alimentos termoprocessados (BEUCHAT & RICE 1979; NILESEN et al, 1988).

2.6.3 – pH

YATES & WOODBINE (1967) realizaram estudos para a verificação do efeito do pH do meio de aquecimento na porcentagem de germinação de ascósporos de *B. nivea*. O pH dos meios variou de 3 a 5,5 e, após o choque térmico de 75°C por 5 minutos, verificou-se a germinação apenas na faixa de pH de 4,0 e 4,5, aumentando a porcentagem desta a partir do pH 5,0.

SPLITTSTOESSER et al (1974) constataram que ascósporos de *B. fulva* apresentavam menor sobrevivência para pHs abaixo de 3,0. SPLITTSTOESSER & SPLITTSTOESSER (1977) em pesquisa realizada para verificação do efeito do pH na resistência térmica de *B. fulva* e *Aspergillus* sp, utilizaram suco de uva como meio de aquecimento e hidróxido de sódio e ácido tartárico como ajustadores de pH. Constataram, para *B. fulva*, que no pH mais baixo (2,5) evidenciou-se a menor resistência térmica. Com o pH na faixa de 3,0 e 4,0, observou-se a maior resistência térmica. Para *Aspergillus* sp, não se observou variação significativa na faixa de pH de 3,0 a 5,5.

BAYNE & MICHENER (1979) constataram que ascósporos de cinco linhagens de *B. fulva*, suspensos em um meio padrão, com pH ajustado para 5,0, se mostraram mais

termorresistentes que no mesmo meio com pH 3,6. Em meios com o pH próximo da neutralidade a inativação ocorre mais lenta.

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

2.6.4 – Presença de ácidos orgânicos

O efeito dos ácidos orgânicos sobre a tolerância de ascósporos de fungos termorresistentes depende principalmente do tipo de ácido presente e do pH do meio de aquecimento.

SPLITTSTOESSER & SPLITTSTOESSER (1977) estudaram o efeito da adição de ácidos orgânicos no meio de aquecimento e verificaram o efeito sobre a resistência térmica de ascósporos de *B. fulva*. Constataram ainda que o uso de soluções com pH 3,0, contendo ácido málico e ácido tartárico, foram as que proporcionaram a maior resistência térmica ao calor, sendo o ácido tartárico o que proporcionou a maior porcentagem de sobreviventes. Com soluções de ácido acético, láctico, fumárico e succínico, também com pH da solução de 3,0, verificou-se que a resistência térmica foi diminuída. Estes autores demonstraram ainda, neste mesmo ensaio, que o pH do meio de aquecimento exerce expressiva influência na ação de cada tipo de ácido sobre a inativação de ascósporos de fungos termorresistentes, onde 0,05 % de solução de ácido fumárico em pH 3,0 provoca máxima sensibilização de ascósporos de *B. fulva*, enquanto que é preciso uma concentração cinco vezes maior deste ácido para produzir o mesmo efeito quando o pH é 3,5. Isto indica que a forma não dissociada é que afeta a resistência térmica.

CONNER & BEUCHAT (1987) realizaram estudos de inativação térmica de ascósporos de *N. fischeri*, utilizando como meios de aquecimento soluções de ácido fumárico, ácido cítrico, málico e tartárico (1 e 2%) a pH 2,5, 3,0 e 3,5. Verificou-se uma diminuição da resistência térmica mais acentuada para ácido fumárico, sendo que os demais ácidos proporcionaram um aumento moderado na resistência térmica.

BEUCHAT (1988), em pesquisa realizada com *T. flavus*, observou que os ácidos fumárico, sórbico e benzóico exercem maior efeito sobre a letalidade destes ascósporos quando comparados com o ácido acético, málico, cítrico e tartárico.

O efeito causado na resistência térmica de *T. flavus* em ácido cítrico, málico e tartárico no meio de aquecimento (pH 5,0 e solução de glucose 16°Brix) foi estudada por KING & WHITEHAND (1990). Estes autores constataram que não houve diferença significativa dos tipos de ácido utilizados na resistência térmica deste fungo.

2.6.5 – Teor de sólidos solúveis

O aumento da concentração de sólidos solúveis no meio de aquecimento, exercendo efeito protetor sobre ascósporos de *B. Fulva*, foi verificado por SPLITTSTOESSER et al. (1974), os quais aqueceram ascósporos de *B. fulva*, a 85°C, por 2 horas, em suco de uva Concord, em diferentes concentrações de sólidos solúveis. Sendo as concentrações do suco de 5 e de 52°Brix, os ascósporos apresentaram uma porcentagem de inativação de 60 e de 28 %, respectivamente. SPLITTSTOESSER & SPLITTSTOESSER (1977), em pesquisa também realizado com concentrações variadas de sólidos solúveis, em suco de uva (5, 26 e 54°Brix), verificaram o mesmo fenômeno apresentado por SPLITTSTOESSER et al. (1974), onde à medida que se elevava a concentração de sólidos solúveis no meio de aquecimento, era verificado também o aumento da resistência térmica dos fungos analisados (*B. fulva* e *Aspergillus* sp.).

BEUCHAT & TOLEDO (1977), em pesquisa também realizada com suco de uva, suplementado de sacarose e de ascósporos de *B. nivea*, verificaram que a adição de sólidos solúveis no meio de aquecimento proporcionou o efeito protetor. De acordo com estes mesmos autores, a razão do efeito protetor não é bem explicada, mas o diferencial de pressão osmótica entre o meio de aquecimento e os ascósporos favorece a resistência à inativação térmica. KING & WHITEHAND (1990) estudaram a influência da composição do meio de aquecimento sobre a inativação térmica de *T. flavus* a 90°C. Estes autores verificaram um aumento na resistência térmica à medida que se aumentava o teor de sólidos solúveis do meio.

TOURNAS & TRAXLER (1994) realizaram trabalho com ascósporos de *N. fischeri* aquecidos em concentrado de abacaxi (42,7°Brix) e em suco de abacaxi (12,6°Brix), para comparação das resistências térmicas obtidas nestes meios. Os resultados indicaram um efeito protetor em função do aumento da concentração de sólidos solúveis, no meio de aquecimento. RAJASHEKHARA et al (1996), em pesquisa realizada com ascósporos de *N. fischeri* e utilizando como meio de aquecimento sucos de manga e uva, contendo diferentes teores de sólidos solúveis (10°Brix, para suco diluído e 45°Brix para

suco concentrado), verificaram que a resistência térmica deste fungo tornou-se maior para sucos concentrados.

TOURNAS & TRAXLER (1994), em estudos realizados com ascósporos de *Neosartorya fischeri*, verificaram que os mesmos quando aquecidos a 85, 88, 90 e 100°C por 1 hora, em suco de abacaxi concentrado (42,7°Brix), mostrou-se mais termorresistente que ao ser aquecido no suco de abacaxi (12,6°Brix), ou mesmo em água deionizada estéril. Este efeito protetor deve-se à maior porcentagem de sólidos solúveis presentes no meio. KING Jr & WHITEHAND (1990) comprovou, em seus experimentos, que uma maior quantidade de açúcar no meio de aquecimento, contendo ascósporos de *Talaromyces flavus*, fez com que a resistência térmica dos mesmos aumentasse.

2.6.6 – Meios de aquecimento

SPLITTSTOESSER & SPLITTSTOESSER (1977) estudaram a influência de diferentes meios de aquecimento, a saber: 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), sobre a resistência térmica de ascósporos de *B. fulva* e *Aspergillus* sp. em tratamentos térmicos realizados a 85°C/1 hora. Para *B. fulva*, as porcentagens de ascósporos recuperados foram de 8,4 %, 5,7 %, 9,2 % e 0,06 %, respectivamente. Para *Aspergillus* sp. a porcentagem recuperada nestes meios foi de 14 %, 11 %, 12 % e 0,61 %, respectivamente.

CONNER & BEUCHAT (1987), em pesquisa realizada para verificação de uma maior resistência térmica de ascósporos de *N. fischeri*, em diferentes meios, constataram que a taxa de inativação térmica dos ascósporos mostrou-se menor em suco de maçã (12,3°Brix, pH 3,8) que em suco de uva Concord (16,6°Brix, pH 3,4) e ambos suspensos em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,0).

RAJASHEKHARA et al (1996) constataram que ascósporos de *N. fischeri* apresentavam menor resistência térmica ao tratamento térmico de 85°C, quando eram suspensos em tampão fosfato (pH 7,0) e, conseqüentemente, apresentaram maior resistência térmica quando eram suspensos em sucos de frutas.

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

2.6.7 - Adição de conservantes

BEUCHAT (1986) observou, em pesquisa realizada com suco de uva, que a adição de sorbato de potássio, nas concentrações de 50 e 100 ppm, intensificou a ativação dos ascósporos de *B. nivea* para um tratamento de 1 hora a 70°C. Concentrações mais altas mostraram efeito letal sobre estes ascósporos. BEUCHAT & RICE (1979) constataram que a presença de conservantes em meios de aquecimento tende a aumentar os efeitos letais ao calor.

BEUCHAT (1988), em pesquisa realizada com cepas de *T. flavus*, em meio de aquecimento com produto à base de “blueberry”, contendo açúcar, água, goma lacusta, pectina e cloreto de cálcio (pH 3,46, 27,8 % p/v de sólidos solúveis), verificou a inativação térmica daquele fungo causada pela adição de benzoato de sódio ou sorbato de potássio, nesse meio de aquecimento. SPLITTSTOESSER & CHUREY (1991) estudaram a ação de conservantes, em meios de aquecimento, com ascósporos de *N. fischeri*. Utilizaram solução de ácido tartárico 0,05 M (pH 3,3) à qual adicionaram 0, 5, 50 e 100 ppm de dióxido de enxofre. Os resultados mostraram que a inativação dos ascósporos de *N. fischeri* foi afetada pela presença de conservantes no meio de aquecimento. Os valores de $D_{80^{\circ}\text{C}}$, para estes meios, foram de 123, 75, 8.5 e 6.1 minutos, respectivamente. Posteriormente, estes autores realizaram pesquisas semelhantes, utilizando suco de frutas como meio de aquecimento com e sem adição de dióxido de enxofre. Os resultados demonstraram uma redução no valor de D de 50 a 75 % para meios adicionados de dióxido de enxofre.

RAJASHEKHARA et al (2000) trabalharam com ascósporos de *N. fischeri* e sucos de manga e de uva que continham sorbato de potássio (0,1 %) ou benzoato de sódio (0,1 %) ou a combinação de ambos (0,05 %), para avaliar os resultados da resistência térmica destes ascósporos nesses meios. O tratamento térmico aplicado foi de 85°C por 10 minutos e a maior inativação térmica foi conseguido no suco de manga que continha a combinação de ambos os conservantes (benzoato e sorbato). A adição de conservante no suco de uva não mostrou efeito na letalidade dos ascósporos, o que só ocorreu, embora de forma pouco expressiva, devido à associação daqueles conservantes.

2.6.8 - Tempo e temperatura de produção dos ascósporos

CONNER & BEUCHAT (1987), utilizando uma temperatura de 30°C para a produção dos ascósporos, avaliaram a influência de três diferentes meios nesta produção (Ágar Acetato de Fowell, Ágar suco de uva e Agar suco de maçã) sobre a resistência térmica de duas linhagens de *N.fischeri* produzidos nestes meios. Os testes demonstraram que não houve influência dos meios de produção na resistência térmica. Os autores, posteriormente, realizaram outro trabalho de avaliação da resistência térmica *N. fischeri* utilizando diferentes tempos e temperaturas de produção. O meio de crescimento utilizado foi o ágar suco de uva e as temperaturas de produção de 18, 21, 25 e 30°C. Os ascósporos foram coletados em intervalos de tempo durante 114 dias e a sua resistência térmica foi testada, utilizando, como meio de aquecimento, tampão fosfato (pH 7,0); os tratamentos térmicos foram realizados a 70, 80 °C, nos tempos de 30 e 60 minutos. Os dados obtidos evidenciaram uma maior dormência e um aumento da resistência térmica com o aumento do tempo de sua produção. No período final desta produção, verificou-se que o tratamento térmico de 85°C por 60 minutos não foi suficiente para inativar ascósporos formados às temperaturas de 25 e 30°C.

A influência da temperatura de produção na resistência térmica de *B.nivea* foi estudada por ENGEL & TEUBER (1991). Estes ascósporos foram produzidos em meio ágar extrato de malte por 21 dias, em diferentes temperaturas de produção (20, 25, 30 e 37°C). Ao final, verificaram que a produção a 30°C evidenciou a maior resistência térmica em relação aos produzidos, nas mesmas condições, à temperatura de 20, 25 e 37°C, contrastando com outros relatos da literatura onde as maiores temperaturas geram com maior resistência térmica.

TOURNAS & TRAXLER (1994) examinaram a influência da idade dos ascósporos de *N. fischeri* quanto à sua resistência térmica. Foram produzidos a 30°C por 1, 2, 3 e 6 meses. Em cada período de sua produção, fez-se o tratamento térmico a 88°C/1 hora, em água deionizada. Verificou-se, ao final, que o aumento do tempo de produção proporcionou o aumento da resistência térmica deste fungo, o que fica evidenciado pelo aumento do valor de D.

2.6.9 – Atmosfera (O₂, CO₂, N₂)

YATES et al (1967) verificaram que o crescimento do fungo *B.nivea* era comprometido quando o mesmo crescia em atmosferas com elevada concentração de CO₂, o que proporciona a redução do crescimento do micélio, onde, em alguns casos, como para atmosferas com 100 % de CO₂ , este fungo apresentou um crescimento de apenas 4 % em relação ao seu crescimento normal. Estes resultados estão de acordo com YATES & FERGUSON (1963) que relataram que ascósporos de *B. nivea* poderiam crescer em baixas concentrações de O₂. KING Jr. & WHITEHAND (1990) realizaram estudos de tolerância do crescimento de fungos termorresistentes (*B. fulva*, *T. flavus* e *N. fischeri*) sob baixas tensões de oxigênio e demonstraram que o fungo *T. flavus* é o menos tolerante a baixos níveis de oxigênio, em relação aos demais. Testes posteriores realizados em câmaras de gás nitrogênio fluente (com presença de 250 mg/l de O₂, a 25°C) evidenciaram não haver crescimento de *T. flavus*, após 56 dias, enquanto que *B. fulva* e *N. fischeri* demonstraram crescimento, nestas mesmas condições.

2.7 – Efeitos da contaminação e deterioração de alimentos por fungos termorresistentes

Os primeiros relatos sobre os efeitos da contaminação de alimentos por fungos termorresistentes foram realizados por OLLIVER & RENDLE, em 1934. Estes autores 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. Constatou-se que as conservas de frutas alteradas tinham uma aparência que sugeria um super processamento (cozimento excessivo) ou a utilização de frutas muito maduras como matéria-prima, sendo detectados 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.

O amolecimento excessivo de frutas processadas pela ação de *Byssochlamys* também ocorre em embalagens contendo baixos níveis de oxigênio, podendo ocorrer pequena formação de micélio (OLLIVER & RENDLE, 1934). Para casos que envolvam produtos líquidos infectados com este gênero de fungo e sob baixas tensões de oxigênio, a

fermentação aparentemente ocorre, com a produção de CO₂, causando visível estufamento nas embalagens e deterioração (HOCHING & PITT, 1984).

ARAGÃO (1989) avaliou a deterioração, em suco de morango, causada por *B. nivea*, *N. fischeri* e *T. flavus*. O autor realizou os testes, utilizando tubos de ensaio contendo suco de morango que havia sido inoculado com ascósporos ativados destes fungos e produzidos a 30°C, por 6 semanas. Os testes foram realizados 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, foi observado o crescimento destes fungos, em três dias de produção dos ascósporos. *B. nivea* foi a única espécie que apresentou crescimento em tubo selado e produção de gás. As espécies testadas não produziram alterações de pH no suco e sua alteração de cor só foi constatada para *B. nivea* e para *T. flavus*.

BAGLIONI (1998), em estudo realizado com uma cepa de *N.fischeri*, para observar a deterioração causada em polpa de tomate (8°Brix), incubou-a por 1 mês, a 30°C. Após esse tempo, observou as seguintes alterações: escurecimento devido à produção de pigmento escuro pelo fungo; separação de fases (soro/polpa); diminuição da viscosidade do produto, indicando a produção de enzimas pectonólíticas; alcalinização da polpa (o pH inicial, subida do pH de 4,3 para 8,9) e liberação de odor levemente amoniacal.

SALOMÃO (2002) fez um estudo para a avaliação da deterioração causada pelo fungo *N.fischeri* em suco de maçã. O estudo consistiu em uma amostra controle, de apenas suco de maçã, que foi incubada ao mesmo tempo a fim de fornecer uma comparação entre as amostras. Ao final do período, o autor verificou o crescimento do fungo, bem como a mudança no aspecto do suco, que se clarificou. Esta clarificação supostamente ocorreu pela ação de enzimas pectonólíticas desenvolvidas pelo fungo inoculado. O autor constatou, ainda, que após 1 mês de produção dos ascósporos, a variação de pH foi pequena, de 3,5 para 3,9 e que as amostras não liberaram odores diferentes.

2.8– Produção, Ativação e Avaliação da Resistência Térmica de Fungos

2.8.1 – Produção dos ascósporos

O uso de alimentos ácidos como meio de produção dos ascósporos de *B. fulva* foi estudada por SPLITTSTOESSER et al (1969). Um estudo dos fatores que afetam a esporulação deste fungo foi realizado, revelando que a população máxima de ascos estava presente quando estes estavam crescendo em caldo de extrato de malte a 5 %, pH 2,0 a 3,0, por um período de 4 a 14 dias, a 30°C. Foram testados diferentes sucos de frutas e vegetais que foram utilizados como substratos para o crescimento destes fungos. Os sucos de ameixa, uva e maçã proporcionaram a maior produção dos ascósporos, seguidos pelos sucos de laranja, coquetel de vegetais e tomate.

Segundo BEUCHAT & RICE (1979), as temperaturas de produção dos ascósporos entre 28 e 35°C são ótimas para o crescimento e produção de *Byssochlamys*, mas existem isolados que, se forem produzidos abaixo de 30°C em um meio sintético, perdem irreversivelmente a capacidade de formas ascos. ENGEL & TEUBER (1991) testaram a influência da temperatura na produção dos ascósporos de *B. nivea* em Ágar Extrato de Malte (MEA), por 21 dias. Observaram que, nas temperaturas de 20°C e 37°C, a produção dos ascósporos foi bem menor em relação à produção a 25°C e 30°C, obtendo-se, a 30°C, o maior número de ascósporos. KING Jr. & WHITEHAND (1990) verificaram uma produção abundante de *T. flavus* em ágar extrato de malte (MEA), adicionado de 7,5 ppm de rosa de bengala que haviam sido produzidos, durante 1 mês, a 20, 25, 30 e 35°C, porém a mesma mostrou-se limitada para a temperatura de 20°C.

SAMSON & VAN RENEEN-HOEKSTRA (1988) relataram que o meio MEA (Agar Extrato de Malte) tem maior capacidade de produção de esporos em comparação com outros meios, pois este se mostra rico em nutrientes. CASELLA et al. (1990) verificaram um forte aumento no valor de D, com o aumento da idade dos ascósporos de *B. nivea* que haviam sido inoculados em meio de cultura MEA, sendo que este aumento foi menos pronunciado para ascósporos inoculados em meio PDA (Potato dextrose Agar).

2.8.2 – Ativação dos ascósporos

Os ascósporos de fungos termorresistentes, quando formados, desenvolvem uma dormência com o tempo que pode ser quebrada por um tratamento térmico sub-letal, geralmente, um choque térmico, chamado de ativação, permitindo, com isso, a posterior germinação e crescimento em condições favoráveis (BEUCHAT & RICE, 1979; BEUCHAT 1986; SPLITTSTOESSER et al. 1993).

SPLITTSTOESSER & SPLITTSTOESSER (1977) reportaram que a influência da natureza do meio de aquecimento sobre a taxa de ativação de ascósporos de *B. fulva* e de *Aspergillus* sp. Os meios de aquecimento utilizados para ativação, nesta pesquisa, foram o suco de uva a 5° Brix e água destilada. A ativação mostrou-se mais lenta em água destilada para ambos os fungos, sendo menos acentuada para o *Aspergillus* sp., cuja maioria dos ascósporos permaneceu dormente, mesmo quando ativados a 80°C, por 90 minutos. Para *B. fulva*, a 80°C, a diferença entre as taxas de ativação, na água e no suco de uva, foram pouco perceptíveis. Estes autores realizaram testes com a mesma linhagem de *Aspergillus* sp. e verificaram que, tanto para o suco de maçã quanto para o suco de tomate, o efeito estimulante na ativação dos ascósporos mostrou-se semelhante. KOTZEKIDOU (1997) também constatou que a ativação de ascósporos de *N. fischeri* é maior em suco de tomate (16% sólidos solúveis, pH 4.2) que em tampão fostato (0.1 M, pH 7). SPLITTSTOESSER et al. (1993) também encontraram uma taxa de ativação maior quando ascósporos de *N. fischeri* eram aquecidos em suco de uva, em comparação com água destilada.

GUMERATO (1995), trabalhando com ascósporos de *N. fischeri* isolado de suco de maçã, conseguiu o melhor tempo de sua ativação, quando aqueceu os mesmos a 85°C por 5 minutos.

BAGLIONI (1998), alterando o meio de aquecimento para polpa de tomate a 8°Brix, conseguiu o melhor binômio temperatura/tempo de 85°C por 10 e 20 minutos para ascósporos deste fungo, produzidos a 30°C por 1 e 3 meses, respectivamente.

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

SALOMÃO (2002), em pesquisa realizada com este mesmo fungo, isolado de néctar de maçã, encontrou o melhor binômio a 85°C por um tempo de ativação de 10 minutos, usando suco de maçã como meio de aquecimento.

MARCOLINO (2003), em pesquisa realizada também com ascósporos de *N. fischeri* isolado de bebida de uva, encontrou os binômios de ativação para ascósporos produzidos a 30°C por 1 e 3 meses de produção, a 85°C/10 minutos e 85°C/25 minutos, respectivamente.

2.8.3 – Determinação dos parâmetros de resistência térmica

Os métodos utilizados para avaliação da resistência térmica de ascósporos de fungos termorresistentes são basicamente de 4 tipos: método do frasco de 3 bocas, tubos TDT selados ou não, tubo capilar e lata TDT. Todos estes métodos têm como base o aquecimento do microrganismo nas temperaturas de estudo desejáveis e verificação posterior da sobrevivência dos mesmos. Em ensaios, os parâmetros temperatura e tempo de processo devem ser rigorosamente controlados (STUMBO, 1973).

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

KING Jr. & HALBROOK (1987) utilizaram o método do tubo TDT, selados em maçarico, para realização de ensaios de resistência térmica de ascósporos de *T. flavus*. KING Jr. et al. (1979) utilizaram o método de tubos TDT, para os ensaios de resistência térmica com ascósporos de *B. fulva*. Os tempos de aquecimento foram corrigidos, utilizando o tempo de 1,7 minutos como tempo de subida da temperatura. Este mesmo método foi utilizado com sucesso por KING Jr. & HALBROOK (1987), KOTZEKIDOU (1997), KING Jr. & WHITEHAND (1990), BAGLIONI (1998), PACHECO (2001) e SALOMÃO (2002).

2.8.4 - Meio de recuperação dos ascósporos após ensaio de resistência térmica

Segundo BAYNER & MICHENER (1979) e SPLITTISTOESSER & SPLITTISTOESSER (1977) a recuperação de ascósporos de *Byssochlamys* pode ser feita com a utilização de PDA.

ARAGÃO (1989), em pesquisa realizada com suco de morango como meio de aquecimento, para testes de resistência térmica com ascósporos de *B. nivea*, de *N. fischeri*, de *E. javanicum* e de *T. flavus*, recuperou-os em meio PDA, com 1% de rosa de bengala e produzidos a 30°C. Também BEUCHAT (1992), BAYNE & MICHENER (1979) e SPLITTISTOESSER & SPLITTISTOESSER (1977) utilizaram o meio PDA para a recuperação de ascósporos que foram submetidos a tratamento térmico.

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

2.9 - Cinética de inativação térmica (método de linearização de Alderton & Snell, 1970)

Segundo KING Jr. et al. (1979), os microrganismos, em geral, apresentam uma taxa de inativação térmica logarítmica, ou seja, uma linha reta é obtida quando se constrói uma curva de morte plotando o logaritmo do número de sobreviventes *versus* o tempo de aquecimento a uma dada temperatura. Entretanto, os fungos termorresistentes, quando analisados através deste tipo de gráfico, mostram uma curva de inativação térmica não logarítmica, onde é possível a visualização de um ombro inicial, representando uma maior lentidão de morte por parte dos esporos, seguido de uma taxa de morte acelerada, que dá à curva um aspecto logarítmico e, por fim, apresentando uma “calda” onde os ascósporos mais resistentes passam a demorar mais tempo para apresentar completa inativação. Este comportamento, segundo teorias, pode se dar por substâncias protetoras (açúcares, ácidos) (SPLITTISTOESSER & SPLITTISTOESSER, 1977) ou por conformação de proteínas, com presença ou não de certos peptídeos capazes de fornecer termorresistência (CONNER & BEUCHAT, 1987). À medida que a temperatura aplicada para inativação é aumentada, o comportamento da curva na parte relativa ao “ombro” diminui, tornando-se semelhante a

uma reta (KING JR. et al., 1979; BAYNE e MICHENER, 1979; KING & HALBROOK, 1987; KOTZEKIDOU, 1997; BAGLIOI, 1998; DELGADO, 2001 e MARCOLINO, 2003).

O cálculo da resistência térmica de microrganismos, que seguem uma taxa de morte logarítmica, é realizado a partir da determinação dos parâmetros “D” (tempo requerido a uma dada temperatura para destruir 90% da população de microrganismos, em um meio de aquecimento definido) e “Z” (graus de temperatura necessários para ocasionar uma variação de 10 vezes no valor de D).

Um método bastante utilizado na literatura, para a linearização da curva de sobreviventes, é o método de ALDERTON & SNELL (1970), que utiliza as seguintes equações:

$$(\log N_0 - \log N)^a = kt + C \quad \text{equação 2.1}$$

onde:

N_0 = Número inicial (ascósporos/ml)

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

a = expoente para linearização

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

C = Constante e intercepto da curva linearizada

t = tempo de aquecimento (min)

O valor de “ a ” é o inverso do coeficiente angular da curva $\log(\log N_0 - \log N)$ *versus* $\log t$. Este valor é calculado à menor temperatura de tratamento térmico e pode ser aplicado na linearização das curvas obtidas em tratamentos mais severos. Se a taxa de morte seguisse a equação 2.1 e não houvesse erros experimentais, “ C ” será zero. Assim, o valor de $1/k$ é derivado da equação 2.2:

$$1/k = t / (\log N_0 - \log N)^a \quad \text{equação 2.2}$$

A equação 2.2 é similar à equação da curva logarítmica, quando $a = 1$ (equação 2.3):

$$D = t / (\log N_0 - \log N) \quad \text{equação 2.3}$$

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 ($^{\circ}\text{C}$).

2.10 - Parâmetros de Resistência Térmica

Muitos estudos têm sido realizados com a finalidade de determinar os parâmetros de resistência térmica dos fungos filamentosos termorresistentes em produtos de frutas ou outros meios utilizados como substrato. Um resumo de alguns destes valores foi feito por SALOMÃO (2002) e é apresentado na tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros de resistência térmica de fungos filamentosos

Autor	Fungo	Tempo (minutos) necessário para alcançar uma redução decimal (1/k ou D)	Valor de Z ou Z* (°C)	Método e Meio utilizado
Aragão (1989)	<i>B. nivea</i>	1/K ₈₀ = 500 1/K ₈₅ = 60,6 1/K ₉₀ = 13,3 1/K ₉₃ = 3,41	6,17	Frasco de três bocas Meio: Suco de morango (15° Brix, pH 3,0)
	<i>N. fischeri</i>	1/K ₈₀ = 200 1/k ₈₅ = 41,84 1/K ₉₀ = 5,51 1/K ₉₃ = 1,61	6,15	
	<i>E. javanicum</i>	1/K ₈₀ = 2,71 1/K ₈₅ = 5,03 1/K ₉₀ = 1,41	7,79	
	<i>T. flavus</i>	D ₇₅ = 53,9 D ₈₀ = 17,9 D ₈₅ = 3,3 D ₉₀ = 0,9	9,25	
Baglioni (1998)	<i>N. fischeri</i> (1 mês de idade)	1/K ₉₀ = 6,14 1/K ₉₂ = 4,72 1/K ₉₄ = 2,62	10,8	Tubos TDT selados com maçarico Meio: Polpa de tomate (8°Brix)
	<i>N. fischeri</i> (3 mês de idade)	1/K ₉₀ = 10,2 1/K ₉₂ = 6,31 1/K ₉₄ = 4,59	11,6	
Kotzekidou (1997)	<i>B.nivea</i> 102	1/K ₈₅ = 19,8	*	Tubos de rosca (8x100mm) Meio: Pasta de tomate (pH 4,2, 16% de sólidos solúveis a 21°C)
	<i>B. fulva</i> 193	1/K ₈₅ = 24,1	*	
	<i>N. fischeri</i> 101	1/K ₈₅ = 13,0	*	

	<i>B.nivea</i> 102	$1/K_{85} = 8,8$	*	Tubos de rosca (8x100mm) Meio: Tampão fostato 0,1M, pH 7,0)	
	<i>B. fulva</i> 193	$1/K_{85} = 8,1$	*		
	<i>N. fischeri</i> 101	$1/K_{85} = 8,5$	*		
King & Whitehand (1990)	<i>T. flavus</i>	$1/K_{90} = 5,2$	*	Tubos TDT selados com maçarico. Meio: Solução de glicose 16° Brix	pH 3,6
		$1/K_{90} = 6,4$	*		pH 5,0
		$1/K_{90} = 7,1$	*		pH 6,6
Gumerato (1995)	<i>N.fischeri</i>	$D_{85} = 15,11$	5,28	Tubos TDT fechados com tampão de algodão Meio: Suco de maçã (15,5° Brix, pH 3,0)	
		$D_{88} = 4,70$			
		$D_{90} = 2,63$			
		$D_{93} = 0,43$			
Delgado (2000)	<i>N.fischeri</i> (4 meses)	$1/k_{90} = 3,11$	*	Tubos TDT fechados com tampão de algodão Meio: Água destilada	

*Pesquisas onde o valor de Z não foi determinado.

Fonte: SALOMÃO (2002).

***CAPÍTULO III –
MATERIAL E MÉTODOS***

CAPÍTULO III – MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo, são apresentadas as metodologias utilizadas nesta pesquisa, os meios de aquecimento e o fungo utilizado, o planejamento experimental, os procedimentos para a produção e a coleta de esporos, para as determinações da acidez, °Brix e *ratio* em sucos de frutas, a determinação dos tempos ótimos de ativação e para a determinação das resistências térmicas.

3.1 - Escolha do fungo termorresistente e meio de aquecimento

O fungo utilizado é o *Neosartorya fischeri* que foi isolado e identificado por SALOMÃO (2002) em amostras retiradas de linha de processamento de néctar de maçã. A resistência térmica deste fungo foi estudada em sucos de abacaxi e mamão e foi realizado um estudo da sua resistência frente a diferentes fatores que são temperatura e idade de produção dos ascósporos e o *ratio* do meio de aquecimento para determinação da resistência térmica.

