



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

**Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos**

**AÇÃO ESPORICIDA DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO
SOBRE BOLORES ISOLADOS EM LAMINADO PARA
EMBALAGENS ASSÉPTICAS**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Denise Aparecida Delgado, aprovada pela Comissão Julgadora em 22 de março de 2001.

**Denise Ap. Delgado
(Bióloga)**

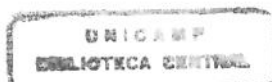
Campinas, 22 de março de 2001

**Prof^a Pilar Rodriguez de Massaguer, PhD
Orientadora**

**Prof^a Dra. Pilar Rodriguez de
Massaguer**
Presidente da Banca

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos na Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Ciência de Alimentos.

**CAMPINAS
Estado de São Paulo - Brasil
2001**



94707000

UNIDADE BC
 N.º CHAMADA:
T/UNICAMP
D.378a
 V. _____ Ex. _____
 TOMBO BC/ 44478
 PROC. 16-392104
 C ☐ D ☒
 PREC. R\$ 11,00
 DATA 16/05/01
 N.º CPD _____

CM00156269-8

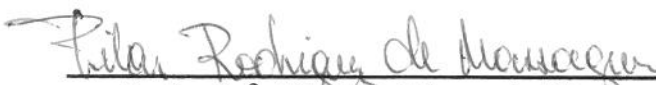
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

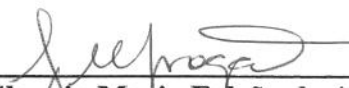
D378a Delgado, Denise Aparecida
 Ação esporicida do peróxido de hidrogênio sobre bolores
 isolados em laminado para embalagens assépticas / Denise
 Aparecida Delgado. – Campinas, SP: [s.n.], 2001.

Orientador: Pilar Rodriguez de Massaguer
 Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
 Faculdade de Engenharia de Alimentos.

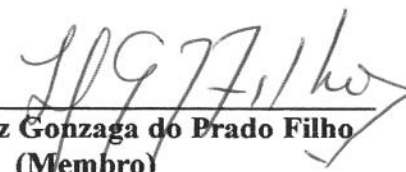
1. Água oxigenada. 2. Tomate. 3. Contaminação 4. *Bolores
 termorresistentes. 5. *Embalagens assépticas. I. Massaguer, Pilar
 Rodriguez. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
 Engenharia de Alimentos. III. Título.

BANCA EXAMINADORA


Profa. Dr.ª. Pilar Rodriguez de Massaguer
(Orientadora)


Profa. Dr.ª. Glaucia Maria Falcão de Aragão
(Membro)


Profa. Dr.ª. Lisiane de Marsillac Terra
(Membro)


Prof. Dr. Luiz Gonzaga do Prado Filho
(Membro)

Prof. Dr. José Luiz Pereira
(Membro)


Prof. Dr. José de Assis Fonseca Faria
(Membro)

Prof. Dr. Marcelo Cristianini
(Membro)

Agradecimentos especiais

À DEUS

AO MEU PAI Argemiro Delgado (*in memorian*), que gostaria muito de estar presente, pelo apoio, carinho e incansável incentivo e que me ensinou a jamais enfraquecer perante os desafios da vida !

À MINHA MÃE que sempre me apoiou e com sua ternura fez com que os muitos momentos difíceis ficassem mais amenos !

*Se as coisas são inatingíveis.....ora!
Não é motivo para não querê-las.....
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!*

Mario Quintana

Agradecimentos

À Prof^a. Dr^a. Pilar Rodriguez de Massaguer pela orientação, apoio e grande contribuição à minha formação profissional.

Ao Maurício Rizzato Coelho, pelo carinho, imensurável paciência, auxílio científico e também por ter cedido seu computador para redação desta tese.

À grande amiga Rosa Maria Andrasso Tosello (“Rosinha”) pelo excelente auxílio técnico, incentivo, e às suas palavras amigas e confortantes presentes em todos os momentos.

Aos amigos Milton M. Atarassi, Marcelo Ventura, Izael Gressoni Junior e Luciane Mendes e Salatir Rodrigues Júnior pelo apoio científico e amizade.

À amiga Henelyta da Silva Santos Ribeiro pela amizade e auxílio nas análises estatísticas.

À todos os amigos do Laboratório de Termobacteriologia da Unicamp pelo auxílio direto ou indireto.

À técnica Norma Teruko Miya pela amizade e auxílio técnico.

À técnica Silvia Helena Vitorino do laboratório de Toxicologia.

À Profa. Dr^a. Hélia Harumi Sato pelo auxílio científico.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

À empresa Tetra Pak Ltda pelo apoio financeiro e técnico, em especial à Maria Antonieta Hilst e Sr. Enzo Squillaro.

Às empresas participantes do projeto pelo suporte técnico e financeiro

À Peróxidos do Brasil por ter cedido o peróxido utilizado e pelo auxílio técnico

À empresa Merck pelo empréstimo do aparelho Refloquant – plus.

Ao pessoal da Secretaria de Pós-Graduação e da Secretaria do Departamento de Ciências de Alimentos pela colaboração.

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos.

Aos membros da banca examinadora pelas sugestões.

Ao Homero Ferracini Gumerato pela identificação dos fungos.

ÍNDICE

Página

ÍNDICE DE TABELAS.....	xvi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xx
NOMENCLATURA.....	xxiii
RESUMO.....	xxiv
ABSTRACT.....	xxvi
1- INTRODUÇÃO.....	1
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. <i>Nível de contaminação de embalagens assépticas</i>	4
2.2. <i>Peróxido de hidrogênio</i>	5
2.2.1. Resistência ao peróxido de hidrogênio.....	10
2.2.1.1. Métodos para avaliação de resistência ao peróxido de hidrogênio.....	14
2.2.2. Efeito do peróxido de hidrogênio e radiação ultra – violeta.....	17
2.2.3. Aplicação de peróxido de hidrogênio no Sistema Tetra Brik Aseptic.....	19
2.3. <i>Fungos termorresistentes</i>	20
2.3.1. Sub reino Ascomycotina.....	20
2.3.2. Características	21
2.3.3. Meio de crescimento, isolamento e esporulação de fungos termorresistentes ...	26
2.3.4. Fatores que aumentam a termorresistência.....	30
2.3.4.1. Temperatura de crescimento.....	30
2.3.4.2. Idade do esporo	31
2.3.4.3. Altas concentrações de solutos no meio	33
2.3.4.4. Ácidos graxos	35
2.3.4.5. Ácidos orgânicos	35

2.3.4.6. Potencial hidrogeniônico.....	36
2.4. Fungos Imperfeitos - Sub reino Deuteromycotina	36
2.4.1. <i>Paecilomyces variotii</i>	37
2.5. Parâmetros de resistência térmica.....	38
2.6. Cinética de Inativação térmica (Método de linearização de Alderton & Snell, 1970).....	40
2.7. Métodos para avaliação de resistência térmica em bolores	42
2.8. Meio de recuperação após ensaios de resistência térmica	47
 3. MATERIAL E MÉTODOS	 50
 3.1. Levantamento de microrganismos presentes em laminado destinado à produção de embalagens Tetra brik	 50
3.2. Composição das embalagens amostradas	51
3.2.1. Análise microbiológica do papelão componente da caixa da embalagem asséptica.....	53
3.3. Teste da presença de inibidores nas esponjas de celulose utilizadas no método de contato com a superfície (Swab).....	54
3.4. Quantificação de bolores termorresistentes	54
3.4.1. Manutenção e identificação das culturas de bolores.....	55
3.4.1.1. Exame microscópico dos bolores isolados.....	56
3.4.2. Produção de esporos	56
3.4.2.1. Coleta, Ativação e Contagem dos esporos.....	57
3.4.2.2. Concentração ótima de catalase utilizada para neutralização do peróxido nos testes de resistência dos esporos ao peróxido	59
3.4.2.3. Teste do efeito da catalase sobre os esporos de <i>N. fischeri</i> e <i>P. variotii</i>	61
3.4.3. Teste de resistência dos esporos de bolores ao peróxido de hidrogênio a temperatura ambiente.....	62

3.4.4. Aplicação de choques térmicos sucessivos.....	65
3.4.5. Produção de esporos de diversas idades	67
3.4.5.1. Coleta dos esporos.....	67
3.4.5.2. Ativação dos esporos.....	67
3.4.6. Teste de resistência ao peróxido de hidrogênio e ao calor.....	68
3.5. Bolors não termorresistentes.....	71
3.5.1. Contagem e isolamento.....	71
3.5.2. Identificação e manutenção dos bolors isolados.....	72
3.5.3. Produção de esporos	72
3.5.4. Suspensão de esporos.....	73
3.5.5. Teste com peróxido de hidrogênio em temperatura ambiente.....	73
3.5.6. Resistência ao peróxido de hidrogênio e calor.....	74
3.6. Resistência térmica de <i>N. fischeri</i> e do bolor isolado do material de embalagem.....	74
3.7. Análise das embalagens após o banho de peróxido	75
3.8. Teste em planta de envase asséptico utilizando o banho de desinfecção com 40% de concentração de peróxido de hidrogênio.....	76
3.9. Utilização do microscópio Confocal	77
3.9.1. Metodologia para a montagem de lâminas	77
3.10. Análises Estatísticas	78
 4.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	 81
 4.1. Teste de presença de inibidores nas esponjas de celulose utilizadas no método de contato com a superfície (SWAB)	 81
4.2. Análise do papelão componente da embalagem.....	82
4.3. Levantamento dos microrganismos existentes no laminado destinado à confecção de embalagens assépticas.....	82

4.3.1. Características dos bolores isolados	86
4.4. Ativação dos ascosporos.....	93
4.4.1. Ativação do bolor <i>Neosartorya fischeri</i>	93
4.4.2. Ativação do bolor <i>Talaromyces flavus</i>	97
4.5. Concentração das suspensões utilizadas nos ensaios com peróxido de hidrogênio	98
4.6. Levantamento da contaminação por bolores após o banho de peróxido de hidrogênio	100
4.7. Verificação da metodologia de avaliação da superfície de contato mediante inoculação induzida.....	101
4.8. Resultado do ensaio para a escolha da concentração necessária de catalase para neutralizar 45% de peróxido de hidrogênio.....	102
4.8.1. Resultados do efeito da concentração de catalase utilizada no ensaios com ensaios com os bolores <i>N. fischeri</i> e <i>P. variotii</i> com 1 mês de idade	104
4.9. Resultados dos ensaios com peróxido de hidrogênio – Primeira fase.....	105
4.9.1. Resistência térmica de esporos de <i>N. fischeri</i> e <i>Paecilomyces variotii</i> com 4 meses de idade	113
4.10. Ensaios com 35, 40 e 45% de peróxido de hidrogênio nas temperaturas de de 40,60 e 70C para <i>P. variotii</i> e <i>N. fischeri</i> com 1 e 4 meses de idade = Segunda fase.....	122
4.10.1. Efeito do aumento da concentração de H_2O_2 nos valores de D	137
4.10.2. Efeito da idade dos esporos no valor de D	147
4.10.3. Influência da temperatura nos valores de D	153
4.10.4. Modelo de regressão linear ajustado para os valores de D para os bolores <i>N. fischeri</i> e <i>P. variotii</i>	157
4.10.5. Parâmetros D e Z.....	173

