

PRESENÇA DE BOLORES TERMO-RESISTENTES EM SUCOS CONCENTRADOS DE FRUTAS

Presence of heat resistance mold in fruit juice concentrates

Raquel Soares Casaes Nunes^{1*}, Flávia Fernandes Paulino¹, Karen Signori Pereira²,
Denise Bello Magalhães¹

¹Pós-graduação em Segurança Alimentar e Qualidade Nutricional. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ) *campus* Rio de Janeiro. Rua Senador Furtado, 121/125, Maracanã, Rio de Janeiro, RJ. CEP: 20270-021RJ. Brasil.

²Departamento de Engenharia Bioquímica, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, RJ. Brasil. *E-mail: raquel.casaes@hotmail.com

RESUMO

Indústrias de alimentos pasteurizados a base de frutas encontram sérios problemas decorrentes da presença de bolores termo-resistentes, que germinam após o tratamento térmico, provocando a deterioração do produto. O objetivo desta revisão é apresentar estudos sobre o desenvolvimento de bolores termo-resistentes em sucos de frutas concentrados, métodos recomendados para enumeração destes fungos e a influência da composição do suco na sobrevivência dos ascósporos após o tratamento térmico.

Palavras-chave: bolores termo-resistentes; sucos concentrados; ascósporos.

ABSTRACT

Food industry pasteurized fruit-based encounter serious problems arising from the presence of heat-resistant molds, which germinate after heat treatment, causing deterioration of the product. The aim of this review is to present studies on the development of heat-resistant molds in fruit juice concentrates, recommended methods for enumeration of fungi and the influence of juice composition on survival of ascospores after heat treatment.

Keywords: heat-resistant mold; concentrated juices; ascospores.

INTRODUÇÃO

Atualmente, os sucos de frutas industrializados têm grande aceitação por parte dos consumidores, que procuram produtos *in natura*, em substituição aos refrigerantes. A elaboração manual de sucos é uma prática cada vez menos adotada por boa parte da população, que possui acelerado ritmo de vida. Tal fato explica o surgimento de diversas marcas comerciais de sucos de frutas industrializados no mercado nacional. Por causa da demanda por este tipo de alimento, as indústrias têm investido intensamente em tecnologia para a formulação de novos ingredientes e aditivos, responsáveis por características funcionais, evitando a adição de conservantes químicos que depreciam a imagem funcional do produto (CAMARGO *et al.*, 2007).

Estas bebidas, ricas em nutrientes, estão sujeitas à contaminação microbiana, notadamente por bolores e leveduras, que encontram no suco um meio propício para o seu desenvolvimento. O controle do crescimento destes microrganismos pode ser feito pela pasteurização, tratamento mais aceitável pelos consumidores do que a adição de conservantes (BAGLIONI, 1998).

Os fungos possuem baixa resistência térmica, sendo normalmente eliminados pela pasteurização, que destrói conídios e hifas. Contudo existe uma pequena classe de bolores que são termo-resistentes, alguns deles, lembrando esporos bacterianos. A resistência térmica é decorrente da presença de esporos sexuados, conhecidos por ascósporos, que resistem ao tratamento térmico. Estes esporos podem permanecer em estado de dormência em restos de frutas apodrecidas e no solo, necessitando de uma ativação térmica para germinarem, o que corresponde aos processamentos térmicos comerciais (TOURNAS & TRAXLER, 1994). Após a germinação dos esporos, a deterioração do alimento pode ocasionar alterações como: escurecimento, separação de fases, diminuição da viscosidade provocada pela excreção de enzimas pectinolíticas, alcalinização do suco e mau cheiro (ARAGÃO, 1989).

Outros fatores contribuem para a sobrevivência e a alteração da resistência térmica de fungos termo-resistentes, dentre eles, destacam-se a presença de ácidos orgânicos, teor de sólidos solúveis, tipos de meios de aquecimento e a adição de conservantes. A atividade de água, atmosfera e o pH do meio também são considerados fatores importantes para a resistência térmica de fungos (SLONGO, 2004; SLONGO *et al.*, 2005).

Outro agravante para a presença destes fungos no alimento é o fato de que muitos bolores termo-resistentes são micotoxigênicos, o que faz com que, atualmente, haja um controle maior quanto à sua presença no alimento (BAGLIONI, 1998).

O objetivo desta revisão é apresentar estudos sobre o desenvolvimento de bolores termo-resistentes em sucos de frutas concentrados, métodos recomendados para enumeração destes fungos e a influência da composição do suco na sobrevivência dos ascósporos após o tratamento térmico.

REVISÃO DA LITERATURA

• CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DOS FUNGOS TERMO-RESISTENTES

A forma sexuada dos bolores termo-resistentes é que lhes confere a resistência. A interação sexual se inicia entre hifas compatíveis e após a plasmogamia (fusão da parede celular) e cariogamia (fusão dos núcleos), havendo formação de um núcleo diplóide. Através de uma divisão meiótica, o núcleo passa a ter quatro ascósporos haplóides, que por mitose formam oito ascósporos. Estes ascósporos ficam encerrados em estruturas conhecidas como ascos, razão pela qual estes fungos são chamados de Ascomicetos. Quando os ascos amadurecem, os ascósporos são liberados (SALOMÃO, 2002).

Muitos bolores termo-resistentes possuem uma forma mais eficaz de proteger seus esporos sexuados, envolvendo os ascos em estruturas conhecidas por “ascocarpos”. Muitos bolores termo-resistentes formam ascocarpos do tipo “cleistotécio” ou “gimnotécio”. Ambos os ascocarpos possuem estrutura globosa e fechada, liberando os ascos na maturidade ou por desintegração da membrana. O gimnotécio difere do cleistotécio por ser um ascocarpo constituído de hifas frouxamente entrelaçadas (SALOMÃO, 2002). Estes Ascomicetos, por serem fungos perfeitos, possuem um ciclo de vida assexuado e sexuado. A forma predominante (assexuada ou sexuada) no meio irá depender de uma série de fatores, tais como: temperatura de incubação, meio de cultivo, pH, entre outros.

• ESPÉCIES DE FUNGOS TERMO-RESISTENTES

Os fungos termo-resistentes mais comumente envolvidos na deterioração de alimentos são o *Byssochlamys fulva* e *Neosartorya fischeri*, capazes de resistir a um tratamento térmico feito em temperaturas superiores a 90° C (HOFFMANN, 2008; SALOMÃO *et al.*, 2008). Outros gêneros citados como termo-resistentes são *B. nivea*, *Talaromyces flavus* e *Eupenicillium* sp.