3.2 - Planejamento experimental fracionário

Com a finalidade de estudar o efeito combinado do *ratio* do meio de aquecimento, da temperatura e da idade de produção dos ascósporos, na resistência térmica deste fungo, foi feito um planejamento experimental 2^3 , com triplicata no ponto central. Os experimentos foram realizados pela combinação de níveis e de fatores e estão descritos nas tabelas 3.2.1, 3.2.2 para suco de abacaxi e 3.2.3 e 3.2.4 para suco de mamão. As tabelas 3.2.2 e 3.2.4 contêm os diferentes ensaios realizados em três condições diferentes para suco de abacaxi e mamão, respectivamente. O ensaio 1 de cada tabela foi realizado a partir de uma suspensão de ascósporos de *N. fischeri*, que foi coletada após produção dos ascósporos a 25°C por 1 mês, e sua resistência térmica realizada em suco de abacaxi com *ratio* 10 e suco de mamão com *ratio* 26. Assim, adotou-se a simbologia (25-1-10) para suco de abacaxi e (25-1-26) para suco de mamão para designar a temperatura e a idade de produção dos ascósporos e o *ratio* do meio de aquecimento correspondente ao ensaio 1 determinantes da resistência térmica.

Tabela 3.2.1 – Níveis e fatores utilizados no planejamento experimental fracionário para suco de abacaxi.

Fatores	Níveis		
	- 1	0	+ 1
Temperatura de produção dos ascósporos (°C)	25	30	35
<i>Ratio</i> do meio de aquecimento (°Brix/acidez)	10	24	38
Idade de produção dos ascósporos (meses)	1	2	3

Tabela 3.2.2 - Ensaios do planejamento experimental fracionário 2³ com triplicata no ponto central para suco de abacaxi.

ENSAIO	FATOR		
	T°C	<i>Ratio</i>	IDADE
1 - (25-1-10)	-	-	-
2 - (25-3-10)	-	-	+
3 - (25-1-38)	-	+	-
4 - (25-3-38)	-	+	+
5 - (35-1-10)	+	-	-
6 - (35-3-10)	+	-	+
7 - (35-1-38)	+	+	-
8 - (35-3-38)	+	+	+
9 - (30-2-24)	0	0	0
10 - (30-2-24)	0	0	0
11 - (30-2-24)	0	0	0

Tabela 3.2.3 – Níveis e fatores utilizados no planejamento experimental fracionário para suco de mamão.

Fatores	Níveis		
	- 1	0	+ 1
Temperatura de produção dos ascósporos (°C)	25	30	35
<i>Ratio</i> do meio de aquecimento (°Brix/acidez)	26	46	66
Idade de produção dos ascósporos (meses)	1	2	3

Tabela 3.2.4 - Ensaios do planejamento experimental 2³ com triplicata no ponto central para suco de mamão.

ENSAIO	FATOR		
	T°C	<i>Ratio</i>	IDADE
1- (25-1-26)	-1	-1	-1
2 - (25-3-26)	-1	-1	1
3 - (25-1-66)	-1	1	-1
4 - (25-3-66)	-1	1	1
5 - (35-3-66)	1	1	1
6 - (35-1-66)	1	1	-1
7 - (35-3-26)	1	-1	1
8 - (35-1-26)	1	-1	-1
9 - (30-2-46)	0	0	0
10 - (30-2-46)	0	0	0
11 - (30-2-46)	0	0	0

As resistências térmicas foram analisadas nas temperaturas de 80°C, 85°C e 90°C, para cada ensaio, utilizando-se o método dos tubos TDT selados.

3.3 – Produção de esporos

Para a realização do planejamento experimental, fez-se a produção dos ascósporos em garrafas de Roux contendo 180 ml de Agar Extrato de Malte (MEA, pH 5,4, formulado conforme PITT & HOCKING, 1985), a diferentes temperaturas e idades de produção dos ascósporos conforme descrito no planejamento experimental (Tabela 1 e 3). As garrafas foram inoculadas com 0,5 ml da suspensão de ascósporos, previamente preparada da cepa de *N. fischeri*. Para a preparação da suspensão e dispersão dos esporos, transferiu-se, com o auxílio de uma alça estéril, um fragmento da colônia do fungo para um tubo contendo 0,5 ml de solução 0,05% de Twen 80. A inoculação da suspensão do fungo em garrafas de Roux foi feita, transferindo-se assepticamente o conteúdo do tubo na boca das garrafas que, posteriormente, foram incubadas a 25°C por 1 e 3 meses, 30°C por 2 meses e 35°C por 1 e 3 meses para permitir a esporulação e o desenvolvimento de sua termorresistência.

3.4 - Coleta dos ascósporos

A obtenção das suspensões de esporos foi realizada após o período de inoculação das garrafas de Roux, nas temperaturas e nas idades pré-determinadas. Primeiramente, para obtenção de um volume maior de suspensão, 25 mililitros de água destilada estéril foram transferidos para a superfície de cada garrafa contendo os fungos cultivados, e em seguida foi raspada delicadamente com o auxílio de pérolas de vidro e uma bagueta de vidro estéril.

As suspensões obtidas foram filtradas através de camadas de gaze estéril para retenção das hifas e submetidas a uma centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos. Posteriormente, foi realizada uma lavagem seguida de centrifugação com água estéril e verificada, microscopicamente, a obtenção dos ascósporos livres, ascos e a ausência de hifas. As suspensões finais foram preparadas ressuspendendo o precipitado em um volume de água suficiente para se obter uma suspensão de, aproximadamente, 10^4 a 10^6 ascósporos por mililitro.

As suspensões finais foram transferidas para recipientes previamente autoclavados, com capacidade de 500 ml, contendo aproximadamente 30 pérolas de vidro, para facilitar a homogeneização, antes do uso.

3.5 - Determinação da acidez de sucos de frutas

A acidez titulável é medida através da quantidade de ácido presente no produto e foi determinado pela titulação de uma solução alcalina padrão a um peso ou volume conhecido de amostra, até ser totalmente neutralizada.

Para a determinação da acidez de produtos de frutas, utilizou-se como indicador de solução, fenolftaleína 1%, e para titulação solução de hidróxido de sódio 0,1 N padronizada com o respectivo fator de correção.

O cálculo da acidez foi realizado através da equação 3.1:

$$\%acidez = \frac{V * N * E * 100}{m * 100} \quad \text{equação 3.1}$$

V = Volume da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação da amostra em ml.

N = Normalidade da solução de hidróxido de sódio utilizada na titulação, em Normal.

E = Equivalente grama do ácido predominante na amostra.

m = Massa da amostra, em gramas, utilizada na titulação da amostra.

O resultado é expresso em porcentagem de acidez, calculado conforme o ácido predominante na fruta que para os sucos estudados foi o ácido cítrico (m/m) (PREGNOLATTO & PREGNOLATTO, 1985).

3.6 - Determinação do °Brix

A determinação do teor de sólidos solúveis totais ou °Brix, expresso em grama de sólidos solúveis totais por 100 gramas de amostra, foi feita através de refratômetro de ABBÉ (Instruterm). Foi adicionada 3 gotas do suco de fruta entre os prismas do refratômetro, e feita a leitura em °Brix.

3.7 - Determinação do *Ratio* (°Brix / acidez)

Uma vez determinados o °Brix e a acidez pode-se determinar o *ratio* que é a relação entre ambos.

3.8 – Ajuste dos valores de *Ratio*

3.8.1 - Baixos valores de *ratio*

Para ajuste destes valores de *ratio*, primeiramente, fixou-se o °Brix dos sucos (12°Brix para abacaxi e 13°Brix para mamão), em seguida, adicionou-se uma solução de ácido cítrico 20 % no meio até que este apresentasse um valor de acidez de 1,2 para suco de abacaxi e 0,5 para suco de mamão. Para determinação do *ratio*, fez-se a relação do °Brix do suco com a acidez encontrada após adição de ácido cítrico, onde os mesmos foram de 10 e 26, respectivamente, para abacaxi e mamão.

3.8.2 - Elevados valores de *ratio*

Para ajuste dos elevados valores de *ratio*, primeiramente, fixou-se a acidez natural dos sucos (0,5 para suco de abacaxi e 0,28 para suco de mamão) e em seguida, adicionou-se uma solução de açúcar 60 % no meio até que este apresentasse um valor °Brix de 19 para suco de abacaxi e de 18,5 para suco de mamão. Para determinação do *ratio*, fez-se a relação do °Brix encontrado pela adição de açúcar com a acidez do suco, onde os mesmos foram de 38 e 66, respectivamente, para abacaxi e mamão.

3.9 - Determinação do tempo de elevação da temperatura

Para a determinação da resistência térmica a uma determinada temperatura, é necessário se conhecer o tempo para que o conteúdo do tubo atinja a temperatura em estudo, contendo um determinado meio.

Para determinação do tempo de elevação da temperatura nos testes realizados com sucos de abacaxi e mamão, tubos TDT - Thermal Death Time – (8 X 124 mm) foram preenchidos com 2 ml de suco de abacaxi ou mamão, que foram utilizados como meio de aquecimento. Um termopar, previamente calibrado, foi introduzido no tubo permanecendo centralizado em seu interior durante o ensaio. A seguir, o tubo contendo o termopar foi colocado no banho previamente ajustado nas temperaturas em que seriam realizadas as análises (80°C, 85°C ou 90°C), e o cronômetro foi acionado. Quando a amostra atingiu a temperatura selecionada, registrou-se o tempo marcado pelo cronômetro (tempo de elevação). O retardo térmico foi determinado por média de 3 medidas de tempo.

3.10 - Determinação das condições ótimas de ativação dos ascósporos

Para a determinação das condições ótimas de ativação dos ascósporos, foi utilizada a temperatura de 85°C, durante os tempos 0 - zero (controle), 5, 10, 15, 20 e 25 minutos. Para os ensaios, foi utilizado suco de abacaxi, mamão ou água destilada (controle) como meio de aquecimento e em diferentes valores de *ratio* conforme estabelecido no item 3.2. Os testes de determinação das condições ótimas de ativação dos ascósporos foram realizados em todos ensaios do planejamento experimental, pois as condições de temperatura e de idade de produção e *ratio* do meio de aquecimento apresentaram-se diferentes para cada ensaio.

Nos tubos TDT, foram adicionados 0,2 ml de suspensão de ascósporos a 1,8 ml de suco de abacaxi, mamão ou água destilada (controle), previamente autoclavados e ajustados nos respectivos *ratios* de cada ensaio. Após homogeneização, os tubos foram selados com maçarico O₂/GLP e submetidos ao calor em banho de água termostático (Tecnal-Te-184), já ajustado à temperatura de 85°C. O tempo de elevação até a temperatura desejada foi determinado previamente conforme item 3.5. Transcorridos os tempos de aquecimento definidos, os tubos foram retirados do banho e resfriados imediatamente em banho de gelo.

Para a determinação do número de ascósporos ativados nos tubos, foi feita a abertura dos mesmos assepticamente (com o auxílio de um diamante cortador de vidro) e, em seguida, feitas diluições seriadas em água destilada autoclavada. A partir das diluições, foram realizados em duplicata plaqueamentos em profundidade (1ml), com MEA (formulado conforme PITT & HOCKING, 1985) acrescido de 50 mg/l de rosa de bengala. A produção dos ascósporos realizou-se a 30°C e a contagem do número de colônias formadas foi realizada a partir do terceiro dia de sua produção.

3.11 - Determinação da resistência térmica

Os ensaios de resistência térmica foram realizados de acordo com o planejamento experimental, nas temperaturas de 80°C, 85°C e 90°C. O método utilizado foi o de tubos TDT selados com maçarico. Os tubos foram preenchidos com 1,8 ml de suco de abacaxi ou mamão esterilizado, com o *ratio* específico para cada ensaio, e posteriormente inoculados com 0,2 ml de suspensão de ascósporos específicas para cada ensaio. Seguiu-se então a homogeneização dos tubos e estes selados em maçarico O₂ / GPL e submetidos ao calor em banho de água termostático (precisão $\pm 0,5$) já ajustado em uma das temperaturas

desejadas (80°C, 85°C ou 90°C). O tempo de atraso térmico para as temperaturas desejadas, já havia sido determinado previamente. Transcorrido cada tempo de aquecimento mais o atraso térmico, os tubos foram retirados do banho e resfriados imediatamente com banho de gelo. Para todas as temperaturas em todos os ensaios, houve uma amostra referente ao tempo 0, a qual foi submetida apenas ao tratamento ótimo de ativação, mais o atraso térmico.

A partir das diluições decimais em série foi realizado o plaqueamento de 1 ml em MEA em profundidade (duplicata) para cada tempo específico em cada temperatura. As placas foram incubadas a 30°C e a leitura do número de colônias formada expressa em UFC/ml, realizadas a partir do terceiro dia de produção dos ascósporos para todos os ensaios. Com o número de sobreviventes encontrado em cada tempo de aquecimento, foram construídas as curvas de sobrevivência para cada temperatura, em cada ensaio. Como estas curvas não apresentaram comportamento logarítmico, foi utilizado o método de linearização de ALDERTON & SNELL (1970) que fornece dados para o cálculo de parâmetros de esterilização equivalentes a D (1/k) e Z (Z*) – como já descrito no item 2.9 da revisão bibliográfica.

***CAPÍTULO IV –
RESULTADOS E DISCUSSÕES***

CAPÍTULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados desta pesquisa são apresentados em duas partes.

4.1 – A primeira parte, apresentada na forma de artigo mostra as condições ótimas de ativação de ascósporos de *Neosartorya fischeri* em suco de abacaxi e de mamão. Estudou-se a influência de diferentes fatores no tempo de ativação ótimo de ascósporos de *Neosartorya fischeri*, nestes sucos. Além dos melhores tempos de ativação, são apresentadas as curvas que apresentaram as maiores diferenças nos tempos de ativação nos sucos.

4.2 – Esta parte da pesquisa configura-se apresentando os resultados do estudo da influência de diferentes fatores na termorresistência de *Neosartorya fischeri*, em sucos tropicais. Os fatores analisados foram: idade e temperatura de produção dos ascósporos e *ratio* do meio de aquecimento. Foram realizadas resistências térmicas às temperaturas de 80°C, 85°C e 90°C, para cada ensaio, utilizando-se o método de tubos TDT selados. Com o número de sobreviventes encontrado em cada tempo de aquecimento, foram construídas as curvas de sobrevivência para cada temperatura, em cada ensaio. Como estas curvas não apresentaram comportamento logarítmico, foi utilizado o método de linearização de ALDERTON & SNELL (1970) que fornece dados para o cálculo de parâmetros de esterilização equivalentes a D (1/k) e Z (Z*). Para a análise dos fatores que tiveram maior influência na resistência térmica deste fungo, fez-se o uso do planejamento experimental 2³ com triplicata no ponto central e onde os resultados estão apresentados na forma de superfícies de resposta e curvas de níveis para os dois sucos utilizados.

4.2.1 - Os resultados obtidos utilizando-se suco de mamão como meio de aquecimento são apresentados neste item.

4.2.2 - Os resultados obtidos utilizando-se suco de abacaxi como meio de aquecimento são apresentados neste item.

4.2.3 – Nesta etapa dos resultados, apresenta-se uma comparação entre os resultados obtidos nos dois sucos estudados.

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES FATORES NO
TRATAMENTO DE ATIVAÇÃO DE ASCÓSPOROS DE
NEOSARTORYA FISCHERI EM SUCO DE ABACAXI E
MAMÃO**

4.1 –INFLUÊNCIA DE DIFERENTES FATORES NO TRATAMENTO DE ATIVAÇÃO DE ASCÓSPOROS DE *NEOSARTORYA FISCHERI* EM SUCO DE ABACAXI E MAMÃO.

Os produtos à base de frutas são altamente susceptíveis à ação de fungos filamentosos termorresistentes. Dentre as frutas com maior suscetibilidade, destacam-se: morango, abacaxi, mamão papaya, maracujá, tomate, entre outros (TOURNAS, 1994).

Ascósporos produzidos por fungos termorresistentes desenvolvem com o tempo uma dormência que pode ser quebrada com um tratamento térmico sub-letal que irá permitir a sua germinação e seu crescimento, em condições favoráveis. Este tratamento é chamado de ativação (BEUCHAT & RICE, 1979; BEUCHAT 1986; CONNER & BEUCHAT 1987; BEUCHAT 1988; SPLITSTTOESSER et al. 1993).

Desta maneira, o objetivo desta etapa foi verificar a influência da temperatura e da idade de produção dos ascósporos de *Neosartorya fischeri* e as diferentes condições de *ratio* do meio de aquecimento, em sua ativação. Ascósporos foram produzidos nas temperaturas e idades de 25°C por 1 e 3 meses, 30°C por 2 meses e 35°C por 1 e 3 meses. Os *ratios* dos meios de aquecimento foram de: 10, 24 e 38 para suco de abacaxi e 26, 46 e 66 para suco de mamão. Os resultados estão apresentados no artigo a seguir.

INFLUÊNCIA DE DIFERENTES FATORES NO TRATAMENTO DE ATIVAÇÃO DE ASCÓSPOROS DE *NEOSARTORYA FISCHERI* EM SUCO DE ABACAXI E MAMÃO.

A.P. SLONGO; S. MIORELLI; G.M.F. ARAGÃO

Universidade Federal de Santa Catarina

Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Centro Tecnológico.

C.P. 476, 88040-900 – Florianópolis, Brasil.

glaucia@enq.ufsc.br

Resumo:

Nesta pesquisa, foram estudados fatores que influenciam a ativação de ascósporos do fungo termorresistente *N. fischeri*, a saber: o meio de aquecimento e a temperatura e idade de sua produção. Os meios de aquecimento utilizados foram sucos de abacaxi e de mamão, em diferentes *ratios* (°Brix/acidez). A partir das suspensões de ascósporos obtidas nas temperaturas e idades de incubações de 25°C por 1 e 3 meses, 30°C por 2 meses e 35°C por 1 e 3 meses, realizaram-se os testes de verificação dos tempos ótimos para ativação destes ascósporos a 85°C nas diferentes condições de *ratio* dos meios de aquecimento. Pôde-se constatar que o fungo *N. fischeri* apresentou seus menores tempos de ativação quando presentes no suco de abacaxi e no mamão, nas condições de temperatura e de idade de produção de 25°C por 1 mês e o *ratio* do meio de aquecimento de 10 para suco de abacaxi e de 26 para suco de mamão, sendo de 5 minutos para ambos os sucos. Os ensaios realizados a 35°C e durante 3 meses de produção, com *ratio* do meio de aquecimento de 38 para o suco de abacaxi e de 66 para o suco de mamão, apresentaram o maior tempo de ativação, sendo este de 15 e 20 minutos, respectivamente.

INTRODUÇÃO

A ocorrência de fungos filamentosos termorresistentes em alimentos tem sido objeto de estudos sistemáticos nos últimos anos, devido à observação de diversos danos que estes microrganismos causam às frutas e aos derivados de frutas processadas. Estes fungos não só resistem às temperaturas normalmente empregadas no processamento

térmico de alimentos (KOTZEKIDOU, 1997), como também são ativados por este tratamento (BEUCHAT, 1986), com conseqüente germinação e crescimento no produto final (MURDOCK & HATCHER, 1978).

A produção dos ascósporos de fungos filamentosos termorresistentes é influenciada por fatores genéticos como linhagem do microrganismo e fatores externos como: idade e temperatura de produção, meio de aquecimento, entre outros. Ascósporos produzidos por fungos termorresistentes desenvolvem, com o tempo, uma dormência que só pode ser quebrada com um tratamento térmico sub-letal que irá permitir a germinação e o crescimento, em condições favoráveis. Este tratamento é chamado de ativação (BEUCHAT & RICE, 1979; BEUCHAT 1986; CONNER & BEUCHAT 1987; BEUCHAT 1988; SPLITSTTOESSER *et al.* 1993).

A taxa de ativação de ascósporos dos fungos termorresistentes *Byssochlamys fulva* e *Aspergillus (Neosartorya fischeri)* foi constatada por SPLITSTTOESSER & SPLITSTTOESSER (1977), em estudo da influência da natureza do meio de aquecimento sobre a sua ativação, onde os meios de aquecimento utilizados foram suco de uva (5°Brix) e água destilada. Os resultados demonstraram uma ativação mais lenta em água destilada, em comparação com o suco de uva. O mesmo efeito foi estudado por SPLITSTTOESSER *et al* (1993), verificando que a ativação de *Neosartorya fischeri*, aquecidos em suco de uva, apresentaram um tempo de ativação maior se comparado com água destilada. KOTEZEKIDOU (1997), em estudo de comparação dos meios de aquecimento suco de tomate (16% de sólidos solúveis, pH 4,2) e tampão fosfato (0,1 M , pH 7,0), constatou que o tempo de ativação destes ascósporos é maior em suco de tomate.

O objetivo desta pesquisa foi o estudo da influência dos diferentes ratios (°Brix/acidez) dos sucos de mamão e abacaxi utilizados como meios de aquecimento e idades e temperaturas de produção dos ascósporos de *Neosartorya fischeri* sobre o tempo para sua ativação máxima. Faz-se ainda uma comparação dos resultados obtidos para os sucos utilizados.

Os resultados desta pesquisa servirão de base para posterior estudo da resistência térmica destes fungos.

MATERIAL E MÉTODOS

Os meios de aquecimento foram suco de abacaxi e de mamão com diferentes valores de *ratio* -°Brix/acidez - (10, 24 e 38 – para abacaxi) e (26, 46 e 66 – para mamão) e suspensões de ascósporos de *Neosartorya fischeri*, com temperaturas e idades de produção

de 25°C por 1 e 3 meses, 30°C por 2 meses e 35°C por 1 e 3 meses. Os valores de *ratio* para cada suco estão baseados naqueles normalmente praticados pela indústria de sucos.

Esporulação das cepas

Garrafas de Roux, contendo aproximadamente 180 ml de Agar Extrato de Malte (MEA, pH5,4, formulado conforme PITT & HOCKING (1985)), foram inoculadas com 0,5 ml da suspensão previamente preparada da cepa de *N. fischeri*. Para a preparação da suspensão, e dispersão dos esporos, transferiu-se, com o auxílio de uma alça estéril, um fragmento da colônia do fungo para um tubo contendo 0,5 ml de solução 0,05% de Twen 80. A inoculação da suspensão do fungo em garrafas de Roux foi feita transferindo-se assepticamente o conteúdo do tubo para a garrafa. Essas foram incubadas a 25°C por 1 e 3 meses, 30°C por 2 meses e 35°C por 1 e 3 meses para permitir a esporulação e o desenvolvimento das estruturas de resistência térmica.

Coleta dos ascósporos das garrafas de Roux

Transcorrido cada período de produção dos ascósporos, 25 mililitros de água destilada estéril foram transferidos para cada garrafa contendo os fungos, e a superfície foi raspada levemente com o auxílio de pérolas de vidro e uma baqueta de vidro estéril. As suspensões resultantes foram filtradas através de camadas de gaze estéril, para remover os fragmentos de hifas, e centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos. Foi, então, realizada a lavagem do precipitado seguido de nova centrifugação em água estéril e verificada (microscopicamente) a obtenção de ascósporos livres, ascos e a ausência de hifas. As suspensões finais foram preparadas, ressuspensando o precipitado em um volume de água suficiente para se obter suspensões na ordem de 10^4 a 10^6 ascósporos/ml. As suspensões foram estocadas sob refrigeração em recipientes contendo pérolas de vidro (para facilitar a homogeneização antes do uso).

Determinação da acidez de sucos de frutas

A acidez titulável foi medida através da quantidade de ácido presente no produto e determinada pela adição de uma solução alcalina padrão a um peso ou volume conhecido de amostra, até que estivesse totalmente neutralizada.

Para a determinação da acidez de produtos de frutas, utilizou-se solução de fenolftaleína 1%, solução de hidróxido de sódio 0,1 N padronizada com o seu respectivo fator de correção.

O cálculo da acidez foi realizado através da equação 01:

$$\%..acidez = \frac{V * N * E * 100}{m * 100} \quad \text{eq. 01}$$

V = volume da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação da amostra em ml.

N = normalidade da solução de hidróxido de sódio utilizada na titulação, em Normal.

E = Equivalente grama do ácido predominante na amostra.

m = massa da amostra em gramas, utilizada na titulação da amostra.

O resultado é expresso em porcentagem de acidez, calculado conforme o ácido predominante na fruta que para os sucos estudados foi o ácido cítrico (m/m) (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

Determinação do °Brix

A determinação do teor de sólidos solúveis totais, ou °Brix, foi feita pela adição de 3 gotas do suco de fruta entre os prismas do equipamento de leitura (refratômetro de ABBÉ –Instruterm-), e feita em seguida a leitura em °Brix (expresso em grama de sólidos solúveis totais por 100 gramas de amostra).

Determinação do *Ratio* (°Brix / acidez)

Uma vez determinados o °Brix e a acidez, pode-se determinar o *ratio* que é a relação entre ambos.

Ajuste dos valores de *ratio*

- Baixos valores de *ratio*

Para ajustar os valores de *ratio*, primeiramente fixou-se o °Brix dos sucos (12°Brix para abacaxi e 13°Brix para mamão) e, em seguida, adicionou-se uma solução de ácido cítrico 20 % no meio até que este apresentasse um valor de acidez de 1,2 para suco de abacaxi e 0,5 para suco de mamão. Para determinação do *ratio*, fez-se a relação do °Brix do suco com a acidez encontrada após adição de ácido cítrico, onde os mesmos foram de 10 e 26, respectivamente, para abacaxi e mamão.

- Elevados valores de *ratio*

Para ajuste destes valores de *ratio*, primeiramente, fixou-se a acidez natural dos sucos (0,5 para suco de abacaxi e 0,28 para suco de mamão), em seguida adicionou-se uma solução de açúcar 60 % no meio até que este apresentasse um valor °Brix de 19 para suco de abacaxi e 18,5 para suco de mamão. Para determinação do *ratio* fez-se a relação do °Brix encontrado pela adição de açúcar com a acidez do suco, onde os mesmos foram de 38 e 66, respectivamente, para abacaxi e mamão.

Determinação das condições ótimas de ativação dos ascósporos

Para a determinação das condições ótimas de ativação dos ascósporos, foi utilizada a temperatura de 85°C (BEUCHAT, 1986; GUMERATO, 1995; BAGLIONI, 1998 e SALOMÃO, 2002) durante os tempos 0 (controle), 5, 10, 15 e 20 minutos. Para todos os

ensaios, foi utilizado suco de abacaxi ou mamão como meio de aquecimento. O método utilizado foi o de tubos TDT selados. Nos tubos foram adicionados 0,2 ml da suspensão de ascósporos e 1,8 ml de suco de abacaxi ou mamão, previamente autoclavados. Após homogeneização, os tubos foram selados em maçarico O₂/GLP e aquecidos em água termostática (Tecnal-TE-184), ajustado previamente à temperatura de 85°C. O tempo para determinação da temperatura desejada foi determinado previamente para todos os ensaios. Depois de transcorridos os tempos de aquecimento definidos, os tubos foram retirados do banho e resfriados imediatamente.

Para a determinação do número de ascósporos ativados, os tubos foram abertos assepticamente (com o auxílio de um diamante cortador de vidro) e, em seguida, feitas diluições seriadas, em água destilada autoclavada. A partir das diluições, foram realizados plaqueamentos em profundidade com MEA (formulado conforme PITT & HOCKING, 1985) acrescido de 50 mg/l de rosa de bengala. A produção dos ascósporos realizou-se a 30°C e a leitura do número de colônias formadas foi realizada a partir do terceiro dia de sua produção. A contagem foi expressa em UFC/ml.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A ativação térmica tem por finalidade interromper o estado de dormência dos ascósporos pela aplicação de calor. As ativações ótimas estão apresentadas em diferentes temperaturas e idades de produção dos ascósporos assim como em diferentes *ratios*. Os tempos a 85°C, onde se obteve a maior quantidade de ascósporos ativados nas temperaturas e idade de produção e *ratios* do meio de aquecimento, encontram-se nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1 – Tratamento de ativação utilizando, como meio de aquecimento, suco de abacaxi.

Ascósporos			Tratamento para obtenção da ativação ótima 85°C
T (°C) - produção dos ascósporos	Ratio do suco	Tempo de produção (meses)	
25°C	1 mês	10	5 minutos
25°C	1 mês	38	10 minutos
25°C	3 meses	10	5 minutos
25°C	3 meses	38	10 minutos
35°C	1 mês	10	10 minutos
35°C	1 mês	38	10 minutos
35°C	3 meses	10	10 minutos
35°C	3 meses	38	15 minutos
30°C	2 meses	24	10 minutos

A influência do *ratio* pode ser observada quando se compara o tratamento de 25°C por 1 mês e 25°C por 3 meses, nos *ratios* 10 e 38. Com *ratio* de 38, o tempo necessário para ativação foi de 10 minutos a 85°C, enquanto que para *ratio* de 10, foi de 5 minutos à mesma temperatura (tabela 1). Quando a temperatura de produção dos ascósporos foi de 35°C, o mesmo efeito pode ser observado apenas para ascósporos com 3 meses de produção dos ascósporos, sendo necessários 15 minutos para sua ativação. Uma maior variação nos tratamentos de ativação é observada em suco de mamão. Os resultados são apresentados na tabela 2.

Tabela 2 – Tratamento de ativação, tendo, como meio de aquecimento, suco de mamão.

Ascósporos			Tratamento para obtenção da ativação ótima 85°C
T (°C) - produção dos ascósporos	Ratio do suco	Tempo de produção (meses)	
25°C	1 mês	26	5 minutos
25°C	1 mês	66	10 minutos
25°C	3 meses	26	10 minutos
25°C	3 meses	66	15 minutos
35°C	1 mês	26	10 minutos
35°C	1 mês	66	15 minutos
35°C	3 meses	26	10 minutos
35°C	3 meses	66	20 minutos
30°C	2 meses	46	15 minutos

Para ascósporos aquecidos em meio com *ratio* de 66 e com temperatura e idade de produção, respectivamente, de 35°C por 3 meses, o tempo requerido para ativação ótima foi de 20 minutos. O menor tempo de ativação foi conseguido para ascósporos produzidos a 25°C por 1 mês e com *ratio* do meio de aquecimento de 26, sendo este de 5 minutos.

As observações feitas nas tabelas 1 e 2 podem ser mais bem visualizadas nas figuras 1 e 2 que apresentam as comparações das condições onde foram necessários os maiores e os menores tratamentos para ativação. Pode-se verificar que para o suco de abacaxi (Figura 1), é necessário um tempo maior de exposição ao calor para ascósporos produzidos a 35°C por 3 meses e com *ratio* de 38 do que para as condições de 25°C com *ratio* de 10. Estes resultados estão de acordo com SPLITSTTOESSER & SPLITSTTOESSER (1977) ao verificarem que a taxa de ativação de ascósporos de *Byssochlamys fulva* e *Aspergillus (Neosartorya fischeri)* era influenciada pela natureza do meio de aquecimento, onde o tempo de ativação nos meios com maior concentração de

sólidos solúveis apresentava-se maior se comparado com os meios com menores ou nenhuma concentração de sólidos solúveis.

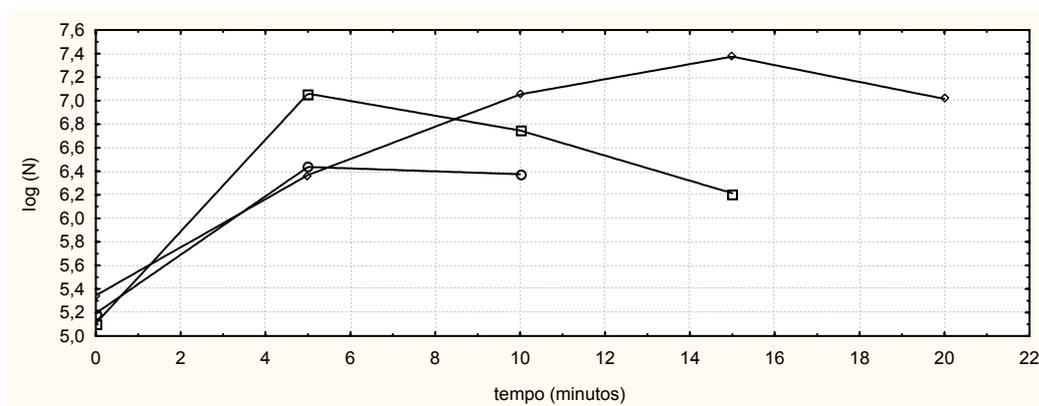


Figura 1 – Curvas de ativação utilizando suco de abacaxi como meio de aquecimento com diferentes condições para ativação: - (□) 25°C e 3 meses de produção dos ascósporos e ratio 10, (○) 25°C e 1 mês de produção dos ascósporos e ratio 10 e (◇) 35°C e 3 meses de produção dos ascósporos e ratio 38.