4.10.6 .Teste em planta de envase asséptico com solução de 40%(p/p) de peróxido de hidrogênio no banho de esterilização do material de embalagem de máquina.. TBA8	179
4.10.7. Utilização do microscópio Confocal para observação de esporos de <i>P. variotii</i> e <i>N. fischeri</i> tratados com H ₂ O ₂ .	181
5.0. CONCLUSÕES	193
6.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	196
APÊNDICES	
Apêndice 1 - Identificação pelo programa Fung- Hom dos fungos isolados da embalagem	210
Apêndice 2 - Análises estatísticas dos tratamentos termoquímicos (Segunda fase do trabalho).	223
Apêndice 3 – Meios de cultura e soluções utilizadas	232

ÍNDICE DE TABELAS

Página

Tabela 1. Parâmetros de resistência térmica de bolores.....	39
Tabela 2. Temperaturas (°C) e tempos (minutos) para os choques sucessivos.....	66
Tabela 3. Variáveis independentes e dependentes (variável de resposta) utilizadas no modelo	80
Tabela 4. Resultados dos bolores isolados da superfície interna do laminado na planta A utilizando técnica de contato de superfície... ..	83
Tabela 5. Resultados dos bolores isolados da superfície interna do laminado da planta B utilizando a técnica de contato de superfície.....	84
Tabela 6. Contagem direta dos ascosporos (Câmara de Neubauer) de <i>Neosartorya fischeri</i> com 1 e 4 meses de idade	94
Tabela 7. Recuperação dos ascosporos de <i>N. fischeri</i> com 1 mês de idade e a porcentagem (%) de ascosporos ativados em relação à contagem direta (Câmara de Neubauer).....	94
Tabela 8. Recuperação dos ascosporos de <i>N. fischeri</i> com 4 meses de idade e a porcentagem (%) de ascosporos ativados em relação à contagem direta (Câmara de Neubauer).....	95
Tabela 9. Contagem das suspensões de esporos utilizadas nos testes com peróxido de hidrogênio.....	99
Tabela 10. Análise de embalagens vazias e fechadas hermeticamente da indústria B (520g) e coletadas após o banho de peróxido.....	100
Tabela 11. Resultados dos teste com diversas concentrações da enzima catalase para inativar 45% de peróxido de hidrogênio	103
Tabela 12. Efeito da catalase sobre os esporos de <i>N. fischeri</i> e <i>P. variotii</i> com 1 mês de idade, média de 3 experimentos.....	105
Tabela 13. Valores γ para o tratamento com peróxido de hidrogênio sobre conídios de <i>Paecilomyces variotii</i> (1 mês) à temperatura ambiente	108

Tabela 14. Valores γ para o tratamento com peróxido de hidrogênio sobre ascósporos de <i>Neosartorya fischeri</i> (1 mês) à temperatura ambiente	109
Tabela 15. Valores γ para o tratamento com peróxido de hidrogênio sobre conídios de <i>Aspergillus sidowii</i> (1 mês) em temperatura ambiente	109
Tabela 16. Valores γ para o tratamento com peróxido de hidrogênio sobre conídios de <i>Aspergillus parasiticus</i> (1 mês) em temperatura ambiente	110
Tabela 17. Valores γ para o tratamento com peróxido de hidrogênio sobre conídios de <i>Penicillium decumbens</i> (1 mês) em temperatura ambiente	110
Tabela 18. Valores γ para o tratamento com peróxido de hidrogênio sobre conídios de <i>Penicillium citrinum</i> (1 mês) em temperatura ambiente	111
Tabela 19. Valores γ para o tratamento com peróxido de hidrogênio sobre ascósporos de <i>Talaromyces flavus</i> (1 mês) em temperatura ambiente	111
Tabela 20. Valores γ para o tratamento com peróxido de hidrogênio sobre conídios de <i>Epicoccum nigrum</i> (1 mês) em temperatura ambiente	112
Tabela 21. Choques térmicos para os esporos de <i>Paecilomyces variotii</i> com 1 mês de idade (média de dois experimentos) em água destilada.....	113
Tabela 22. Choques térmicos para o <i>Penicillium citrinum</i> com 1 mês de idade (média de dois experimentos) em água destilada	113
Tabela 23. Contagem do número de sobreviventes com o tempo de aquecimento, em água destilada, de ascósporos de <i>N. fischeri</i> com 4 meses de idade a 90°C, média de dois experimentos	115
Tabela 24. Valores de resistência térmica para ascósporos de <i>N. fischeri</i> com 4 meses de idade a 90°C	118
Tabela 25. Contagem do número de sobreviventes com o tempo de aquecimento, em água destilada, de ascósporos de <i>Paecilomyces variotii</i> com 4 meses de idade a 85°C, média de dois experimentos.....	119

Tabela 26. Valores de resistência térmica para conídios de <i>Paecilomyces variotii</i> com 4 meses de idade a 85°C	121
Tabela 27. Redução decimais (γ) para o tratamento de esporos de <i>Paecilomyces variotii</i> (4 meses) com 35 % de peróxido de hidrogênio em diferentes tempos de contato e temperaturas.....	123
Tabela 28. Redução decimais (γ) para o tratamento de esporos de <i>Paecilomyces variotii</i> (4 meses) com 40 % de peróxido de hidrogênio em diferentes tempos de contato e temperaturas	124
Tabela 29. Redução decimais (γ) para o tratamento de esporos de <i>Paecilomyces variotii</i> (4 meses) com 45 % de peróxido de hidrogênio em diferentes tempos de contato e temperaturas	125
Tabela 30. Redução decimais (γ) para o tratamento de esporos de <i>Neosartorya fischeri</i> (4 meses) com 35% de peróxido de hidrogênio em diferentes tempos de contato e temperaturas	126
Tabela 31. Redução decimais (γ) para o tratamento de esporos de <i>Neosartorya fischeri</i> (4 meses) com 40% de peróxido de hidrogênio em diferentes tempos de contato e temperaturas	127
Tabela 32. Redução decimais (γ) para o tratamento com esporos de <i>Neosartorya fischeri</i> (4 meses) com 45% de peróxido de hidrogênio em diferentes tempos de contato e temperaturas.....	128
Tabela 33. Redução decimais (γ) para o tratamento de esporos de <i>Paecilomyces variotii</i> (1 mês) com 35% de peróxido de hidrogênio em diferentes tempos de contato e temperaturas	129
Tabela 34. Redução decimais (γ) para o tratamento de esporos de <i>Paecilomyces variotii</i> (1 mês) com 40% de peróxido de hidrogênio em diferentes tempos de contato e temperaturas	130
Tabela 35. Redução decimais (γ) para o tratamento de esporos de <i>Paecilomyces variotii</i> (1 mês) com 45% de peróxido de hidrogênio em diferentes tempos de contato e temperaturas.....	131
Tabela 36. Redução decimais (γ) para o tratamento de esporos de <i>Neosartorya fischeri</i> (1 mês) com 35% de peróxido de hidrogênio em diferentes tempos de contato e temperaturas	132
Tabela 37. Redução de ciclos logarítmicos (γ) para o tratamento de esporos de <i>Neosartorya fischeri</i> (1 mês) com 40% de peróxido de hidrogênio em diferentes tempos de contato e temperaturas	133

Tabela 38. Redução decimais (γ) para o tratamento de esporos de <i>Neosartorya fischeri</i> (1 mês) com 45% de peróxido de hidrogênio em diferentes tempos de contato e temperaturas	134
Tabela 39. Comparação da redução de ciclos logarítmicos para o <i>P. variotii</i> e <i>N. fischeri</i> expostos a 40% de peróxido de hidrogênio a 70°C nos tempos de 6 e 10 segundos.....	137
Tabela 40. Valores observados e Valores preditos de D para o bolor <i>Paecilomyces variotii</i> com 1 e 4 meses de idade.....	170
Tabela 41. Valores observados e Valores preditos de D para o bolor <i>N.fischeri</i> com 1 e 4 meses de idade.....	171
Tabela 42. Tempo total de exposição requerido (segundos) para uma diminuição de 4 ciclos logarítmicos(4D).....	174
Tabela 43. Coeficiente térmico (°C) de <i>P.variotii</i> e <i>N.fischeri</i> expostos a H ₂ O ₂ nas concentrações de 35, 40 e 45% nas temperaturas de 40,60 e 70°C.....	176
Tabela 44. Análise do residual de peróxido de hidrogênio após teste em planta de envase asséptico com solução de 40% de peróxido de hidrogênio no banho de desinfecção.....	180

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo reprodutivo dos ascomicetos. Fonte: Adaptado de Samsom & Van Reenen Hoekstra (1988) citado por Gumerato (1995).....	20
Figura 2. Camadas da embalagem Tetra Brik - (Tetra Pak – Comunicação pessoal).....	52
Figura 3. Esquema do ensaio realizado com esporos tratados com peróxido de hidrogênio - Primeira fase	64
Figura 4. Esquema de ensaio realizado com esporos tratados com peróxido de hidrogênio - Segunda fase	70
Figura 5. <i>Neosartorya fischeri</i> em MEA (5 dias) a 30°C	89
Figura 6. <i>Paecilomyces variotii</i> em MEA (5 dias) a 30°C	91
Figura 7. <i>Epicoccum nigrum</i> em MEA (7 dias) a 25°C	91
Figura 8. Determinação do tempo de ativação ótimo de <i>Neosartorya fischeri</i> (1 mês) em água destilada a 80°C.....	96
Figura 9. Determinação do tempo de ativação ótimo de <i>Neosartorya fischeri</i> (4 meses) em água destilada a 85°C.....	96
Figura 10. Curva de inativação térmica em água destilada a 90°C para ascósporos de <i>N. fischeri</i> com 4 meses	116
Figura 11 . Determinação do valor de “a” para ascósporos de <i>N. fischeri</i> com 4 meses de idade a 90°C	116
Figura 12 . Curva de linearização da inativação térmica de <i>N. fischeri</i> em água destilada a 90°C para ascósporos com 4 meses de idade	117
Figura 13. Curva de inativação térmica para conídios de <i>Paecilomyces variotii</i> (4 meses) em água destilada a 85°C	119
Figura 14. Determinação do valor de “a” para conídios de <i>Paecilomyces variotii</i> com 4 meses de idade	120
Figura 15. Curva de linearização da inativação térmica de conídios de <i>Paecilomyces variotii</i> com 4 meses de idade	120
Figura 16. Curvas de sobreviventes para <i>Paecilomyces variotii</i> (4 meses) exposto a 40% de H ₂ O ₂ a 40, 60 e 70°C	139
Figura 17. Curvas de sobreviventes para <i>Paecilomyces variotii</i> (4 meses) exposto a 45% de H ₂ O ₂ a 40,60 e 70°C	139