• GÊNERO *Byssochlamys*

Os fungos do gênero *Byssochlamys* são caracterizados pela ausência de cleistotécio, gimnotécio ou qualquer outro corpo que envolva os ascos durante o desenvolvimento. Os ascos em *Byssochlamys* são produzidos em cachos irregulares abertos, contendo geralmente oito ascósporos em associação com fragmentos de hifas brancas. O habitat do *Byssochlamys* é o solo, na qual as frutas podem tornar-se contaminadas com *Byssochlamys* (BAGLIONI, 1998).

O gênero *Byssochlamys* é resistente ao calor e capaz de crescer sob tensões de oxigênio muito baixa e de produzir enzimas pectinolíticas. A combinação dessas três características fisiológicas fazem o gênero *Byssochlamys* muito importante como deteriorante de leites pasteurizados e conservas de frutas podendo causar grandes prejuízos econômicos (HOUBRAKEN *et al.*, 2006).

Além de causar a deterioração dos produtos pasteurizados, algumas espécies de *Byssochlamys* também são capazes de produzir micotoxinas, incluindo patulina, byssotoxina A e ácido bissoclâmico. (HOUBRAKEN *et al.*, *loc. cit.*).

De acordo com a literatura quatro espécies de *Byssochlamys* já foram descritas: *B. fulva*, *B. nivea*, *B. zollerniae* e *B. verrucosa*. As espécies *B. fulva* e *B. nivea* são as mais citadas como deteriorantes e produtoras de micotoxinas em alimentos. A espécie *B. fulva* foi isolada de frutas recém colhidas, particularmente uvas, morangos e ameixas. É encontrada, também, em morangos processados, sucos de frutas e alimentos infantis à base de frutas (HOUBRAKEN *et al.*, *loc. cit.*, SALOMÃO *et al.*, *loc. cit.*). À 25° C, forma colônias no MEA (*Malt Extract Agar*) e CYA (*Czapek Yeast Extract Agar*) de aspecto um pouco flocoso, castanho-verde oliva, com cor similar mais clara no reverso (Figura 1). A formação de conídios é abundante. A 30° C, a produção de conídios no MEA e CYA é moderada. As colônias são amarronzadas, com partes esbranquiçadas provenientes das hifas onde os ascos são produzidos; o reverso da colônia varia de castanho-verde oliva a castanho escuro. No MEA e CYA seus ascos atipicamente não estão encerrados em ascocarpos e, ao contrário da espécie *B. nivea*, não forma clamidósporos (BEUCHAT & PITT, 2001).

Os ascos se formam melhor a 30 °C, maturando em 7-12 dias; a 25° C, o teleomorfo se forma em culturas novas, mas apresentam maturação lenta, quando ocorre. Os ascos são esféricos a subsféricos e os ascósporos são elipsoidais, hialinos, cor de palha (Figura 2). O anamorfo é mais bem observado a 25 °C e consiste de penicílios do *Paecilomyces fulvus*.



Figura 1. *Byssochlamys fulva* crescendo no MEA (a) e em CYA (b), respectivamente (KUBÁTOVÁ, 2006).

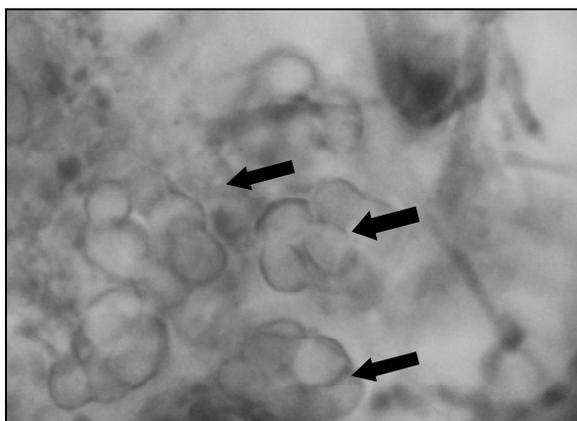


Figura 2. Ascospores do *Byssochlamys fulva* (setas). Aumento: 1200x. (MAGALHÃES *et al.*, 2009).

- **GÊNERO *Neosartorya***

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

A análise macroscópica deste fungo é realizada principalmente em meios CYA e MEA (PITT & HOCKING, 1985). A 25° C, o bolor forma no CYA e MEA colônias algodonosas com micélio que varia da cor branca a creme, com grande produção de cleistotécios brancos (Figura 3).



Figura 3 *Neosartorya* no MEA, formando colônias com círculos concêntricos (MAGALHÃES *et al.*, 2009).

As colônias podem ter cabeças conidiais esverdeadas espalhadas com reverso amarelado. Os cleistotécios brancos amadurecem em 1–2 semanas a 25° C; os ascosporos são elipsoidais, ornamentados com duas saliências longitudinais (Figura 4). O anamorfo (Figuras 5 e 6) é o *Aspergillus fischerianus*, do tipo unisseriado (BEUCHAT & PITT, 2001).

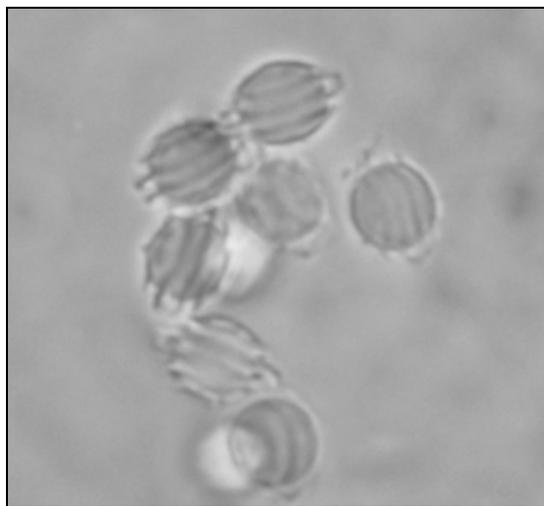


Figura 4. Ascosporos equatoriais do *Neosartorya fischeri*. Aumento: 1200x. (MAGALHÃES *et al.*, 2009).



Figura 5. Visualização da forma anamorfa aspergilar da *Neosartorya*. Aumento: 400x (MAGALHÃES *et al.*, 2009).



Figura 6. Colônias do fungo *Neosartorya fischeri* crescido em suco, mostrando a forma aspergilar (assexuada) e sexuada (regiões em branco), formando círculos concêntricos (MAGALHÃES *et al.* 2009).

- **GÊNERO *Talaromyces***

Talaromyces é um gênero de bolor deteriorante de frutas e produtos derivados, comumente encontrado em suco de polpas comerciais congeladas de morango (SALOMÃO, 2002).

O gênero caracteriza-se pela produção de gimnotécios brancos ou amarelados em associação com o estado anamórfico característico de *Penicillium*, *Paecilomyces* ou *Geosmithia*. Gimnotécio é o ascocarpo composto por hifas finas entrelaçadas resultando numa estrutura mais ou menos fechada de tamanho indeterminado.