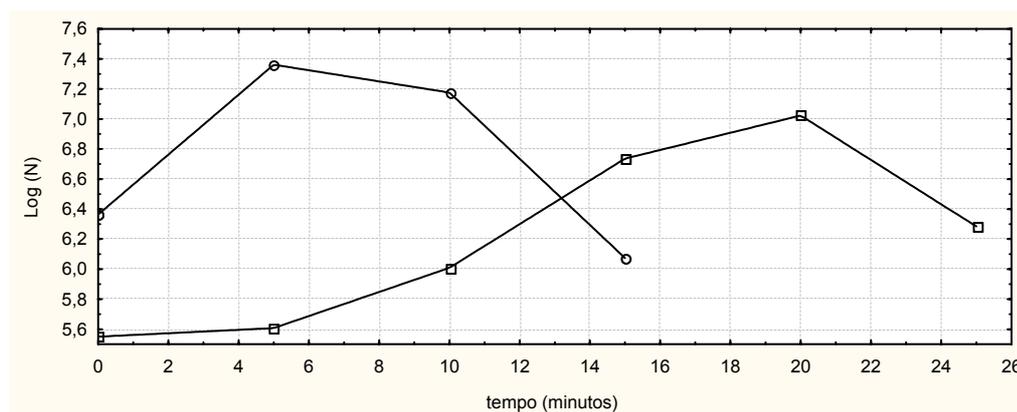


Figura 2 – Curvas de ativação utilizando suco de mamão como meio de aquecimento com diferentes condições para ativação: (□) 35°C e 3 meses de produção dos ascósporos e ratio 66 e (○) 25°C e 1 mês de produção dos ascósporos e ratio 26.

Foi observado, especialmente para o suco de mamão (Figura 2), que o maior tempo de produção dos ascósporos (3 meses) leva a um aumento do tratamento de ativação. Estes resultados estão de acordo com MARCOLINO (2003), que trabalhando com isolados termorresistentes de *N. fischeri* de linha de processamento de bebida de uva (pH 3,0 e 14°Brix), produziu ascósporos a 30°C, com idades de 1 e 3 meses. O autor construiu curvas de ativação a 85°C para ambas as idades e obteve um tempo ótimo de ativação de 10 e 25 minutos, respectivamente. O mesmo efeito de ativação foi estudado por BAGLIONI (1998) com ascósporos de *N. fischeri*, produzidos a 30°C por 1 e 3 meses. O autor verificou um maior tempo requerido para ativação ótima dos ascósporos a 85°C e

com 3 meses de idade (20 minutos) em comparação com ascósporos com 1 mês de idade (10 minutos). DELGADO (2001) trabalhou com ascósporos de *N. fischeri* produzidos a 30°C por 1 e 4 meses, usando, como meio de aquecimento, água destilada e obteve através das curvas de ativação a 80°C para ascósporos com 1 mês, e 85°C para ascósporos com 4 meses, um tempo ótimo de ativação de 5 e 20 minutos, respectivamente.

SALOMÃO (2002), trabalhando com ascósporos de *N. fischeri* produzidos a 30°C por 1 mês e utilizando, como meio de aquecimento, suco de maçã (pH 3,5 e *ratio* do meio de aquecimento de 48), obteve um tempo ótimo de ativação de 10 minutos. Este valor é inferior ao encontrado nesta pesquisa para o suco de mamão com *ratio* de 46. Isto mostra que pode haver influência de outros fatores na ativação destes ascósporos.

Verificou-se que o aumento da temperatura de produção dos ascósporos também proporcionou o aumento do tempo de ativação. ENGEL & TEUBER (1991), em trabalho de resistência térmica realizada com ascósporos de *B.nivea* produzidos em diferentes temperaturas, verificou que, nas temperaturas mais elevadas, a termorresistência dos ascósporos também se mostrava mais elevada.

CONCLUSÃO

Os resultados da presente pesquisa mostram que os ascósporos de *N. fischeri* desenvolvem maior dormência com o aumento especialmente do *ratio* do meio de aquecimento, seguido da temperatura e da idade de sua produção. Evidenciou-se, também, o efeito das condições de obtenção dos ascósporos e das características do meio de aquecimento na ativação de ascósporos de *N. fischeri*. Se o meio apresentar expressivas concentrações de sólidos solúveis, ou seja, elevados valores de *ratio*, a resistência deste fungo também irá se elevar devido ao efeito protetor por estes exercido.

Os resultados obtidos são de extrema importância primeiramente devido ao fato de existirem poucos dados na literatura, comparando diferentes fatores sobre a ativação ótima de ascósporos de fungos termorresistentes e também por não existir até então, estudos de comparação do efeito de diferentes temperaturas de produção dos ascósporos sobre a ativação ótima destes. Estes resultados são importantes como base para o estudo da resistência térmica deste fungo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAGLIONI, Flávio. **Estudo da ocorrência de fungos filamentosos termorresistentes em polpa de tomate envasada assepticamente**. Campinas: UNICAMP, 1998. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, 1998.

- BEUCHAT, L.R. & RICE, S.L. *Byssochlamys* spp. and their importance in processed fruits. **Advances in Food Research**, v.25, p.237-289, 1979.
- BEUCHAT, L.R. Extraordinary heat resistance of *Talaromyces flavus* and *Neosartorya fischeri* ascospores in fruit products. **Journal of Food Science**, v.51, n.6, p.1506-1510, 1986.
- BEUCHAT, L.R. Thermal tolerance of *Talaromyces flavus* ascospores as affected by growth medium, age and sugar content in the inactivation. **Transactions of British Mycological Society**, v.90, n.3, p.359-364, 1988.
- CONNER, D. E. & BEUCHAT, L.R. Heat resistance of ascospores of *Neosartorya fischeri* as affected by sporulation and heating medium. **International Journal of Food Microbiology**, v.4, p.303-312, 1987.
- DELGADO, D.A. **Ação esporicida do peróxido de hidrogênio sobre bolores isolados de laminado para embalagens assépticas**. Campinas: UNICAMP, 2001. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, 2001.
- ENGEL, G. & TEUBER, M. Heat resistance of *Byssochlamys nivea* in milk and cream. **International Journal of Food Microbiology**, v.12, p.225-234, 1991.
- 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: UNICAMP, 1995. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, 1995.
- PREGNOLATTO, W. & PREGNOLATTO, N.P. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. – Métodos Químicos e Físicos para a análise de Alimentos**. Instituto Adolfo Lutz, 3.ed. São Paulo (Brasil), 1985.
- KATAN, T. Heat activation of dormant ascospores of *Talaromyces flavus*. **Transactions of British Mycological Society**, v.84, p.748-750, 1985.
- 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.
- MARCOLINO, V.A. **Quantificação de leveduras, bolores comuns e termorresistentes em linha de processamento asséptico de bebida de uva**. Campinas: UNICAMP, 2003. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, 2003.
- MURDOCK, D.I.; HATCHER, W.S. A simple method to screen fruit juices and concentrates for heat resistance mold. **Journal of Food Protection**, v.41, p.254-256, 1978.
- PITT, J. I. & HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. Sydney: Academic Press, 1985, 413 p.

SALOMÃO, B.C.M. **Isolamento, identificação e estudo da resistência térmica de fungos filamentosos termorresistentes em produtos de frutas**. Florianópolis, 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

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

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

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

4.1.1 – CONCLUSÃO

Através deste estudo, verificou-se que os diferentes fatores, especialmente o *ratio* do meio de aquecimento, tiveram influência no tempo de ativação ótimo de ascósporos de *Neosartorya fischeri*, e que a mesma deve-se ao efeito protetor que os sólidos solúveis exercem sobre estes microrganismos. Constatou-se ainda que a adição de ácido cítrico nos meios de aquecimento provocou a sensibilização dos mesmos, obtendo-se assim tempos menores de ativação. O aumento da temperatura e da idade de produção dos ascósporos faz com que estes aumentem a sua termorresistência e com isso necessitem de um tempo maior para sua máxima ativação.

Os resultados obtidos nesta etapa servirão de base para os estudos de resistência térmica de *N. fischeri* que são apresentados a seguir.

***INFLUÊNCIA DE DIFERENTES FATORES NA
TERMORRESISTÊNCIA DE NEOSARTORYA
FISCHERI EM SUCOS TROPICAIS***

4.2 - INFLUÊNCIA DE DIFERENTES FATORES NA TERMORRESISTÊNCIA DE NEOSARTORYA FISCHERI EM SUCOS TROPICAIS.

A resistência térmica de fungos filamentosos termorresistentes pode variar muito com o meio de aquecimento, especialmente quando ocorre grande variação no *ratio* (°Brix/acidez). RAJASHEKHARA et al (1996) contrastaram os dados de resistência térmica de ascósporos de *Neosartorya fischeri* isolados de mamão, suco de manga, abacaxi e “blendas” de mamão e abacaxi e verificaram um aumento de quatro vezes na resistência térmica quando o teor de sólidos solúveis nessas frutas variou de 10 a 45°Brix.

Nesta pesquisa, com o auxílio da metodologia de planejamento experimental fracionário, fez-se o estudo da influência da temperatura e da idade de produção dos ascósporos de *Neosartorya fischeri* e do *ratio* (°Brix/acidez) do meio de aquecimento na resistência térmica deste, em suco de mamão e de abacaxi. Os ensaios de resistência térmica foram realizados, utilizando o método de tubos TDT, selados, com ascósporos suspensos em suco de mamão ou abacaxi, e as temperaturas utilizadas, em todos os ensaios de resistência térmica, foram de 80, 85 ou 90°C. 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 em todos os ensaios foram submetidos à análise de variância e de estimação dos efeitos através do *software Statistica 6.0*. Os fatores foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. Os resultados são apresentados nos itens 2.1, para suco de mamão e 2.2, para suco de abacaxi e a comparação destes é apresentada no item 2.3.

As tabelas e curvas com os resultados de todos os ensaios realizados estão apresentadas no Anexo II e III.

4.2.1 - INFLUÊNCIA DE DIFERENTES FATORES NA TERMORRESISTÊNCIA DE *NEOSARTORYA FISCHERI* EM SUCO DE MAMÃO.

Os experimentos foram realizados pela combinação de níveis e fatores e estão descritos na tabela 4.2.1.1.

Tabela 4.2.1.1 – Níveis e fatores utilizados no planejamento experimental para suco de mamão.

Fatores	Níveis		
	- 1	0	+ 1
Temperatura de produção dos ascósporos (°C)	25	30	35
<i>Ratio</i> do meio de aquecimento (°Brix/acidez)	26	46	66
Idade de produção dos ascósporos (meses)	1	2	3

Foram realizadas as resistências térmicas dos ascósporos de *N. fischeri*, em todos os ensaios. As curvas de sobreviventes obtidas não foram lineares nos diferentes tratamentos realizados, especialmente às temperaturas mais brandas. Foi necessária a utilização do método de linearização das curvas de sobreviventes para obtenção dos parâmetros de resistência térmica equivalentes a D e Z.

Na figura 4.2.1.1, apresenta-se um exemplo de inativação térmica de um dos ensaios do planejamento experimental. Esta figura apresenta todas as curvas nas diferentes temperaturas, com *ratio* do meio de aquecimento de 66, e suspensões de ascósporos que foram produzidos após 3 meses de produção dos ascósporos a 35°C. Observa-se a não linearidade nas curvas com temperaturas mais brandas (80 e 85°C). Com o aumento da temperatura (90°C), a curva torna-se praticamente linear. KING et al (1979) também observaram este fenômeno e constataram que as altas temperaturas mascaram a não linearidade das curvas, sendo necessária a utilização de temperaturas mais baixas para evidenciar este fenômeno. O mesmo resultado foi observado por KING & HALBROOK (1987), ARAGÃO (1989), KING & WHITEHAND (1990), BAGLIONI (1998) e SALOMÃO (2002).

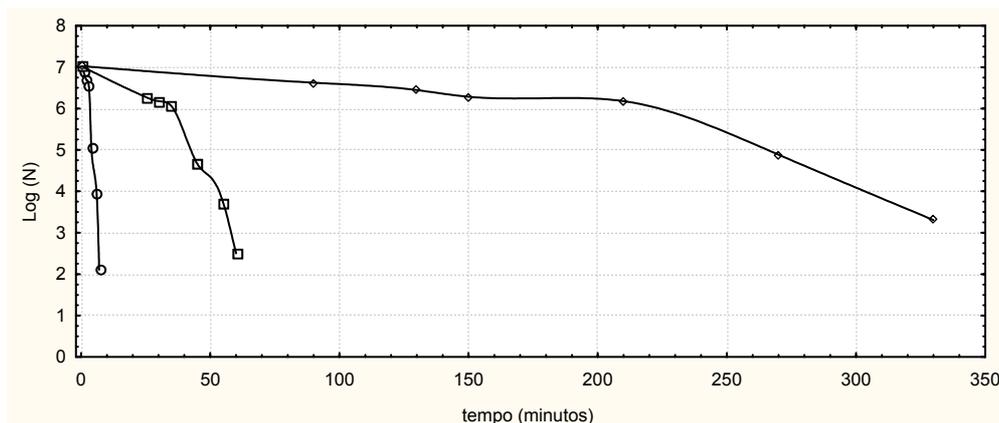


Figura 4.2.1.1 – Curva de inativação térmica de ascósporos de *N. fischeri* a (◇) 80°C, (□) 85°C e (○) 90°C em suco de mamão (ratio 66 e ascósporos produzidos a 35°C por 3 meses).

O primeiro procedimento para a linearização das curvas é o cálculo do valor do parâmetro “a”, que é obtido pelo inverso da curva extraída do gráfico $\log(\log N_0 - \log N)$ versus $\log(t)$ (figura 4.2.1.2). O valor de “a” foi obtido, através do tratamento menos severo (80°C) e, a partir do valor encontrado, procedeu-se à linearização das curvas dos tratamentos mais severos. Isto se deve ao fato de a curva de sobreviventes, a 80°C, apresentar o maior “ombro” dentre as demais. O valor do expoente “a” calculado a 80°C, para este ensaio, e o coeficiente de correlação (r^2) foram de 0,603 e 0,9075, respectivamente.

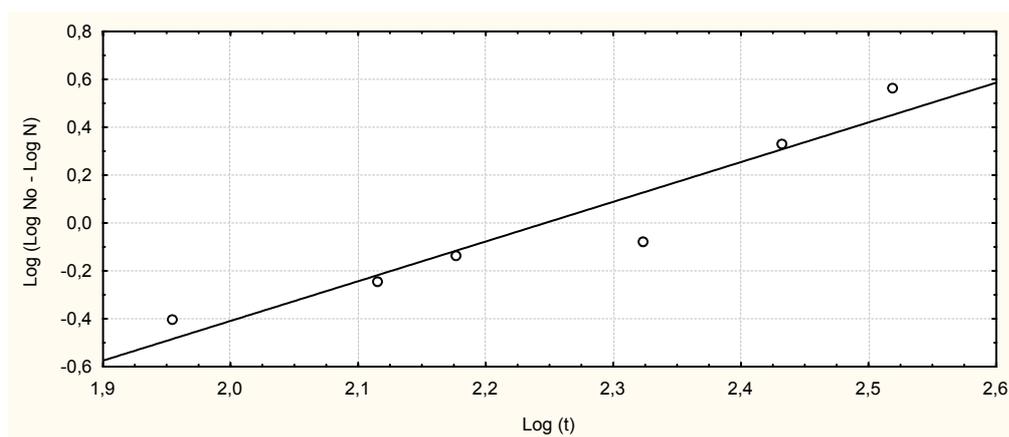


Figura 4.2.1.2 - Curva linearizada para a determinação do parâmetro “a” à temperatura de 80°C.

Os valores de resistência térmica ($1/k$) – equivalente a “D” e os valores de Z^* e seus respectivos coeficientes de correlação, para ascósporos de *N. fischeri*, foram calculados a partir das equações das curvas linearizadas. Estes valores são provenientes das equações das curvas linearizadas do gráfico $(\log N_0 - \log N)^a$ versus (tempo), sendo o

valor de $1/k$ calculado pelo inverso da inclinação destas curvas. A figura 4.2.1.3 apresenta os gráficos de linearização das curvas de sobreviventes para o ensaio analisado.

A partir dos gráficos, foi possível a determinação do parâmetro equivalente a “D”, para cada temperatura, correspondendo a 158,73 min para a temperatura de 80°C, 28,01 min para 85°C e 2,97 min para 90°C.

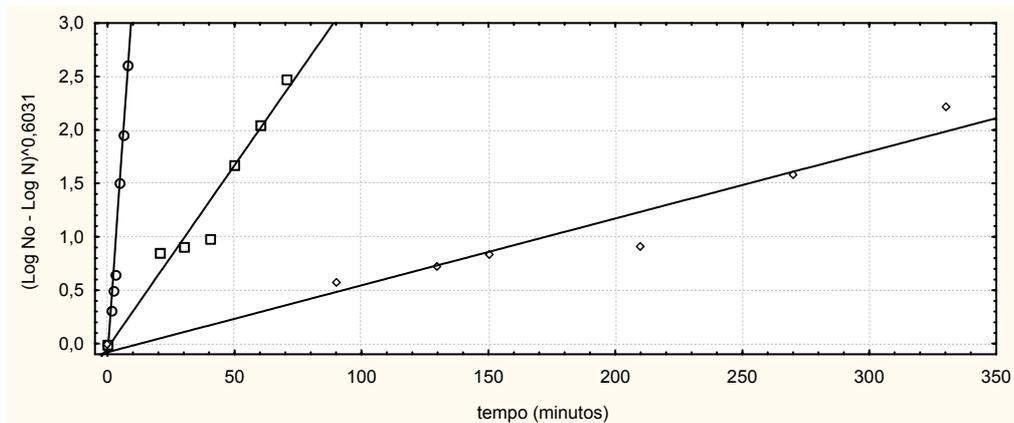


Figura 4.2.1.3 - Curvas de linearização da inativação térmica de ascósporos de *N. fischeri* a 80(◇), 85(□) e 90°C (○) em suco de mamão (ensaio 5 – temperatura e idade de produção dos ascósporos = 35°C por 3 meses, e ratio do meio de aquecimento = 66).

As equações de cada reta são apresentadas abaixo:

$$(\log N_0 - \log N)^{0,6031} = 0,0063t - 0,08 \quad (\text{para } 80^\circ\text{C}) \quad \text{equação 4.2.1.1}$$

$$(\log N_0 - \log N)^{0,6031} = 0,0342t - 0,039 \quad (\text{para } 85^\circ\text{C}) \quad \text{equação 4.2.1.2}$$

$$(\log N_0 - \log N)^{0,6031} = 0,3368t - 0,1021 \quad (\text{para } 90^\circ\text{C}) \quad \text{equação 4.2.1.3}$$

A figura 4.2.1.4 apresenta a determinação do valor de Z^* (equivalente a Z) para ascósporos de *N. fischeri*, onde o valor de Z^* encontrado foi de 5,79°C, com um coeficiente de correlação de 0,993.

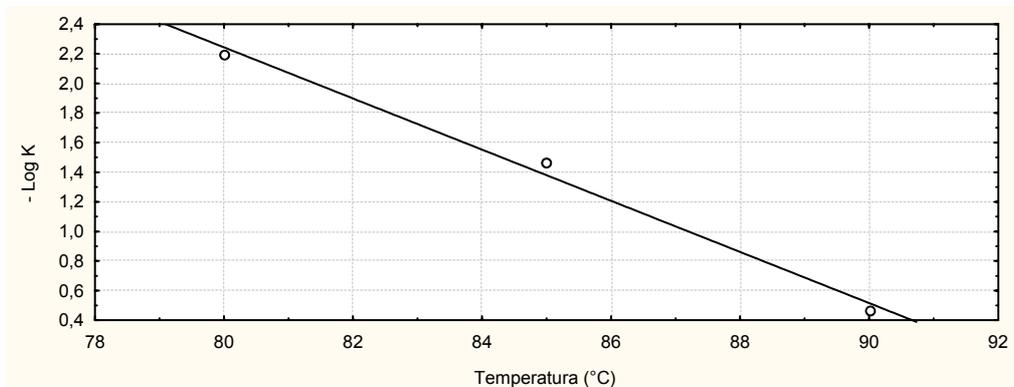


Figura 4.2.1.4 - Determinação de Z^* para *Nesartorya fischeri* (curva TDT-equivalente).

A tabela 4.2.1.2 contém os resultados obtidos para os demais ensaios. São apresentados os valores do expoente “a” calculados a 80°C e os valores de 1/k para os diferentes ensaios realizados às temperaturas de 80, 85 e 90°C. A tabela apresenta, ainda, os valores de Z* para cada condição. Os valores de r^2 , para todos os ensaios, apresentaram-se na faixa de 0,90 a 0,99. O ensaio 1 foi realizado a partir de uma suspensão de ascósporos de *N. fischeri* que foi coletada de uma produção a 25°C, por 1 mês, e sua resistência térmica realizada em suco de mamão com *ratio* 26. Assim adotou-se a simbologia (25-1-26) para designar a temperatura e a idade de produção dos ascósporos e o *ratio* do meio de aquecimento no qual se determinou a sua resistência térmica.

Tabela 4.2.1.2 – Matriz do planejamento fracionário experimental 2^3 para os diferentes valores do expoente “a” e dos parâmetros de resistência 1/k (equivalente a D) e Z* (equivalente a Z).

Ensaio	Fatores							
	T	R	I	Expoente “a”	1/k 80°C (min)	1/k 85°C (min)	1/k 90°C (min)	Z* (°C)
1 - (25-1-26)	-1	-1	-1	0,50	74,6	16,89	2,37	6,4
2 - (25-3-26)	-1	-1	1	0,62	78,1	18,87	2,50	6,7
3 - (25-1-66)	-1	1	-1	0,75	119,0	19,23	1,81	5,9
4 - (25-3-66)	-1	1	1	0,36	135,1	27,25	2,67	5,7
5 - (35-3-66)	1	1	1	0,60	158,7	28,01	2,97	5,8
6 - (35-1-66)	1	1	-1	0,47	133,33	23,92	2,68	5,8
7 - (35-3-26)	1	-1	1	0,47	108,66	27,62	2,80	6,3
8 - (35-1-26)	1	-1	-1	0,37	101,00	25,32	2,43	6,0
9 - (30-2-46)	0	0	0	0,39	149,24	31,06	3,05	6,02
10 - (30-2-46)	0	0	0	0,58	138,89	27,17	2,96	5,98
11 - (30-2-46)	0	0	0	0,55	147,06	31,54	2,94	5,9

Legenda:

T = Temperatura (°C)

R = Ratio (°Brix/acidez)

I = Idade (meses)

Os resultados da tabela 4.2.1.2 foram submetidos a análise de variância e de estimativa dos efeitos através do *software Statistica 6.0* e são apresentados na tabela 4.2.1.3. Os fatores são considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

Tabela 4.2.1.3 - Análise de variância e estimativa dos efeitos para as variáveis respostas estudadas - valores de D e Z*.

Fatores	Variável resposta 1 / k						Variável resposta Z*	
	1/k a 80°C		1/k a 85°C		1/k a 90°C		Efeito	Valor- p
(1) – T°C	23,70	0,025	6,11	0,007	0,382	0,009	-0,213	0,049
(2) - Ratio	45,94	0,006	2,59	0,041	0,008	0,830	-0,512	0,009
(3) - Idade	13,16	0,007	4,25	0,016	0,413	0,008	0,069	0,290
(1) por (2)	-4,76	0,342	-2,47	0,059	0,202	0,073	0,183	0,064
(1) por (3)	3,37	0,474	-0,44	0,498	-0,081	0,163	0,028	0,623
(2) por (3)	7,57	0,188	2,11	0,060	0,161	0,071	-0,206	0,052

Analisando-se a variável resposta (valor de 1/k), para temperatura de 80°C, onde todos os fatores tiveram efeito significativo, verifica-se uma estimativa de aumento da resistência térmica de *N. fischeri* de, aproximadamente, 45%, 13% e 23%, respectivamente, para *ratio*, idade e temperatura de produção dos ascósporos, quando estes fatores passam de um nível inferior (temperatura e idade de produção dos ascósporos de 25°C e 1 mês e *ratio* 26) para um nível superior (temperatura e idade de produção dos ascósporos de 35°C e 3 meses e *ratio* 66). As figuras 4.2.1.5 e 4.2.1.6 apresentam as superfícies de resposta e as curvas de níveis construídas para a variável resposta valor de 1/k a 80°C, respectivamente, para temperatura *versus* idade de produção dos ascósporos e *ratio versus* temperatura de produção dos ascósporos.

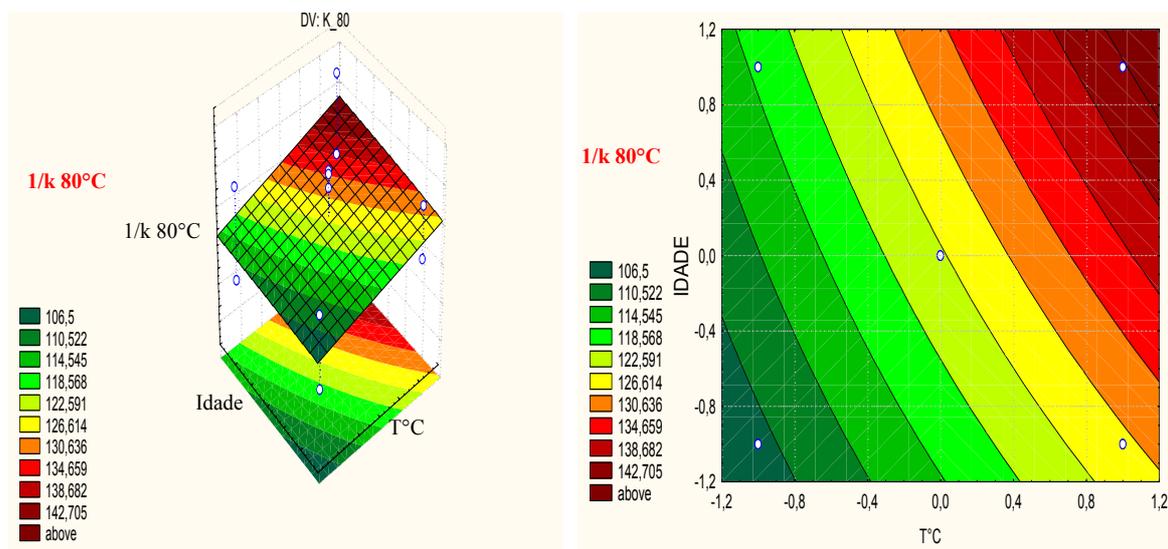


Figura 4.2.1.5 - Superfície de resposta e curva de nível para a variável resposta valor de 1/k a 80°C para os fatores temperatura *versus* idade de produção dos ascósporos.

A equação do modelo da superfície de resposta e da curva de nível da figura 4.2.1.5 que correlaciona os fatores temperatura de produção e idade de produção dos ascósporos é apresentada na equação 4.2.1.4:

$$1/K = 122,17 + 11,85 * T^{\circ}C + 6,58 * IDADE \quad \text{equação 4.2.1.4}$$

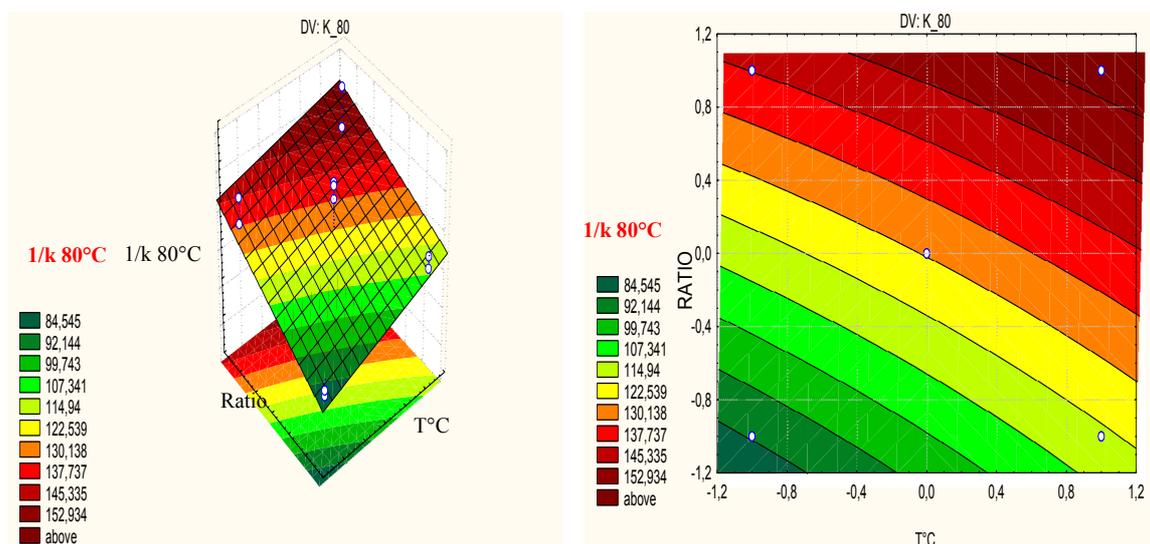


Figura 4.2.1.6 - Superfície de resposta e curva de nível para a variável resposta valor de $1/k$ a $80^{\circ}C$ para os fatores *ratio versus* temperatura de produção dos ascósporos.

A equação do modelo da superfície de resposta e da curva de nível da figura 4.2.1.6 que correlaciona os fatores temperatura de produção dos ascósporos e o ratio é apresentada na equação 4.2.1.5:

$$1/K = 122,17 + 11,85 * T^{\circ}C + 22,974 * RATIO \quad \text{equação 4.2.1.5}$$

Avaliando-se a variável resposta $1/k$ a $85^{\circ}C$, verifica-se que todos os fatores apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$). Estes fatores, ao passarem de níveis inferiores para níveis superiores, proporcionaram um aumento na resistência térmica de 6,11; 2,59 e 4,25 %, respectivamente, para os fatores temperatura, ratio e idade. As figuras 4.2.1.7 e 4.2.1.8 apresentam as superfícies de resposta e as curvas de níveis construídas para a variável resposta valor de $1/k$ a $85^{\circ}C$, para temperatura de produção dos ascósporos *versus* ratio e idade *versus* temperatura de produção dos ascósporos, respectivamente.