Figura 18. Curvas de sobreviventes de <i>Neosartorya fischeri</i> (4 meses) exposto a 35% de H_2O_2 a 40 e 60°C	140
Figura 19. Gráfico tridimensional dos valores de D para <i>P. variotii</i> (1 e 4 meses) exposto a 35,40 e 45% de peróxido de hidrogênio nas temperaturas de 40,60 e 70°C.....	141
Figura 20. Valores de D para <i>N. fischeri</i> (1 e 4 meses) exposto a 35, 40 e 45% de peróxido de hidrogênio nas temperaturas de 40,60 e 70°C.....	141
Figura 21. Curvas de sobreviventes de <i>Neosartorya fischeri</i> (4 meses) exposto a 40% de H_2O_2 a 40 e 60°C	142
Figura 22. Curvas de sobreviventes de <i>Neosartorya fischeri</i> (4 meses) exposto a 40% de H_2O_2 a 70 e 75°C	142
Figura 23. Curvas de sobreviventes de <i>Neosartorya fischeri</i> (4 meses) exposto a 45% de H_2O_2 a 40,60 e 70°C	143
Figura 24. Curvas de sobreviventes para <i>N.fischeri</i> (1 mês) exposto a 45% de peróxido de hidrogênio nas temperaturas de 40,60 e 70°C.....	144
Figura 25. Gráfico tridimensional dos valores de D para <i>N.fischeri</i> (1 e 4 meses de idade) nas temperaturas de 40, 60 e 70°C e nas concentrações de 35,40 e 45% de peróxido de hidrogênio.....	145
Figura 26. Curvas de sobreviventes de <i>Paecilomyces variotii</i> (4 meses) exposto a 35% de H_2O_2 a 70 e 75 °C	149
Figura 27. Curvas de sobreviventes de <i>Neosartorya fischeri</i> (1 mês) exposto a 40% de H_2O_2 a 40, 60 e 70 °C	149
Figura 28. Curvas de sobreviventes de <i>Neosartorya fischeri</i> (1 mês) exposto a 35% de H_2O_2 a 40 e 60 C	150
Figura 29. Curvas de sobreviventes de <i>Neosartorya fischeri</i> (1 mês) exposto a 35% de H_2O_2 a 70 e 75° C	150
Figura 30. Curvas de sobreviventes de <i>Neosartorya fischeri</i> (4 meses) exposto a 35% de H_2O_2 a 70 e 75° C	151
Figura 31. Curvas de sobreviventes de <i>Paecilomyces variotii</i> (1 mês) exposto a 35% de H_2O_2 a 40,60 e 70°C	152
Figura 32. Curvas de sobreviventes de <i>Paecilomyces variotii</i> (4 meses) exposto a 35% de H_2O_2 a 40 e 60 °C	153

Figura 33. Curvas de sobreviventes de <i>Paecilomyces variotii</i> (1 mês) exposto a 45% de peróxido de hidrogênio a 40, 60 e 70°C	155
Figura 34. Curvas de sobreviventes de <i>Paecilomyces variotii</i> (1 mês) exposto a 40% de H ₂ O ₂ a 40,60 e 70°C	155
Figura 35. Superfície de resposta para o modelo ajustado de <i>N.fischeri</i> (1 e 4 meses).....	159
Figura 36. Superfície de resposta para o modelo ajustado de <i>N.fischeri</i> (1 e 4 meses).....	161
Figura 37. Comportamento médio entre temperatura e peróxido de hidrogênio para <i>N.fischeri</i> com 1 e 4 meses de idade.....	163
Figura 38. Superfície de resposta para o modelo ajustado de <i>Paecilomyces variotii</i> com 1 e 4 meses de idade.....	167
Figura 39. Valores observados e preditos para <i>Paecilomyces variotii</i> com 1 e 4 meses de idade ensaiados com peróxido de hidrogênio nas concentrações 35,40 e 45% nas temperaturas de 40,60 e 70°C.....	172
Figura 40. Valores observados e valores preditos para <i>N.fischeri</i> (1 e 4 meses) ensaiados com 35,40 e 45% de peróxido de hidrogênio nas temperaturas de 40,60 e 70°C.....	172
Figura 41. Curva fantasma de <i>P. variotii</i> (4 meses) exposto a 35 e 40% de peróxido de hidrogênio nas temperaturas de 40, 60 e 70°C	178
Figura 42. Curvas fantasmas de <i>N. fischeri</i> (4 meses) exposto a 35, 40 e 45% de peróxido nas temperaturas de 40,60 e 70°C	178
Figura 43. Ascosporos de <i>N. fischeri</i> (1 mês) sem tratamento com peróxido (aumento de 1000 x)	185
Figura 44. Ascosporos de <i>N. fischeri</i> (1 mês) sem tratamento com peróxido (aumento + zoom = 3000 x)	187
Figura 45. Ascosporos de <i>N. fischeri</i> (1 mês) expostos a 35% de peróxido de hidrogênio a 70C por 6 segundos (aumento +zoom = 3000x).....	189
Figura 46. Ascosporos de <i>N. fischeri</i> (1 mês) expostos a 40% de peróxido de hidrogênio a 70°C por 6 segundos (Aumento + zoom=3000x)....	191

NOMENCLATURA

a_w -	Atividade de água
CYA -	Czapek Extrato de levedura Ágar
D_T -	Índice de Redução decimal a T°C. Tempo (segundos) para reduzir em 90% a concentração inicial de microrganismos, nutrientes ou fatores de qualidade
FDA -	Food and Drug Administration
FNT -	Fungos não termorresistentes
FT -	Fungos termorresistentes
H_2O_2 -	Peróxido de Hidrogênio
MEA -	Extrato de Malte e Ágar
OA -	Ágar Aveia
PDA -	Ágar batata dextrose
pH -	Potencial Hidrogeniônico
g -	Força relativa centrífuga
TDT -	Tubos de morte térmica
TBA -	Tetra Brik Aseptic
UFC -	Unidade Formadora de Colônia
Z -	Intervalo de temperatura necessário para que a Curva Fantasma TDT atravessasse um ciclo logarítmico (°C)
Υ -	Redução de ciclos logarítmicos ($\Upsilon = -\log N/N_0$)

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade esporicida do peróxido de hidrogênio sobre bolores isolados de laminado para a confecção de embalagens destinadas ao envase asséptico de polpa de tomate.

A contaminação da superfície interna do laminado (polietileno / cartão/ polietileno/ Alumínio/ polietileno) foi estabelecida mediante método de contato de superfície com esponja (3M) ; 1 ½ x 3" x 5/8" e água peptonada 0,1% (p/v) como diluente. Foi amostrada no laminado em movimento uma área correspondente a 60 embalagens (24 amostras) e 102 embalagens (44 amostras) produzidas em 1 minuto em duas indústrias A e B, respectivamente.

Somente duas amostras entre as 24 da indústria A e uma amostra entre as 44 coletadas da indústria B mostraram contaminação com bolores. As contagens médias de bolores termorresistentes foram menores que 1UFC/100cm² de superfície interna da embalagem, no entanto nas 3 amostras contaminadas foram isolados e identificados 7 bolores sendo seis não termorresistentes e apenas um termorresistente (*Talaromyces. flavus*), no entanto o *Paecilomyces variotii* foi considerado o mais resistente aos testes iniciais com peróxido a 5,10,20,35 e 40% (p/p) em temperatura ambiente e 10 segundos de contato dentre todos os isolados.

Os ensaios de resistência termoquímica foram realizados com suspensões de 1 e 4 meses de esporos de *Paecilomyces variotii* e ascosporos de *Neosartorya fischeri* (controle). Tratamentos combinados com peróxido de hidrogênio (35,40 e 45%; p/p) e temperaturas (40,60 e 70°C) nos tempos de

contato de 2,4,6,8 e 10 segundos, foram aplicados aos esporos e a contagem foi realizada após neutralização com catalase (Sigma).

O bolor *N.fischeri* conhecido como termorresistente também foi o mais resistente ao tratamento com H_2O_2 , mas não foi isolado do laminado. Para o *N.fischeri* a concentração de H_2O_2 foi altamente significativa e para *P.variotii* as interações idade x temperatura, idade x concentração de H_2O_2 e concentração de H_2O_2 x temperatura foram significativas (95%) mas os efeitos isolados das variáveis não foram significativos.

Para os bolores *N.fischeri* e *P.variotii*, na temperatura de 40°C e nas concentrações de 35 e 40% (p/p) de peróxido de hidrogênio, foi possível observar a diferença de comportamento entre as idades, mas em temperaturas maiores (60 e 70°C) e na concentração de H_2O_2 de 45%(p/p) o efeito do H_2O_2 e temperatura foi drástico impedindo a detecção de diferença de comportamento entre as idades.

Considerando a incidência de bolores detectada, conclui-se que um tratamento de 6 segundos, 35%(p/p) de H_2O_2 e 70°C eliminou os bolores comuns e as formas esporuladas menos resistentes dos bolores termorresistentes sendo adequada para contaminações de até 1 esporo/100cm². Para o caso de populações maiores ou a incidência de bolores altamente resistentes, um tratamento com 40%(p/p) de peróxido de hidrogênio, na temperatura de 70°C e com 10 segundos de contato irá assegurar uma baixa probabilidade dos sobreviventes (10^{-4}).

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the sporicidal activity of hydrogen peroxide against molds isolated from packaging laminate designed for aseptic packaging of tomato pulp.

Contamination from the inside surface of the packaging laminate was accessed by surface contact method (Sveum et al.1992) with 1 ½" x 3" x 5/8" sponge (3M) and peptone 0,1 % (w/v) water used as diluent. Sampled area of the moving laminate corresponded to 60 packages (24 samples) and 102 packages (44 samples) produced in 1 minute at industry A and B.

Only two out of 24 samples from industry A and one sample out of 44 collected from industry B showed mold contamination. Mean mold count were < 1 UFC/ 100 cm² of internal laminate surface. Nevertheless from 3 contaminated samples, seven molds were isolated and identified. Six isolated molds were not heat resistant and only one, *T. flavus*, was heat resistant. Among the isolates *P. variotii* was the most resistant to hydrogen peroxide when challenged to 5,10,20,30 and 40% (w/w) applied at ambient temperature during 10 seconds contact time.

For the combined resistance, heat - peroxide, spores suspensions of 1 and 4 months of *P. variotii* and ascospores de *N. fischeri* (control) were tested individually. Combined treatment with hydrogen peroxide (35,40,45 % ,w/w) and temperature (40,60 and 70°C) at contact time 2,4,6,8 and 10 seconds were applied and survivors count were performed after hydrogen

peroxide neutralization with catalase (Sigma)

The mould *N. fischeri* known as heat resistant, was the most resistant when challenged with hydrogen peroxide but it wasn't isolated from the packaging laminate. To *N.fischeri* the hydrogen peroxide concentration was highly significant (95%) and to *P.variotii* also all the interactions were significant: age x H₂O₂ concentration, age x temperature and H₂O₂ x temperature but not each variable alone.

To *N. fischeri* and *P.variotii* at 40°C and 35 and 40%(w/w) of hydrogen peroxide it was possible to observe the difference of behavior between ages but at higher temperatures(60 and 70°C) and 45% of hydrogen peroxide the effect of the interaction hydrogen peroxide and temperature was so big that was not possible to detect difference of behavior between ages.

In this work considering the incidence of moulds detected, we can conclude that a treatment of 6 seconds contact time, 35% (w/w) of hydrogen peroxide and 70°C can eliminate the common moulds and less resistant forms of mould been adequate for contamination less than 1 spore/100cm². For higher populations or the incidence of more resistant mould spores a treatment with 10 seconds contact time will give a low probability of survivors (10⁻⁴).

1- INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, ocorreu uma intensa utilização de embalagens assépticas, principalmente para leite e derivados, e também para outros tipos de produtos. Para derivados de tomate foram vendidas no ano de 1995 um total de 290 milhões de unidades, com um aumento para 400 milhões de unidades no ano de 2000. As razões para o desenvolvimento do sistema cartonado tipo Tetra Pak são muitas, principalmente o fornecimento de alimentos com maior tempo de conservação e melhor qualidade. O fator tempo de conservação em temperatura ambiente, principalmente nos produtos longa vida, traz ao consumidor de países tropicais uma vantagem adicional.