A espécie mais comumente isolada de alimentos ácidos termoprocessados é o *Talaromyces macrosporus*. O anamorfo desta espécie é o *Penicillium macrosporus*. No meio CYA a 25 °C, observa-se um micélio amarelo a brilhante, com formação ocasional de exsudados avermelhados. No MEA, as colônias possuem coloração similar, mas são maiores que no CYA (Figura 7); observa-se também neste meio uma formação abundante de gimnotécios. Os gimnotécios são de cor amarelo brilhante e amadurecem após duas semanas, com ascosporos amarelos, elipsoidais, com paredes espinhosas. Neste meio de cultura a 30°C, ocorre formação de pigmento vermelho solúvel no agar (BEUCHAT & PITT, 2001).

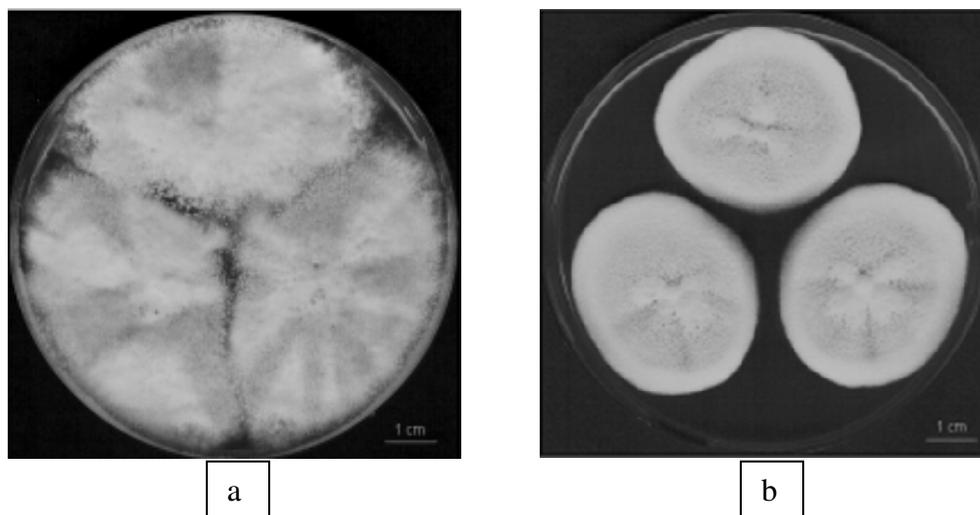


Figura 7. Crescimento do *Talaromyces macrosporus* em meios de cultura MEA (a) e CYA (b) (KUBÁTOVÁ, 2006).

- **GÊNERO *Eupenicillium***

O fungo *Eupenicillium* spp. tem a capacidade de produzir esporos de parede lisa, com formato esférico a ovóide, sendo comum a visualização de cleistotécio que, posteriormente, liberará no meio ascos contendo oito ascosporos. Suas características de crescimento em CYA são de crescimento rápido e denso, com micélio amarelo e pouco exsudado sem cor, sendo seu reverso usualmente âmbar (PITT & HOCKING 1985).

Segundo TOURNAS (1994), o fungo *Eupenicillium brefeldianum* é o principal microrganismo responsável pela deterioração de sucos na África. ARAGÃO (1989) demonstrou em seus estudos com suco de morango que a espécie de maior incidência se tratava de *Eupenicillium* com capacidade de resistência térmica maior do que a citada por outros autores.

MICOTOXINAS EXCRETADAS POR BOLORES TERMO-RESISTENTES

Os fungos termo-resistentes podem produzir diferentes metabólitos secundários tóxicos, entre os quais estão a patulina, o ácido bissoclâmico, byssoxina A, assimetrina e variotina (*B. fulva* / *B. nivea*), terreina, verruculogena, fumitremorginas A, B, C, fischerina (*N. fischeri*) todas com efeitos tóxicos comprovados em animais (TANIWAKI & DA SILVA, 2001; HOFFMANN, 2008).

- **PATULINA**

A patulina é a 4-hidroxi-4Hfuro[3,2-c]piran-2(6H)-ona, uma lactona do grupo dos policetídeos. Esta micotoxina é sintetizada por espécies de *Aspergillus* (*A. clavatus*, *A. terreus*), *Penicillium* (*P. urtical*, *P. expansum*) e *Byssochlamys* (*B. nivea*, *B. fulva*). *B. nivea* foi capaz de produzir esta micotoxina, quando o fungo se desenvolveu em produtos armazenados a temperatura ambiente. As frutas mais atingidas foram maçã, abacaxi, uva e morango, utilizadas na fabricação de sucos concentrados (MELLO, 2004).

Primeiramente, esta micotoxina foi descrita como um antibiótico, sendo posteriormente comprovado seu alto grau de toxicidade para tal fim. Ensaios em humanos demonstraram que a patulina causa hiperemia, congestão e lesões hemorrágicas, particularmente no trato gastrointestinal, náuseas e vômitos (TOURNAS, 1994).

PRIETA *et al.* (1992) & MAHFOUD *et al.* (2002), propuseram que ela altera a função de barreira das células do epitélio intestinal, levando a injúrias e degeneração celular com conseqüente inflamação e hemorragia. WICHMANN *et al.* (2002) demonstraram que esta micotoxina seria capaz de diminuir a produção de γ -interferon (IFN-gama) por linfócitos T-helper (Th1), sendo um fator de risco para o desenvolvimento de doenças alérgicas.

• FUMITREMORGINAS E VERRUCULOGENA

As fumitremorginas A e B (HOIRE & YAHMAZAKI, 1981) e verruculogena (PATTERSON *et al.*, 1981) são provenientes de linhagens de *N. fischeri*. As últimas três micotoxinas são membros do grupo das fumitremorginas, que inclui ainda fumitremorginas C e TR-2 (COLE *et al.*, 1974). Estas toxinas agem no sistema nervoso central causando tremores, convulsões e a morte de animais (PERERA *et al.*, 1982; YAMAZAKI, *et al.*, 1971; YAMAZAKI, *et al.*, 1979). A verruculogena é a mais tóxica, causando tremores em suínos e ovelhas numa concentração de 5 a 10 mg/kg de peso corporal, administrado por meio intravenal (PERERA *et al.*, 1982).

Dependendo do alimento e das condições de armazenagem, o bolor excreta fumitremorgina A, B e C e verruculogena (BAGLIONI, 1998, CARRILO, 2003).