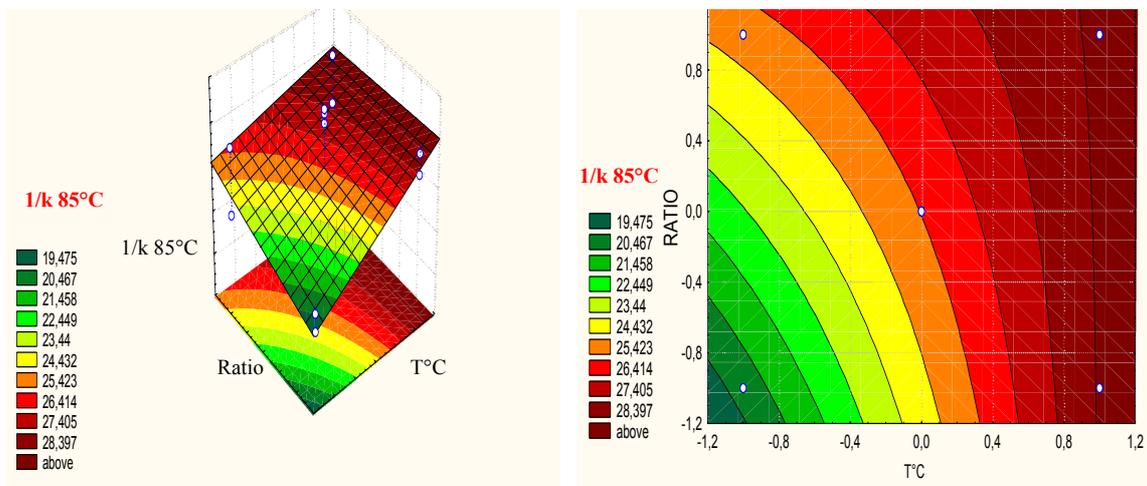


Figura 4.2.1.7 - Superfície de resposta e curva de nível para a variável resposta valor de $1/k$ a 85°C para os fatores *ratio* versus temperatura de produção dos ascósporos.

A equação do modelo da superfície de resposta e da curva de nível da figura 4.2.1.7 que correlaciona os fatores *ratio* e temperatura de produção dos ascósporos é apresentada na equação 4.2.1.6:

$$1/K = 25,49 + 3,05 * T^{\circ}\text{C} + 1,295 * \text{RATIO}$$

equação 4.2.1.6

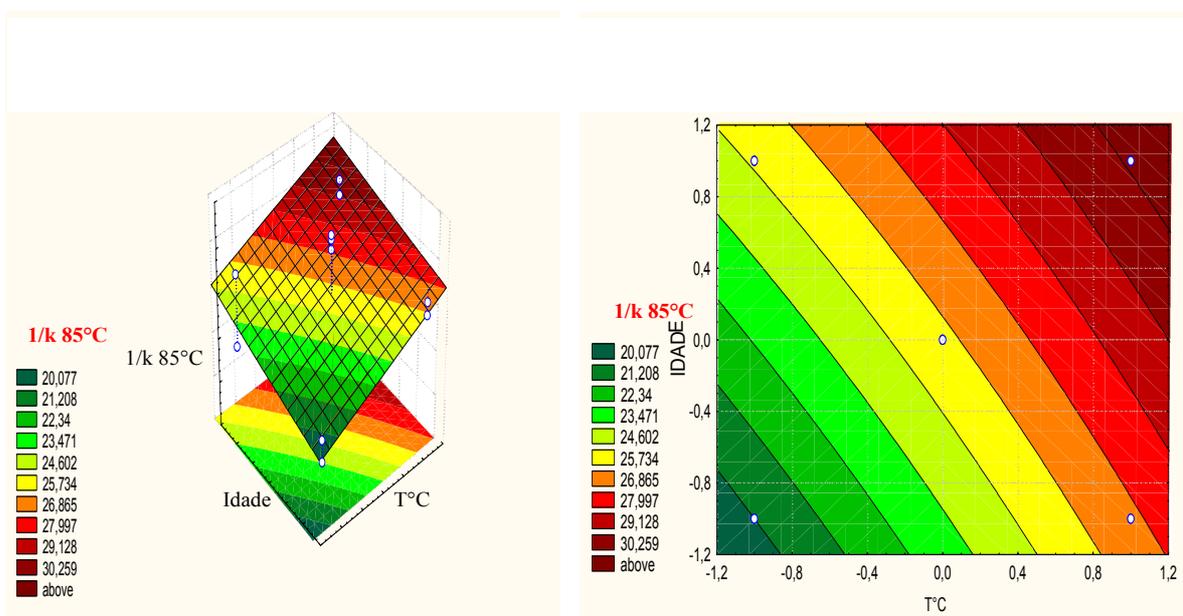


Figura 4.2.1.8 - Superfície de resposta e curva de nível para a variável resposta valor de $1/k$ a 85°C para os fatores idade de produção dos ascósporos versus temperatura de produção dos ascósporos.

A equação do modelo da superfície de resposta e da curva de nível da figura 4.2.1.8 que correlaciona os fatores idade de produção e temperatura de produção dos ascósporos é apresentada na equação 4.2.1.7:

$$1/K = 25,49 + 3,05 * T^{\circ}C + 2,129 * IDADE \quad \text{equação 4.2.1.7}$$

Avaliando-se a variável resposta $1/k$ a $90^{\circ}C$, verifica-se que os fatores temperatura e idade de produção dos ascósporos apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$). As figuras 4.2.1.9 e 4.2.1.10 apresentam as superfícies de respostas e as curvas de níveis construídas para a variável resposta valor de $1/k$ a $90^{\circ}C$, respectivamente, para idade *versus* temperatura de produção dos ascósporos e *ratio versus* temperatura de produção dos ascósporos.

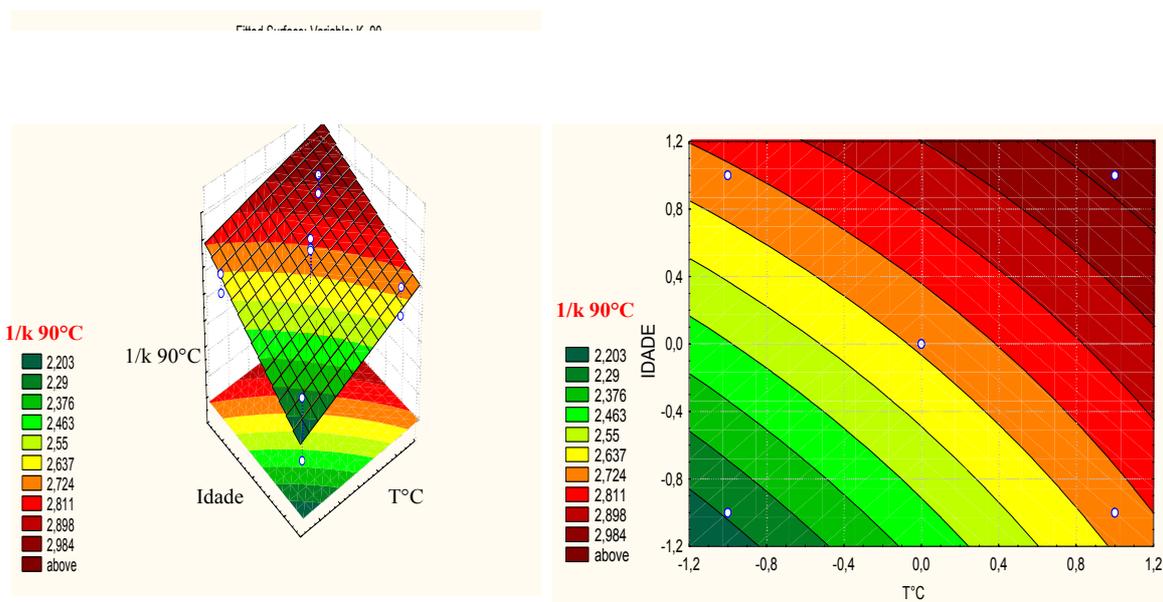


Figura 4.2.1.9 – Superfície de resposta e curva de nível para a variável resposta valor de $1/k$ a $90^{\circ}C$ para os fatores idade versus temperatura de produção dos ascósporos.

A equação do modelo da superfície de resposta e da curva de nível da figura 4.2.2.9 que correlaciona os fatores idade de produção e temperatura de produção dos ascósporos é apresentada na equação 4.2.1.8:

$$1/K = 2,652 + ,191 * T^{\circ}C + ,206 * IDADE \quad \text{equação 4.2.1.8}$$

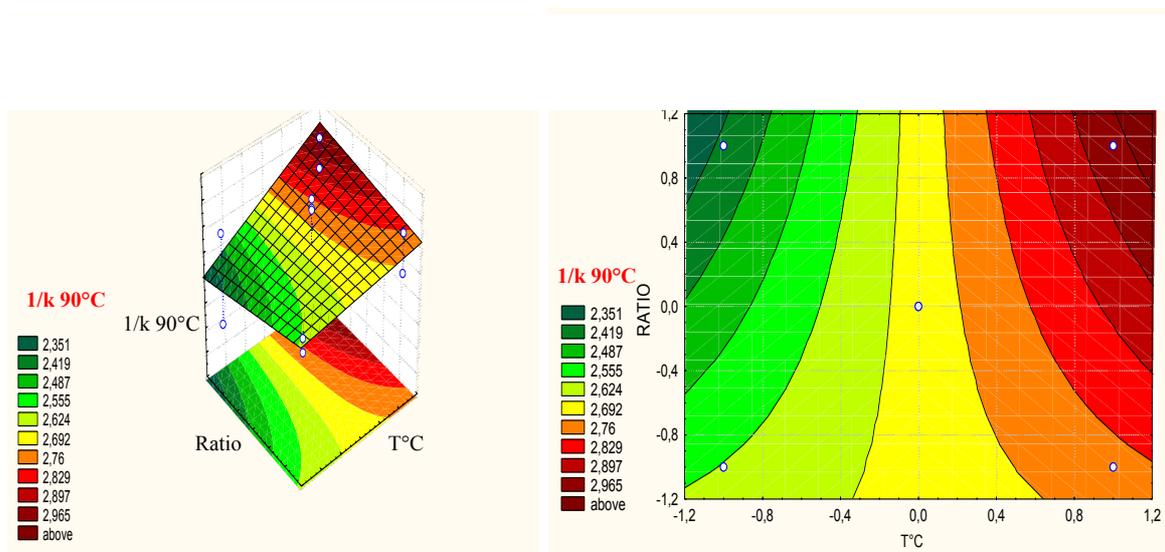


Figura 4.2.1.10 – Superfície de resposta e curva de nível para a variável resposta valor de $1/k$ a 90°C para os fatores *ratio* versus temperatura de produção dos ascósporos.

A equação do modelo da superfície de resposta e da curva de nível da figura 4.2.1.10 que correlaciona os fatores *ratio* e temperatura de produção dos ascósporos é apresentada na equação 4.2.1.9:

$$1/K = 2,65 + ,1917 * T^{\circ}\text{C} + ,0044 * \text{RATIO} \quad \text{equação 4.2.1.9}$$

Nas temperaturas mais elevadas, os efeitos provocados pelas variações dos fatores foram bem inferiores aos apresentados a 80°C . Estes resultados mostram que às temperaturas mais altas, o efeito da variação dos fatores é mascarado pelo efeito da temperatura de tratamento térmico.

Na presente pesquisa, o aumento do valor de *ratio* de valores inferiores (26) para valores superiores (66) foi conseguido pela adição de solução de sacarose no meio de aquecimento. Verificou-se que esta mudança ocasionou um expressivo aumento da resistência térmica, como se pode observar pela análise de variância, pelas superfícies de resposta e pelas curvas de níveis, especialmente para a variável resposta valor de $1/k$ a 80°C , onde o aumento da resistência térmica foi de 45 %.

TOURNAS & TRAXLER (1994) constataram que ascósporos de *Neosartorya fischeri* aquecidos a 85, 88, 90, 95 e 100°C , por 1 hora, em suco de abacaxi concentrado (42,7°Brix), apresentaram uma maior resistência térmica, em comparação com o suco de abacaxi (12,6°Brix) e água destilada. RAJASHEKLARA et al (1996) verificaram que a resistência térmica de ascósporos de *Neosartorya fischeri* aumentou, em até quatro vezes,

quando o teor de sólidos solúveis do meio de aquecimento utilizado (suco de manga) variou de 10 a 45°Brix.

Verificou-se, também, na presente pesquisa, que o aumento da temperatura de produção dos ascósporos leva ao aumento da resistência térmica, onde ao se trabalhar com as mesmas condições de *ratio* do meio de aquecimento e idade de produção dos ascósporos e ao se variar somente a temperatura de produção, os ascósporos mostraram maior termorresistência com a sua elevação, comprovando-se assim a influência da temperatura de produção dos ascósporos no aumento da resistência térmica de *Neosartorya fischeri*. Pela análise de variância para a variável resposta valor de $1/k$ a 80°C, este aumento da resistência térmica foi de 23 %, podendo ser visualizado pelas superfícies de resposta e pelas curvas de níveis desta resposta.

A avaliação do efeito de diferentes temperaturas de produção dos ascósporos (20, 25, 30 e 35°C), na resistência térmica de ascósporos de *Talaromyces flavus*, foi realizada por KING JR. & WHITHAND (1990). Eles obtiveram a maior resistência para os ascósporos armazenados a 20 e 35°C.

Pode-se observar, através da análise dos resultados experimentais e da análise de variância e de estimativa dos efeitos da presente pesquisa, que o fungo *Neosartorya fischeri* apresenta menor termorresistência para meios de aquecimento com baixos valores de *ratio*. Estes valores foram conseguidos pela adição de ácido cítrico 20 % ao meio de aquecimento. RAJASHEKLARA et al (1998), em trabalho de resistência térmica realizada com ascósporos de *Neosartorya fischeri*, e utilizando como meio de aquecimento suco de manga com diferentes adições de ácidos orgânicos (ácido málico, cítrico e tartárico), verificaram que as mais baixas resistências térmicas dos ascósporos em tratamento térmico a 85°C deram-se quando o meio de aquecimento continha ácido cítrico.

O aumento da resistência térmica de ascósporos de *Neosartorya fischeri* ocasionado pelo aumento da idade de sua produção também pode ser observado na presente pesquisa. Ao fixarmos a temperatura de produção dos ascósporos e o *ratio* do meio de aquecimento e ao variarmos a idade de produção, verifica-se que a resistência térmica aumenta. Pela análise de variância, verificou-se que este aumento da resistência térmica foi de 13 %.

TOURNAS & TRAXLER (1994), em estudos com ascósporos de *N. fischeri* de 1, 2, 3 e 6 meses de produção e isolados de suco de abacaxi, puderam verificar que os ascósporos com maior idade apresentaram resistência térmica superior aos de menor idade.

A figura 4.2.1.11 apresenta a superfície de resposta e a curva de nível construída para a variável resposta valor de Z^* , onde os fatores temperatura de produção dos

ascósporos e *ratio* apresentaram efeito significativo na resistência térmica de *N.fischeri*. A estimativa de aumento apresentada por estes fatores foi de, aproximadamente, 0,21 e 0,51%, respectivamente.

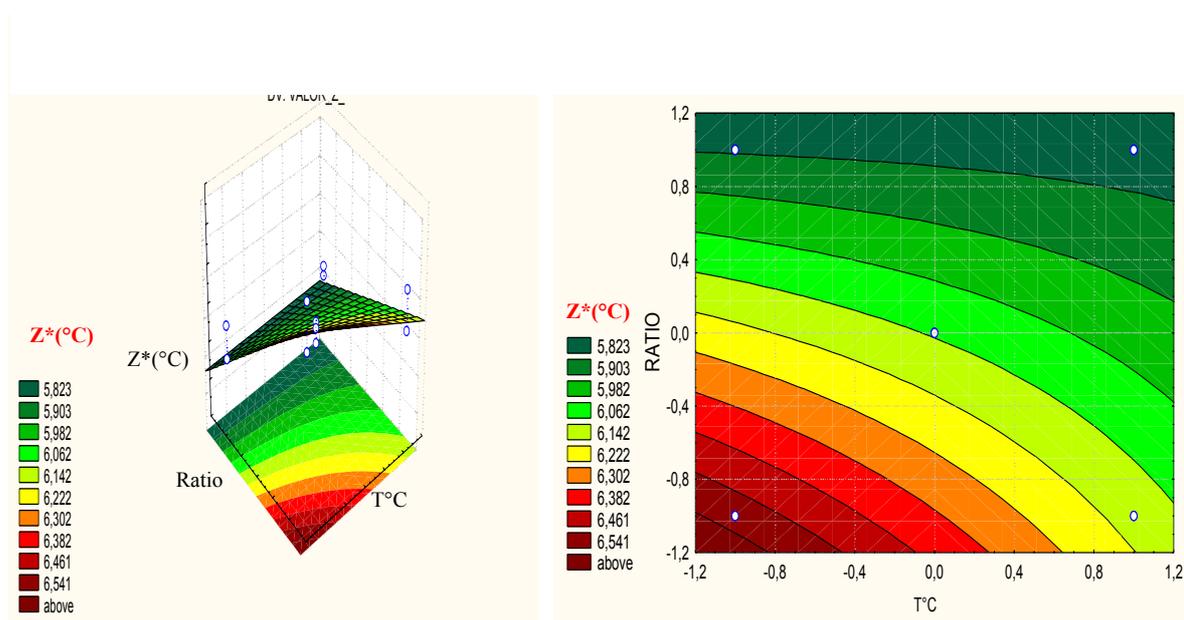


Figura 4.2.1.11 – Superfície de resposta e curva de nível obtida para os fatores temperatura de produção dos ascósporos e *ratio* para a variável resposta valor de Z^* .

A equação do modelo da superfície de resposta e da curva de nível da figura 4.2.1.11 que correlaciona os fatores temperatura de produção dos ascósporos e o *ratio* é apresentada na equação 4.2.1.10:

$$Z^* = 6,05 - ,1062 * T^{\circ}C - ,2556 * RATIO \quad \text{equação 4.2.1.10}$$

Os valores obtidos para Z^* , nesta pesquisa, estão na faixa dos valores apresentados na literatura. SALOMÃO (2002), em pesquisa realizada com ascósporos de *N.fischeri* produzidos à 30°C por 1 mês e utilizando como meio de aquecimento suco de maçã (14°Brix, pH 3,5) e *ratio* de 48 (dado não publicado), encontrou um valor de Z^* de 4,59°C. ARAGÃO (1989), em pesquisa realizada com *N.fischeri* e utilizando suco de morango como meio de aquecimento (15°Brix, pH 3,0), encontrou um valor de Z^* de 6,17°C.

Os ensaios realizados nas menores temperaturas de produção dos ascósporos e nos menores *ratios* do meio de aquecimento apresentaram os maiores valores de Z^* (6,7°C). Porém à medida que houve um aumento da temperatura de produção dos ascósporos e do *ratio* do meio de aquecimento, os valores de Z^* se reduzem (5,7°C). Desta maneira,

constatou-se que o aumento da *ratio* assim como da idade e da temperatura de produção exercem influência na redução dos valores de Z^* .

Com os valores de Z^* e $1/k$ (equivalente a D) de todos os ensaios, foi possível o cálculo dos valores de esterilização (F) para o suco de mamão. Este cálculo foi feito com o objetivo de verificar se o tratamento térmico comercial aplicado no suco de mamão é suficiente para destruir os ascósporos do fungo *Neosartorya fischeri*. O tratamento térmico aplicado em suco de mamão é, geralmente, de 100°C/30 segundos. Como os valores de $1/k$, obtidos nesta pesquisa, somente foram calculados para 80, 85 e 90°C, fez-se necessário obtenção do valor de $1/k$ para 100°C, utilizando-se a equação da “curva fantasma” (curva TDT-equivalente).

Pelos gráficos das curvas fantasmas (Anexo II – figuras A31 e A32), foram obtidas as seguintes equações para todos os ensaios:

1 - (25-1-26)	- (log k) = 13,894 – 0,1498 T
2 - (25-3-26)	- (log k) = 13,898 – 0,1495 T
3 - (25-1-66)	- (log k) = 16,647 – 0,1818 T
4 - (25-3-66)	- (log k) = 15,805 – 0,1708 T
5 - (35-3-66)	- (log k) = 16,068 – 0,1728 T
6 - (35-1-66)	- (log k) = 15,757 – 0,1697 T
7 - (35-3-26)	- (log k) = 14,807 – 0,1589 T
8 - (35-1-26)	- (log k) = 15,03 – 0,1619 T
9 - (30-2-46)	- (log k) = 15,75 – 0,169 T
10 - (30-2-46)	- (log k) = 15,553 – 0,1671 T
11 - (30-2-46)	- (log k) = 15,814 – 0,1698 T

Substituindo o valor de T (temperatura) das equações por 100°C, encontramos novos valores para k e $1/k$:

1 - $1/k = 0,082 \text{ min} \equiv 4,92 \text{ segundos}$	7 - $1/k = 0,0612 \text{ min} \equiv 3,67 \text{ segundos}$
2 - $1/k = 0,087 \text{ min} \equiv 5,02 \text{ segundos}$	8 - $1/k = 0,0643 \text{ min} \equiv 3,85 \text{ segundos}$
3 - $1/k = 0,029 \text{ min} \equiv 1,76 \text{ segundos}$	9 - $1/k = 0,071 \text{ min} \equiv 4,25 \text{ segundos}$
4 - $1/k = 0,058 \text{ min} \equiv 3,49 \text{ segundos}$	10 - $1/k = 0,069 \text{ min} \equiv 4,18 \text{ segundos}$
5 - $1/k = 0,069 \text{ min} \equiv 4,15 \text{ segundos}$	11 - $1/k = 0,068 \text{ min} \equiv 4,09 \text{ segundos}$
6 - $1/k = 0,083 \text{ min} \equiv 4,95 \text{ segundos}$	

Para o cálculo do valor de esterilização (F) a 100°C, ainda são necessárias duas considerações:

- 1) População inicial de *N. fischeri* (N_0) = 10^{-2} ascósporos/ml, conforme encontrou BAGLIONI (1998), investigando a ocorrência deste fungo em pasta de tomate. Considerando que a embalagem utilizada para o suco de mamão foi de 300 ml, temos: $N_0 = 3,0$ ascósporos/embalagem.

- 2) Considerando a probabilidade de sobrevivência de 1 ascósporo de *N. fischeri* em 1000 (10^3) embalagens, temos que o número de reduções decimais (γ) necessárias é 4, ou seja, ($\gamma = 4$).

Seja F definido como: $F = \gamma \cdot D$

$$F_{100^\circ\text{C}} = 4 \cdot D_{100^\circ\text{C}}$$

$$F_{100^\circ\text{C}} (\text{ensaio1}) = 4 * 4,92 \text{ s} = 19,68 \text{ segundos}$$

$$F_{100^\circ\text{C}} (\text{ensaio2}) = 4 * 5,20 \text{ s} = 20,80 \text{ segundos}$$

$$F_{100^\circ\text{C}} (\text{ensaio3}) = 4 * 1,76 \text{ s} = 7,04 \text{ segundos}$$

$$F_{100^\circ\text{C}} (\text{ensaio4}) = 4 * 3,49 \text{ s} = 13,96 \text{ segundos}$$

$$F_{100^\circ\text{C}} (\text{ensaio5}) = 4 * 4,15 \text{ s} = 16,60 \text{ segundos}$$

$$F_{100^\circ\text{C}} (\text{ensaio6}) = 4 * 4,95 \text{ s} = 19,80 \text{ segundos}$$

$$F_{100^\circ\text{C}} (\text{ensaio7}) = 4 * 3,67 \text{ s} = 14,68 \text{ segundos}$$

$$F_{100^\circ\text{C}} (\text{ensaio8}) = 4 * 3,85 \text{ s} = 15,40 \text{ segundos}$$

$$F_{100^\circ\text{C}} (\text{ensaio9}) = 4 * 4,25 \text{ s} = 17,00 \text{ segundos}$$

$$F_{100^\circ\text{C}} (\text{ensaio10}) = 4 * 4,18 \text{ s} = 16,72 \text{ segundos}$$

$$F_{100^\circ\text{C}} (\text{ensaio11}) = 4 * 4,09 \text{ s} = 16,36 \text{ segundos}$$

Diante destes resultados, verifica-se que o tempo de tratamento térmico aplicado pelas indústrias, em suco de mamão ($100^\circ\text{C}/30\text{segundos}$), é suficiente para se obter a redução decimal esperada.

Considerando-se um grau de segurança maior, para a probabilidade de sobrevivência de 1 ascósporo de *N. fischeri* em 10^6 embalagens, teremos, $\gamma = 7$.

$$F_{100^\circ\text{C}} = 7 \cdot D_{100^\circ\text{C}}$$

$$F_{100^\circ\text{C}} (\text{ensaio1}) = 7 * 4,92 \text{ s} = 34,44 \text{ segundos}$$

$$F_{100^\circ\text{C}} (\text{ensaio2}) = 7 * 5,20 \text{ s} = 36,40 \text{ segundos}$$

$$F_{100^\circ\text{C}} (\text{ensaio3}) = 7 * 1,76 \text{ s} = 12,32 \text{ segundos}$$

$$F_{100^\circ\text{C}} (\text{ensaio4}) = 7 * 3,49 \text{ s} = 24,43 \text{ segundos}$$

$$F_{100^\circ\text{C}} (\text{ensaio5}) = 7 * 4,15 \text{ s} = 29,05 \text{ segundos}$$

$$F_{100^\circ\text{C}} (\text{ensaio6}) = 7 * 4,95 \text{ s} = 34,65 \text{ segundos}$$

$$F_{100^\circ\text{C}} (\text{ensaio7}) = 7 * 3,67 \text{ s} = 25,69 \text{ segundos}$$

$$F_{100^\circ\text{C}} (\text{ensaio8}) = 7 * 3,85 \text{ s} = 26,95 \text{ segundos}$$

$$F_{100^\circ\text{C}} (\text{ensaio9}) = 7 * 4,25 \text{ s} = 29,756 \text{ segundos}$$

$$F_{100^\circ\text{C}} (\text{ensaio10}) = 7 * 4,18 \text{ s} = 29,26 \text{ segundos}$$

$$F_{100^\circ\text{C}} (\text{ensaio11}) = 7 * 4,09 \text{ s} = 28,63 \text{ segundos}$$

Considerando este maior grau de segurança, verifica-se que, para alguns ensaios, o tratamento térmico aplicado na indústria (100°C/30 segundos), seria insuficiente para garantir este grau de segurança pois estes valores de esterilização são superiores a 30 segundos.

CONCLUSÃO

Todos os fatores analisados mostraram influência significativa no aumento da resistência térmica de *N. fischeri*. Os resultados evidenciaram o aumento da resistência térmica deste fungo com o aumento especialmente do *ratio* do meio de aquecimento, seguida da temperatura e da idade de produção dos ascósporos.

Verificou-se que a diminuição do *ratio* proporcionou uma maior sensibilidade destes ascósporos ao calor. Porém, o aumento do *ratio* mostrou efeito inverso, onde a adição destes no meio de aquecimento ocasionou um aumento de 45% na resistência térmica de *Neosartorya fischeri*, exercendo, desta maneira, um efeito protetor sobre estes ascósporos, fato este também constatado na literatura.

Na indústria, o tratamento térmico aplicado a sucos de mamão é suficiente para se atingir a probabilidade de 1 ascósporo de *N. fischeri* em cada 1000 embalagens. Constatou-se, então que, mesmo sucos com expressivos valores de *ratio* não estão causando riscos a saúde do consumidor. Entretanto, se um grau de segurança maior, for requerido, como por exemplo, a probabilidade de sobrevivência de 1 ascósporo de *Neosartorya fischeri* em um milhão de embalagens, o tratamento térmico aplicado na indústria de sucos não seria suficiente.

***INFLUÊNCIA DE DIFERENTES FATORES NA
TERMORRESISTÊNCIA DE NEOSARTORYA
FISCHERI EM SUCO DE ABACAXI***

4.2.2 - INFLUÊNCIA DE DIFERENTES FATORES NA TERMORRESISTÊNCIA DE *NEOSARTORYA FISCHERI* EM SUCO DE ABACAXI.

Os experimentos foram realizados pela combinação de níveis e fatores e estão descritos na tabela 4.2.2.1.

Tabela 4.2.2.1 – Níveis e fatores utilizados no planejamento experimental para suco de abacaxi.

Fatores	Níveis		
	- 1	0	+ 1
Temperatura de produção dos ascósporos (°C)	25	30	35
<i>Ratio</i> do meio de aquecimento (°Brix/acidez)	10	24	38
Idade de produção dos ascósporos (meses)	1	2	3

Foram realizadas as determinações de resistência térmica dos ascósporos de *N. fischeri*, de todos os ensaios. As curvas de sobreviventes obtidas não foram lineares nos diferentes tratamentos realizados, especialmente, às temperaturas mais brandas. Foi necessária a utilização do método de linearização das curvas de sobreviventes para obtenção dos parâmetros de resistência térmica equivalentes a D e Z. Em todos os ensaios, determinou-se a resistência térmica, utilizando-se como meio de aquecimento suco de abacaxi com diferentes valores de *ratio* (°Brix/acidez) e suspensões de ascósporos com diferentes temperaturas e idade de produção, conforme apresentado na tabela 4.2.2.1.

Na figura 4.2.2.1, apresenta-se um exemplo das curvas linearizadas de um dos ensaios do planejamento experimental onde, a partir das mesmas, obtêm-se os valores de $1/k$ para este ensaio.

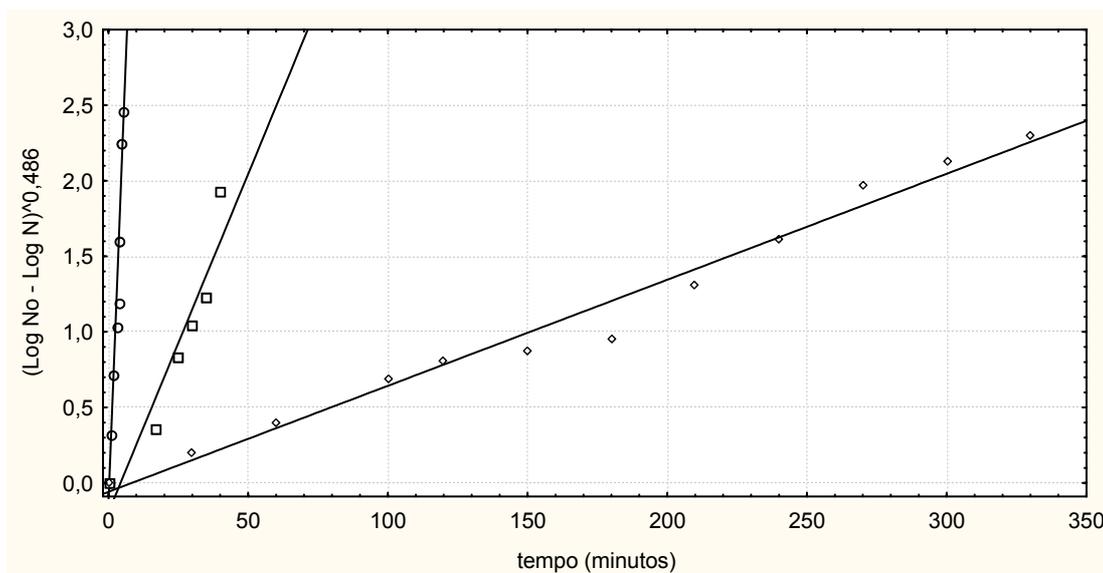


Figura 4.2.2.1 - Curvas de sobreviventes linearizadas de ascósporos de *N. fischeri* a (◇)80, (□) 85 e (○) 90°C em suco de abacaxi (ensaio 9 – temperatura e idade de produção dos ascósporos = 30°C e 2 meses, e *ratio* do meio de aquecimento = 24).

As equações de cada reta são apresentadas abaixo:

$$(\log N_0 - \log N)^{0,4859} = 0,007t - 0,0585 \quad (r^2 = 0,9801) \quad \text{para } 80^\circ\text{C} \quad \text{equação 4.2.2.1}$$

$$(\log N_0 - \log N)^{0,4859} = 0,0459t - 0,0636 \quad (r^2 = 0,9009) \quad \text{para } 85^\circ\text{C} \quad \text{equação 4.2.2.2}$$

$$(\log N_0 - \log N)^{0,4859} = 0,4704t - 0,1258 \quad (r^2 = 0,9350) \quad \text{para } 90^\circ\text{C} \quad \text{equação 4.2.2.3}$$

A tabela 4.2.2.2 contém os resultados obtidos para os demais ensaios. São apresentados os valores do expoente “a” calculados a 80°C e os valores de 1/k para os diferentes ensaios realizados, às temperaturas de 80, 85 e 90°C. A tabela apresenta ainda os valores de Z^* , para cada condição. Os valores de r^2 , para todos os ensaios, apresentaram-se na faixa de 0,90 a 0,99. O ensaio 1 foi realizado a partir de uma suspensão de ascósporos de *N. fischeri* que foi coletada de uma produção a 25°C por 1 mês, e sua resistência térmica realizada em suco de abacaxi com *ratio* 10. Assim, adotou-se a simbologia (25-1-10) para designar a temperatura e a idade de produção dos ascósporos e o *ratio* do meio de aquecimento no qual se determinou a resistência térmica.