Muitos dos problemas com relação ao sistema cartonado tipo Tetra Pak já foram resolvidos, porém, existem muitos parâmetros que necessitam ainda serem estudados.

No sistema que utiliza laminados a esterilização da embalagem, principalmente da parte que entrará em contato com o alimento, é realizada utilizando-se o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é o agente esterilizante mais utilizado comercialmente. Geralmente, na indústria esse agente é utilizado na concentração de 35% (p/p), juntamente com um umectante. O peróxido de hidrogênio possui ação oxidante sobre a parede celular de microrganismos levando-os à morte. O Food and Drug Administration (FDA) estabelece um limite para resíduos de peróxido em embalagens nos Estados Unidos, que é de 0,5 $\mu\text{g/ml}$, porém, no Brasil a legislação não estabelece limites para o residual do peróxido de hidrogênio em embalagens.

A concentração de peróxido de hidrogênio utilizada para a

desinfecção de embalagens é muito importante assim como a temperatura, pois esse procedimento deve ser eficiente para a eliminação de esporos de bactérias e fungos termorresistentes.

Grande parte das pesquisas desenvolvidas sobre a ação de peróxido de hidrogênio nos microrganismos referem-se a seu efeito nos esporos de bacilos, principalmente *Bacillus subtilis* (Toledo, 1973). Poucos trabalhos relatam a ação do peróxido de hidrogênio em fungos e menos ainda em bolores termorresistentes.

Os esporos de fungos termorresistentes podem estar presentes no material utilizado para a confecção de embalagens, por exemplo no papelão, e através de microfuros no laminado plástico entrar em contato com o produto e causar a deterioração do mesmo, além da produção de micotoxinas, que poderia ocorrer para algumas espécies de fungos acarretando riscos à saúde pública.

Os fungos termorresistentes mais estudados pertencem ao gênero *Neosartorya*, *Byssochlamys* e *Talaromyces* e estes são causadores freqüentemente de deterioração em produtos industrializados com frutas .

A característica dos fungos termorresistentes é a formação de ascosporos (esporos formados sexualmente no interior de estruturas chamadas ascos) que são muito resistentes, sendo que a forma e ornamentação desses esporos podem variar com o tipo, as espécies e linhagens de microrganismos. Os fungos termorresistentes além da resistência às altas temperaturas, podem ser resistentes às altas concentrações de peróxido de hidrogênio, irradiação,

além de outros agentes como baixos valores de potencial hidrogeniônico (pH), baixas concentrações de oxigênio e atividades de água (a_w).

Alguns fatores podem aumentar a termorresistência como a idade do esporo, presença de solutos no meio, ácidos graxos e ácidos orgânicos de cadeia curta. Segundo dados da literatura, os esporos mais velhos seriam mais resistentes à temperatura e esse parâmetro deverá ser investigado nesse trabalho.

Além dos bolores termorresistentes, existem outros que possuem uma alta resistência ao peróxido de hidrogênio, como por exemplo o *Mucor spinescens*, porém, com baixa resistência térmica, sendo que a ocorrência destes e de outros fungos com as mesmas características será investigada com relação à presença no laminado.

A ocorrência de bolores termorresistentes em polpa de tomate envasada assepticamente, na matéria prima e na água de lavagem dos tomates, constatada por Baglioni (1998) fez surgir a necessidade de um estudo da contaminação das embalagens por estes microrganismos. O aparecimento de destes fungos em produtos derivados de tomate pode acarretar vários problemas, como a produção de micotoxinas, elevação do pH com possibilidade do desenvolvimento de bactérias, presença de micélio, escurecimento do produto e perda de viscosidade da polpa.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade esporicida do peróxido de hidrogênio sobre bolores isolados de laminado utilizado para a confecção de embalagens tipo Tetra Brik[®].

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Nível de contaminação de embalagens assépticas

O processo asséptico é uma técnica bem aceita para a preservação de alimentos fluídos. A alta temperatura e o curto tempo de exposição ao calor, que é utilizado para estabilizar o produto, permite a máxima retenção dos nutrientes e melhor qualidade dos alimentos (Toledo, 1975).

A esterilidade comercial da superfície da embalagem em contato com o alimento é um pré-requisito para a tecnologia do acondicionamento asséptico. O grau de esterilização obtido no material é proporcional ao nível de contaminação, eficiência do tratamento e a área da embalagem. A contaminação do material de embalagem, exceto algumas exceções, ocorre através do ar e em menor grau por contato com equipamentos de embalagem e seres humanos. A interação entre esses microrganismos e o material de embalagem é fraca, devido principalmente à força de gravidade ou eletrostáticas, o que possibilita uma fácil remoção dos mesmos (Värnamo, 1982).

Entretanto, os esporos bacterianos estão usualmente presentes em pequena quantidade em materiais de embalagem usados em sistemas assépticos (Smith & Brown, 1980). A média da contagem total de microrganismos obtida por um método de *swab* (não especificado pelos autores) na superfície de polietileno, que entra em contato com o alimento, no material de embalagem cartonada foi de 2-5 microrganismos/100cm². Os grupos de microrganismos freqüentemente presentes foram aproximadamente

10% leveduras, 20% bolores, e os 70% restantes são bactérias. Esta flora indica uma infecção pelo ar que corresponde diretamente ao modo como o material de embalagem foi produzido, estocado e utilizado. Esta contaminação depende das condições microbiológicas (higiênicas) da área na qual a máquina de envase asséptico está instalada. Estas condições são levadas em consideração para se determinar o número e, o mais importante, os tipos de microrganismos encontrados (Värnamo, 1982 e von Bockelmann & von Bockelmann, 1986).

2.2. Peróxido de Hidrogênio

O peróxido de hidrogênio (peso molecular =34,01) é um forte agente oxidante capaz de inativar uma grande variedade de microrganismos na forma vegetativa e esporos bacterianos. Na sua forma pura, livre de água, o peróxido de hidrogênio é um líquido incolor e viscoso, semelhante à água em muitas das suas propriedades. O peróxido de hidrogênio é obtido por hidrólise dos peróxidos, especialmente do ácido persulfúrico ($S_2O_8H_2$) ou de seus sais (Rose, 1983).

Durante a respiração aeróbica, na transferência de elétrons para o oxigênio, que é oceptor final de elétrons, e na redução do oxigênio com formação de água, podem ser produzidas espécies de oxigênio com propriedades reativas, tanto no sistema microbiano como no homem. As espécies de oxigênio reativas são o ânion superóxido (O_2^-), radicais hidroxilas ($OH^\cdot$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que podem interagir com outros constituintes celulares, tais como DNA, RNA, lipídios e proteínas, alterando estas moléculas. As espécies reativas de oxigênio podem surgir pela

exposição a certas condições ambientais como as radiações ionizantes (raio X), radiação UV, e pela oxidação - redução de certas drogas (Ahern, 1991).

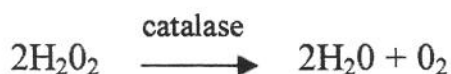
O agente esterilizante peróxido de hidrogênio não é propriamente reativo, porém, é convertido em radicais, tais como o radical hidroxil ($\text{OH}\cdot$), e são esses radicais que oxidam os componentes do esporo. O peróxido de hidrogênio, em solução aquosa, não modifica de modo oxidativo os ácidos nucléicos, lipídios ou proteínas na ausência de catalisadores, pois estes são os que proporcionam a formação dos radicais. Presumivelmente, a necessidade da formação de radicais é a base principal da grande dependência da temperatura para a morte de esporos (Shin et al., 1994).

O peróxido de hidrogênio é conhecido há muito tempo por ser um excelente agente esporicida e bactericida. Seu emprego é uma alternativa para inativar conídios fúngicos (Buchen & Marth, 1977), sendo utilizado extensivamente para a esterilização e desinfecção, especialmente em processos assépticos e materiais de embalagem (Shin et al., 1994). O peróxido de hidrogênio tem ação oxidante na parede celular dos microrganismos levando-os à morte (Oliveira, 1988). Segundo Toledo et al. (1973), o peróxido de hidrogênio é o agente esterilizante mais utilizado por não deixar “*off-flavor*” no produto e sim apenas pequenos resíduos no material de embalagem, que podem ser tolerados sem efeitos adversos. O ar quente utilizado após o banho de peróxido no material para a produção de embalagens, e para dissipar o peróxido de hidrogênio restante (Stevenson & Shafer, 1983).

Os regulamentos do FDA nos Estados Unidos limitam o residual máximo de peróxido de hidrogênio como sendo de $0,5 \mu\text{g/ml}$, determinado em

água destilada, analisado imediatamente após o processo de embalagem e nas condições de produção. Esse residual é crítico e deve ser muito bem monitorado principalmente no caso de alimentos com baixa acidez, como sucos contendo vitamina C, pois o ácido ascórbico é o componente mais sensível ao residual de peróxido (Toledo,1988), além de outras vitaminas presentes nos alimentos que podem ser oxidadas pelo peróxido (Toledo, 1975).

Segundo Lück (1971) a catalase é uma enzima presente em quase todas as células animais e de plantas e é utilizada para cessar a reação do peróxido de hidrogênio (Bauldry, 1983); Bayliss & Waites (1982); Toledo et al.(1973); Toledo (1988); McNeillie & Bieser (1993); Tsuchida & Tsuchido (1997). Existem muitos tipos de catalase, porém, Setlow & Setlow (1993) e Buchen & Marth (1977) utilizaram a catalase proveniente de fígado bovino para destruir o peróxido de hidrogênio residual, esta enzima catalisa a seguinte reação:



A utilização do peróxido de hidrogênio aquoso como um esterilizante químico já é conhecida por mais de um século, bem como suas propriedades germicidas (Bayliss & Waites, 1982; Toledo, 1975; Stannard *et al.*, 1983; Baldry, 1983 e Stevenson & Shafer, 1983). O peróxido de hidrogênio pode ser aplicado através de um banho quando se trabalha com material em bobina, ou por “*spray*” em embalagens pré-formadas (Oliveira & Padula, 1988).

O tempo correto de exposição ao peróxido é um fator muito

importante para uma boa esterilização. Segundo Toledo (1988), embora o tempo de exposição seja facilmente estabelecido em laboratório, quando geralmente os esporos são adicionados diretamente na solução de peróxido, esses dados são de difícil extrapolação para a prática comercial, já que é difícil monitorar diretamente a presença e concentração de peróxido de hidrogênio na superfície do material de embalagem após a saída do tanque de contato com o agente esterilizante.

A destruição dos esporos pelo peróxido de hidrogênio é maior em pH ácido do que em neutro ou alcalino e altamente dependente da temperatura. Esse agente químico é um esporicida muito fraco em temperatura ambiente, mas é muito potente em temperaturas mais altas (Shin et al., 1994), porém, Buchen & Marth (1977) encontraram que, em temperaturas mais baixas, o peróxido foi mais efetivo em reduzir a contagem de esporos do que o calor sozinho, sendo que na ausência de peróxido leva-se horas e dias para obter 90% de destruição de esporos de *Aspergillus flavus* a 45°C, porém, na presença de 6% de H₂O₂ foi obtida uma redução de 99,9 % em 20 minutos a 40°C para esporos de *A. flavus* NRRL 3353.