• MÉTODOS DE ENUMERAÇÃO DE BOLORES TERMO-RESISTENTES

Um dos métodos mais citados na bibliografia especializada sobre enumeração de bolores termo-resistente é o elaborado por BEUCHAT & PITT (2001). O método baseia-se na inativação pelo calor de formas vegetativas (forma assexuada) e eliminação de células bacterianas e também de esporos fúngicos não resistentes ao calor. O tratamento térmico ativa os ascósporos de bolores termo-resistentes, que após o abaixamento da temperatura, irão germinar. A temperatura e condições do tratamento térmico variam de acordo com o bolor termo-resistente. Uma vez que os ascósporos, após o tratamento térmico, encontram-se fragilizados, os autores recomendam correções na amostra, de forma a evitar um *stress* adicional durante o tratamento térmico. Outro fator importante na metodologia preconizada pelos autores é decorrente da baixa concentração dos ascósporos normalmente encontrada nos alimentos. Por conseguinte, na detecção de bolores termo-resistentes é importante se analisar grandes volumes de amostra.

BEUCHAT & PITT (*loc. cit.*), elaboraram dois métodos de Enumeração de Bolores Termo-resistentes, quais sejam:

• PLAQUEAMENTO

Frutas e produtos contendo pedaços de frutas devem ser misturados ou homogeneizados antes da análise. Colocar no jarro do liquidificador 100 g da amostra e 100 mL de água estéril. Agitar por 5 minutos ou até se obter uma mistura homogênea. Após a agitação, fechar o jarro usando um saco de polietileno e colocá-lo em banho-maria ajustado a 75 – 80° C por 1,5 horas. Este procedimento assegura que o homogeneizado ficará pelo menos 30 minutos a 75° C.

A mistura 100 g de amostra e 100 mL de água estéril pode também ser homogeneizada no *stomacher* por 2 – 4 minutos. Após a homogeneização, tirar duas porções de 50 mL e colocá-las em tubos de ensaio estéreis de 200 x 30 mm. Os tubos deverão ser incubados em um banho-maria a 75 – 80° C por 30 minutos.

As amostras nos jarros ou tubos de ensaio devem estar bem mergulhadas no banho-maria. Após o período estipulado, as amostras devem ser rapidamente resfriadas à temperatura ambiente, podendo ser empregado um banho de gelo. Após o aquecimento, cada duplicata de 50 mL, obtida do homogeneizado no liquidificador ou do *stomacher*, será misturada com 10 mL de PDA (*Potato Dextrose Agar*) ou MEA liquefeitos, preparados 1,5 vezes mais concentrados. A mistura deve ser vertida em 4 placas de Petri de 150 mm de diâmetro. As placas devem ser embaladas em sacos de plástico para evitar ressecamento e incubadas a 30° C por 30 dias e examinadas semanalmente. Ascosporos viáveis irão germinar e formar colônias dentro de 7 a 10 dias; contudo, os ascosporos que foram injuriados pelo tratamento térmico irão necessitar de um tempo de incubação maior. O tempo de 30 dias de incubação é suficiente para o amadurecimento e esporulação do bolor, o que irá auxiliar na sua identificação.

Sucos de frutas com Brix (1 °Brix = 1 g de sacarose por 100 g de solução) inferior a 35° são analisados da forma acima descrita; sucos com Brix superior a 35° e também concentrados de frutas devem ser diluídos na proporção 1:2, usando água estéril e misturados antes do tratamento térmico ser aplicado.

Amostras de baixa acidez estão sujeitas à contaminação bacteriana, por conseguinte, devem ser acidificadas ou acrescidas de cloranfenicol. Amostras muito ácidas devem ter o seu pH ajustado entre 3,4 -3,6 utilizando solução de NaOH 10%. A contaminação da amostra nesta técnica é muito grande, ocorrendo principalmente no instante em que a amostra é vertida para as placas.

• INCUBAÇÃO DIRETA

Neste método evita-se a contaminação que ocorre no procedimento anterior, quando da transferência da amostra para as placas de Petri e também impede o ressecamento do agar, durante a incubação.

Alíquotas de 50 mL de amostras já homogeneizadas são aquecidas em recipientes do tipo frasco Roux em banho-maria a 80° C por 30 minutos e então incubadas de forma a se ter uma posição com maior área superficial (obtida pela inclinação dos frascos), a 30° C, por 30 dias. Amostras de volumes maiores que 100 mL podem ser analisadas por esta técnica. Uma desvantagem deste método é que fica mais difícil a retirada de amostras do bolor da superfície do suco para posterior identificação.

INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DO SUCO NA RESISTÊNCIA TÉRMICA

• ATIVIDADE DE ÁGUA

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 influência da atividade de água sobre o crescimento de *B. nivea* foi estudada 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.

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 (SLONGO, 2004).

Em estudo citado por ZIMMERMANN (2008), foi avaliado o crescimento de *Neosartorya* sp. em agar contendo sucos de frutas (agar suco de manga, agar suco de laranja e agar suco de abacaxi) contendo várias concentrações de açúcar adicionadas. A adição de sacarose nas concentrações de 10% para o suco de abacaxi, 11,5% para o suco de laranja e 9% para o suco de manga aumentou o número de colônias. Entretanto, a adição de sacarose nas concentrações iguais ou superiores a 30 % para suco de abacaxi, 31,5% para suco de laranja e 29% para suco de manga, diminuíram o número de colônias produzidas.

- **pH**

De acordo com TOURNAS (1994), é bastante ampla a faixa de pH em que os fungos termo-resistentes podem crescer em um dado meio, como o *Neosartorya fischeri*, que cresce em pH's entre 3,0 e 7,95 e o *Byssochlamys* spp, que cresce em meios com pH entre 2,0 e 9,0, estando por volta de pH 3,0 o ideal. Desta forma, observa-se que a faixa é bem ampla, inviabilizando a inibição do crescimento destes fungos em alimentos pela correção do pH (HOFFMANN, 2004).

SALOMÃO *et al.* (2004) observaram que um aumento do pH do meio de aquecimento leva a um aumento do tempo de inativação dos ascósporos a temperaturas menores que 90°C, onde concluíram que devido à grande resistência térmica dos ascósporos de *N. fischeri*, os tratamentos térmicos comercialmente aplicados ao concentrado de maçã (95°C/30s) não são suficientes para fornecer um grau de segurança que garanta a probabilidade de sobrevivência de um ascósporo a cada 10⁵ embalagens.

- **PRESENÇA DE ÁCIDOS ORGÂNICOS**

BEUCHAT (1988) investigou três cepas de *Talaromyces flavus* em relação à sua tolerância a ácidos orgânicos após exposição a temperaturas elevadas e constatou que os ácidos fumárico, sórbico e benzóico foram explicitamente mais letais do que os ácidos acético, málico, cítrico e tartárico. A letalidade foi reforçada quando o pH do meio de aquecimento foi reduzido de 5,0 para 2,5. De acordo com o autor, os efeitos dos ácidos na viabilidade dos ascósporos variaram em função da cepa e de outros constituintes do meio de aquecimento. Os ascósporos de uma cepa de *T. flavus* com maior termo-tolerância mostraram-se maiores e de formato elipsóide menor do que os ascósporos das cepas de menor termo-tolerância. Segundo BEUCHAT & PITT (2001), geralmente a porcentagem de inativação térmica de ascósporos em suco de uva é menor do que em suco de manga, e a natureza protetora de certos constituintes do suco de uva (como os ácidos orgânicos) é que influenciam este fenômeno.