Tabela 4.2.2.2 – Matriz do planejamento fracionário experimental 2^3 para os diferentes valores do expoente “a” e dos parâmetros de resistência 1/k (equivalente a D) e Z^* (equivalente a Z).

Ensaio	Fatores							
	R	I	T	“a”	1/k 80°C (min)	1/k 85°C (min)	1/k 90°C (min)	Z^* (°C)
1 - (25-1-10)	-1	-1	-1	0,156	56,18	12,51	1,52	6,39
2 - (25-3-10)	-1	-1	+1	0,161	62,11	14,81	1,45	6,13
3 - (25-1-38)	-1	+1	-1	0,177	71,42	17,92	1,65	5,79
4 - (25-3-38)	-1	+1	+1	0,175	87,71	20,40	2,24	5,86
5 - (35-1-10)	+1	-1	-1	0,174	88,49	14,28	1,39	5,86
6 - (35-3-10)	+1	-1	+1	0,180	88,49	14,99	1,78	5,37
7 - (35-1-38)	+1	+1	-1	0,162	113,6	21,93	1,74	6,01
8 - (35-3-38)	+1	+1	+1	0,723	142,8	19,34	1,97	5,91
9 - (30-2-24)	0	0	0	0,480	142,8	21,78	2,12	5,47
10 - (30-2-24)	0	0	0	0,579	135,1	21,93	2,18	5,58
11 - (30-2-24)	0	0	0	0,532	135,1	20,24	2,12	5,54

Legenda:

T = Temperatura (°C)

R = Ratio (°Brix/acidez)

I = Idade (meses)

Os resultados da tabela 4.2.2.2 foram submetidos à análise de variância e de estimativa dos efeitos através do *software* Statistica 6.0. Os fatores são considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

A tabela 4.2.2.3 apresenta o resultado da análise estatística. Observa-se que, para a variável resposta valores de 1/k a 80°C, todos os fatores apresentaram efeito significativo. Avaliando-se os valores de 1/k a 85°C, todos os fatores analisados apresentaram efeito significativo. Analisando-se a variável resposta valor de 1/k a 90°C, verifica-se que os fatores idade e temperatura de produção dos ascósporos e a interação do *ratio* com a idade de produção apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$). Para a variável resposta valor de Z^* , os fatores significativos foram o *ratio* e a idade de produção dos ascósporos e as interações entre *ratio* com idade de produção ((1) por (2)) e idade de produção com temperatura de produção dos ascósporos ((2) por (3)).

Tabela 4.2.2.3 - Análise de variância e estimativa dos efeitos para as variáveis respostas estudadas - valores de D e Z*.

Fatores	Variável resposta 1 / k						Variável resposta Z*	
	1/k a 80°C		1/k a 85°C		1/k a 90°C			
	Efeito	Valor- p	Efeito	Valor- p	Efeito	Valor- p	Efeito	Valor- p
(1)- <i>Ratio</i>	40,85	0,0027	3,33	0,037	0,006	0,787	-0,25	0,023
(2) – Idade	28,20	0,0058	4,39	0,021	0,385	0,003	-0,36	0,011
(3) – T°C	14,71	0,0208	4,57	0,02	0,259	0,007	0,125	0,084
(1) por (2)	7,75	0,069	-1,10	0,23	-0,074	0,022	0,067	0,226
(1) por (3)	3,63	0,234	2,18	0,08	0,003	0,890	0,216	0,070
(2) por (3)	7,99	0,658	-0,39	0,61	0,126	0,078	0,180	0,083

Analisando-se a variável resposta valor de 1/k a 80°C, verifica-se que todos os fatores analisados foram significativos e apresentaram uma estimativa de aumento da resistência térmica de *N. fischeri* de, aproximadamente, 41 %, 28% e 14%, para *ratio*, idade e temperatura, respectivamente, quando estes fatores passam de um nível inferior para o nível superior.

As figuras 4.2.2.2 e 4.2.2.3 apresentam as superfícies de resposta e as curvas de níveis construídas para a variável resposta valor de 1/k a 80°C, respectivamente, para temperatura *versus* idade de produção dos ascósporos e *ratio versus* idade de produção dos ascósporos. Através dessas observações, pode-se constatar que o fungo *N. fischeri* apresenta maior resistência térmica para meios de aquecimento com ascósporos com idade mais elevada, aquecidos em meio com *ratio* elevado. Este fato é intensificado com o aumento da temperatura de produção dos ascósporos.

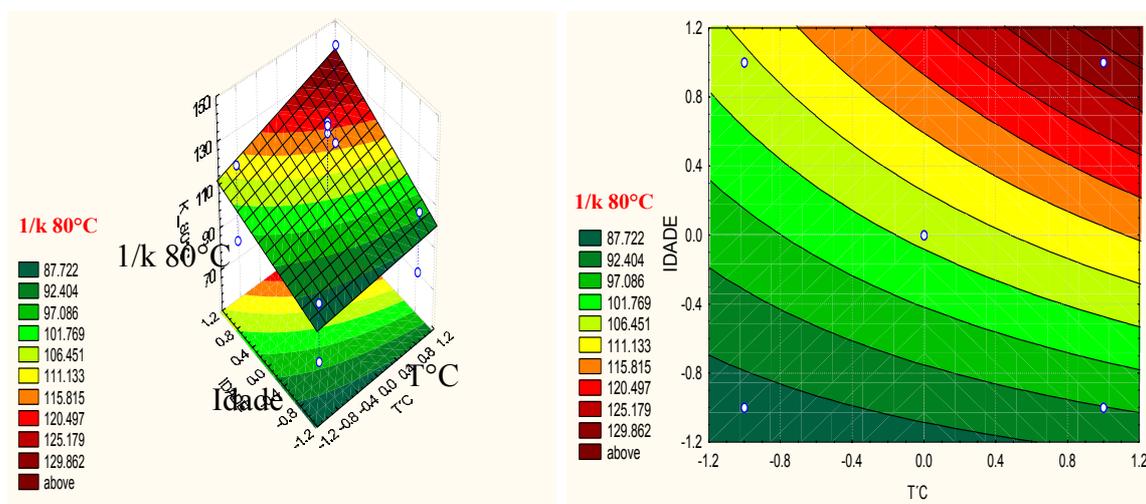


Figura 4.2.2.2 - Superfície de resposta e curva de nível para a variável resposta valor de 1/k a 80°C para os fatores idade versus temperatura de produção dos ascósporos.

A equação do modelo da superfície de resposta e da curva de nível da figura 4.2.2.2 que correlaciona os fatores temperatura de produção e idade de produção dos ascósporos é apresentada na equação 4.2.2.4:

$$1/K = 103,3 + 14,10 * Idade + 7,35 * T^{\circ}C \quad \text{equação 4.2.2.4}$$

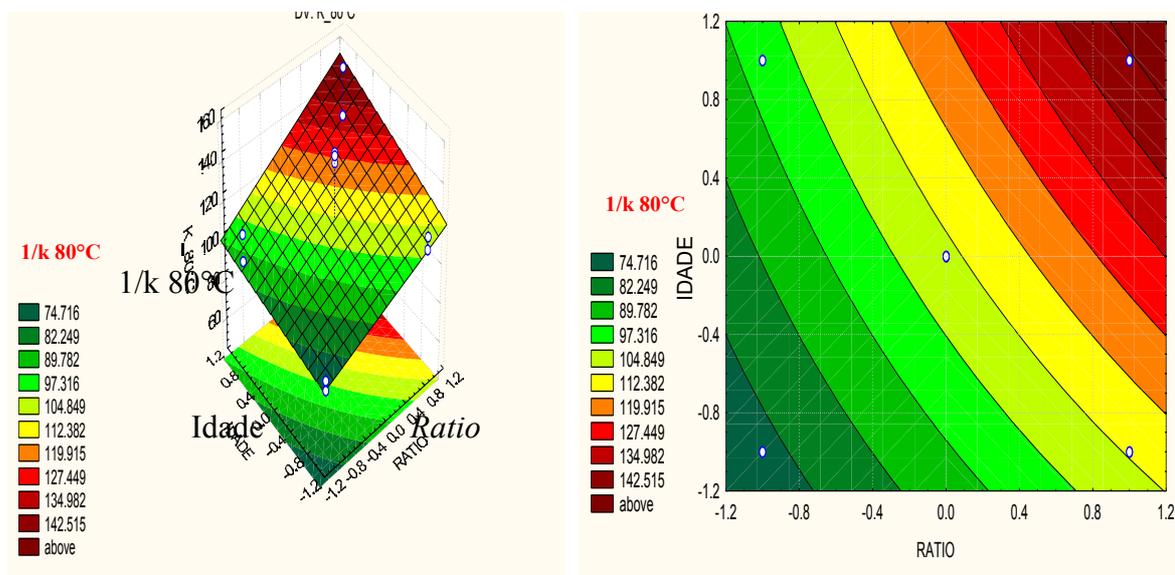


Figura 4.2.2.3 - Superfície de resposta e curva de nível para a variável resposta valor de $1/k$ a $80^{\circ}C$ para os fatores *ratio* versus idade de produção dos ascósporos.

A equação do modelo da superfície de resposta e da curva de nível da figura 4.2.2.3 que correlaciona os fatores *ratio* e idade de produção dos ascósporos é apresentada na equação 4.2.2.5:

$$1/k = 103,3 + 20,43 * RATIO + 14,10 * IDADE \quad \text{equação 4.2.2.5}$$

Na presente pesquisa, o aumento do valor de *ratio* de valores inferiores para valores superiores foi conseguido pela adição de solução de sacarose no meio de aquecimento. Verificou-se que esta mudança ocasionou um aumento da resistência térmica, em relação aos outros fatores.

SALOMÃO (2002), em pesquisa realizada com ascósporos de *N. fischeri* produzidos a $30^{\circ}C$ por 1 mês e usando como meio de aquecimento suco de maçã (pH 3,5 e *ratio* 48 - dado não publicado) e com as mesmas temperaturas de aquecimento utilizadas na presente pesquisa, obteve um valor de $1/k_{80^{\circ}C}$ de 153 minutos, que é superior aos encontrados. Entretanto, observando que o maior valor de *ratio* apresentado na presente

pesquisa é de 38 e comparando-se os ensaios realizados nas idades e temperaturas de produção dos ascósporos de 30°C por 2 meses e 35°C por 3 meses e utilizando um meio de aquecimento com *ratio* 24 e 38, respectivamente, verifica-se que os valores dos parâmetros 1/k encontrados estão próximos do valor encontrado por SALOMÃO. Estes resultados estão em concordância com as verificações de TOURNAS & TRAXLER (1994), que constataram que ascósporos de *N. fischeri* aquecidos a 85, 88, 90, 95 e 100°C por 1 hora, em suco de abacaxi concentrado (42,7°Brix), apresentaram uma maior resistência térmica em comparação com o suco de abacaxi (12,6°Brix) e água deionizada. RAJASHEKHARA (2000) obteve constatações semelhantes, em trabalho realizado com ascósporos de *N. fischeri*, em suco de manga e de uva contendo diferentes concentrações de sólidos solúveis (10°Brix, para suco diluído e 45°Brix, para o suco concentrado), apresentando maior termorresistência neste último.

A análise dos resultados da presente pesquisa mostra ainda que a idade de produção dos ascósporos aumenta, consideravelmente, a termorresistência deste fungo. TOURNAS & TRAXLER (1994), em estudos com ascósporos de *N. fischeri* de 1, 2, 3 e 6 meses de produção dos ascósporos, e isolados de suco de abacaxi, e aquecidos em água deionizada, puderam verificar que os ascósporos com maior idade apresentaram resistência térmica superior aos de menor idade. CONNER & BEUCHAT (1987) constataram que ascósporos de *N. fischeri*, com 21 dias de produção mostraram-se mais termorresistentes que ascósporos com 8 dias de produção.

Constatou-se, na presente pesquisa, que os ascósporos apresentaram menor resistência térmica, em meios de aquecimento com baixos valores de *ratio*. Nestes meios, adicionou-se determinada quantidade de solução de ácido cítrico 20 % até obter-se o *ratio* esperado. Devido ao fato de estes meios de aquecimento apresentarem-se mais ácidos, houve a sensibilização destes ascósporos e, conseqüentemente, a redução de sua resistência térmica. A ação do ácido cítrico na redução da resistência térmica de ascósporos de *N. fischeri* também foi verificada por RAJASHEKHARA et al (1998), em pesquisa realizada com suco de manga e diferentes ácidos orgânicos (ácido málico, cítrico e tartárico). Os autores verificaram que o ácido cítrico proporcionou a maior inativação térmica e conseqüente aumento da sensibilização destes ascósporos.

Avaliando a variável resposta valor de 1/k a 85°C, constatou-se que a mudança de níveis inferiores para níveis superiores dos fatores analisados proporcionou um aumento na resistência térmica de *N. fischeri*. Entretanto, este aumento é de apenas 3,3; 4,0 e 5,0 %, respectivamente, para *ratio*, idade e a temperatura de produção dos ascósporos. Nota-se

pela figura 4.2.2.4, que o *ratio* tem um efeito importante na resistência térmica, onde a sua elevação aumenta, consideravelmente, a resistência térmica. Pela análise da curva de nível da figura 4.2.2.4, pode-se verificar a influência desses fatores

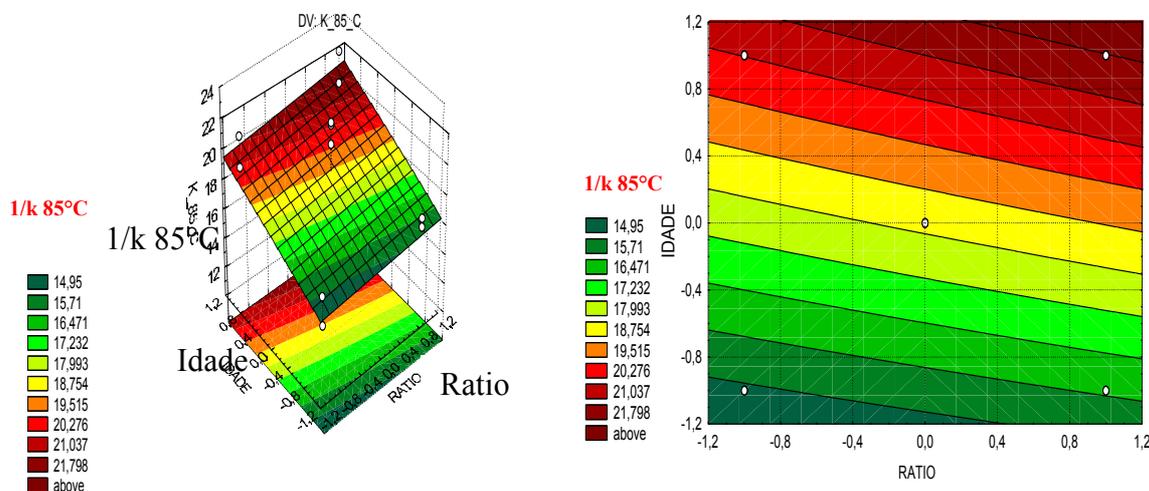


Figura 4.2.2.4 - Superfície de resposta e curva de nível obtida para os fatores temperatura de produção dos ascósporos *versus ratio* para variável resposta valor de 1/k a 85°C.

A equação do modelo da superfície de resposta e da curva de nível da figura 4.2.2.4 que correlaciona os fatores *ratio* e idade de produção dos ascósporos é apresentada na equação 4.2.2.6:

$$1/K = 18.965 + 1.667 * RATIO + 2.195 * T^{\circ}C \quad \text{equação 4.2.2.6}$$

Com relação à variável resposta valor de 1/k a 90°C, observou-se um pequeno aumento dos efeitos dos fatores estudados, onde a temperatura e a idade de produção dos ascósporos apresentaram um efeito significativo no aumento da resistência térmica. A temperatura de produção, ao passar de um nível inferior (25°C) para um nível superior (35°C), apresentou uma estimativa de aumento da resistência térmica de *N. fischeri* de 0,26 %. A idade também apresentou um pequeno aumento na resistência térmica (0,38 %). Estas observações são verificadas na figura 4.2.2.5, que apresenta a superfície de resposta e a curva de nível construída para a variável resposta valor de 1/k a 90°C, respectivamente, para idade de produção dos ascósporos *versus ratio*.

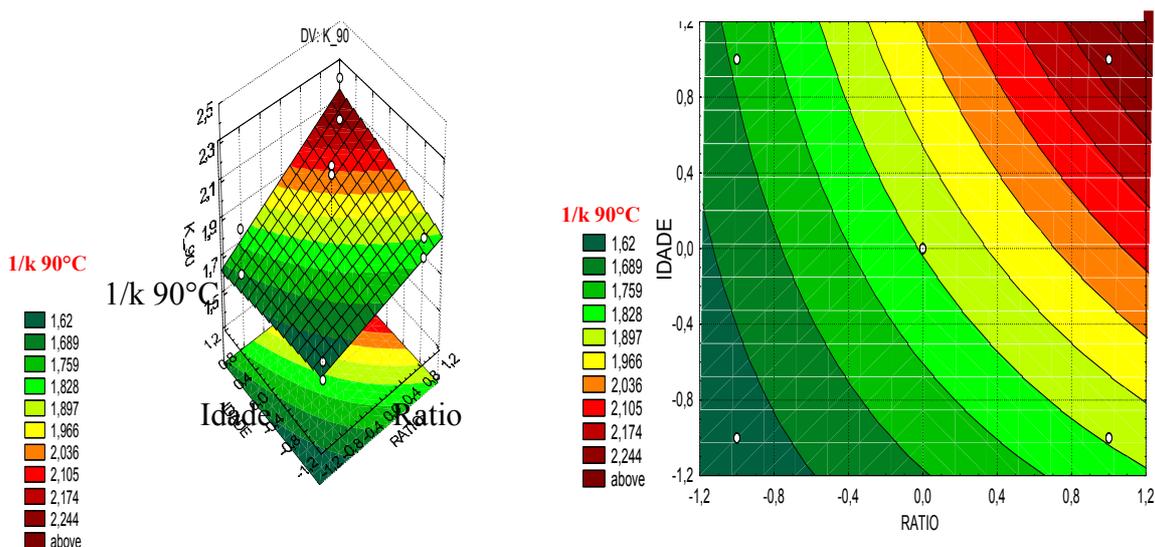


Figura 4.2.2.5 - Superfície de resposta e curva de nível obtida para os fatores *ratio* versus idade de produção dos ascósporos para variável resposta valor de *k* a 90°C.

A equação do modelo da superfície de resposta e da curva de nível da figura 4.2.2.5 que correlaciona os fatores *ratio* e idade de produção dos ascósporos é apresentada na equação 4.2.2.7:

$$1/K = 1.8379 + 0.190 * RATIO + 0.127 * IDADE \quad \text{equação 4.2.2.7}$$

Neste caso, os tempos requeridos para uma redução decimal logarítmica (*1/k*) encontram-se muito próximos e, sendo a temperatura aplicada para inativação destes ascósporos menos branda, não se verificou uma diferença expressiva na mudança de níveis. Desta maneira, pode-se dizer que sob altas temperaturas de aquecimento, os fatores analisados tiveram pouca influência na inativação dos ascósporos. SALOMÃO (2002), em pesquisa realizada com ascósporos de *N. fischeri* e suco de maçã, com diferentes valores de pH, verificou que, para a temperatura de aquecimento de 90°C, os valores do parâmetro *1/k*, para os diferentes valores de pH, não variavam muito.

A figura 4.2.2.6 apresenta a curva de nível para a variável resposta valor de *Z**, onde os fatores o *ratio* e a idade de produção dos ascósporos apresentaram efeito significativo na resistência térmica de *N. fischeri*. Observa-se que, à medida que os níveis dos dois fatores aumentam, o valor de *Z** se reduz em, aproximadamente, 0,25% e 0,37 %, respectivamente.

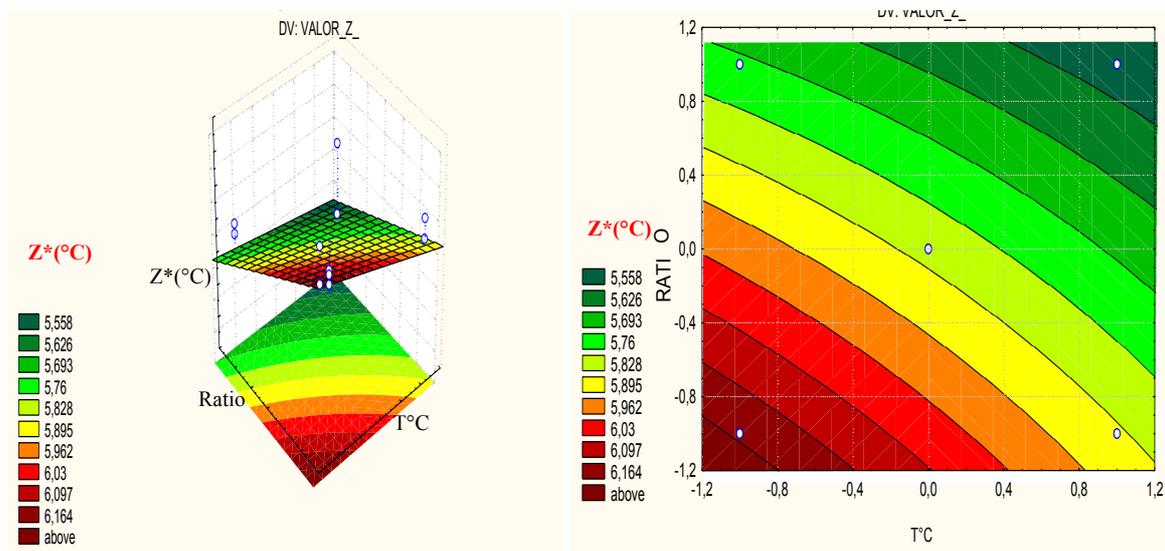


Figura 4.2.2.6 - Superfície de resposta e curva de nível obtida para os fatores temperatura de produção dos ascósporos versus *ratio* para variável resposta valor de Z^* .

A equação do modelo da superfície de resposta e da curva de nível da figura 4.2.2.6 que correlaciona os fatores temperatura de produção dos ascósporos e *ratio* é apresentada na equação 4.2.2.8:

$$Z^* = 5,813 - ,1255 * T^{\circ}C - ,1830 * RATIO \quad \text{equação 4.2.2.8}$$

SALOMÃO (2002), em pesquisa realizada com ascósporos de *N.fischeri*, produzidos à 30°C por 1 mês, e utilizando como meio de aquecimento suco de maçã (14°Brix, pH 3,5) e *ratio* de 48 (dado não publicado), encontrou um valor de Z^* de 4,59°C. ARAGÃO (1989), em pesquisa realizada com *N.fischeri* e utilizando suco de morango como meio de aquecimento (15°Brix, pH 3,0), encontrou um valor de Z^* de 6,17°C.

Com os valores de Z^* de todos os ensaios, foi possível, ainda, o cálculo dos valores de esterilização (F) para o suco de abacaxi. Assim como realizado para o suco de mamão, o cálculo foi feito com o objetivo de verificar se o tratamento térmico comercial aplicado no suco de abacaxi é suficiente para destruir os ascósporos do fungo *N. fischeri*. O cálculo do valor de esterilização do produto (F) realizou-se a partir dos valores de 1/k (equivalentes a “D”). O tratamento térmico geralmente aplicado em suco de abacaxi é de 96°C/30 segundos. Como os valores de 1/k obtidos nesta pesquisa, somente foram calculados para

80, 85 e 90°C, fez-se necessário a obtenção do valor de 1/k para 96°C, utilizando-se a equação da curva fantasma (curva TDT-equivalente).

Pelos gráficos das curvas fantasmas (tirados das demais curvas em anexo), foram obtidas as seguintes equações para todos os ensaios:

1 - (25-1-10)	- (log k) = 14,314 – 0,1565 T
2 - (25-3-10)	- (log k) = 14,909 – 0,1631 T
3 - (25-1-38)	- (log k) = 15,537 – 0,1704 T
4 - (25-3-38)	- (log k) = 15,734 – 0,1705 T
5 - (35-1-10)	- (log k) = 15,821 – 0,1727 T
6 - (35-3-10)	- (log k) = 15,999 – 0,1742 T
7 - (35-1-38)	- (log k) = 15,536 – 0,1692 T
8 - (35-3-38)	- (log k) = 17,089 – 0,186 T
9 - (30-2-24)	- (log k) = 16,806 – 0,1827 T
10 - (30-2-24)	- (log k) = 16,503 – 0,1792 T
11 - (30-2-24)	- (log k) = 16,582 – 0,1803 T

Para o cálculo do valor de esterilização (F) a 96°C, foram feitas as mesmas considerações:

1) População inicial de *N. fischeri* (No) = 2 ascósporos/100 ml, conforme encontrou BAGLIONI (1998), investigando a ocorrência deste fungo em pasta de tomate. Considerando que a embalagem utilizada para o suco de abacaxi foi de 300 ml, temos: No = 6,0 ascósporos/embalagem.

2) Considerando a probabilidade de sobrevivência de 1 ascósporo de *N. fischeri* em 100000 (10⁵) embalagens, temos que o número de reduções decimais (γ) necessárias é 5, ou seja, ($\gamma = 5$).

Seja F definido como: **F = $\gamma \cdot D$**

F_{96°C} = 5 · D_{96°C}

F_{96°C} (ensaio1) = 5* 11,69 s = 58,45 segundos

F_{96°C} (ensaio2) = 5* 10,70 s = 53,50 segundos

F_{96°C} (ensaio3) = 5* 9,05 s = 45,25 segundos

F_{96°C} (ensaio4) = 5* 11,32 s = 56,60 segundos

F_{96°C} (ensaio5) = 5* 10,47 s = 52,35 segundos

F_{96°C} (ensaio6) = 5* 13,93 s = 69,65 segundos

F_{96°C} (ensaio7) = 5* 11,77 s = 58,85 segundos

F_{96°C} (ensaio8) = 5* 10,26 s = 51,30 segundos

F_{96°C} (ensaio9) = 5* 11,09 s = 55,45 segundos

F_{96°C} (ensaio10) = 5* 11,96 s = 59,80 segundos

F_{96°C} (ensaio11) = 5* 11,25 s = 56,25 segundos

Diante destes resultados, verifica-se que o tempo de tratamento térmico aplicado pelas indústrias em suco de abacaxi (96°C/30 segundos) não está sendo suficiente para se obter a redução decimal esperada.

CONCLUSÃO

Nas temperaturas mais elevadas, os efeitos provocados pelas variações dos fatores não foram muito expressivos se comparados com os obtidos a temperatura de 80°C. Desta maneira, os resultados mostram que altas temperaturas de tratamento térmico mascaram os reais efeitos provocados pela variação dos fatores.

Ascósporos de *N. fischeri* quando aquecidos em suco de abacaxi com *ratio* do meio de aquecimento de 38 e produzidos a 35°C, por 3 meses, foram os que apresentaram a maior resistência térmica ($1/k_{80^{\circ}\text{C}}= 142,86$ minutos, $1/k_{85^{\circ}\text{C}}= 19,40$ minutos e $1/k_{90^{\circ}\text{C}}= 1,97$ minutos). O aumento da temperatura e da idade de produção dos ascósporos também proporcionaram o aumento da termorresistência deste fungo, em suco de abacaxi.

Constatou-se desta maneira, que todos os fatores analisados exerceram influência no aumento da resistência térmica do fungo *N. fischeri*. Verificou-se também que os maiores valores de resistência térmica foram conseguidos nos meios de aquecimento que apresentavam os maiores *ratios*. Este fato pode ser explicado devido ao efeito protetor que a presença de sólidos solúveis proporciona aos ascósporos de *N. fischeri*. O efeito contrário pode ser observado nos menores valores de *ratio*, onde houve a sensibilização dos ascósporos e estes se tornam menos termorresistentes ao calor.

Analisando os resultados do cálculo do valor de esterilização ($F_{96^{\circ}\text{C}}$) para todos os ensaios, para uma população inicialmente existente de 3 ascósporos/embalagem, pode-se concluir que os tempos de esterilização encontrados na presente pesquisa são superiores aos empregados normalmente nas indústrias de sucos (96°C/30 segundos).

Industrialmente, o tratamento térmico, em geral, aplicado a sucos de abacaxi é de 96°C/30segundos e considerando-se a população inicial de 3 ascósporos/embalagem, pode-se concluir que os valores de esterilização encontrados na presente pesquisa são insuficientes para se atingir a probabilidade de 1 ascósporo de *N. fischeri* em cada 1000 embalagens. Verifica-se, assim, que mesmo sucos com baixos valores de *ratio* estão causando riscos à saúde do consumidor.

Concluiu-se, portanto, que medidas de processo adequadas como, lavagem e sanitização das matérias-primas e linhas de processamento assépticas, devem ser tomadas e inspecionadas, regularmente, em linhas de processamento de suco de abacaxi, pois devido

ao tratamento térmico não estar sendo suficiente para reduzir a incidência deste fungo no produto final, deve-se minimizar a população presente na matéria-prima. Cabe ressaltar que uma vez presentes no suco, não será possível destruir os ascósporos, por tratamento térmico, sem prejuízo da qualidade do produto final.

***COMPARAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE DIFERENTES
FATORES NA TERMORRESISTÊNCIA DE
NEOSARTORYA FISCHERI EM SUCO DE MAMÃO E
DE ABACAXI***

4.2.3 - COMPARAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE DIFERENTES FATORES NA TERMORRESISTÊNCIA DE *NEOSARTORYA FISCHERI* EM SUCO DE MAMÃO E DE ABACAXI.

Através das tabelas 4.2.1.2 para suco de mamão e 4.2.2.2 para suco de abacaxi, pode-se fazer o estudo de comparação da influência dos diferentes fatores na termorresistência de *Neosartorya fischeri*, nestes sucos.

Os resultados dessas tabelas foram submetidos à análise de variância e de estimativa dos efeitos através do *software Statistica 6.0*. Os fatores foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

A tabela 4.2.3.1 apresenta os resultados da análise estatística para as variáveis respostas valores de $1/k$ a 80°C e valores de Z^* , para ambos os sucos. As variáveis respostas valores de $1/k$ a 85 e 90°C tiveram a influência da alta temperatura e seus efeitos não se mostraram expressivos. Para a variável resposta valor de $1/k$ a 80°C, todos os fatores analisados mostraram um efeito significativo no aumento da resistência térmica, ao passarem de níveis inferiores para níveis superiores.

Tabela 4.2.3.1 - Análise de variância e estimativa dos efeitos para as variáveis respostas estudadas - valores de D e Z^* .

Fatores	Variável resposta							
	1/k a 80°C – suco de mamão		1/k a 80°C - suco de abacaxi		Z^* - suco de mamão		Z^* - suco de abacaxi	
	Efeito	Valor- p	Efeito	Valor- p	Efeito	Valor- p	Efeito	Valor- p
(1) – T°C	23,70	0,025	14,71	0,0208	-0,21	0,04	0,125	0,084
(2) – <i>Ratio</i>	45,94	0,006	40,85	0,0027	-0,51	0,01	-0,25	0,023
(3) - Idade	13,16	0,007	28,20	0,0058	0,07	0,29	-0,36	0,011

Comparando-se os resultados obtidos para cada suco, verifica-se que para o fator *ratio* os maiores efeitos do aumento da resistência térmica deste fungo foram encontrados em suco de mamão, e para os demais fatores o maior efeito foi conseguido em suco de abacaxi.