Smilanick et al. (1995) investigaram a utilização de solução de peróxido de hidrogênio nas concentrações de 5, 10 e 15 % (p/p) na temperatura de 25°C para o combate da “doença do fungo verde”, que ocorre em citrus e é típica do período de pós colheita e causada pelo fungo *Penicillium digitatum*. Os autores encontraram que, nas condições de estudo, o peróxido não foi eficiente contra esse fungo e dependendo do tempo de exposição os frutos foram danificados com o tratamento.

Segundo Stevenson & Shafer (1983), as soluções de peróxido de hidrogênio em baixas concentrações são bactericidas, mas não altamente esporicidas. A eficiência esporicida aumenta com o aumento da concentração. Para obter uma atividade esporicida rápida são utilizadas concentrações relativamente altas (35%), em alguns sistemas assépticos para a esterilização do material de embalagem. Toledo (1988) ressalta que normalmente os sistemas comerciais trabalham na esterilização de embalagens com a concentração de 35% (peso/peso) de peróxido de hidrogênio, sendo que a ocorrência de uma operação imprópria do sistema pode gerar níveis de resíduos que excedem a tolerância permitida, sendo que, dentre os componentes do alimento, o ácido ascórbico é o mais sensível ao peróxido de hidrogênio residual.

Shin et al. (1994) observaram que a morte causada pelo peróxido de hidrogênio (1% (p/p) de H₂O₂ a 50°C) parece similar à morte causada pelo calor, na qual os esporos mortos permanecem intactos e totalmente refráteis, porém, em concentrações mais altas de peróxido como 15% (p/p) a 60°C foram observadas rupturas das membranas mais externas da capa do esporo de *B. megaterium*. Entretanto, a morte pelo peróxido de hidrogênio é diferente da morte pela pressão, que inicialmente induz a germinação e então mata as formas resultantes.

Ito et al. (1973) trabalharam com *Clostridium botulium* e observaram que, quando há um aumento da temperatura (55°C) e concentração de peróxido de hidrogênio (20%), há um aumento do efeito esporicida deste agente. Segundo estes autores, o *Cl. botulinum* 169B apresentou uma resistência ao peróxido de hidrogênio 35% nas temperaturas

de 71,1°C e 87,8°C de 5 e 3 segundos, respectivamente e o *B. subtilis* (*globigii*) apresentou resistência de 16 segundos na temperatura de 87,8°C.

Bauldry (1983) comparou a atividade esporicida e bactericida do ácido peracético e do peróxido de hidrogênio, em células vegetativas e esporos de leveduras e bactérias. O autor encontrou que o peróxido de hidrogênio é mais efetivo como esporicida do que como bactericida e o ácido peracético é um excelente bactericida, fungicida e esporicida. Alasri et al. (1993) observaram que o ácido peracético apresentava maior atividade sobre os esporos do que o peróxido de hidrogênio na desinfecção de membranas de ultrafiltração, agindo principalmente sobre esporos de *Bacillus subtilis*, sendo que a combinação de 21 ppm de ácido peracético com 2813 ppm de peróxido de hidrogênio permitiu uma total desinfecção dessas membranas, em 2-3 horas de contato. O ácido peracético está sendo bem utilizado em outros sistemas assépticos não laminados, principalmente sua mistura com peróxido de hidrogênio ou outros produtos.

O peróxido de hidrogênio possui muitas utilidades além de agente esterilizante. Segundo McNeillie & Bieser (1993) ele pode ser utilizado para a obtenção de farinhas de baixa caloria, a partir de cascas de arroz, talos de milho e palha de trigo. Nesse processo, as fibras são colocadas em contato com peróxido de hidrogênio 10 % na faixa de pH de 9 a 12, para que ocorra a quebra das ligninas, obtendo-se uma farinha de baixa caloria e boa qualidade.

2.2.1. Resistência ao peróxido de hidrogênio

a. Esporos Bacterianos

Toledo et al. (1973) variaram a concentração de peróxido de hidrogênio de 10 a 41 % (peso/volume) frente a alguns esporos de organismos deterioradores de alimentos, em temperaturas na faixa de 24 a 76°C. Os autores observaram que os esporos de *Bacillus subtilis* var. *globigii* foram os mais resistentes de todos testados, o que também foi relatado por Smith & Brown (1980). Estes observaram que em concentrações mais altas (41 %) e na temperatura de 24°C houve uma diminuição do valor "D". Observaram ainda que os esporos apresentaram uma morte mais rápida em temperaturas mais altas (76°C) na concentração de 25,8% de peróxido de hidrogênio. Os esporos submetidos a choque térmico de 80°C por 20 minutos, antes da exposição ao peróxido de hidrogênio, tiveram uma diminuição na sua resistência. Os autores encontraram ainda que os esporos úmidos eram mais resistentes ao peróxido de hidrogênio do que os esporos secos.

Klapes & Vesley (1990) utilizaram o peróxido de hidrogênio na forma de vapor e analisaram sua atuação, com relação à eliminação de esporos de *Bacillus subtilis* subesp. *globigii* e *Bacillus stearothermophilus* na desinfecção do interior de uma centrífuga. Os autores encontraram que o peróxido nessa forma possui uma capacidade esporicida significativa, porém, alguns estudos precisam ser realizados para a utilização do peróxido na forma de vapor como esterilizante, principalmente devido à falta de informações sobre o mecanismo de morte e os fatores que o influenciam. Os esporos de *B. stearothermophilus* foram os mais resistentes a esse tratamento. A utilização dessa tecnologia possui muitas aplicações em produtos farmacêuticos, equipamentos na indústria, materiais de embalagem e fermentadores e ainda possui uma vantagem que é a penetração em lugares inacessíveis para o peróxido líquido. O vapor de peróxido de hidrogênio é um substituto dos

esterilizantes gasosos como o óxido de etileno e formaldeído que são tóxicos e carcinogênicos.

Setlow & Setlow (1993) estudaram esporos de *Bacillus subtilis* e a presença de um tipo de proteína (SASP), pequena, ácido-solúvel, do tipo α/β , que estaria ligada ao DNA conferindo resistência, evitando a quebra do mesmo pelo peróxido de hidrogênio. Foram estudados três tipos de esporos: os que possuíam a proteína SASP; os que não possuíam ($\alpha\beta^-$) e tipos selvagem (wt). Os esporos que não possuíam a proteína ligada ao DNA ($\alpha\beta^-$) e que sobreviveram ao tratamento com o peróxido de hidrogênio desenvolveram um número significativo de mutações, sendo que essas, segundo os autores, podem significar que as proteínas SASP do tipo α/β protegem diretamente o DNA do esporo contra os efeitos do peróxido de hidrogênio e inferem ainda sobre a proteção dessa proteína contra outros agentes que danificam a célula.

Popham et al. (1995) encontraram, porém, que as proteínas SASP tipo α/β , ligadas ao DNA do esporo, conferiam proteção com relação à radiação ultra-violeta e ao calor seco. Segundo os autores, a resistência de esporos de *Bacillus subtilis* com relação ao peróxido de hidrogênio e calor úmido estaria ligada ao conteúdo de água presente no núcleo do esporo, pois, quando houve aumento do conteúdo de água no núcleo houve diminuição de resistência dos esporos, com relação ao peróxido e calor úmido.

b. Esporos de bolores

Vicini et al. (1983) isolaram a partir de suco de pera e tomate alterados em embalagens TetraBrik® o bolor *Mucor spinescens*, que produzia

esporos com baixa termorresistência, com um $D_{60} = 0,5 - 0,7$ minutos, porém, com resistência elevada ao peróxido de hidrogênio sendo que na concentração de 30 % e com 1 minuto de contato foram obtidas 0,5 a 1,5 reduções decimais e mais de 4 para *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium expansum* também presentes nos sucos.

Spotti & Casolari (1987) encontraram que o bolor *Mucor spinescens* (isolado de suco de laranja deteriorado) era mais resistente ao peróxido de hidrogênio e possuía a maior quantidade de catalase no interior do esporo do que os bolores *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium expansum*, ambos com baixa resistência ao peróxido.

Buchen & Marth (1977) trabalharam com duas linhagens de *Aspergillus parasiticus* e uma linhagem de *Aspergillus flavus* e estas foram submetidas a tratamentos com peróxido de hidrogênio nas concentrações de 2, 4, e 6 % (peso/volume) e temperaturas de 20, 30 e 40°C. Os conídios utilizados eram coletados de culturas de 7, 10 e 14 dias. Os autores encontraram que a idade do esporo variou entre as linhagens, influenciando o grau de inativação pelo peróxido de hidrogênio, sendo que em uma delas houve diferença apreciável nas três idades com relação à resistência ao peróxido de hidrogênio. Esta linhagem se apresentou como a mais resistente entre as testadas, e neste caso os conídios de 10 dias tratados com 2 e 6 % de peróxido de hidrogênio apresentaram D_{40} e D_{20} maior que 120 minutos e os de 14 dias a 40°C (2% de peróxido), 30°C (4% de peróxido) e 20°C (6% de peróxido) tiveram um D de 61,9 minutos, 67 min. e 46,8 min, respectivamente. Os conídios mais jovens (7 dias) foram menos resistentes com $D_{40}^{\circ C}$ de 32,9 minutos e $D_{30^{\circ C}}$ de 55 minutos. Segundo os autores,

embora os conídios mais velhos (10 e 14 dias) foram mais resistentes que os mais jovens, não ficou muito evidente uma tendência geral da resistência ao peróxido de hidrogênio com relação à idade do esporo.

Buchen & Marth (1977) inferem que a destruição de esporos provavelmente é devida à desnaturação de proteínas; sendo que os esporos do gênero *Aspergillus* possuem uma grande quantidade de proteínas, o que faz com que esses esporos sejam muito susceptíveis à oxidação pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é um agente oxidante muito potente.

Segundo Sussman & Douthit (1973) a diferença mais evidente entre os esporos e células vegetativas ocorre na parede. Embora ocorra uma grande variação na parede dos vários tipos de esporos e no número de camadas, as paredes dos estadios vegetativos dos fungos usualmente são mais finas e menos complexas. No fungo *Neurospora* essa diferença foi examinada em detalhe e encontrado que os ascosporos e conídios possuíam paredes mais compactas e mais complexas e eram mais resistentes às condições adversas do meio ambiente (pH, a_w , agentes químicos, concentração de sais, altas e baixas temperaturas, e etc.) e constitucionalmente dormentes quando comparados com as células vegetativas. A quitina, que é um polímero de N-acetyl-D-glucosamine, é o principal constituinte das paredes de esporos fúngicos e micélio segundo Pitt & Hocking (1985) e Madigan et. al.(1997).

2.2.1.1. Métodos para avaliação de resistência ao peróxido de hidrogênio

a- Bolores

Para a avaliação de resistência de bolores ao peróxido Buchen &

Marth (1977) utilizaram uma suspensão de esporos de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* obtidas a partir do crescimento do fungo por 7, 10 e 14 dias a 28°C. A concentração inicial de esporos variou de 5×10^6 a 1×10^7 por mL e esta suspensão foi estocada entre 1 e 2°C por 8 semanas, antes da sua utilização. As concentrações de peróxido utilizadas foram 2, 4 e 6 % e essas soluções eram preparadas para cada experimento, a partir de uma solução de peróxido de hidrogênio com 30 % de concentração. Devido à natureza instável do peróxido, a concentração inicial da solução a 30% era determinada mensalmente de modo quantitativo por titulação iodométrica.