• TEOR DE SÓLIDOS SOLÚVEIS

SLONGO *et al.* (2005) verificaram, em suco de mamão, que o aumento do *ratio* (°Brix/acidez), ou seja, em concentrações elevadas de açúcar e baixa acidez, a atividade de água do meio de aquecimento é menor, o que protege os ascósporos, resultando, com isso, no aumento da sua resistência térmica, em comparação com ascósporos presentes em meios com pouca ou nenhuma concentração de açúcar.

O *ratio* é calculado através da razão entre o valor do °Brix e a acidez, normalmente expressa em g de ácido cítrico/100 mL de suco. Esta acidez é calculada pela titulação com NaOH 0,1 N de 25 mL do suco em presença de fenolftaleína e determinada pela equação:

Peso em gramas de ácido cítrico/100 mL = $N_{\text{real}} \times V \times 0,064 \times 4$, onde:

N_{real} = Normalidade real da solução de NaOH, calculada multiplicando-se a N_{teo} x fator;

V = volume de NaOH gasto na titulação em mL;

0,064 = miliequivalente-grama do ácido cítrico

• MEIOS DE AQUECIMENTO

CONNER & BEUCHAT (1987) avaliaram o crescimento de ascósporos de três cepas de *Neosartorya fischeri* em diferentes meios de esporulação (suco de maçã, suco de uva e tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0). Os ascósporos, de população inicial aproximada de 10^6 /mL, crescidos nos três meios sobreviveram ao tratamento térmico de 84°C por 120 minutos, verificando-se que a taxa de inativação térmica dos ascósporos foi menor no suco de maçã do que no suco de uva e no tampão fosfato. O ácido fumárico, a 1 e 2% e valores de pH em 2,5, 3,0 e 3,5, aumentou significativamente a taxa de inativação térmica dos ascósporos. Nas mesmas concentrações e valores de pH, os ácidos acético, cítrico e tartárico proporcionaram aumento moderado nas taxas de inativação. O ácido málico apresentou pouca influência na taxa de inativação. As taxas de inativação aumentaram quando os valores de pH dos meios contendo os ácidos fumárico, cítrico, tartárico e acético diminuíram. Assim, o pH, o tipo, o percentual e a molaridade do ácido orgânico no meio de aquecimento agem sinergicamente com o calor para inativar os ascósporos de *N. fischeri* (CONNER & BEUCHAT, 1987).

Em outra pesquisa sobre fatores que interferem na resistência térmica de ascósporos de *Talaromyces flavus*, BEUCHAT (1988) investigou a influência do meio de crescimento, temperatura de incubação, idade e açúcares, como sacarose, glicose e frutose em suco de maçã. Dos oito meios estudados, as fórmulas ricas em carboidratos apresentaram os maiores índices de produção de ascósporos. Aqueles resistentes ao calor desenvolveram-se mais rapidamente em agar aveia e, em todas as etapas, o aumento de sua tolerância ao calor foi correlacionada à idade das culturas, acima de 30 dias de incubação. Uma pequena mudança na tolerância ao calor foi notada em culturas de idades entre 30 e 58 dias. A resistência térmica foi menor quando *T. flavus* cresceu a 21°C, comparado a 25° e 30°C.

A proteção contra a inativação térmica aumentou quando os ascósporos foram aquecidos em suco de maçã suplementado com açúcares em concentrações suficientes para reduzir a atividade de água para 0,96, com 60% de sacarose, 34,5% de glicose e frutose. Este efeito protetor não foi influenciado pelo tipo de açúcar (BEUCHAT, 1988). No estudo de GUMERATO (1995) foi isolado o fungo *Neosartotya fischeri* presente na matéria prima, em polpa de maçã, e no concentrado de maçã, mesmo depois deste último produto ter passado por efeitos térmicos da pasteurização e concentração, demonstrando potencial de resistência térmica do isolado.

- **ADIÇÃO DE CONSERVANTES**

King *et al.* (1969) investigaram a adição de dióxido de enxofre (SO₂) em suco de uva para inativação de ascósporos de *Byssoschlamys fulva*, verificando que os valores da redução decimal (D) a 88°C foram 4,5 e 1,6 minutos correspondentes à adição de 90 e 250 ppm de SO₂, respectivamente. Por outro lado, o controle (sem adição de SO₂) apresentou um valor D (88° C) de 8,8 minutos, indicando que o uso de SO₂ influencia significativamente a inativação térmica de ascósporos.

Sete anos mais tarde, foi observado que o SO₂ em concentrações muito baixas (50 ppm) reduziram a termo resistência de *B. nivea* (BEUCHAT, 1976). SLONGO (2004) cita um estudo em que se trabalhou com ascósporos de *Neosartorya 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 %), foram avaliados 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. Com o propósito de fornecer subsídios quanto ao uso de quantidades mais racionais de conservantes pela indústria de alimentos e, portanto, tornar seu consumo menos danoso à população, LÓPEZ *et al.* (2009) determinaram *in vitro* a concentração mínima de metabissulfito de sódio, benzoato de sódio e sorbato de potássio necessária e suficiente para inibir o crescimento micelial e a germinação de ascósporos de *Byssoschlamys fulva*, *Neosartorya fischeri* e *Talaromyces flavus* em meio de cultivo acidificado (pH 3,5). Foi demonstrado que metabissulfito de sódio em baixas concentrações é tão eficiente na inibição dos fungos mencionados quanto aos demais conservantes em altas concentrações. Por comparação com os procedimentos utilizados pelas indústrias de alimentos, é possível inferir que estas podem reformular o uso de conservantes, considerando-se o tipo de matéria-prima, a temperatura de processamento, a combinação e concentração efetivamente necessária de aditivos, bem como os efeitos tóxicos desses compostos para a saúde humana (LÓPEZ *et al.*, 2009).