Analisando-se isoladamente o fator *ratio*, observa-se que o efeito proporcionado pela passagem de um nível inferior para um nível superior para o suco de mamão foi de aproximadamente 45 %, enquanto que, para o suco de abacaxi, este aumento foi de 41 %, o mesmo podendo ser observado para a temperatura de produção dos ascósporos que, para o

suco de mamão, foi de 23 % o efeito de aumento da resistência térmica, enquanto que, para o suco de abacaxi, foi de 14 %.

As figuras 4.2.1.6, para o suco de mamão, e 4.2.2.3, para o suco de abacaxi, apresentam as superfícies de respostas e as curvas de níveis e foram construídas para a variável resposta valor de $1/k$ a 80°C , com os fatores *ratio versus* temperatura de produção dos ascósporos, para o suco de mamão, e *ratio versus* idade de produção dos ascósporos, para o suco de abacaxi. Constatou-se que o fungo *Neosartorya fischeri* apresentou maior resistência térmica no meio de aquecimento que apresentou o maior valor de *ratio*, ou seja, no suco de mamão.

O aumento da resistência térmica apresentada através da estimativa dos efeitos, dos níveis inferiores para os níveis superiores, pode ser explicado pelo fato de que, nos ensaios realizados nos níveis inferiores, fez-se necessária adição de solução de ácido cítrico no meio de aquecimento para que se pudesse alcançar o *ratio* esperado. Esta adição proporcionou a sensibilização dos ascósporos e estes se tornaram menos resistentes ao tratamento térmico. Já nos ensaios realizados nos valores de *ratio* superiores, houve um efeito protetor sobre estes ascósporos, proporcionando o aumento da resistência térmica destes. RAJASHEKLARA et al (1998), em estudo de resistência térmica com ascósporos de *Neosartorya fischeri* realizado com diferentes ácidos (ácido láctico, málico, cítrico e tartárico) onde os mesmos foram adicionados individualmente em suco de manga e onde o tratamento térmico foi realizado a 85°C , verificou que a maior destruição térmica foi conseguida com o meio de aquecimento que continha ácido cítrico, e a menor resistência térmica foi conseguida com o meio de aquecimento utilizando ácido tartárico.

CONNER & BEUCHAT (1987), em pesquisa realizada para verificação de uma maior resistência térmica de ascósporos de *N. fischeri*, em diferentes meios de aquecimentos, constataram que a taxa de inativação térmica dos ascósporos mostrou-se menor em suco de maçã ($12,3^{\circ}\text{Brix}$, pH 3,8) do que em suco de uva Concord ($16,6^{\circ}\text{Brix}$, pH 3,4) e tampão fosfato (0,1 M, pH 7,0). TOURNAS & TRAXLER (1994) realizaram pesquisas com ascósporos de *N. fischeri* aquecidos em concentrado de abacaxi ($42,7^{\circ}\text{Brix}$) e em suco de abacaxi ($12,6^{\circ}\text{Brix}$), para comparação das resistências térmicas obtidas nestes meios. Os resultados indicaram um efeito protetor, em função do aumento da concentração de sólidos solúveis no meio de aquecimento. BEUCHAT & TOLEDO (1977), em pesquisa também realizada com suco de uva suplementado de sacarose e ascósporos de *B. nivea*, verificaram que a adição de sólidos solúveis no meio de aquecimento proporcionou o efeito protetor. De acordo com estes mesmos autores, a razão do efeito protetor não é bem

explicada, mas o diferencial de pressão osmótica entre o meio de aquecimento e os ascósporos poderia favorecer o aumento da resistência térmica.

Os fatores temperatura e idade de produção dos ascósporos também apresentaram efeito significativo no aumento da resistência térmica deste fungo. Quando estes fatores passaram de níveis inferiores de temperatura e idade para níveis superiores dos mesmos, houve um aumento de 23 % e 13 %, respectivamente, para suco de mamão e 14 % e 28 %, respectivamente, para suco de abacaxi, na resistência térmica deste fungo, analisada pelo fator D (1/K).

A influência da temperatura de produção dos ascósporos na resistência térmica de fungos termorresistentes foi observada por outros autores. ENGEL & TEUBER (1991) estudaram a resistência térmica de *B.nivea* produzidos em meio ágar extrato de malte por 21 dias em diferentes temperaturas de produção dos ascósporos (20, 25, 30 e 37°C). Ao final, verificaram que ascósporos produzidos a 30°C apresentaram maior resistência térmica que aqueles produzidos nas mesmas condições, às temperaturas de 20, 25 e 37°C, contrastando com outros relatos da literatura onde as maiores temperaturas geram os ascósporos com maior resistência térmica. TOURNAS & TRAXLER (1994) examinaram a influência da idade dos ascósporos de *N. fischeri* sobre a sua resistência térmica. Os ascósporos foram produzidos a 30°C por 1, 2, 3 e 6 meses. Em cada período de produção dos ascósporos, fez-se o tratamento térmico a 88°C/1 hora em água deionizada. Verificou-se, ao final, que o aumento do tempo de produção dos ascósporos proporcionou o aumento da resistência térmica deste fungo.

As figuras 4.2.1.11, para suco de mamão, e 4.2.2.6, para suco de abacaxi, apresentam, respectivamente as superfícies de resposta e as curvas de níveis para a variável resposta valor de Z^* , onde os fatores temperatura de produção dos ascósporos e *ratio* apresentaram efeito significativo sobre este parâmetro de resistência de *N. fischeri*, para ambos os sucos. Pela análise estatística, verifica-se que somente os fatores temperatura e idade de produção dos ascósporos provocaram uma pequena redução do valor de Z^* para os meios de aquecimento analisados.

CONCLUSÃO

Através dos resultados da comparação dos dois sucos, pode-se concluir que as condições iniciais dos meios de aquecimento exercem influência significativa sobre a resistência térmica do fungo *Neosartorya fischeri*. Pela análise estatística, pode-se verificar

a influência do *ratio* que para o suco de mamão apresentava-se superior ao *ratio* do suco de abacaxi, e com isso, a resistência térmica mostrou-se superior para o primeiro suco.

A adição de sólidos solúveis em ambos os sucos analisados proporcionou um efeito protetor sobre estes ascósporos, sendo este efeito mais acentuado para o suco de mamão onde, além do fato de a concentração de sólidos solúveis ser mais elevada, este meio também apresentava uma menor acidez, comparado com suco de abacaxi.

Verificou-se, perante estas constatações, que meios de aquecimento com elevados valores de acidez proporcionaram uma maior inativação de ascósporos de *Neosartorya fischeri* devido à sensibilização que os ácidos exercem sobre os mesmos. Todos os meios de aquecimento com suco de abacaxi da presente pesquisa, apresentaram valores de acidez bem superiores aos meios de aquecimento com suco de mamão e, conseqüentemente, estes valores mais elevados de resistência térmica apresentados em sucos de mamão poderiam ser explicados pela baixa acidez que estes apresentam, em comparação com suco de abacaxi.

***CAPÍTULO V –
CONCLUSÕES E SUGESTÕES***

CAPÍTULO V – CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Os sucos tropicais vêm, cada vez mais, ocupando lugar de destaque na industrialização; no entanto, são, ainda, escassos os relatos científicos na literatura, referentes ao seu estudo, considerando o evidente interesse da indústria na melhoria da qualidade de seus produtos, o que, por si, ratifica a importância da presente pesquisa.

Dos fatores analisados (*ratio* do meio de aquecimento e temperatura e idade de produção dos ascósporos), o que causou maior efeito no aumento da resistência térmica deste fungo para ambos os sucos foi o *ratio* do meio de aquecimento (45 % para suco de mamão e 36 % para suco de abacaxi), seguido de idade e da temperatura de produção dos ascósporos.

O aumento proporcionado pelo *ratio* do meio de aquecimento deve-se à adição de solução de sacarose nestes sucos nos níveis mais elevados do planejamento experimental que exerceu efeito protetor sobre os ascósporos e, conseqüentemente, ocasionou o aumento da resistência térmica. Nestes ensaios obtiveram-se os maiores valores de resistência térmica para os demais fatores analisados. A idade de produção também exerceu influência no aumento da resistência térmica, pois, ascósporos com maior idade de produção (3 meses) mostraram-se mais termorresistentes que ascósporos de menor idade (1 mês). Nestes ensaios, a temperatura utilizada foi de 35°C e verificou-se um expressivo aumento da resistência térmica quando os ascósporos passaram da temperatura de produção dos ascósporos de 25°C para 35°C, onde o aumento da resistência térmica foi de 22 % para suco de mamão e de 19 % para suco de abacaxi, avaliada pelo aumento do valor de D (1/K).

Na análise realizada para os níveis inferiores do planejamento, verificaram-se os menores valores de resistência térmica para os menores valores de *ratio*, idade e temperatura de produção dos ascósporos. Os baixos valores de *ratio* foram conseguidos pela adição de ácido cítrico nestes meios e verificou-se que o mesmo proporcionou a sensibilização dos ascósporos e desta maneira, exerceu influência na maior taxa de sua inativação.

Estes resultados para ambos os sucos evidenciam um aumento da resistência térmica do fungo *Neosartorya fischeri* com o aumento da concentração de sólidos solúveis no meio e a diminuição desta resistência térmica com a adição de ácido cítrico. O aumento da idade de produção dos ascósporos e da temperatura de produção também proporcionou o aumento da resistência térmica.

O tratamento térmico, geralmente aplicado na indústria de sucos de mamão e de abacaxi é de 100°C/30 segundos e 96°C/30 segundos, respectivamente, e, considerando-se que a população inicialmente existente é de 3 ascósporos/embalagem conforme descrito por Baglioni (1998), pode-se concluir que os valores de esterilização da presente pesquisa para suco de mamão são suficientes para se atingir a probabilidade de sobrevivência de 1 ascósporo de *Neosartorya fischeri* em cada 1000 embalagens.

Para suco de abacaxi, os valores de esterilização encontrados no presente estudo são superiores há 30 segundos evidenciando-se insuficientes para se atingir a probabilidade de 1 ascósporo de *Neosartorya fischeri* em cada 1000 embalagens. Considerando o exposto acima e o valor utilizado na indústria de sucos, ou seja, 96°C / 30 segundos constata-se, industrialmente, a necessidade de mudanças efetivas no processamento industrial do suco de abacaxi.

Os resultados obtidos permitiram fazer algumas sugestões:

É fundamental que as indústrias de processamento de sucos tenham implantado sistemas de qualidade que assegurem matérias-primas de boa qualidade e cuja higienização minimize, ao máximo, a população destes ascósporos na linha de processamento, permitindo a redução da severidade do tratamento térmico aplicado, o que acarretará produtos de melhor qualidade.

***CAPÍTULO VI –
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

CAPÍTULO VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ARAGÃO, Gláucia Maria Falcão. **Identificação e determinação da resistência térmica de fungos filamentosos termorresistentes isolados da polpa de morango**. Campinas: UNICAMP, 1989. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, 1989.

BAGLIONI, Flávio. **Estudo da ocorrência de fungos filamentosos termorresistentes em polpa de tomate envasada assepticamente**. Campinas: UNICAMP, 1998. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, 1998.

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

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

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

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

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

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

CARVALHO, V. D.; CUNHA, G. A. P. da. Produtos e usos. In: CABRAL, J. R. et al. **A cultura do abacaxizeiro**. Brasília, BA: Embrapa – SPI, 1999.

CASELLA, A. L. M.; MATASCI, F.; SCHIMIDT-LORENZ, W. Influence of age, growth medium and temperature, on heat resistance of *Byssochlamys nivea* ascospores. **Lebensmittel Wissenschaft & Technologie**, v. 23, n. 5, p. 404-411, 1990.

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

DELGADO, D. A. **Ação do peróxido de hidrogênio sobre bolores isolados de laminado para embalagens assépticas**. Campinas: UNICAMP, 2001. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, 2001.

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

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

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

FRISVAD, J.C. & SAMSON, R.A. Filamentous fungi in foods and feeds: Ecology, Spoilage and Micotoxin production production. In: ARORA, D.K.; MUKERJI, K.G. & MARTH, E.H. (Eds) **Handbook of Applied Mycology-Foods and Feeds**. New York: Marcel Dekker Inc., v.3, cap.2, p. 31-68, 1991.

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.

GRESSONI, I. **APPCC – Base para sucos processados asépticamente**. Campinas: UNICAMP, 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, 2002.

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: UNICAMP, 1995. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, 1995.

HOCKING, A.D.; PITT, J.I.; SAMSON, R. A. & KING, A. Food spoilage fungi. II. Heat Resistant Fungi. **CSIRO Division of Food Research**, North Ryde, N.S.W., 2113, v.44, n.4, p.73-82, 1984.

HULL, R. Studies of *Byssochlamys fulva* and control measures in processed fruits. **Ann. Applied Biology**, v.26, p. 800-822, 1939. Apud 13.

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

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

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

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

_____; 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.830-836, 1990.

KNORR, D. Effects of high-hydrostatic-pressure processes on food safety and quality. **Food Technology** v.47, n.6, p. 156-161, 1993.

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.

JESENKA, Z.; PIECKOVA, E. & BERNAT, D. Heat resistance of fungi from soil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 19, p. 187-192, 1993.

_____; & SEPTIKOVA, J. Thermoresistant propagules of *Neosartorya fischeri*: Some ecologic considerations. **Journal of Food Protection**, v. 54, n.8, p.582-584, 1991.

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

LOVETT, J.; PEELER, J.T. Effects of pH on the thermal destruction kinetics of patulin in aqueous solutions. **Journal of Food Science**, v.38, p. 1094, 1973.

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

MARCOLINO, V.A., **Quantificação de leveduras, bolores comuns e termorresistentes em linha de processamento asséptico de bebida de uva**. Campinas: UNICAMP, 2003. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, 2003.

MATOS, A. P.; SOUZA, J. da S. Situação atual e perspectiva da abacaxicultura no Estado da Bahia. **Informe agropecuário**, v.19, n.195, p.74-76. 1998.

MAUNDER, D. T. Spoilage problems caused by molds of the *Byssochlamys*, *Paecilomyces*. New York State Agric. Exp. Stn., Geneva. *Byssochlamys* Semin. **Abstr. Res. Circ.** n.20, p. 12-16, 1969.

MEDINA, J. C. et al. **Abacaxi: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos**. 2º ed., Campinas: ITAL, 1987. 285p.

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

NIELSEN, P.V.; BEUCHAT, L. R. & FRISVAD, J.C. Growth and fumitremorgin production by *Neosartorya fischeri* as affected by food preservatives and organic acids. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, p.197-207, 1989.

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

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

OGAWA, H.; FUKUHISA, K.; KUBO, Y.; FUKUMOTO, H. Pressure Inactivation of Yeast, Molds and Pectinesterase in Satsuma Mandarin Juice: Effects of Juice Concentration, pH and Organic Acid and Comparison with Heat Sanitation, 1989.

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

PORRETA, S. Il controllo della stabilità microbiologica dei derivati del pomodoro. In: **II controllo della stabilità microbiologica dei derivati del pomodoro**. Parma: Satazione Sperimentale per Industria delle conserve alimentari, 1992, p. 204-212.

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

PREGNOLATTO, W. & PREGNOLATTO, N.P. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. – Métodos Químicos e Físicos para a análise de Alimentos**. Instituto Adolfo Lutz, 3.ed. São Paulo (Brasil), 1985.

PRIETA, J.; MORENO, M. A.; BAYO, J.; DIAS, S.; SUAREZ, G.; DOMINGUEZ, L.; CANELA, R. & SANCHIS, V. Survey of patulin in apple juice and children's apple food by the diphasic membrane procedure. **J. Agric. Food Chem**, v.42, n.8, p. 1701-1703, 1994. Apud

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

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

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

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

SALOMÃO, B.C.M. **Isolamento, identificação e estudo da resistência térmica de fungos filamentosos termorresistentes em produtos de frutas**. Florianópolis, 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

SAMSON, R.A.; VAN REENEN-HOEKSTRA, E.S. **Introduction to food-bom fungi**. Netherlands: Centralbureau voor Schimmelcultures, 1988.

SAVITCI, L.A.; GASPARINO FILHO, J.; MORETTI, V.A. Perfil industrial e de mercado para suco de abacaxi. **Coletânea do ITAL**, Campinas, v. 25, n.2, p. 153-168, 1995.

SCOTT, P.M.; SOMERS, E. Stability of patulin and penicilic acid in fruit juice and flour. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.16, p. 483, 1968.

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

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

SPLITSTOESSER, 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.; v. 3, cap.7, p.201-219, 1991.

SPLITSTOESSER, D. F.; CHUREY, J. J. Reduction of heat resistance of *Neosartorya fischeri* ascospores by sulfur dioxide. **Journal of Food Science**. v. 56, p. 876-877, 1991.

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

_____.; 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, v.3, p.79-85, 1974.

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

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

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

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

STUMBO, C.R. Thermobacteriology in Food Processing, 2° ed. **Academic Press**, New York, 1973.

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

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

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

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

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

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

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

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO I – ATIVAÇÕES

Estão apresentadas a seguir as tabelas e curvas de recuperação de ascósporos de *N. fischeri* como citado no capítulo resultados e discussões.

A Tabela A1 apresenta o número de ascósporos recuperados após tratamento térmico ótimo de ativação à temperatura de 85°C em suco de abacaxi. A Tabela A2 apresenta o número de ascósporos recuperados após tratamento térmico ótimo de ativação à temperatura de 85°C em suco de mamão. A Tabela A3 apresenta o número de ascósporos recuperados após tratamento térmico ótimo de ativação à temperatura de 85°C em água destilada e em suco de maçã. As figuras A1, A2, A3, A4, A5 e A6 ilustram as curvas de ativação térmica em diferentes condições de temperatura e idade de produção dos ascósporos e *ratio* do meio de aquecimento para os sucos de abacaxi e mamão respectivamente.

Tabela A1 - Recuperação (MEA profundidade) dos ascósporos de *N. fischeri* coletados a diferentes temperaturas e idades de produção dos ascósporos, em suco de abacaxi apresentando diferentes *ratios* do meio de aquecimento à temperatura de 85°C.

Tempo	1 mês		3 meses	
	<i>Ratio</i> = 10	<i>Ratio</i> = 38	<i>Ratio</i> = 10	<i>Ratio</i> = 38
	Ascósporos/ml	Ascósporos/ml	Ascósporos/ml	Ascósporos/ml
0	1,56E+05	1,23E+05	1,28E+05	1,18E+05
5	2,73E+06	3,17E+05	1,15E+07	1,92E+06
10	2,37E+06	1,95E+06	5,58E+06	1,03E+07
15	3,06E+05	4,15E+06	1,64E+06	3,79E+06

Tempo	1 mês		3 meses	
	<i>Ratio</i> = 10	<i>Ratio</i> = 38	<i>Ratio</i> = 10	<i>Ratio</i> = 38
	Ascósporos/ml	Ascósporos/ml	Ascósporos/ml	Ascósporos/ml
0	3,05E+05	2,02E+05	1,85E+05	2,21E+05
5	1,70E+06	2,31E+06	2,82E+06	2,33E+06
10	1,57E+07	1,42E+07	2,03E+07	1,13E+07
15	8,45E+06	8,53E+06	1,28E+07	2,37E+07
20	4,21E+06		3,74E+06	1,04E+07

Tempo	Ponto Central - <i>Ratio</i> 24	
	Ascósporos/ml	
0	2,30E+05	
5	3,02E+06	
10	1,15E+07	
15	5,78E+06	
20	2,43E+06	

Tabela A2 - Recuperação (MEA profundidade) dos ascósporos de *N. fischeri* coletados a diferentes temperaturas e idades de produção dos ascósporos, em suco de mamão apresentando diferentes *ratios* do meio de aquecimento à temperatura de 85°C.

Tempo	1 mês		3 meses	
	<i>Ratio = 26</i>	<i>Ratio = 66</i>	<i>Ratio = 26</i>	<i>Ratio = 66</i>
	Ascósporos/ml	Ascósporos/ml	Ascósporos/ml	Ascósporos/ml
0	2,31E+06	1,48E+06	1,15E+05	2,08E+05
5	2,30E+07	3,10E+06	1,48E+06	7,58E+05
10	1,50E+07	1,68E+07	8,10E+06	5,18E+06
15	1,19E+06	1,87E+06	4,18E+06	1,16E+07
20			6,50E+05	2,35E+06

Tempo	1 mês		3 meses	
	<i>Ratio = 26</i>	<i>Ratio = 66</i>	<i>Ratio = 26</i>	<i>Ratio = 66</i>
	Ascósporos/ml	Ascósporos/ml	Ascósporos/ml	Ascósporos/ml
0	1,28E+06	1,03E+06	4,08E+05	3,55E+05
5	3,48E+06	1,18E+06	2,10E+06	4,05E+05
10	1,16E+07	4,08E+06	1,01E+07	1,02E+06
15	6,13E+06	1,02E+07	5,45E+06	5,45E+06
20	3,30E+06	3,00E+06	1,93E+06	1,06E+07
25				1,93E+06

Tempo	Ponto Central - <i>Ratio 24</i>
	Ascósporos/ml
0	3,23E+05
5	1,26E+06
10	1,40E+07
15	2,13E+07
20	1,39E+07

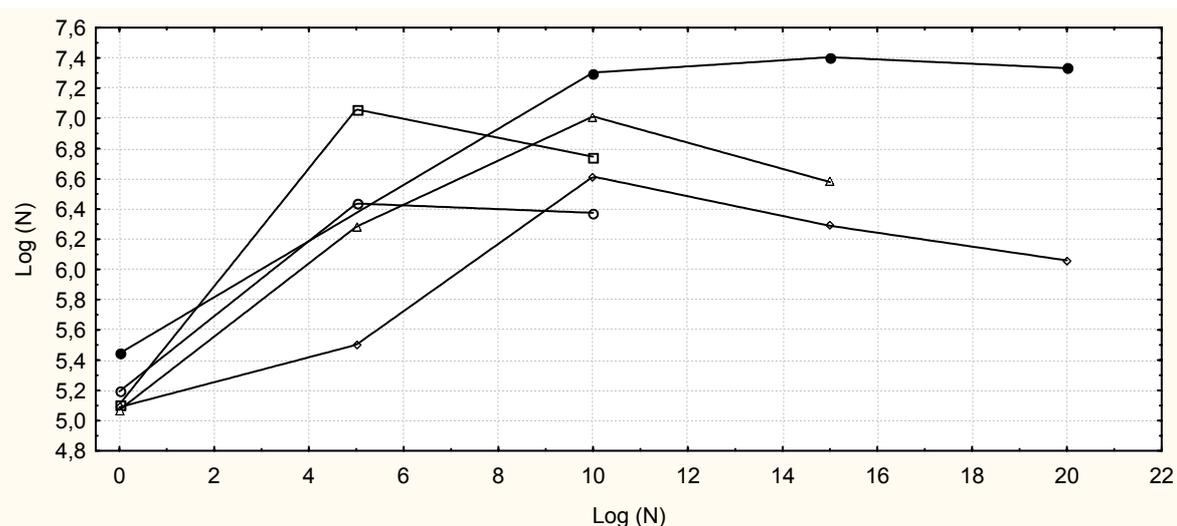


Figura A1 - Curvas de Ativação Térmica de ascósporos de *N. fischeri* utilizando como meio de aquecimento suco de abacaxi com diferentes valores de *ratio* nas condições de: (○) produção dos ascósporos a 25°C por 1 mês e *ratio* 10, (□) produção dos ascósporos a 25°C por 3 meses e *ratio* 10, (◆) produção dos ascósporos a 25°C por 1 mês e *ratio* 38, (▲) produção dos ascósporos a 25°C por 3 meses e *ratio* 38 e (●) produção dos ascósporos a 30°C por 2 meses e *ratio* 24.

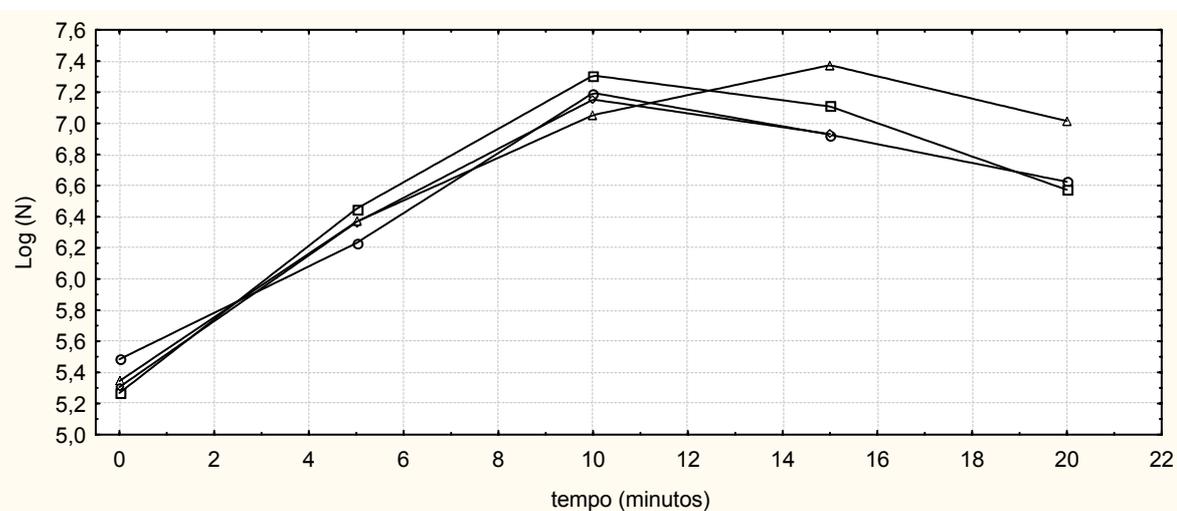


Figura A2 - Curvas de Ativação Térmica de ascósporos de *N. fischeri* utilizando como meio de aquecimento suco de abacaxi com diferentes valores de *ratio* nas condições de: (○) produção dos ascósporos a 35°C por 1 mês e *ratio* 10, (□) produção dos ascósporos a 35°C por 3 meses e *ratio* 10, (◆) produção dos ascósporos a 35°C por 1 mês e *ratio* 38 e (▲) produção dos ascósporos a 35°C por 3 meses e *ratio* 38.

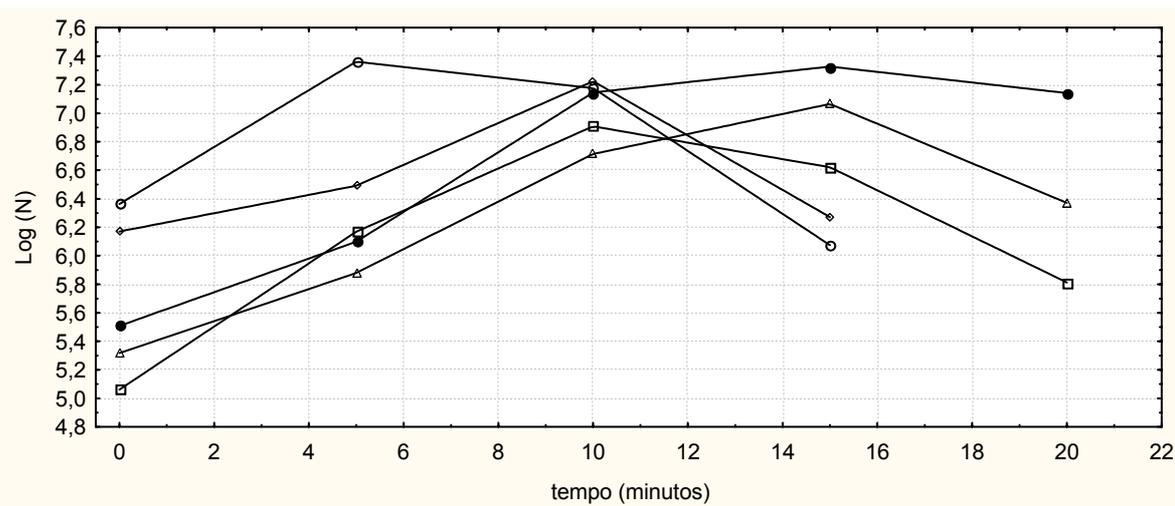


Figura A3 - Curvas de Ativação Térmica de ascósporos de *N. fischeri*, utilizando como meio de aquecimento suco de mamão, com diferentes valores de *ratio*, nas condições de: (○) produção dos ascósporos a 25°C por 1 mês e *ratio* 26, (□) produção dos ascósporos a 25°C, por 3 meses e *ratio* 26, (◇) produção dos ascósporos a 25°C, por 1 mês e *ratio* 66, (▲) produção dos ascósporos a 35°C por 3 meses e *ratio* 66 e (●) produção dos ascósporos a 30°C por 2 meses e *ratio* 46.

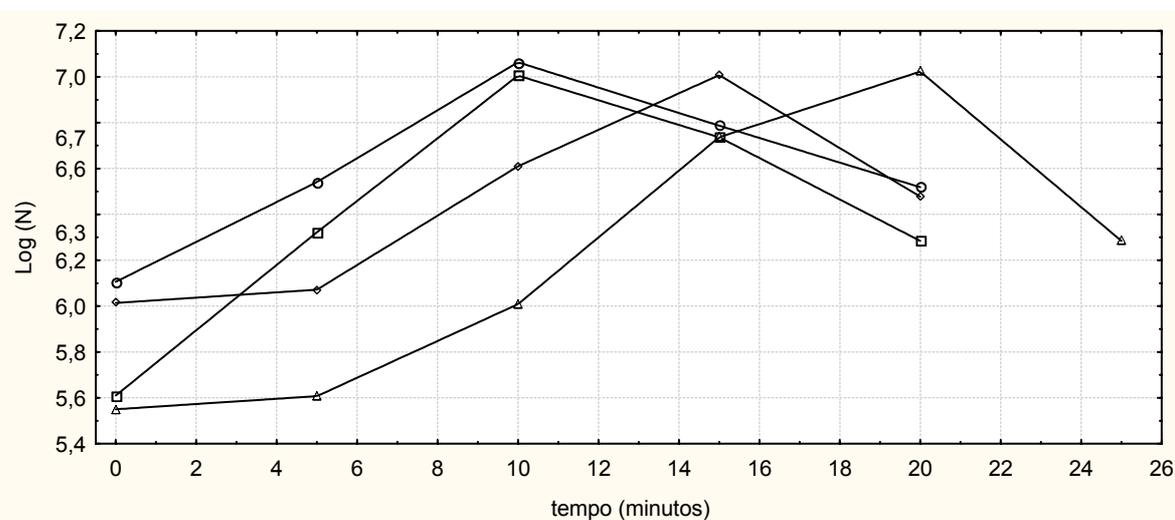


Figura A4 - Curvas de Ativação Térmica de ascósporos de *N. fischeri*, utilizando como meio de aquecimento suco de mamão, com diferentes valores de *ratio*, nas condições de: (○) produção dos ascósporos a 35°C por 1 mês e *ratio* 26, (□) produção dos ascósporos a 35°C por 3 meses e *ratio* 26, (◇) produção dos ascósporos a 35°C por 1 mês e *ratio* 66 e (▲) produção dos ascósporos a 35°C por 3 meses e *ratio* 66.