Os experimentos dos autores Buchen & Marth (1977) foram realizados nas temperaturas de 20, 30 e 40°C na presença das três concentrações de peróxido, utilizando-se um banho termostaticamente controlado e equipado com um agitador para a uniformização do tratamento. Os autores utilizaram 90 ml de solução de peróxido de hidrogênio, para cada concentração, esta solução foi equilibrada na temperatura desejada, utilizando-se o banho, por 20 minutos. Foi acrescentada à solução, assepticamente, 10 mL de suspensão de esporos. Em intervalos de tempo foi retirado 1 mL da mistura (peróxido + esporos) e descartado em água contendo catalase, para decompor o peróxido residual. Os esporos sobreviventes foram plaqueados em dois meios de cultura (Ágar micológico e de Moyer). A catalase de fígado bovino foi utilizada pelos autores para decompor o peróxido residual após o tratamento, sendo que a eficiência da decomposição foi testada pela adição de iodeto de potássio e solução de amido, uma solução incolor indicava a ausência de peróxido.

b- Bactérias

Stannard et al. (1983) avaliaram o efeito letal do peróxido de hidrogênio em combinação com o tratamento com radiação UV-C (ultravioleta de alta intensidade - 254 nm) para a redução da contaminação microbiana em cartões pré-formados, utilizados para a confecção de embalagens de alimentos. Os microrganismos utilizados no teste pelos autores foram *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus stearothermophilus*, e *Clostridium sporogenes*, além de *Flavobacterium* e *Corynebacterium* e *Bacillus* isolados de leite UHT deteriorado. A suspensão de esporos dos microrganismos foi preparada em laboratório. Dois tipos de laminado foram utilizados sendo que um não continha alumínio. Os laminados foram inoculados com os microrganismos utilizando um borrifador. Foi pulverizada uma solução com 10^8 ou 10^4 organismos/mL por 1 segundo para dar um inóculo final de 10^7 ou 10^3 organismos por embalagem, respectivamente. As embalagens foram deixadas secar. Foram utilizadas concentrações de peróxido de 0 % a 30% (peso/volume) adicionadas usando um “spray” para pulverizar o peróxido no interior da embalagem, sob uma pressão de 20 lb/polegada² em uma taxa de 0,1 mL por 0,6 segundos, para cada embalagem. Em algumas embalagens foi combinado o tratamento com UV-C. Segundo os autores, os esporos juntamente com o peróxido de hidrogênio, após o término do tratamento das embalagens foram adicionados em uma mistura de proteose - peptona (Difco) e catalase para remoção do peróxido residual. Este tipo de trabalho realizado por Stannard et al. (1983) sobre uma superfície não é muito comum, já que a maioria dos trabalhos encontrados na literatura para a avaliação do efeito do peróxido frente a esporos são realizados em meio líquido.

2.2.2. Efeito do peróxido de hidrogênio e radiação ultra-violeta

Os estudos com relação ao efeito do peróxido e radiação ultravioleta referem-se predominantemente às bactérias.

A porção ultravioleta no espectro de radiações situa-se em comprimentos de onda abaixo de 450 nm. As radiações ultravioletas na faixa de 210 e 330 nm são mais eficientes como germicidas. Essas radiações são absorvidas pelas proteínas e ácidos nucleicos, provocando mutações genéticas e inativação de enzimas, podendo resultar na morte da célula, porém, o maior efeito ocorre sobre o DNA. Os bolores são mais resistentes que as bactérias Gram negativas não esporogênicas, cocos Gram positivos e alguns esporos de bactérias. Na área de alimentos, as lâmpadas UV (ultra-violeta) possuem várias aplicações, sendo uma delas a esterilização de embalagens para produtos submetidos ao envase asséptico (Roitman et al., 1988).

A luz UV segundo Papa et al. (1995) é utilizada em câmaras de maturação de salame para evitar o ataque por fungos e leveduras indesejáveis a esse processo e também em câmaras de maturação de queijos e outras instalações ligadas a manipulação/manuseio de alimentos.

Segundo Bayliss & Waites (1979) os esporos de *Bacillus subtilis* irradiados com luz ultra violeta, na presença de peróxido de hidrogênio, tiveram uma morte rápida, sendo até 2000 vezes maior do que quando foram submetidos somente à irradiação. A irradiação UV e o peróxido de hidrogênio agem sinergisticamente matando os esporos, quando utilizados juntos e não sucessivamente, sendo o mesmo observado por Bayliss & Waites (1980) com

bactérias não esporogênicas.

Bayliss & Waites (1982) encontraram que os esporos de *Bacillus subtilis*, irradiados com luz ultra-violeta, na presença de 2,5 % (peso/volume) de peróxido de hidrogênio, tiveram uma morte rápida, porém, concentrações acima de 2,5 % protegiam os esporos contra os efeitos da radiação. Segundo os autores, a utilização de uma lâmpada ultra violeta de alta intensidade ($1,8 \times 10^3$ mW/cm²), combinada com baixas concentrações de peróxido de hidrogênio, permite a esterilização rápida de superfícies de embalagem, contaminadas com esporos fúngicos e bacterianos. As linhagens mais resistentes de *Bacillus subtilis* necessitaram de um aquecimento prévio e suave, para se obter a redução de microrganismos exigida para a esterilização de embalagens utilizadas em processamento asséptico.

Stannard et al. (1983) verificaram que houve um efeito sinérgico do tratamento com peróxido de hidrogênio, combinado com a irradiação ultra - violeta de alta intensidade sobre esporos de *Bacillus subtilis* , sendo que, a letalidade máxima ocorreu na faixa de concentração entre 0,5 e 1 % de peróxido e com 10 segundos de irradiação. A eficiência do tratamento foi dependente também do tipo de superfície interna do cartão, já que os experimentos foram realizados em embalagens de cartão pré-formadas. O melhor efeito letal sobre os esporos foi obtido no cartão revestido com polietileno. Os autores ressaltam ainda que os resultados obtidos são referentes a experimentos realizados sobre a superfície da embalagem, sendo que a maioria é realizado com esporos em solução (Bayliss & Waites, 1979 ; Bayliss & Waites, 1982) e não sobre superfícies.

2.2.3. Aplicação de peróxido de hidrogênio no Sistema Tetra Brik Aseptic

No sistema Tetra Brik Aseptic (TBA) o laminado destinado à confecção das embalagens assépticas está na forma de bobina. Esse laminado é introduzido na máquina e, em movimento, passa através de um banho de peróxido de hidrogênio por imersão. Após o tempo de contato de aproximadamente 6 segundos com o agente esterilizante, um par de rolos remove o excesso de peróxido. Após a desinfecção, o material ganha forma em um tubo de selagem longitudinal. O peróxido de hidrogênio restante sofre evaporação pelo calor em um tubo de aquecimento com ar (sistema TBA3). Primeiramente a água é evaporada do peróxido, ocorrendo um aumento na temperatura e na concentração de peróxido, e logo após ocorre a evaporação do agente esterilizante. A maior temperatura alcançada no interior do tubo de laminado, na camada de plástico, é de aproximadamente 120°C (von Bockelmann, 1982). O produto já esterilizado é adicionado nessa fase ocorrendo a selagem transversal, obtendo-se então a forma final das embalagens.

Segundo Buchener (1978) citado por Smith & Brown (1980), os sistemas de embalagens assépticas empregam o peróxido de hidrogênio na faixa de concentrações de 10 - 35 % em temperatura ambiente ou temperaturas mais elevadas, na forma de spray ou banho de imersão. Quando o sistema de desinfecção é realizado por imersão, os pontos críticos de controle são: a concentração do peróxido de hidrogênio, o tempo e a temperatura de exposição ao agente esterilizante e o nível de peróxido para oferecer total cobertura da superfície de contato (Värnamo, 1982)

2.3 - Fungos Termorresistentes

2.3.1. Sub Reino Ascomicotina

Os fungos do sub - reino Ascomicotina são chamados “Ascomicetos” pois produzem suas estruturas reprodutivas, ascósporos, dentro de um saco chamado asco. Na maioria dos fungos, o núcleo existe no estado haplóide. Em um ponto do ciclo de vida do ascomiceto (Figura 1), são produzidos núcleos diplóides por fusão nuclear. Este núcleo sofre meiose dentro do asco, seguido por uma divisão mitótica e então sofrem diferenciação em oito ascósporos haplóides. Quando os ascósporos amadurecem os ascos sofrem ruptura e estes são liberados. Os ascósporos possuem parede fina, altamente refráteis e são geralmente ornamentados.

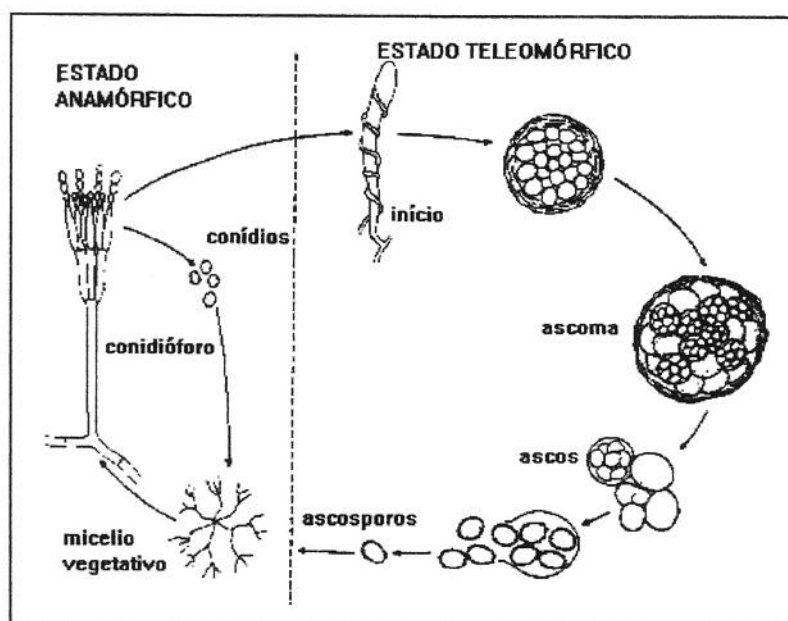


Figura 1. Ciclo reprodutivo dos ascomicetos. Fonte: Adaptado de Samsom & Van Reenen Hoekstra (1988) citado por Gumerato (1995)

2.3.2. Características

A maior parte dos fungos apresenta uma limitada resistência ao calor. Os esporos assexuais (conídios) dos gêneros mais comuns como *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus* e *Fusarium* são mortos quando expostos a temperaturas de 60°C durante cinco minutos (Tournas, 1994). As células vegetativas desses gêneros também são inativadas dentro de 5 a 10 minutos quando aquecidas em água destilada.

Os bolores termorresistentes mais freqüentemente estudados são do gênero *Byssochlamys*, *Neosartorya* e *Talaromyces* devido à participação desses na deterioração de frutas processadas e produtos derivados (Tournas & Traxler, 1994), porém, a produção de toxinas por esses microrganismos, principalmente nos produtos derivados de frutas, é um fator preocupante. O gênero *Byssochlamys* pode produzir a patulina, ácido Bissoclâmico, Byssotoxina A, Assimetrina e Variotina. Certas linhagens de *Neosartorya fischeri* são capazes também de produzir toxinas como as fumitremorginas A, B e C e verruculogena. Estes compostos podem agir no sistema nervoso central provocando tremores, convulsões e morte em animais (Tournas, 1994).