- **TEMPO (IDADE) E TEMPERATURA DE PRODUÇÃO DE ASCOSPOROS**

Ainda segundo BEUCHAT (1988), enquanto as duas cepas são conhecidas por desenvolverem termotolerância de acordo com a idade, não há diferenças externas em relação à forma e tamanho que possam ser discriminadas entre os ascósporos, quando da influência da idade (11 e 51 dias) das culturas. Entretanto, TOURNAS e TRAXLER (1994), em estudos com *N. fischeri* com idades de 1, 2, 3 e 6 meses de produção e isolados de abacaxi observaram que os ascósporos com maior idade apresentaram resistência térmica superior aos de menor idade. Em seu trabalho sobre resistência térmica de *Byssoschlamys nivea* e *Talaromyces flavus* em suco de maçã, HOFFMANN (2004) cita um estudo sobre resistência térmica com o fungo *T. flavus* nas temperaturas de 20, 25, 30 e 35° C, onde foi observada uma produção abundante de ascósporos nas temperaturas de 25, 30 e 35° C e limitada a 20°C, mostrando que a temperatura de crescimento do fungo é fundamental para sua resistência térmica. A autora menciona, também, que as temperaturas de incubação entre 28 e 35° C são ótimas para crescimento e produção de ascósporos de *Byssoschlamys*, mas existem isolados que, se forem incubados abaixo de 30°C em um meio sintético, perdem irreversivelmente a capacidade de formar ascos. Em outra pesquisa citada, também, por HOFFMANN (2004), sugere-se que é necessária a incubação de culturas de *Byssoschlamys* a 30° C em laboratório para a observação de ascos e ascósporos, já que alguns isolados não produzem ascos a 25 e 37° C.

Outro trabalho citado pela autora mostra testes com a influência da temperatura de incubação na produção de ascósporos de *B. nivea* em Ágar Extrato de Malte (MEA), por 21 dias, onde se verificou que, nas temperaturas 20 e 37° C, a produção de ascósporos foi bem menor em relação à produção em 25 e 30° C, obtendo-se em 30° C o maior número de ascósporos.

- **ATMOSFERA (O₂, CO₂, N₂)**

O tipo de embalagem escolhida para o condicionamento do suco de frutas é muito importante para a manutenção de suas características nutricionais e organolépticas. No caso de contaminação do suco por bolores termo-resistentes é de crucial importância a ausência de oxigênio, devido a estes microrganismos serem aeróbios estritos. De acordo com Correa Neto (1999), o oxigênio exerce grande influência na qualidade e estabilidade do suco de frutas, podendo estar presente no produto de forma dissolvida, no espaço livre da embalagem (*headspace*) ou ainda ser permeado através da mesma. Contudo, a presença de ascósporos de *B. fulva* foi detectada em alimentos pasteurizados e armazenados em embalagens cartonadas, tipo TetraPak[®], o que mostra um comportamento incomum para um fungo filamentosos (RICE, 2006).

Em trabalho realizado com sucos de frutas, ZIMMERMANN (2008) cita um estudo realizado para verificar o crescimento de fungos e produção de micotoxinas em atmosfera modificada, em que foi observado que *B. nivea* foi capaz de crescer em atmosferas com 20% ou 40% de CO₂ e menos que 0,5% de O₂. Neste mesmo trabalho, a autora menciona outro estudo onde foi verificado que o crescimento de *B. nivea* era comprometido quando o mesmo crescia em atmosferas com elevadas concentrações de CO₂, o que proporcionou a redução do crescimento do micélio, onde, em alguns casos, como para atmosfera de 100% de CO₂, este fungo apresentou um crescimento de apenas 4% em relação ao seu crescimento normal. Em outra pesquisa mencionada pelo mesmo autor, foi realizado estudo de tolerância do crescimento de fungos termo-resistentes (*B. fulva*, *T. flavus* e *N. fischeri*) sob baixas tensões de O₂ e demonstrado que o fungo *T. flavus* é o menos tolerante a baixos níveis de oxigênio, em relação aos demais.

Em estudo realizado com suco de abacaxi (12,6°Brix) e concentrado de abacaxi (42,7°Brix), TOURNAS E TRAXLER (1994) constataram que o aumento do tempo (idade) de produção dos ascósporos de *N. fischeri* proporcionou o aumento da resistência térmica deste fungo em ambas as condições do meio de aquecimento (suco e concentrado), evidenciado pelo aumento do valor de D deste fungo à temperatura de 88°C. Com estas observações, estes autores observaram que a resistência térmica do fungo aumenta com o aumento do *ratio*, que é a relação entre °Brix e acidez (°Brix/acidez). SLONGO *et al.* (2005) verificaram o mesmo perfil para a resistência térmica do *N. fischeri*, em relação ao *ratio*, em suco de mamão e que o aumento da temperatura de produção leva a um aumento da resistência térmica do fungo.

MEDIDAS ADOTADAS PARA A ELIMINAÇÃO DE BOLORES TERMO-RESISTENTES EM SUCOS DE FRUTAS

- **BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO**

Como boa parte dos fungos termo-resistentes residem no solo, podendo contaminar frutas e posteriormente as linhas de seu processamento, as Boas Práticas de Fabricação (BPF) tornam-se imprescindíveis para a obtenção de produtos com qualidade assegurada (SBRT, 2007).

As BPF são um sistema de qualidade que assegura uma produção controlada 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 termo-resistentes; lavagem e sanitização 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 e, por fim a água de lavagem das frutas deverá ser sempre desprezada (SBRT, 2007).

WELKE *et al.* (2009), em investigação da ocorrência de fungos termo-resistentes em suco de maçã, constataram que a pasteurização empregada durante a produção do suco não foi eficiente para eliminar fungos do gênero *Byssochlamys*, implicando em possível deterioração do produto durante o armazenamento e na produção de patulina. De acordo com os autores, a inativação de fungos termo-resistentes é um processo complexo, em que é necessário aplicar processos térmicos severos ou uso da chamada tecnologia de barreiras através da combinação de métodos de custo elevado. Considerando estes fatores, é importante controlar a contaminação das frutas através da aplicação de boas práticas agrícolas, principalmente durante a colheita, transporte e armazenamento das frutas (WELKE *et al.*, *loc. cit.*).

• CINÉTICA DE MORTE MICROBIANA

Grande parte dos microrganismos apresenta um comportamento logarítmico frente à inativação térmica por métodos de esterilização, no qual é o processo que objetiva destruir todas as formas de vida com capacidade de desenvolvimento durante os estágios de conservação e de utilização do produto.

Desta maneira, uma linha reta é obtida quando se constrói uma curva de morte, “plotando” o logaritmo do número de sobreviventes versus tempo de aquecimento a uma dada temperatura (KING JR *et al.*, 1979).

A cinética de inativação térmica de microrganismos que possuem uma taxa de morte logarítmica é feita pela determinação dos parâmetros D e Z (graus de temperatura requeridos para ocasionar uma variação de 10 vezes no valor de D) que podem ser obtidos a partir regressão dos dados da própria curva de sobreviventes.