ANEXO II – CONTAGEM DO NÚMERO DE SOBREVIVENTES

Estão apresentados, a seguir, os resultados da contagem do número de ascósporos de *N. fischeri* que sobreviveram aos tratamentos térmicos a 80, 85 e 90°C, em todos os ensaios do planejamento experimental. A Tabela A3 e A4 apresentam a contagem de ascósporos de *N. fischeri* provenientes de incubações a 25°C por 1 e 3 meses, 30°C por 2 meses e 35°C por 1 e 3 meses e utilizando suco de abacaxi e suco de mamão, respectivamente, como meio de aquecimento, com diferentes valores de *ratio* (°Brix/acidez), após aplicação de testes de resistência térmica.

Tabela A3 - Contagem do número de ascósporos de *N. fischeri* que sobreviveram aos tratamentos térmicos a 80, 85 e 90°C, em suco de abacaxi, tratados a diferentes temperaturas e idades de esporulação e diferentes *ratios* (relação °brix/acidez) do meio de aquecimento.

T°C de esporulação – 25°C				T°C de esporulação – 25°C			
Idade = 1 mês				Idade = 3 meses			
Ratio = 10		Ratio = 38		Ratio = 10		Ratio = 38	
80°C							
Tempo (min)	Esporos/ml	Tempo (min)	Esporos/ml	Tempo (min)	Esporos/ml	Tempo (min)	Esporos/ml
0	2,27E+06	0	4,12E+06	0	1,75E+07	0	1,03E+07
40	2,25E+06	40	2,83E+06	40	6,05E+06	40	8,50E+06
90	1,72E+05	90	2,12E+05	60	2,54E+06	90	1,40E+06
100	1,35E+05	120	2,70E+04	90	1,50E+05	120	1,74E+05
120	2,16E+04	150	2,47E+03	120	3,55E+03	150	1,20E+04
150	1,55E+02	180	3,50E+01	150	1,60E+02	180	1,81E+03
85°C							
Tempo (min)	Esporos/ml	Tempo (min)	Esporos/ml	Tempo (min)	Esporos/ml	Tempo (min)	Esporos/ml
0	2,27E+06	0	4,12E+06	0	1,50E+07	0	1,07E+07
10	5,23E+05	17	1,74E+06	10	3,13E+06	20	3,06E+06
15	1,81E+05	25	1,26E+05	15	1,93E+06	25	2,62E+05
20	1,28E+04	30	6,85E+03	23	1,58E+05	27	1,51E+05
23	4,35E+03	35	1,40E+02	25	1,92E+04	35	9,05E+03
				30	1,35E+03	37	1,85E+03
						40	1,30E+02
90°C							
Tempo (min)	Esporos/ml	Tempo (min)	Esporos/ml	Tempo (min)	Esporos/ml	Tempo (min)	Esporos/ml
0	2,27E+06	0	4,12E+06	0	1,50E+07	0	2,06E+07
1	1,23E+06	0,5	1,58E+06	0,5	1,01E+07	1,5	1,48E+07
1,5	9,80E+05	1	1,18E+06	1	1,16E+07	2	3,68E+06
2	9,93E+04	1,5	5,74E+05	1,5	6,65E+06	2,5	1,09E+06
3	1,32E+04	2	1,22E+04	2	9,65E+05	3	4,14E+05

3,5	1,70E+02	3	2,00E+02	2,5	1,56E+04	3,5	2,85E+04
				3	1,18E+03	4	1,68E+03
				3,5	1,65E+01	4,5	2,08E+02
T°C de esporulação – 35°C				T°C de esporulação – 35°C			
Idade = 1 mês				Idade = 3 meses			
Ratio = 10		Ratio = 38		Ratio = 10		Ratio = 38	

80°C

Tempo (min)	Esporos/ml						
0	1,11E+07	0	1,51E+07	0	1,60E+07	0	1,11E+07
40	3,46E+06	30	1,51E+07	40	1,00E+07	90	7,73E+06
90	1,40E+06	60	1,08E+06	90	1,17E+06	150	3,92E+06
120	1,69E+05	75	2,32E+05	100	8,35E+05	210	2,06E+06
150	1,19E+04	90	1,60E+04	120	1,23E+05	270	1,07E+06
180	1,79E+03	100	2,75E+03	135	4,80E+04	300	4,31E+05
240	1,40E+02	120	1,58E+02	180	1,30E+03	330	8,55E+03
						360	1,05E+02

85°C

Tempo (min)	Esporos/ml						
0	1,76E+07	0	1,51E+07	0	1,60E+07	0	1,11E+07
15	1,32E+07	15	9,45E+06	15	1,27E+07	20	4,91E+06
20	5,94E+06	20	3,40E+05	25	1,30E+06	30	1,34E+06
30	3,45E+05	23	1,04E+04	30	1,78E+05	35	1,18E+06
35	1,46E+05	30	1,63E+02	35	1,85E+03	40	1,91E+05
40	1,78E+04			45	1,58E+02	50	1,78E+04
45	2,35E+02					55	2,35E+02

90°C

Tempo (min)	Esporos/ml						
0	1,76E+07	0	1,51E+07	0	1,60E+07	0	1,29E+07
0,5	1,27E+07	0,5	8,38E+06	0,5	1,31E+07	1,5	4,69E+06
1	7,98E+06	1	1,15E+05	1,5	8,50E+06	2	1,95E+06

1,5	5,04E+06	1,5	1,79E+04	2	7,35E+06	3	6,10E+05
2	3,20E+06	2	1,43E+03	2,5	1,51E+06	4	1,22E+05
2,5	3,13E+05			3	1,38E+04	5	1,78E+03
3	2,46E+04			3,5	7,00E+02		
3,5	8,75E+03						
T°C de esporulação – 30°C		T°C de esporulação – 30°C		T°C de esporulação – 30°C			
Idade - 2 meses		Idade - 2 meses		Idade - 2 meses			
1° Triplicata		2° Triplicata		3° Triplicata			
Ratio = 24		Ratio = 24		Ratio = 24			
80°C							
Tempo (min)	Esporos/ ml	Tempo (min)	Esporos/ ml	Tempo (min)	Esporos/ ml	Tempo (min)	Esporos/ ml
0	1,86E+07	0	2,54E+07	0	3,19E+07		
30	1,7E0+07	30	1,76E+07	30	1,47E+07		
60	1,30E+07	60	1,53E+07	100	0,93E+07		
100	6,31E+06	100	3,75E+06	120	2,17E+06		
120	4,24E+06	120	2,61E+06	150	1,14E+06		
150	3,18E+06	150	1,70E+06	180	1,03E+06		
180	2,35E+06	180	0,97E+06	210	1,24E+05		
210	3,39E+05	210	3,33E+05	240	3,37E+04		
240	3,86E+04	240	3,17E+04	270	1,41E+03		
270	1,81E+03	270	1,68E+03	300	3,03E+02		
300	3,32E+02			330	4,35E+01		
330	4,80E+01						
85°C							
Tempo (min)	Esporos/ ml	Tempo (min)	Esporos/ ml	Tempo (min)	Esporos/ ml	Tempo (min)	Esporos/ ml
0	1,06E+07	0	1,75E+07	0	2,54E+07		
17	7,95E+06	17	2,43E+06	17	1,77E+07		
20	2,93E+06	20	1,82E+06	20	1,55E+07		
25	2,13E+06	25	1,25E+06	25	1,35E+06		
30	8,30E+05	30	7,87E+05	30	7,65E+05		

35	3,00E+05	35	2,53E+05	35	2,35E+05
40	1,38E+03	40	4,25E+03	40	1,81E+03
90°C					
Tempo (min)	Esporos/ ml	Tempo (min)	Esporos/ ml	Tempo (min)	Esporos/ ml
0	1,91E+07	0	2,52E+07	0	2,54E+07
1	1,54E+07	1	1,92E+07	1,5	3,37E+06
1,5	5,98E+06	1,5	1,68E+07	2	1,97E+06
3	1,60E+06	2	1,53E+07	3	1,43E+06
3,5	6,88E+05	3	1,75E+06	4	1,02E+04
4	4,40E+04	3,5	1,00E+06	4,5	0,80E+02
4,5	9,70E+01	4	4,61E+04	5	0,74E+01
5	8,90E+0	4,5	0,90E+02		
		5	5,00E+01		

Tabela A4 - Contagem do número de ascósporos de *N. fischeri* que sobreviveram aos tratamentos térmicos a 80, 85 e 90°C, em suco de mamão, a diferentes temperaturas e idades de esporulação e diferentes *ratios* (relação °Brix/acidez) do meio de aquecimento.

T°C de esporulação – 25°C		T°C de esporulação – 35°C					
Idade = 1 mês		Idade = 1 mês					
Ratio = 26	Ratio = 66	Ratio = 26	Ratio = 66	Ratio = 26	Ratio = 66		
80°C							
Tempo (min)	Esporos/ ml	Tempo (min)	Esporos/ ml	Tempo (min)	Esporos/ ml	Tempo (min)	Esporos/ ml
0	3,78E+07	0	1,35E+07	0	2,75E+07	0	7,70E+06
40	1,60E+07	40	8,65E+06	40	1,87E+07	40	6,20E+06
60	1,32E+07	90	3,52E+06	60	1,10E+07	90	5,35E+06
75	9,60E+06	120	3,54E+06	75	3,99E+06	120	2,06E+06
90	1,82E+06	180	2,52E+06	90	2,61E+06	150	1,34E+06
105	1,41E+06	210	1,84E+06	120	1,67E+05	180	5,68E+05
120	7,17E+04	240	3,47E+04	150	3,50E+03	210	1,28E+04
135	1,37E+04	270	1,94E+03	210	1,17E+03	240	1,79E+03

150	4,28E+03						
85°C							
Tempo (min)	Esporos/ ml	Tempo (min)	Esporos/ ml	Tempo (min)	Esporos/ ml	Tempo (min)	Esporos/ ml
0	3,78E+07	0	1,35E+07	0	2,75E+07	0	7,70E+06
10	8,23E+06	15	4,13E+06	15	1,54E+07	20	1,10E+06
15	3,83E+06	20	1,38E+06	20	1,14E+07	30	1,53E+05
20	2,91E+06	30	2,16E+05	30	3,19E+05	40	5,60E+04
30	1,40E+05	40	2,09E+04	40	5,20E+04	50	4,48E+03
40	1,13E+03	60	1,28E+02	50	6,25E+03	55	1,58E+02
45	1,80E+02						
90°C							
Tempo (min)	Esporos/ ml	Tempo (min)	Esporos/ ml	Tempo (min)	Esporos/ ml	Tempo (min)	Esporos/ ml
0	3,78E+07	0	1,35E+07	0	2,75E+07	0	7,70E+06
1	1,31E+07	1	8,03E+06	0,5	1,21E+07	1	5,08E+06
1,5	1,08E+07	2	1,69E+06	1,5	8,45E+06	2	2,00E+06
2	3,17E+06	3	2,07E+05	2	5,23E+06	3	1,63E+05
2,5	2,54E+06	4	8,40E+04	3	2,79E+06	4	1,58E+04
3	1,77E+05	5	1,31E+03	3,5	1,20E+05	5	1,07E+03
4	2,02E+04			4	8,83E+03		
T°C de esporulação – 25°C				T°C de esporulação – 35°C			
Idade = 3 meses				Idade = 3 meses			
Ratio = 26		Ratio = 66		Ratio = 26		Ratio = 66	
80°C							
Tempo (min)	Esporos/ ml	Tempo (min)	Esporos/ ml	Tempo (min)	Esporos/ ml	Tempo (min)	Esporos/ ml
0	2,35E+07	0	1,09E+07	0	1,01E+07	0	1,06E+07
40	9,93E+06	40	1,01E+07	40	9,13E+06	90	4,20E+06
60	7,05E+06	90	9,90E+06	60	3,16E+06	130	2,79E+06
90	1,55E+06	120	3,87E+06	90	1,95E+06	150	1,93E+06
120	9,05E+05	150	4,47E+05	120	8,10E+05	210	1,51E+06
150	3,33E+04	180	2,57E+04	135	5,73E+04	270	7,68E+04

180	2,40E+03	240	1,72E+03	165	1,11E+04	330	2,02E+03
210	3,98E+02			180	1,15E+03		

85°C

Tempo (min)	Esporos/ml						
0	2,35E+07	0	1,09E+07	0	1,01E+07	0	1,06E+07
20	7,08E+06	20	1,40E+06	15	5,45E+06	25	1,90E+06
30	1,15E+06	25	7,58E+05	20	1,83E+06	30	1,51E+06
40	1,04E+04	30	2,57E+05	25	8,95E+05	35	1,14E+06
50	7,58E+02	35	1,35E+04	35	1,81E+04	45	4,61E+04
		45	1,40E+02	45	1,49E+03	55	5,40E+03

90°C

Tempo (min)	Esporos/ml						
0	2,35E+07	0	1,09E+07	0	1,01E+07	0	1,06E+07
1	9,68E+06	1	2,68E+06	0,5	3,92E+06	1	7,65E+06
2	6,78E+06	1,5	1,01E+06	1	2,98E+06	2	5,00E+06
2,5	3,46E+06	2,5	3,15E+05	2	9,18E+05	3	3,53E+06
4	7,63E+05	3	1,33E+04	3	2,68E+05	4	1,10E+05
5	4,35E+03	3,5	1,12E+03	4	2,66E+03	6	9,28E+03
		4,5	1,53E+02			7	1,28E+02

T°C de esporulação – 30°C		T°C de esporulação – 30°C		T°C de esporulação – 30°C	
Idade - 2 meses		Idade - 2 meses		Idade - 2 meses	
<i>Ratio = 46</i>		<i>Ratio = 46</i>		<i>Ratio = 46</i>	
80°C		80°C		80°C	
Tempo (min)	Esporos/ml	Tempo (min)	Esporos/ml	Tempo (min)	Esporos/ml
0	2,34E+07	0	2,19E+07	0	2,34E+07
40	2,19E+07	75	6,45E+06	30	1,99E+07
60	1,69E+07	105	5,53E+06	60	7,95E+06
100	9,98E+06	150	2,58E+06	100	2,83E+06
150	4,35E+06	180	1,92E+06	120	2,23E+06
180	3,93E+05	210	2,62E+05	180	1,65E+05

240	5,70E+03	240	1,49E+05	210	2,97E+04
270	1,15E+03	300	3,60E+03	240	7,50E+03
		330	2,90E+02		
85°C		85°C		85°C	
Tempo (min)	Esporos/ ml	Tempo (min)	Esporos/ ml	Tempo(min)	Esporos/ ml
0	2,34E+07	0	2,56E+07	0	2,34E+07
20	1,85E+07	20	1,30E+07	20	1,20E+07
25	7,43E+06	25	7,53E+06	25	1,08E+07
30	5,28E+06	30	4,34E+06	30	3,72E+06
40	1,25E+06	40	2,35E+06	40	2,18E+06
50	1,60E+05	50	1,08E+05	50	1,41E+05
55	6,50E+03	55	1,04E+04	60	1,12E+04
60	3,20E+02	60	6,15E+03	70	6,05E+03
90°C		90°C		90°C	
Tempo (min)	Esporos/ ml	Tempo (min)	Esporos/ ml	Tempo(min)	Esporos/ ml
0	1,68E+07	0	1,79E+07	0	2,34E+07
1	9,75E+06	1	1,18E+07	1	1,35E+07
2	6,33E+06	2	6,60E+06	1,5	7,95E+06
3	5,08E+06	3	5,98E+06	2	6,23E+06
3,5	1,66E+06	4	9,83E+05	3	1,05E+06
4	4,80E+05	5	1,64E+05	3,5	4,83E+05
5	1,26E+05	6	2,22E+03	4,5	1,31E+05
6	5,83E+03	7	3,15E+01	5,5	7,78E+04
7	2,45E+01			6,5	2,25E+02

ANEXO III – CURVAS DE SOBREVIVENTES

As figuras de A6 a A19 referem-se aos experimentos realizados com suco de abacaxi. As figuras de A6 a A10 mostram a inativação térmica dos ascósporos. As figuras A11 e A12 mostram as curvas linearizadas para o parâmetro “a”. As figuras de A13 a A17 mostram as curvas linearizadas para cada ensaio. As figuras A18 e A19 mostram as curvas para determinação do parâmetro Z^* .

As figuras de A20 a A32 referem-se aos experimentos realizados com suco de mamão. As figuras de A20 a A32 mostram a inativação térmica dos ascósporos. As figuras A25 e A26 mostram as curvas linearizadas para o parâmetro “a”. As figuras de A27 a A30 mostram as curvas linearizadas para cada ensaio. As figuras A31 e A32 mostram as curvas para determinação do parâmetro Z^* .

A figura de A33 mostra a inativação térmica dos ascósporos em suco de mamão. A figura A34 mostra a curva linearizada para o parâmetro “a” para este suco. A figura A35 mostra as curvas linearizadas. A figura A36 mostra a curva para determinação do parâmetro Z^* para suco de mamão.

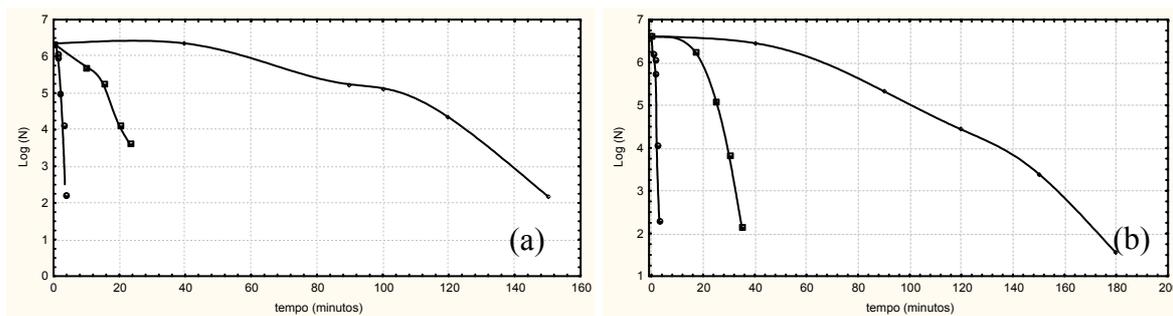


Figura A6 - Curvas de Inativação Térmica de ascósporos de *N. fischeri* produzidos a 25°C por 1 mês e utilizando suco de abacaxi como meio de aquecimento apresentando ratio (a) 10 e (b) 38 nas temperaturas de tratamento térmico: (◆) 80°C, (□) 85°C e (○) 90°C.

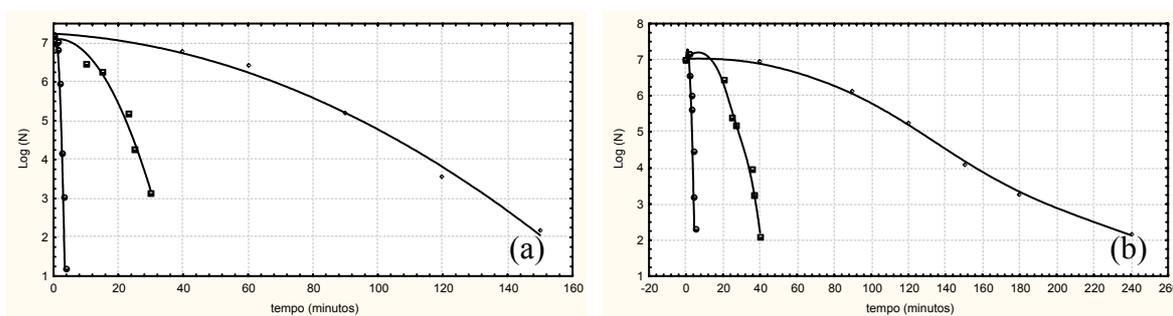


Figura A7 - Curvas de Inativação Térmica de ascósporos de *N. fischeri* produzidos a 25°C por 3 meses e utilizando suco de abacaxi como meio de aquecimento apresentando ratio (a) 10 e (b) 38 nas temperaturas de tratamento térmico(◆) 80°C, (□) 85°C e (○) 90°C.

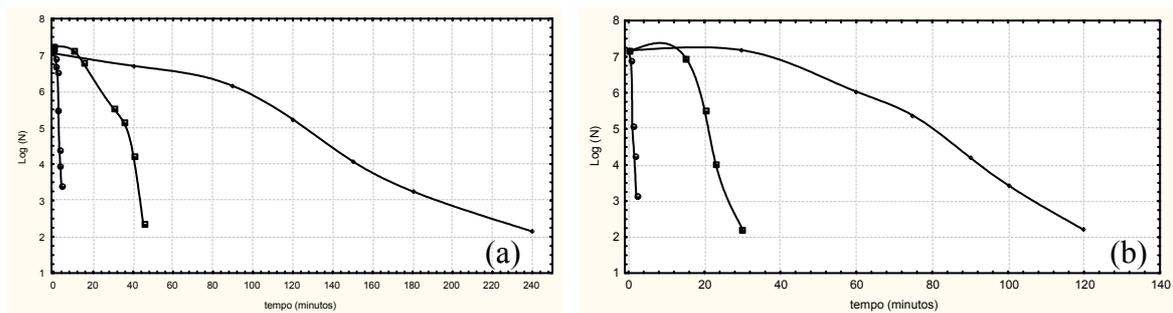


Figura A8 - Curvas de Inativação Térmica de ascósporos de *N. fischeri* produzidos a 35°C por 1 mês e utilizando suco de abacaxi como meio de aquecimento apresentando ratio (a) 10 e (b) 38 nas temperaturas de tratamento térmico(◆) 80°C, (□) 85°C e (○) 90°C.

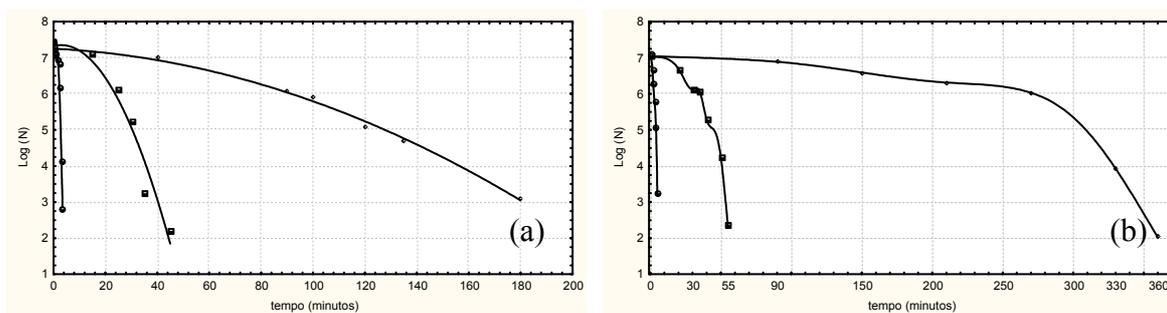


Figura A9 - Curvas de Inativação Térmica de ascósporos de *N. fischeri* produzidos a 35°C por 3 meses e utilizando suco de abacaxi como meio de aquecimento apresentando *ratio* (a) 10 e (b) 38 nas temperaturas de tratamento térmico(♦) 80°C, (□) 85°C e (○) 90°C.

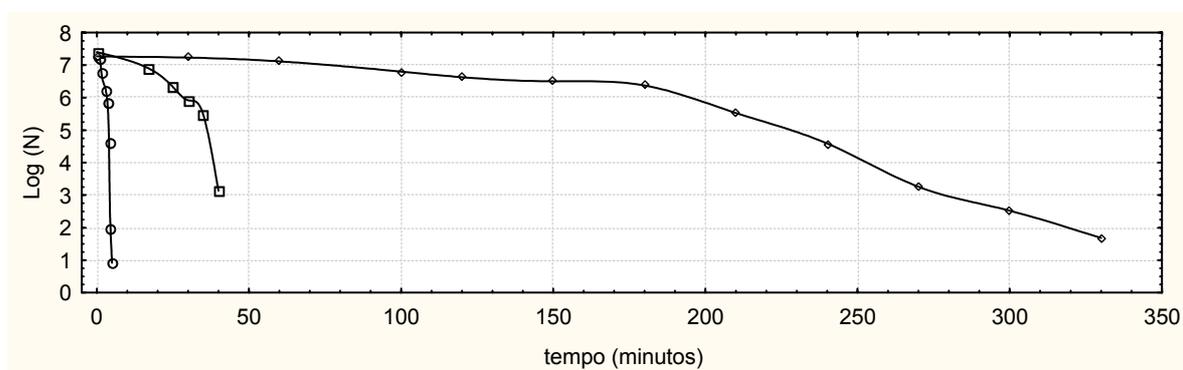


Figura A10 - Curvas de Inativação Térmica de ascósporos de *N. fischeri* produzidos a 30°C por 2 meses e utilizando suco de abacaxi como meio de aquecimento apresentando *ratio* 24 nas temperaturas de tratamento térmico(♦) 80°C, (□) 85°C e (○) 90°C.

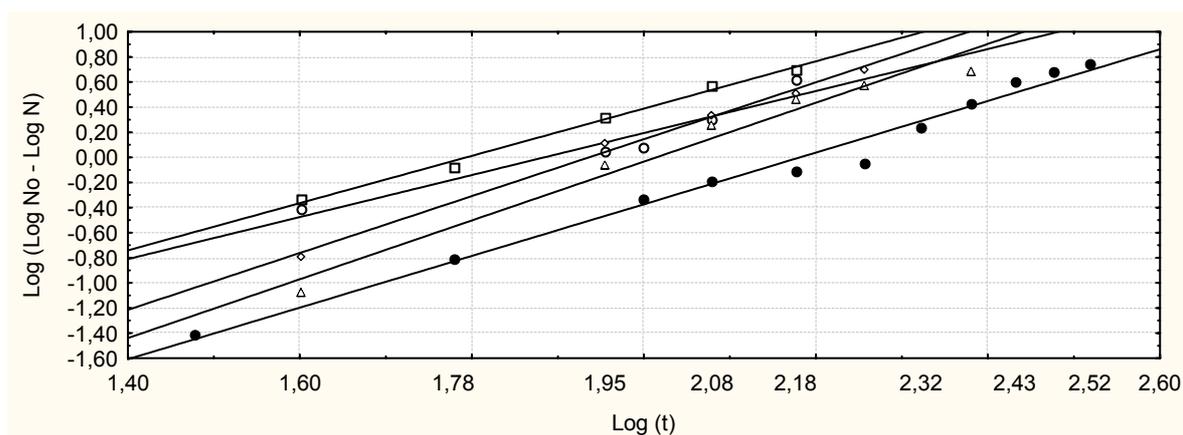


Figura A11 - Curvas para a determinação do parâmetro “a” à temperatura de 80°C para as condições de (◇) produção dos ascósporos a 25°C por 1 mês e *ratio* 10, (□) produção dos ascósporos a 25°C por 3 meses e *ratio* 10, (○) produção dos ascósporos a 25°C por 1 mês e *ratio* 38, (▲) produção dos ascósporos a 25°C por 3 meses e *ratio* 38 e (♦) produção dos ascósporos a 30°C por 2 meses e *ratio* 24.

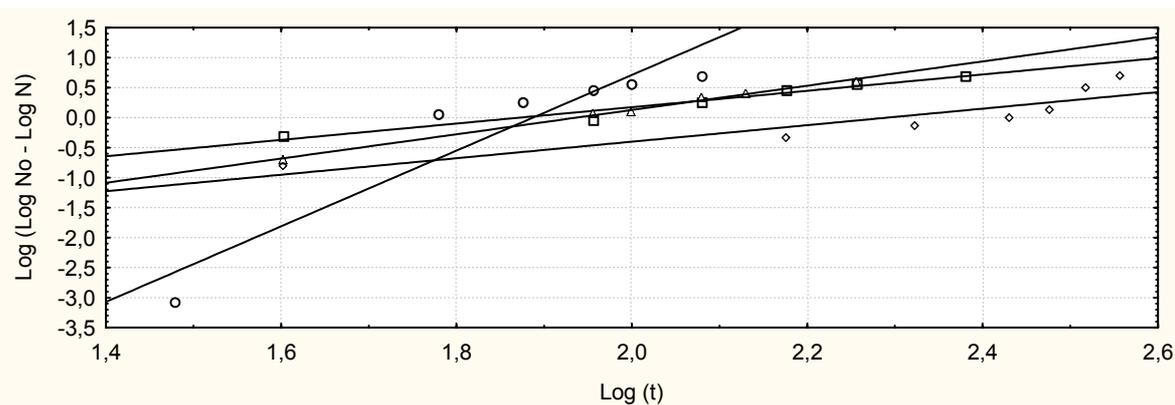


Figura A12 - Curvas para a determinação do parâmetro “a” à temperatura de 80°C para as condições de (◇) produção dos ascósporos a 35°C por 3 meses e *ratio* 38, (□) produção dos ascósporos a 35°C por 1 mês e *ratio* 10, (○) produção dos ascósporos a 35°C por 1 mês e *ratio* 10 e (▲) produção dos ascósporos a 25°C por 3 meses e *ratio* 10.

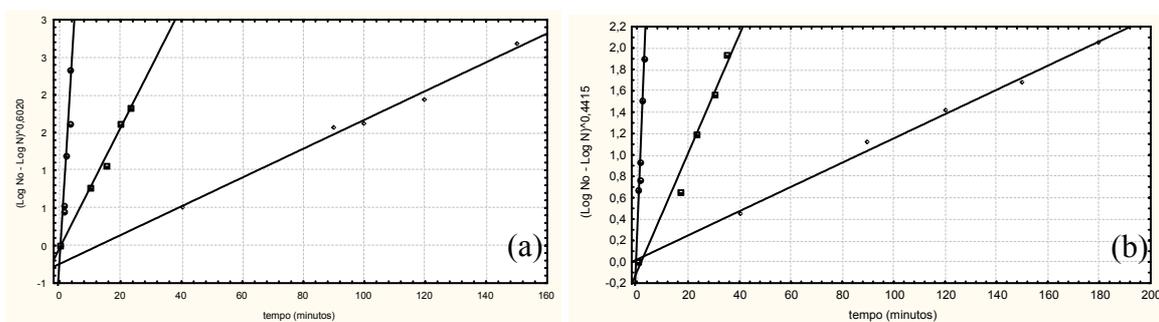


Figura A13 – Curvas de linearização da inativação térmica de ascósporos de *N. fischeri* produzidos a 25°C por 1 mês e aquecidos a 80, 85 e 90°C em suco de abacaxi com *ratio* 10 (a) e *ratio* 38 (b).

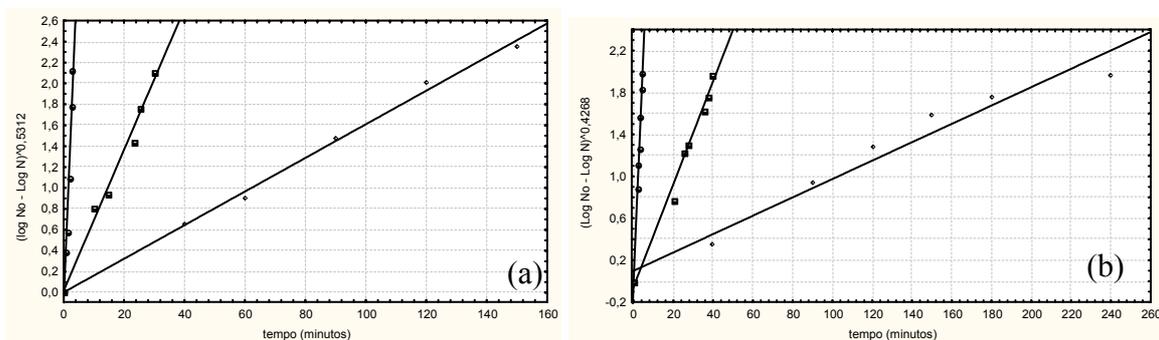


Figura A14 – Curvas de linearização da inativação térmica de ascósporos de *N. fischeri* produzidos a 25°C por 3 meses e aquecidos a 80, 85 e 90°C em suco de abacaxi com *ratio* 10 (a) e *ratio* 38 (b).