A característica dos bolores termorresistentes é a formação de ascosporos (grupo dos Ascomicetos) resistentes, sendo que a forma e ornamentação desses esporos podem variar com o tipo, as espécies e linhagens de microrganismos (Tournas, 1994). Os gêneros de interesse na área de alimentos normalmente produzem ascos e ascosporos que podem estar dentro de um corpo esférico de parede lisa, a cleistotécia (gênero *Eupenicillium* spp e *Neosartorya* spp.) ou num corpo de paredes formadas de hifas, a gimnotécia

(gênero *Talaromyces* spp) (Pitt & Hocking, 1985).

Os ascos geralmente amadurecem vagarosamente após uma incubação por 10 dias a 25°C, e usualmente nascem dentro de um grande corpo macroscópico chamado ascocarpo (Pitt & Hocking 1985).

Normalmente, as variedades de *Neosartorya fischeri* são descritas com base na ornamentação de seus ascosporos, porém, Girardin & Latgè (1992) utilizaram padrões de proteínas e antigênicos para diferenciar entre três variedades de *N. fischeri* e separar este grupo do fungo *Aspergillus fumigatus*. Os autores utilizaram técnicas como eletroforese em gel realizada a partir de extratos de micélio dos dois fungos. As propriedades antigênicas foram estudadas com o teste ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) e o teste de Imunoblotes.

Samson et al. (1992) trabalharam com polpa de framboesa e concluíram que amostras grandes (100g ou 100ml) são importantes para a enumeração de fungos termorresistentes, assim como Beuchat & Pitt (1992), principalmente pela baixa incidência de ascosporos em frutas (1 a 10 por 100g). Samson et al. (1992), Beuchat & Pitt (1992) e Hocking & Pitt (1984) citados por Samson et al. (1992) utilizaram 100g de produto a ser analisado. Hocking & Pitt (1984) citados por Samson et al. (1992) observaram ainda que um tempo maior que 7 dias é necessário para a enumeração e identificação de bolores termorresistentes, por permitir a germinação de esporos que foram injuriados pelo tratamento térmico aplicado na amostra (80°C por 30min), prática utilizada para separação de bolores não termorresistentes dos bolores termorresistentes.

Jesenská et al. (1991) sugeriram ainda um melhor entendimento da ecologia dos fungos termorresistentes, devido a perdas consideráveis causadas por eles na indústria. Os autores encontraram que o solo contém grandes quantidades do bolor *Neosartorya fischeri*, por isso os equipamentos das plantas de processamento devem ser protegidos do solo e pó, assim como a matéria prima.

O ascomiceto do gênero *Neosartorya* contém sete espécies que são; *N. aurata*, *N. aureola*, *N. fennelliae*, *N. fischeri* var. *fischeri*, *N. quadricincta*, *N. spathulata* e *N. stramenia* e três variedades que são *N. fischeri* var. *fischeri*, *N. fischeri* var. *glabra* e *N. fischeri* var. *spinosa* (Nielsen & Samson, 1992). Segundo os autores, muitas das espécies do gênero de *Neosartorya* são capazes de produzir metabólitos secundários tóxicos e nem todas as espécies são causadoras de deterioração em produtos produzidos com frutas. As variedades mais comumente encontradas em produtos deteriorados derivados de frutas são *Neosartorya fischeri* var. *glabra* e *Neosartorya fischeri* var. *spinosa*.

O fungo *Neosartorya fischeri* (anamorfo = *Aspergillus fischerianus* = *Aspergillus fischeri*) cresce na faixa de temperatura de 10 - 52°C com uma faixa ótima de 26 - 45°C. Os ascósporos formados no estado teleomórfico são excepcionalmente termorresistentes (Nielsen et al., 1989) podendo sobreviver aos processos térmicos comerciais de alguns produtos derivados de frutas e sucos, sendo esse um fator preocupante e que merece atenção especial (Splittstoesser et al., 1993). Segundo Jesenská et al. (1991), o bolor *Neosartorya fischeri* é um membro da família dos micomicetos formando cleistotécia e ascósporos de várias morfologias que podem

sobreviver a temperaturas de 70°C por 120 minutos e 85°C por 60 minutos ou até temperaturas maiores.

Em 1969, acreditava-se que o gênero *Byssochlamys*, que compreende duas espécies *B. fulva* e *B. nivea* era o único que produzia ascosporos suficientemente resistentes ao calor e que sobreviviam aos processos térmicos de alimentos com alta acidez (Splittstoesser et al., 1969).

Nielsen et al. (1989) encontraram que o bolor termorresistente *Byssochlamys nivea* é capaz de crescer e produzir patulina em atmosferas com baixas quantidades de oxigênio (0,2 % de oxigênio), porém, não em condições anaeróbicas estritas. Para *Neosartorya fischeri*, os autores encontraram que esse fungo apresentou crescimento em atmosfera com até 0,1 % de oxigênio, com uma pequena produção de fumitremorginas A, C e verruculogena. Rice (1980) demonstrou que os conteúdos de oxigênio no “headspace” em alguns sucos comercializados, como o de uva em embalagens de vidro foi de 0,16 - 0,58 % de Oxigênio. Com essa afirmação, segundo o autor, é possível inferir que o *N. fischeri* pode crescer e produzir fumitremorginas em alguns produtos a base de frutas, especialmente aqueles acondicionados em embalagens que não são fechadas hermeticamente.

Beuchat (1992) trabalhou com vários tipos de frutas em pó e encontrou que os ascosporos dos fungos *Neosartorya fischeri* e *Talaromyces flavus* podem manter a viabilidade em atividade de água (a_w) de 0,23 e 25°C, em períodos longos de estocagem (30 meses), que segundo o autor, é um período maior do que o normalmente utilizado na prática comercial.

Splittstoesser & Splittstoesser (1977) compararam os fungos *Byssochlamys fulva* e *Aspergillus sp* (*Aspergillus fischeri*) e encontraram similaridades entre eles, como a necessidade de calor para a quebra de dormência do esporo, ordem não logarítmica de morte e aumento de resistência ao calor em soluções contendo açúcar, sendo a maior diferença entre eles a resposta aos ácidos orgânicos.

Maggi et al. (1994) encontraram que os ascosporos de *Byssochlamys nivea*, *Byssochlamys fulva* e *Neosartorya fischeri* foram os mais resistentes quando submetidos a tratamentos com altas pressões (6000, 7000, 8000 e 9000 bars) a 20°C, com pré-aquecimento do produto a 50 e 60°C. Foi utilizado nectar de damasco e água destilada. Os ascosporos de *Talaromyces flavus* apresentaram baixa resistência nas condições estudadas, porém, os ascosporos de *Byssochlamys nivea*, que se mostraram os mais resistentes, foram completamente inativados na pressão de 8000 bars em 3 minutos com um pré-aquecimento de 50°C.

Splittstoesser & Churey (1991) observaram que, com a adição de 100 mg/l de dióxido de enxofre (SO₂) em suco de frutas, houve redução em 50% da resistência ao calor de ascosporos de *Neosartorya fischeri* e, com o aumento de pH de 3,0 para 5,0, o efeito do SO₂ foi menor sobre a redução de termorresistência.

Samsom et al. (1992) fizeram um levantamento dos microrganismos existentes em polpa de framboesa e as suas viabilidades após o tratamento térmico a 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, e 100°C. Na temperatura de 70°C e acima, só foram detectados os bolores termorresistentes *Neosartorya*,

Eupenicillium, *Hamigera* e *Byssochlamys*. Foram isoladas três espécies do fungo *Hamigera*, descrito pela primeira vez nesse estudo como um bolor deteriorador de alimento e termorresistente. Aragão (1989) estudou a ocorrência de fungos filamentosos termorresistentes em 15 amostras de polpa de morango sendo que o gênero mais prevalente foi o *Eupenicillium* spp e em segundo *Talaromyces* spp além de *Byssochlamys nivea* e *N. fischeri* com menor ocorrência.

Baglioni (1998) encontrou que a ocorrência de fungos filamentosos termorresistentes durante o processamento asséptico de polpa de tomate é baixo variando de <1 a 8 UFC/100 ml de amostra, porém, maiores contagens para esses bolores foram obtidas na matéria prima, na água de pré-lavagem e transporte. De 50 isolados de fungos termorresistentes encontrados pelo autor, o mais termorresistente foi o *N. fischeri* com sobrevivência ao choque de 100°C por 25 minutos em polpa de tomate. A deterioração causada por este bolor foi a perda total de viscosidade da polpa, elevação do pH até 9,0 e escurecimento do produto.

2.3.3. Meio de crescimento, isolamento e esporulação de fungos termorresistentes

A escolha do meio de crescimento é muito importante pois é nele que características especiais são observadas para que se possa identificar um fungo. O meio escolhido depende muito do que se deseja obter, se o interesse é que o fungo tenha intensa esporulação ou ascósporos mais resistentes ou um crescimento mais rápido utiliza-se o meio mais adequado para cada propósito.

Segundo Tournas (1994), o fungo *Byssochlamys fulva* cresce rapidamente em ágar Czapek e igualmente de modo rápido em CYA (agar extrato de levedura). As colônias obtidas em Ágar batata dextrose (PDA) e Ágar extrato de malte (MEA) são semelhantes àquelas do ágar Czapek, exceto por elas serem mais funiculosas. O fungo *Byssochlamys nivea* apresenta um crescimento rápido em ágar Czapek a 30°C e o crescimento é similar em PDA e MEA, sendo mais rápido no início em MEA, porém, o *B. nivea* cresce melhor em ágar Saboraud, alcançando um diâmetro de colônia de 45 mm após 2 dias. Se o objetivo é a obtenção de estruturas conidiais, estas são obtidas mais abundantemente em ágar Czapek do que em MEA.

O meio de cultura Ágar malte (M.A) , também pode ser utilizado para o crescimento dos fungos termorresistentes. Segundo Peterson (1992), quando um bolor é incubado nesse meio a 25°C, ele produz ascomata abundantemente e um número limitado de conídios, portanto, a aparência da colônia é dominada pela ascomata. Nenhum exudato ou pigmento solúvel foi observado pelo autor com a cultura de *Aspergillus thermomutatus* nesse meio e temperatura de incubação.

O fungo *Neosartorya fischeri*, segundo Tournas (1994), desenvolve cleistotécia de modo abundante em CYA, porém, as colônias formadas em MEA são maiores. Já para *Talaromyces flavus* ocorre crescimento em CYA e MEA de modo semelhante, porém, em MEA ocorre a formação de gimnotécia de modo mais abundante.

King Jr. & Whitehand (1990) observaram que os ascosporos do fungo *Talaromyces flavus* eram mais termorresistentes quando o fungo teve

seu crescimento em MEA, em estado sólido, do que quando cresceu em um meio de composição similar, porém, sem ágar. Segundo os autores, esse dado é muito importante porque em uma situação prática, um fungo que contamina um produto pode variar na sua resistência térmica, dependendo do meio no qual ele cresceu e produziu ascosporos, que pode ser na superfície de um líquido ou em contato com superfícies na indústria, ou tecido de plantas antes do processamento.