Conforme KOTZEKIDOU (1997), o bolor *B.nivea* apresentou valores D a 85°C (D₈₅) de 19,8 minutos e *B.fulva* demonstrou resistência até 24,1 minutos, enquanto *N. fischeri* a esta mesma temperatura apresentou resistência de 13 minutos. O bolor *T. flavus* apresentou valores D a 91° C, para as duas linhagens mais resistentes de que variaram de 2,9 a 11,7 minutos, sendo que a linhagem menos resistente apresentou um valor D máximo igual a 2,2 minutos a 79° C. As linhagens de *N. fischeri* apresentaram entre si, praticamente a mesma resistência, com valor D a 91°C, menor que 2,0 minutos. *B. spp* não se mostraram muito resistentes, apresentando valores D superiores a 2,0 minutos somente em temperaturas abaixo de 77° C. Em produtos de morango, o D para *T. flavus* a 91° C variou de 3,9 a 11,7 minutos e para *N. fischeri* foi menor que 2 minutos, à mesma temperatura (ARAGÃO 1989; SALOMÃO, 2002).

Estudos mais recentes informam que *B. nivea* apresentou valores D_{85} de 45,45 minutos, D_{90} em 4,56 minutos e D_{95} em 1,21 minutos e *N. fischeri* com valores $D_{85}=30,3$ minutos, $D_{90}=3,43$ minutos e $D_{95}=1,06$ minutos. Isto indica alta resistência térmica destes fungos termorresistentes em tempos considerados inviáveis para a pasteurização do alimento (acima de 85 °C em mais de 10 segundos) sem causar danos nas condições organolépticas dos produtos alimentares (SLONGO, 2007).

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

CONCLUSÕES

Com base nos resultados sobre incidência e resistência dos fungos em produtos a base de frutas, pode-se dizer que devido à elevada resistência dos esporos há uma grande probabilidade desses microrganismos serem encontrados no produto final, mesmo com a utilização de métodos combinados, como adição de conservantes, filtração em terra diatomácea e tratamento termoquímico (envolvendo aquecimento e resfriamento, temperatura, atmosfera com objetivo de alterar as propriedades aspecto visual e composição química).

Cabe considerar, também, a procedência da matéria-prima, quanto ao local de cultivo (solo, clima, adubo) e forma de colheita (se a fruta tiver sido retirada diretamente do pé ou do chão). Estes aspectos influenciam, respectivamente, nas características físico-químicas do produto, em termos de pH, sólidos totais, atividade de água, produção de ácidos orgânicos pela fruta, tendo, também, implicações microbiológicas por contaminação fúngica, quando da retirada da fruta do solo.

Logo, o uso de matéria-prima de boa qualidade e a adoção das Boas Práticas de Fabricação, que incluem o uso de matéria-prima de boa qualidade, a lavagem e seleção adequada da matéria prima, a certificação dos fornecedores, a sanitização e as condições assépticas das áreas de processamento, são medidas de controle contra a multiplicação tanto para fungos termo-resistentes quanto para os demais microrganismos comuns à planta de processamento de sucos concentrados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAGÃO G.M.F. **Identificação e determinação de resistência térmica de fungos filamentosos termo-resistentes isolados de polpa de morango**. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos – FEA. Campinas: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 1989. 139p.
- BAGLIONI F. **Estudo da ocorrência de fungos filamentosos termo-resistentes em polpa de tomate envasada assepticamente**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos – FEA. Campinas: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 1998.
- BAGLIONI F.; GUMERATO H.F.; MASSAGUER P.R. Ocorrência de fungos filamentosos termo-resistentes em polpa de tomate envasada assepticamente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 19(2), 1999. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010120611999000200019&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 27/07/2010.
- BARATA A; SEBORRO F.; BELLOCH C.; FERREIRA M; LOUREIRO V. Ascomycetous yeast species recovered from grapes damaged by honeydew and sour rot. **Journal of Applied Microbiology**, 1364-5072, 2007.
- BEUCHAT L.R. Effectiveness of various food preservatives in controlling the outgrowth of *B. nivea* ascospores. **Mycopathologia**, 59(3), 175-178, 1976, *apud* BEUCHAT L.R. Extraordinary heat resistance of *Talaromyces flavus* and *Neosartorya fischeri* ascospores in fruit products. **Journal of Food Science**, 51(6), 1506-1510, 1986.
- BEUCHAT L.R.. Influence of organic acids on heat resistance characteristics of *Talaromyces flavus* ascospores. **International Journal of Food Microbiology**, 6(2), 97-105, 1988. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em 09/11/2010.