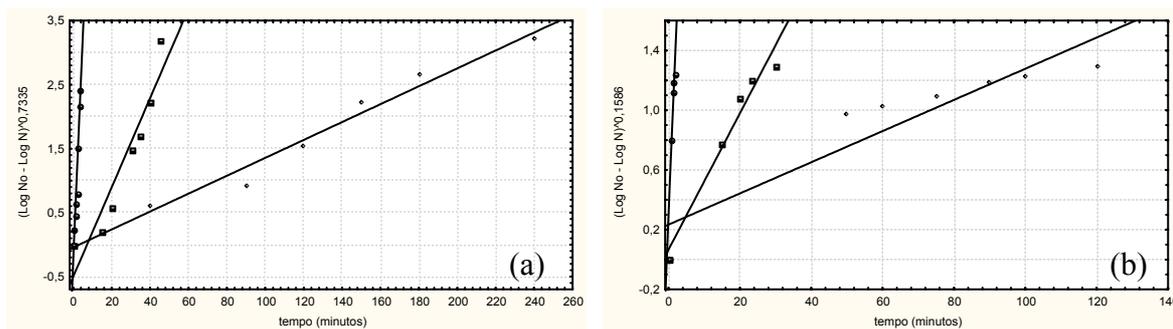


Figura A15 – Curvas de linearização da inativação térmica de ascósporos de *N. fischeri* produzidos a 35°C por 1 mês e aquecidos a 80, 85 e 90°C em suco de abacaxi com *ratio* 10 (a) e *ratio* 38 (b).

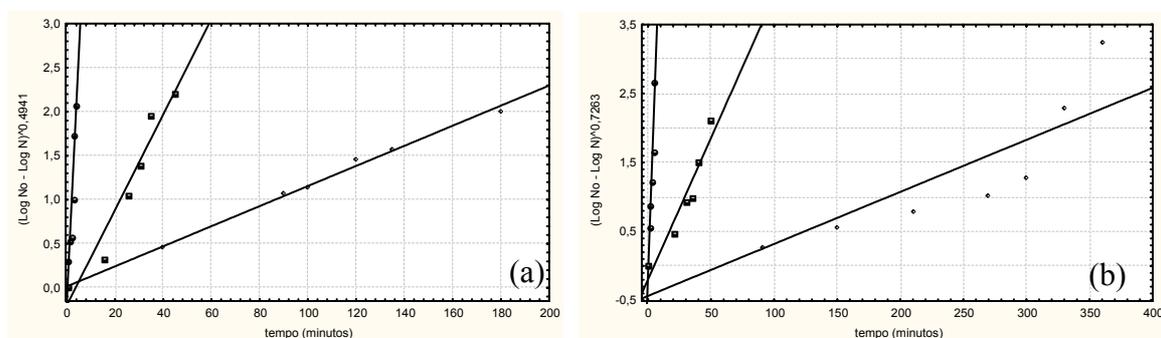


Figura A16 – Curvas de linearização da inativação térmica de ascósporos de *N. fischeri* produzidos a 35°C por 3 meses e aquecidos a 80, 85 e 90°C em suco de abacaxi com *ratio* 10 (a) e *ratio* 38 (b).

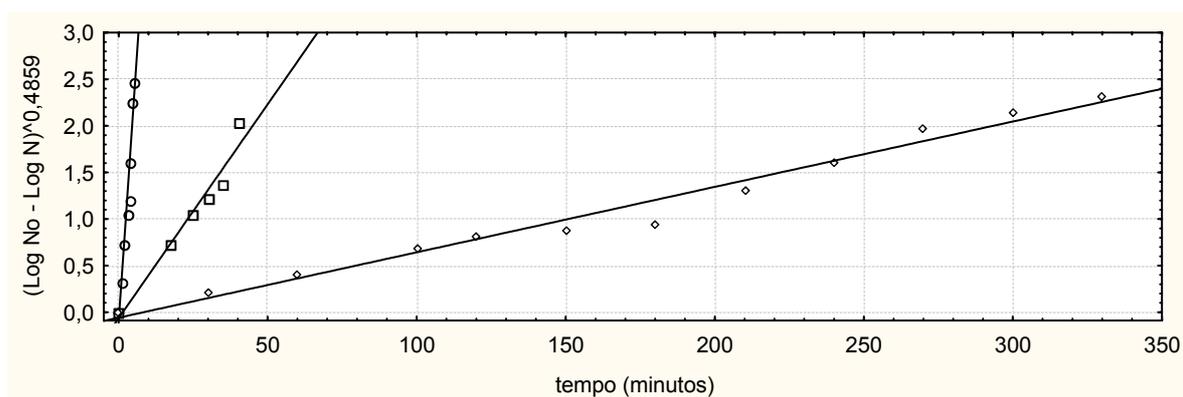


Figura A17 – Curvas de linearização da inativação térmica de ascósporos de *N. fischeri* produzidos a 30°C por 2 meses e aquecidos a 80, 85 e 90°C em suco de abacaxi com *ratio* 24.

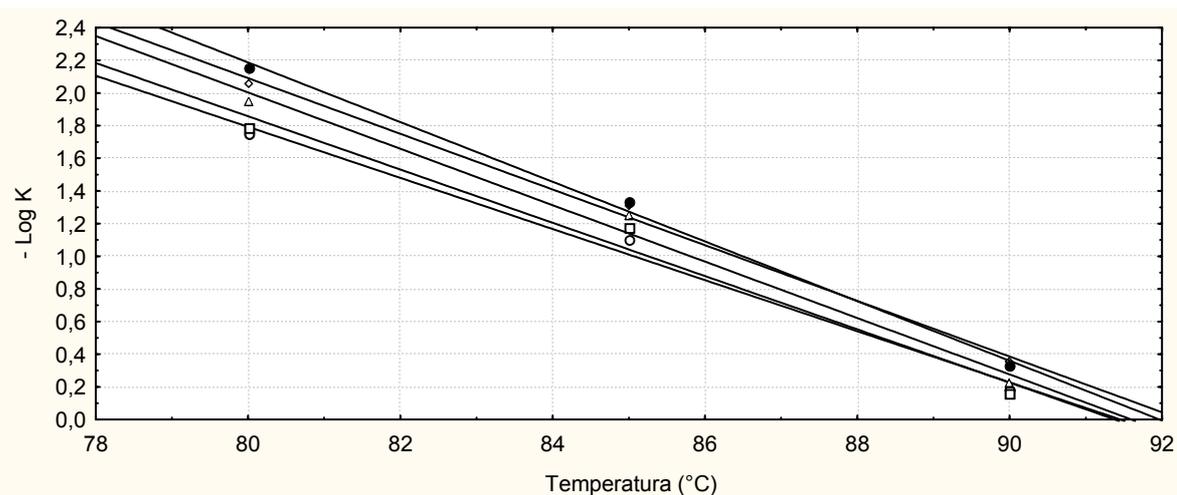


Figura A18 - Determinação de Z^* para *N. fischeri* (Curva TDT) nas condições de: (◇) produção dos ascósporos a 25°C por 3 meses e *ratio* 10, (□) produção dos ascósporos a 25°C por 1 mês e *ratio* 38, (○) produção dos ascósporos a 25°C por 1 mês e *ratio* 10, (▲) produção dos ascósporos a 25°C por 3 meses e *ratio* 38 e (◆) produção dos ascósporos a 30°C por 2 meses e *ratio* 24.

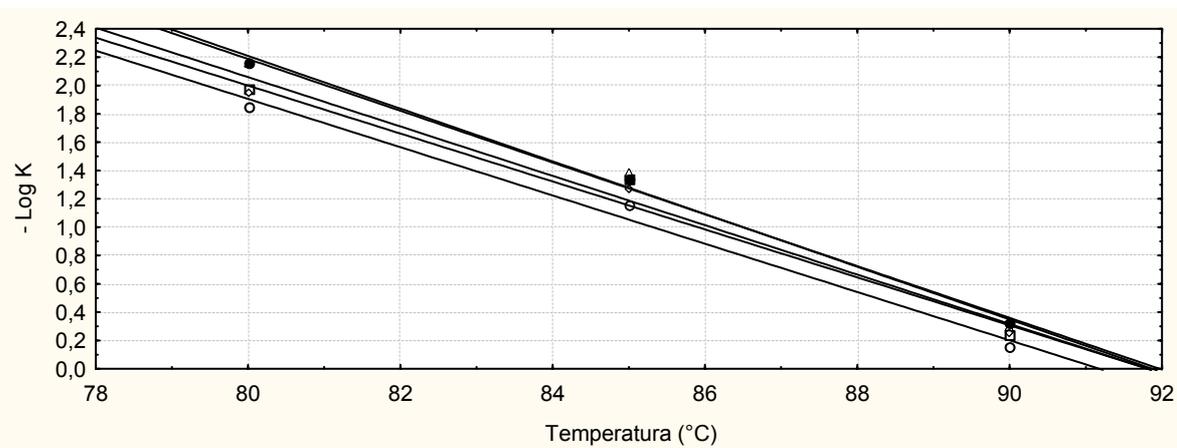


Figura A19 - Determinação de Z^* para *N. fischeri* (Curva TDT) nas condições de: (◇) produção dos ascósporos a 35°C por 3 meses e *ratio* 10, (□) produção dos ascósporos a 35°C por 1 mês e *ratio* 38, (○) produção dos ascósporos a 35°C por 1 mês e *ratio* 38, (▲) produção dos ascósporos a 35°C por 3 meses e *ratio* 38 e (◆) produção dos ascósporos a 30°C por 2 meses e *ratio* 24.

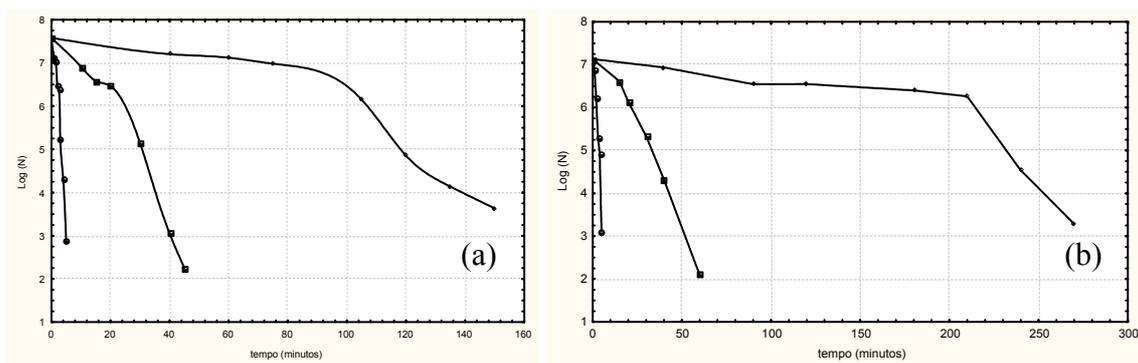


Figura A20 - Curvas de Inativação Térmica de ascósporos de *N. fischeri* produzidos a 25°C por 1 mês e utilizando suco de mamão como meio de aquecimento apresentando *ratio* (a) 26 e (b) 66 nas temperaturas de tratamento térmico: (\diamond) 80°C, (\square) 85°C e (\circ) 90°C.

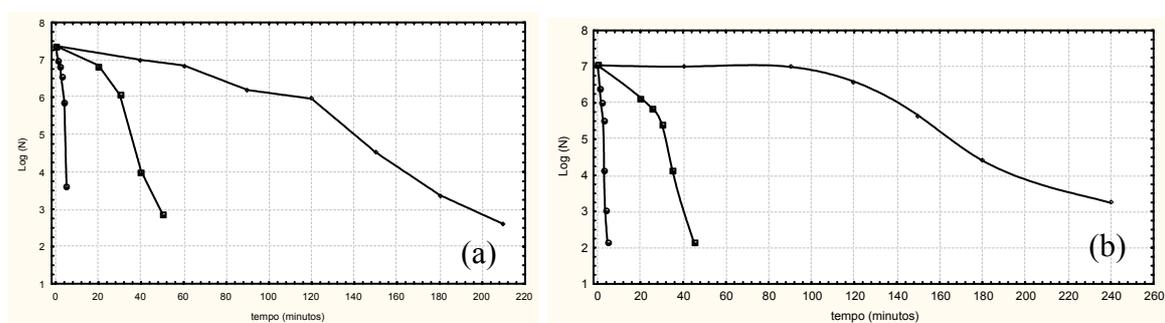


Figura A21 - Curvas de Inativação Térmica de ascósporos de *N. fischeri* produzidos a 25°C por 3 meses e utilizando suco de mamão como meio de aquecimento apresentando *ratio* (a) 26 e (b) 66 nas temperaturas de tratamento térmico: (\diamond) 80°C, (\square) 85°C e (\circ) 90°C.

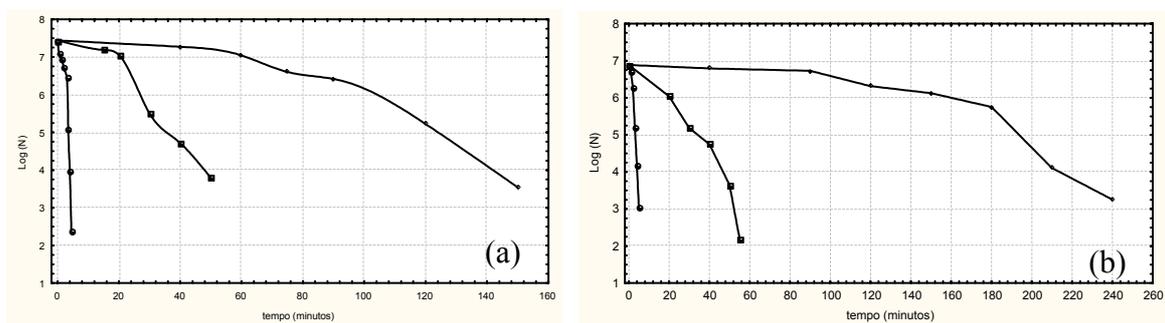


Figura A22 - Curvas de Inativação Térmica de ascósporos de *N. fischeri* produzidos a 35°C por 1 mês e utilizando suco de mamão como meio de aquecimento apresentando *ratio* (a) 26 e (b) 66 nas temperaturas de tratamento térmico: (\diamond) 80°C, (\square) 85°C e (\circ) 90°C.

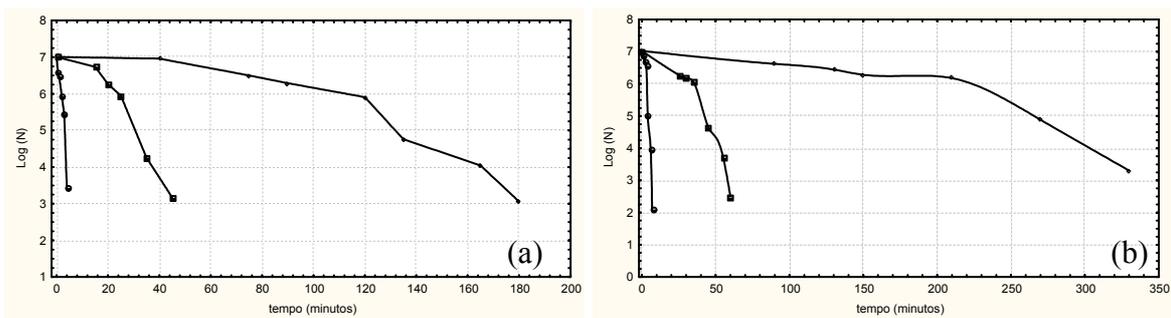


Figura A23 - Curvas de Inativação Térmica de ascósporos de *N. fischeri* produzidos a 35°C por 3 meses e utilizando suco de mamão como meio de aquecimento apresentando *ratio* (a) 26 e (b) 66 nas temperaturas de tratamento térmico: (\diamond) 80°C, (\square) 85°C e (\circ) 90°C.

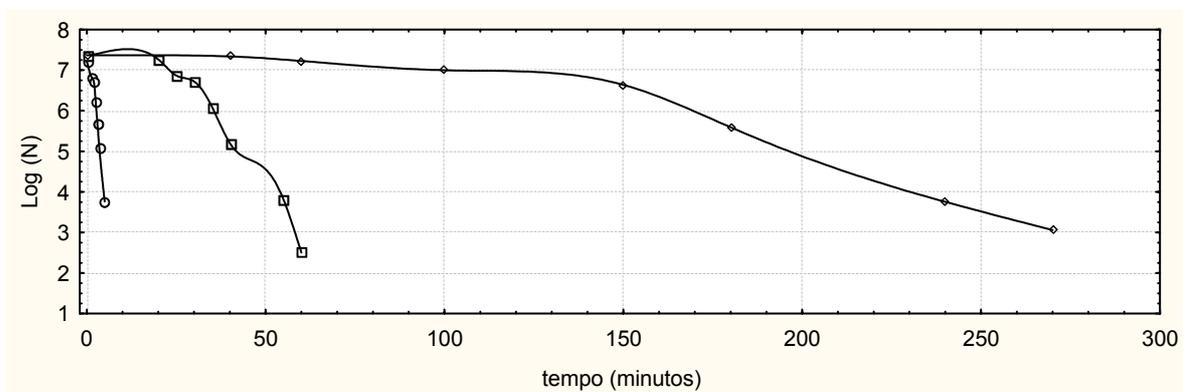


Figura A24 - Curvas de Inativação Térmica de ascósporos de *N. fischeri* produzidos a 30°C por 2 meses e utilizando suco de mamão como meio de aquecimento apresentando *ratio* 46 nas temperaturas de tratamento térmico: (\diamond) 80°C, (\square) 85°C e (\circ) 90°C.

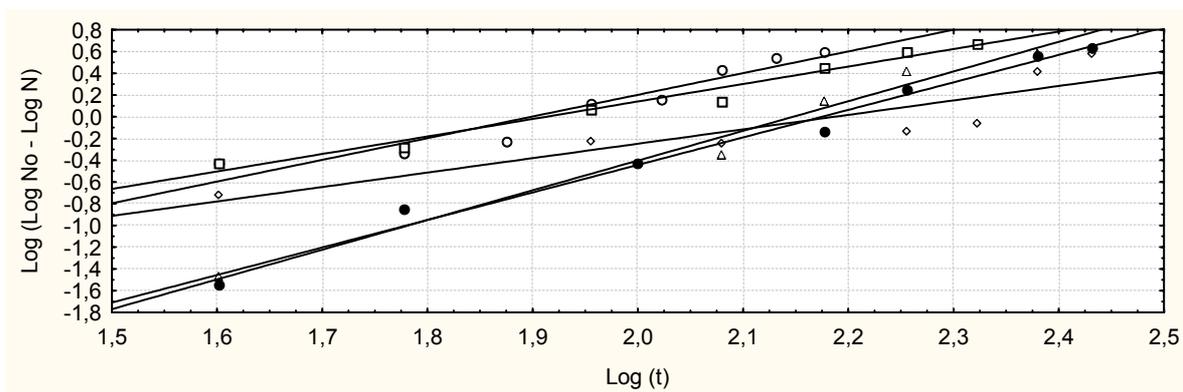


Figura A25 - Curvas para a determinação do parâmetro “a” à temperatura de 80°C para as condições de: (\diamond) produção dos ascósporos a 25°C por 1 mês e *ratio* 66, (\square) produção dos ascósporos a 25°C por 3 meses e *ratio* 26, (\circ) produção dos ascósporos a 25°C por 1 mês e *ratio* 26, (\triangle) produção dos ascósporos a 25°C por 1 mês e *ratio* 66.

ratio 26, (▲) produção dos ascósporos a 25°C por 3 meses e ratio 66 e (●) produção dos ascósporos a 30°C por 2 meses e ratio 24.

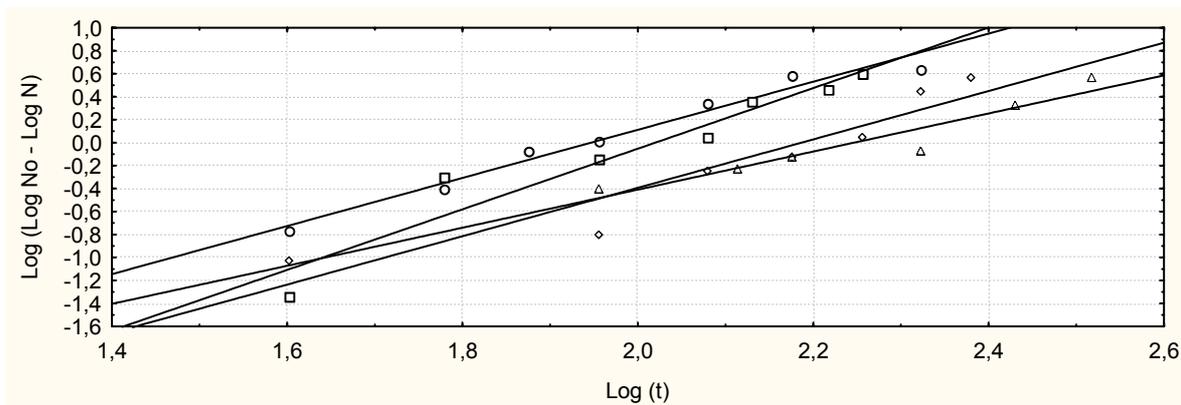


Figura A26 - Curvas para a determinação do parâmetro “a” à temperatura de 80°C para as condições de: (◇) produção dos ascósporos a 35°C por 1 mês e ratio 26, (□) produção dos ascósporos a 35°C por 1 mês e ratio 26, (○) produção dos ascósporos a 35°C por 1 mês e ratio 26 e (▲) produção dos ascósporos a 35°C por 1 mês e ratio 26.

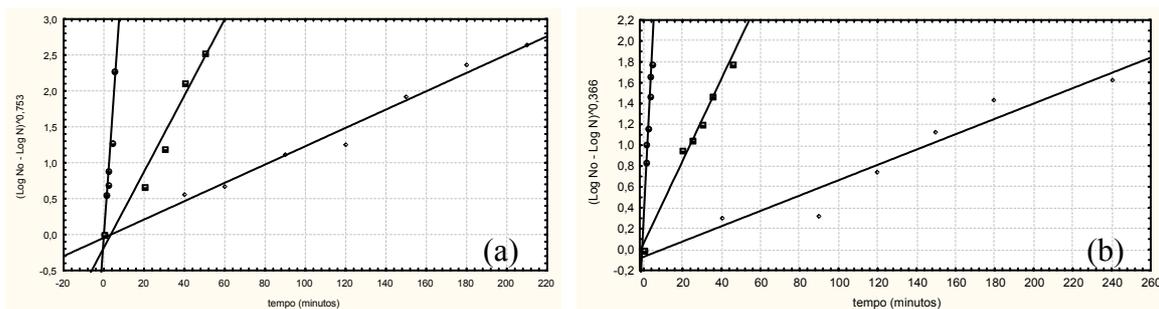


Figura A27 – Curvas de linearização da inativação térmica de ascósporos de *N. fischeri* produzidos a 25°C por 1 mês e aquecidos a 80, 85 e 90°C em suco de abacaxi com ratio 26 (a) e ratio 66 (b).

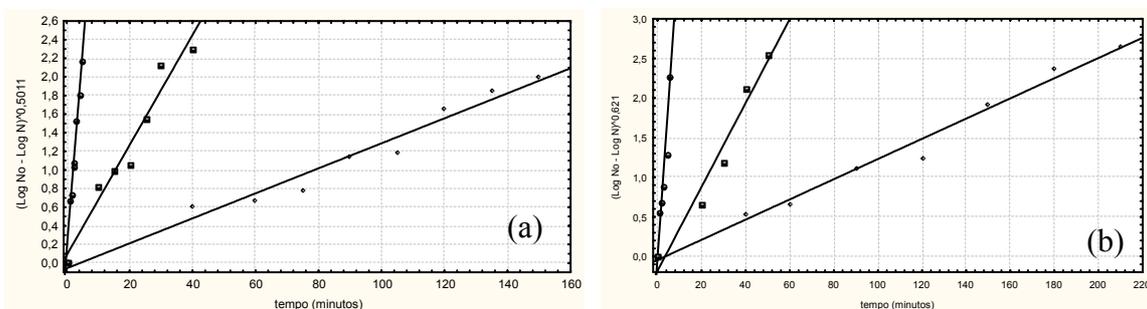


Figura A28 – Curvas de linearização da inativação térmica de ascósporos de *N. fischeri* produzidos a 25°C por 3 meses e aquecidos a 80, 85 e 90°C em suco de abacaxi com ratio 26 (a) e ratio 66 (b).

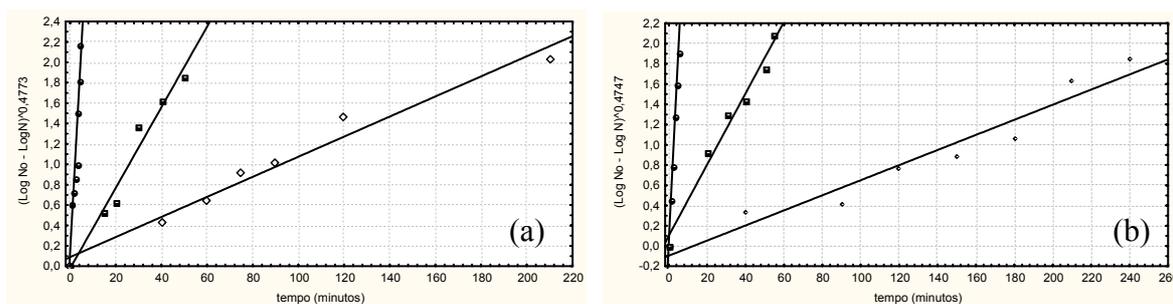


Figura A29 – Curvas de linearização da inativação térmica de ascósporos de *N. fischeri* produzidos a 35°C por 1 mês e aquecidos a 80, 85 e 90°C em suco de abacaxi com *ratio* 26 (a) e *ratio* 66 (b).

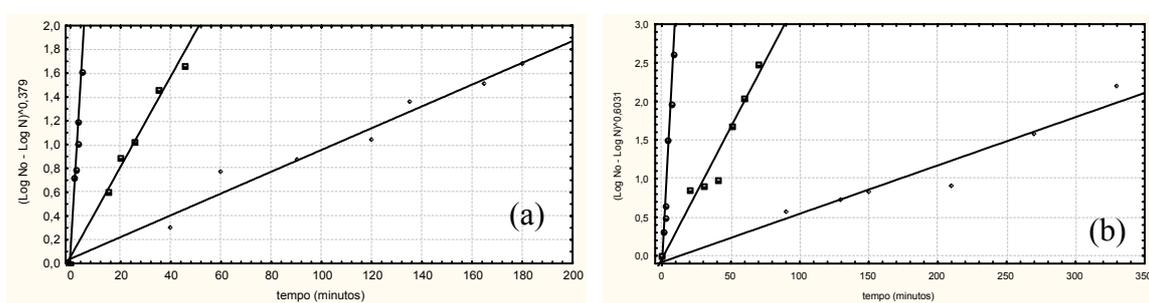


Figura A30 – Curvas de linearização da inativação térmica de ascósporos de *N. fischeri* produzidos a 35°C por 3 meses e aquecidos a 80, 85 e 90°C em suco de abacaxi com *ratio* 26 (a) e *ratio* 66 (b).

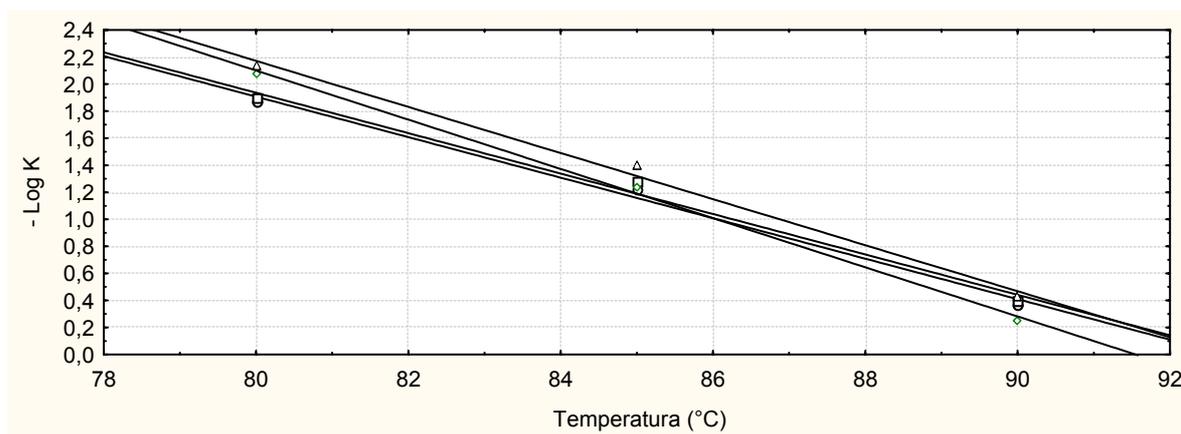


Figura A31 - Determinação de Z^* para *N. fischeri* (Curva TDT) nas condições de: (◇) produção dos ascósporos a 25°C por 1 mês e *ratio* 26, (◻) produção dos ascósporos a 25°C por 3 meses e *ratio* 26, (○) produção dos ascósporos a 25°C por 1 mês e *ratio* 66 e (▲) produção dos ascósporos a 25°C por 3 meses e *ratio* 66.

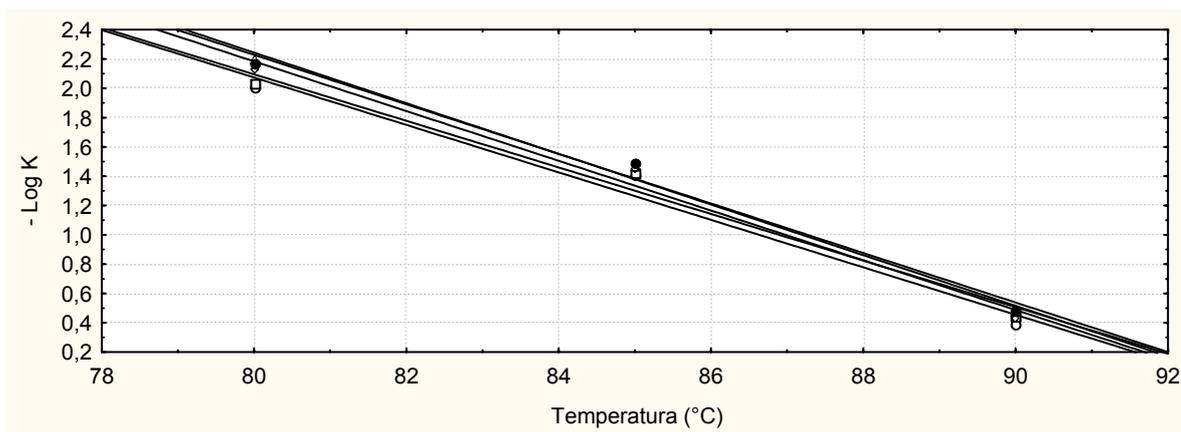


Figura A32 - Determinação de Z^* para *N. fischeri* (Curva TDT) nas condições de: (\diamond) produção dos ascósporos a 35°C por 1 mês e *ratio* 26, (\square) produção dos ascósporos a 35°C por 3 meses e *ratio* 26, (\circ) produção dos ascósporos a 35°C por 1 mês e *ratio* 66, (\blacktriangle) produção dos ascósporos a 35°C por 3 meses e *ratio* 66 e (\blacklozenge) produção dos ascósporos a 30°C por 2 meses e *ratio* 46.

ANEXO IV – MEIOS UTILIZADOS

Formulação e preparo dos meios e soluções utilizadas nesta pesquisa.

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

Rosa de bengala 0,5 g

Água 10 g

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

2. Suspensão de Tween 80

Tween 0,05 ml

Água 100 ml

3. Ágar Extrato de Malte (MEA)

Extrato de Malte 20 g

Peptona 1,0 g

Glicose 20 g

Ágar 20 g

Água destilada 1 litro

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