- BEUCHAT L.R. Thermal tolerance of *Talaromyces flavus* ascospores as affected by growth medium and temperature, age and sugar content in the inactivation medium. **Transactions of the British Mycological Society**, **90**(3), 359-364, 1988. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em 09/11/2010.
- BEUCHAT L.R.; PITT J.I. Detection and enumeration of heat resistant molds. In: VANDERZANT, C. & SPLITTSTOESSER D.F. (Eds.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Washington DC: American Public Health Association, 239-249, 1992.
- BEUCHAT L.R.; PITT J.I. Detection and enumeration of heat resistant molds. In: VANDERZANT, C. & SPLITTSTOESSER, D.F. (Eds.) **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 3^a ed., Washington: A.P.H.A., 1992. 251-253.
- BEUCHAT L.R.; PITT J.I. Detection and enumeration of heat-resistant molds. In: **Compendium of Methods for the microbiological examination of molds**. 4th. ed., 2001. 217-220.
- CAMARGO G.A.; CONSOLI L.; LELLIS I.C.S.; MIELI J.; SASSAKI E.K. Bebidas naturais de frutas: perspectivas de mercado, componentes funcionais e nutricionais. **BioEng.**, **1**(2), 179-205, 2007.
- CARRILLO C. **Los hongos de los alimentos y forages**. Univ. Nac. Salta, 2003.
- COLE R.J. A new tremorgenic metabolite from *Penicillium paxilii*, **Canadian Journal of Microbiology**, **20**, 1159-1162, 1974.
- 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**, **4**(4), 303-312, 1987. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em 09/11/2010.
- CORRÊA-NETO R.S; FÁRIA J.A.F. Fatores que incluem na qualidade do suco de laranja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, **19**(1), 1999.
- EIROA G.; AMSTALDEN V.C. Ocorrência de espécies de *Byssoschlamys* em hortas, pomares e vinhedos da região de Campinas. **Col. ITAL**, **15**(1), 61-70, 1985.
- GUMERATO F.H. **Desenvolvimento de um programa de computador par identificação de alguns fungos comuns em alimentos e determinação da resistência térmica de *Neosartorya fischeri* isolado de maçãs**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). 1995. 106p.
- HASHIZUME T. **Fabricação de vinhos de frutas**. ITAL, Campinas, 1991.
- HOFFMANN M.G.S. **Estudo de resistência térmica de *Byssoschlamys nivea* e *Talaromyces flavus* em néctar de maçã**. Florianópolis, SC: Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Santa Catarina: Universidade do Sul de Santa Catarina. 2004. 102p. Disponível em: <http://www.tede.ufsc.br/teses/PENQ0128.pdf>. Data de acesso: 01/10/2008.
- HOIRE Y.; YAMAZAKI M. Productivity of tremorgenic mycotoxins, fumitremorgins A e B in *Aspergillus fumigatus* and valled species. **Nippon Kingakkai Kaiko**, **22**, 113-119, 1981.
- HOUBRAKEN J.; SAMSON R.A.; FRISVAD J.C. *Byssoschlamys*: significance of heat resistance and mycotoxin production. In: **Advances in Food Mycology. Advances in Experimental Medicine and Biology**; **571**, 212-224, 2006.
- KUBÁTOVÁ A. **Atlas mikroskopických saprofitních hub (Ascomycota)**. Disponível em <http://botany.natur.cuni.cz/cs/atlas-mikroskopicky-ch-saprofytnich-hub-ascomycota>, 2006. Acessado 20 de dezembro de 2010.
- KING Jr. A.D.; MICHENER H.D., ITO K.A. Control of *Byssoschlamys* and related heat-resistant fungi in grape products. **Applied Microbiology**, **18**(2), 166-173, 1969.
- LÓPEZ A.M.Q.; LIMA-COELHO S.F.; FERREIRA L.F.R. Efeito *in vitro* de concentrações de metabisulfito de sódio, benzoato de sódio e sorbato de potássio sobre fungos termo-resistentes. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, **68**(2), 215-223, 2009.
- MAGALHÃES D.B; SILVA J.P.C.; SILVA D.L.D. **Influência da Composição do Suco de Laranja na Sobrevivência de Ascosporos de *Neosartorya Fischeri* e *Byssoschlamys Fulva***, Campinas: 8^o SLACA. Anais. 2009.
- MAHFOUD R.; MARESCA M.; GARMY N.; FANTINI J. The mycotoxin patulin alters the barrier function of the intestinal epithelium: mechanism of action of the toxin and protective effects of glutathione. **Toxicology and Applied Pharmacology**, **181**(3), 1209-1218, 2002.
- MELLO L.M.R. Produção e Mercado Brasileiro de Maçã. **EMBRAPA: Comunicado técnico**, **50**. 2004. Acessado em 20/01/2011. Disponível em <http://www.cnpqv.embrapa.br/publica/comunicado/>.pdf.
- MURDOCK D.I.; HATCHER W.S. A simple method to screen fruit juices and concentrates for heat resistant mold. **Journal of Food Protection**, **41**, 254-256, 1978.
- PATTERSON D.S.P.; SHREEVE B.J.; ROBERTS A.; MacDONALD S.M. Verruculogen produced by soil fungi in England and Wales. **Applied and Environmental Microbiology**, **42**(5), 916-917, 1981.

- PERERA K.P.W.C.; DAY J.B; MANTLE P.G.; RODRIGUES L. Metabolism of verrucologen in rats. **Applied Environmental Microbiology**, **43**, 503-508, 1982.
- PITT J.I. & HOCKING A.D. **Fungi and food spoilage**. Sydney: Academic Press, 1985, 413p.
- PRIETA J; MORENO M.A; BLANCO J.L. Determination of patulin by diphasic dialysis extration and thin layer chromatography. **Journal of Food Protection**, **55**(2), 1001-1002, 1992.
- RICE S.L. Patulin production by *Byssochlamys spp.* In canned grape juice. **Journal of Food Science**, **45**, 485-488, 2006.
- SALOMÃO B.C.M. **Isolamento, identificação e estudo da resistência térmica de fungos filamentosos termo-resistentes em produtos de frutas**. Florianópolis, SC; Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). 2002, 99p.
- SALOMÃO B.C.M; MASSAGUER P.R; ARAGÃO G.M.F. Isolamento e seleção de fungos filamentosos termo-resistentes em etapas do processo produtivo de néctar de maçã. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** **28**(1), 116-121, 2008.
- SALOMÃO B.C.M; MASSAGUER P.R; COSTA C.A; ARAGÃO G.M.F. Influência de diferentes pH do meio de aquecimento na resistência térmica de *Neosartorya fischeri* isolado do processo produtivo de néctar de maçã. **Alimentos e Nutrição**, **15**(1), 7-10, 2004.
- SBRT. Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas. Disponível em:<<http://sbrtv1.ibict.br/upload/sbrt-referencial2757.pdf>>. Acesso em: 14/02/2011.
- SLONGO A.P. **Estudo da influência de diferentes fatores na termorresistência do fungo *Neosartorya fischeri* em sucos tropicais**. Florianópolis, SC: **Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)**. Universidade Federal de Santa Catarina, 2004. 141p.
- SLONGO A.P; ARAGÃO G.M.F. Avaliação da resistência térmica de *Byssochlamys nivea* e de *Neosartorya fischeri* em suco de abacaxi. **Boletim do Centro de Pesquisas de Processamento de Alimentos**, Curitiba, **25**(2), 217-224, 2007.
- SLONGO A.P; MIORELLI S; ARAGÃO G.M.F. Influência de diferentes fatores na termorresistência de *Neosartoria fischeri* em suco de mamão. **Alimentos e Nutrição**, **16**(4), 377-387, 2005.
- SURESH E.R.; ETHIRAJ S.; JAYARAM H.L. Heat resistance of *Neosartorya fischeri* isolated from grapes. **Journal of Food Science and Technology**, **33**(1), 76-77, 1996.
- TANIWAKI M.H; SILVA N da. **Fungos em alimentos: ocorrência e detecção**. Campinas: ITAL, 2001.
- TOURNAS V; TRAXLER R.W. Heat resistance of a *Neosartorya fischeri* strain isolated from pineapple juice frozen concentrate. **Journal of Food Protect**, **57**(9), 814-816, 1994.
- TOURNAS V. Heat-resistant fungi of importance to the food and beverage industry. **Critical Reviews in Microbiology**, **20**(4), 243-263, 1994.
- WELKE J.E, HOELTZ M, DOTTORI H.A; NOLL I.B. Ocorrência de fungos termo-resistentes em suco de maçã. **Brazilian Journal of Food Technology**, II SSA, Janeiro, 2009.
- WICHMANN G; HERBARTH O; LEHMANN L. The mycotoxins citrinin, gliotoxin, and patulin affect interferongamma rather than interleukin-4 production in human blood cells. **Environmental Toxicology**, **17**(3), 211-218, 2002.
- YAMAZAKI M., OKUYAMA E, MAEBAYASHI Y. Isolation of some new tryptoquiva- line-related metabolites from *Aspergillus fumigatus*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, **27**, 1611-1617, 1979.
- YAMAZAKI M; SUZUKI S; MIYAKI K. Tremorgenic toxins from *Aspergillus fumigatus*. **Fres. Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, **19**, 1739-1740, 1971.