Os bolores do gênero *Neosartorya*, segundo Nielsen & Samson (1992), podem ser cultivados em vários meios de cultura como o ágar farinha de aveia (OA); ágar extrato de levedura Czapek (CYA); ágar extrato de malte (MEA); ágar sacarose extrato de levedura (YES), porém, os ascosporos utilizados na pesquisa foram coletados do meio OA, sem explicação do autor para a escolha. O meio de crescimento utilizado para *Neosartorya fischeri* por Conner & Beauchat (1987b) foi o PDA (pH 5,6) com incubação a 30°C.

Para o isolamento do fungo *N. fischeri* a partir de amostras de solo, foi utilizado por Jesenská et al. (1991) o meio ágar Saboraud com pH 6,57, contendo ainda 150 mg de rosa bengala/L. Tournas & Traxler (1994) isolaram o fungo *N. fischeri* de suco de abacaxi concentrado e utilizaram o ágar Czapek para o crescimento e esporulação deste fungo.

O meio utilizado por Nielsen et al. (1989), quando o objetivo foi a produção de toxinas, mais precisamente de fumitremorginas, foi o CYA, por este meio ter se revelado, por estudos prévios, um bom substrato para a produção destas toxinas.

Casella et al. (1990) testaram a influência do meio de crescimento na resistência térmica de ascosporos de *Byssosclamyces nivea* e encontraram que os esporos provenientes do meio MEA eram mais termorresistentes do que os obtidos a partir do meio PDA .

King Jr. & Halbrook (1987) escolheram o MEA para *Talaromyces flavus* como meio de crescimento pois este meio proporcionou um maior crescimento a este bolor do que o PDA, quando foram comparados.

Bayne & Michener (1979), em seu experimento para a determinação de resistência térmica de ascosporos de *Byssosclamyces*, tinham a necessidade de utilizar um meio de crescimento que desse condições para a formação de ascosporos mais termorresistentes. Foi observado pelos autores que nem todas as linhagens cresciam rapidamente ou mesmo produziam ascos nos meios considerados padrões como o PDA e MEA. Os autores inferem sobre a possibilidade de que somente culturas crescidas em meios naturais produzam ascosporos tão resistentes como os encontrados na contaminação industrial.

Splittstoesser et al. (1969) compararam caldos de extrato de levedura- triptona - glucose, PDA e caldo de extrato de malte e obtiveram a máxima população de esporos de *Byssosclamyces fulva* em caldo de extrato de malte, após uma incubação de 7-14 dias a 30°C, sendo o pH ótimo do meio abaixo de 3,0.

Apesar de existirem muitos meios para o crescimento de bolores termorresistentes, os que mais são citados pela literatura para o crescimento e

esporulação dos gêneros *Neosartorya*, *Byssochlamys*, *Talaromyces* são o MEA, PDA e CYA, porém, deve-se levar em consideração o objetivo de cada estudo. Sabe-se pela literatura que os meios de crescimento com maior teor de açúcar produzem esporos mais termorresistentes.

2.3.4. Fatores que aumentam a termorresistência

Segundo Pitt & Hocking (1985) o grau de resistência térmica dos ascosporos de *N. fischeri* é comparável ao de muitos esporos bacterianos e maior do que a resistência dos ascosporos de *Byssochlamys fulva*. A resistência ao calor das espécies de fungos termorresistentes é dependente de vários fatores, como a cepa em estudo, o tipo de meio de aquecimento, o tratamento térmico aplicado, a idade dos ascosporos, o meio de esporulação entre outros. Baglioni (1998) fez uma revisão completa dos fatores, sendo discutidos aqui apenas os mais relevantes.

2.3.4.1. Temperatura de crescimento

Segundo King Jr. & Whitehand (1990), a temperatura na qual o fungo cresce é muito importante para sua resistência ao calor. O fungo *Talaromyces flavus* teve seu crescimento nas temperaturas de 20, 25, 30 e 35°C. Os autores encontraram que houve uma produção abundante de ascosporos nas temperaturas de 25, 30 e 35°C e limitada a 20°C. A resistência térmica foi maior para os ascosporos produzidos em temperaturas extremas, ou seja, 20 e 35°C, sendo 1/k de 5,2 e 4,8 minutos, respectivamente, do que para os ascosporos produzidos nas temperaturas intermediárias de 25 e 30°C sendo 1/k de 3,0 e 4,1 minutos, respectivamente.

2.3.4.2. Idade do esporo

Doyle & Marth (1975 a) trabalharam com conídios de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* que foram testados nas temperaturas de 40, 50, 55 e 60°C utilizando calor úmido em várias idades do esporo. Os autores encontraram que conídios mais velhos eram menos resistentes ao calor úmido, do que os mais jovens quando tratados a 55°C por aproximadamente 45 minutos.

Conner & Beuchat (1987 b) encontraram que ascosporos de *Neosartorya fischeri* var. *glaber* FRR 1833 de 21 dias de idade eram mais termorresistentes que os de 8 dias. Os ascosporos cultivados em temperaturas menores (18 e 21°C) tendiam a ser menos resistentes ao calor do que ascosporos da mesma idade, cultivados a 25 e 30°C. Su & Beuchat (1984) citados por Conner & Beuchat (1987b) indicaram que células fisiologicamente velhas de *Hansenula anomala* eram mais termorresistentes que células jovens. Segundo os autores, esse resultado seria devido às reações bioquímicas serem dependentes da temperatura, sendo assim, os ascosporos formados em temperaturas de incubação menores são fisiologicamente mais jovens do que aqueles formados em temperaturas maiores.

Segundo Conner & Beuchat (1987 a) muitos fatores podem influenciar a resposta de ascosporos de *Neosartorya fischeri* ao tratamento térmico e assim causar uma variação nos valores D (tempo em minutos necessário para reduzir uma população em 90% em uma dada temperatura) obtidos em estudos de tempo de morte térmica (TDT). Assim, para a padronização dos valores D, os fatores como natureza do meio de

aquecimento, produção de ascosporos, idade dos esporos, pH do meio e presença de ácidos orgânicos devem ser bem definidos, assim como a temperatura do tratamento.

Casella et al. (1990) observaram que os ascosporos mais velhos (16 semanas) de *Byssoschlamys nivea* eram mais resistentes ao tratamento térmico do que os mais jovens (8 semanas), porém, esse fato somente ocorreu quando os esporos eram obtidos a partir de um meio muito nutritivo como o MEA nas temperaturas de 25 e 35° C. No meio PDA, que é menos nutritivo, esse fato somente ocorreu com a incubação a 35°C e não a 25°C, nesse caso o substrato afetou a termorresistência dos ascosporos. Conner & Beuchat (1987 b), entretanto, encontraram que o tipo de meio de esporulação não afetou a termorresistência de ascosporos de *Neosartorya fischeri*, porém, Su & Beachaut (1987) citado por Conner & Beuchat (1987 b), observaram que a composição do meio de esporulação influenciava a resistência ao calor da levedura ascoporógena *Hansenula anomala*.

Nielsen & Nielsen (1995) estudaram o efeito de alguns desinfetantes sobre fungos normalmente encontrados em processos de fabricação de pães e queijos e investigaram a resistência de ascosporos e conídios de várias idades frente ao etanol 70 %. As culturas utilizadas para testar a relação existente entre a idade do ascosporo e a resistência ao etanol foram cultivadas de 17 a 110 dias. Os autores encontraram que a resistência dos ascosporos de *Eurotium repens*, *Monascus ruber* e *Neosartorya pseudofischeri* era fortemente aumentada pela idade, porém, para conídios de alguns fungos não foi observada a relação entre o aumento da idade do esporo e aumento da resistência ao etanol 70 %. Os autores inferem que o aumento de

resistência observada com a idade, para ascosporos, pode ser consequência de alterações estruturais e/ ou bioquímicas ocorridas no esporo com o tempo, o que poderia explicar essa alteração de resistência ao etanol.

Tournas & Traxler (1994) trabalharam com ascosporos de *Neosartorya fischeri* de 1, 2, 3 e 6 meses de idade, isolados de suco concentrado de abacaxi, que foram aquecidos a 88 °C por 1 hora em água deionizada e encontraram que os ascosporos mais velhos eram mais resistentes do que os mais jovens a essa temperatura. Segundo os autores, quando o processo é delineado, com relação à temperatura de aquecimento, deve-se considerar a presença de ascosporos extremamente maduros e assim delineia-se o processo.

2.3.4.3 Altas concentrações de solutos no meio

Doyle & Marth (1975 a, b) mostraram que a resistência ao calor de conidiosporos de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* aumentou em soluções que continham sacarose, glucose e cloreto de sódio.

Splittstoesser (1978) citado por Tournas (1994) estudaram o efeito de açúcares na resistência ao calor de ascosporos de *Byssochlamys fulva* e *Aspergillus fischeri*. O autor observou que, quando os esporos eram aquecidos em soluções de glicose, havia um número maior de sobreviventes. Splittstoesser & Splittstoesser (1977) igualmente observaram que, com a elevação da concentração da solução de glicose, para os mesmos microrganismos, houve aumento no número de sobreviventes após o tratamento térmico de 75 minutos a 85°C para *Byssochlamys fulva* e 60

minutos a 85°C para *Aspergillus* WR1, levando-os a concluir que a glucose possuía um efeito protetor. Conner e Beuchat (1987 a) encontraram que a resistência de ascosporos de três linhagens de *Neosartorya fischeri* em temperaturas elevadas aumentava em soluções contendo maiores concentrações de sacarídeos. Os autores testaram o meio de suco de maçã (12,3°Brix), uva (16,6°Brix) e tampão fosfato e encontraram que as linhagens sobreviveram ao tratamento de 95°C por 30 minutos em suco de maçã e não nos outros meios, isto sugere que os açúcares, glicose, sacarose e frutose, em associação com os ácidos orgânicos ou pH do suco de maçã, protegeram os ascosporos.

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

Uma maior quantidade de açúcar no meio de aquecimento também aumentou a resistência ao calor de ascosporos de *Talaromyces flavus* (King Jr & Whitehand, 1990).

Conner & Beuchat (1987) encontraram maiores concentrações de glicerol, manitol e trealose em ascosporos mais termorresistentes.

2.3.4.4. Ácidos graxos

A presença de ácidos graxos de cadeia longa (com mais de 20 carbonos) em ascosporos de *Byssoschlamys fulva* é apontado por Banner et al. (1979) como um provável fator de termorresistência deste fungo. Os autores observaram ainda que os minerais mais abundantes nos esporos das duas linhagens de *Byssoschlamys fulva* eram fósforo, potássio e sódio, porém, eles estão presentes em esporos de outros fungos não sendo provavelmente esse o fator que confere termorresistência a esse gênero.

2.3.4.5. Ácidos orgânicos

King Jr. & Whitehand (1990) não observaram a influência dos diferentes tipos de ácidos orgânicos (ácido cítrico, málico, láctico ou tartárico) presentes no meio de aquecimento (pH 5,0 e 16° Brix) com relação à maior ou menor termorresistência de *Talaromyces flavus*.

Conner & Beuchat (1987 b) estudaram três linhagens de *Neosartorya fischeri* em suco de maçã, uva e tampão fosfato 0,1M (pH 7,0) e encontraram que o tipo, porcentagem e molaridade do ácido orgânico, adicionado ao meio de aquecimento agem sinergisticamente com o calor para inativar os ascosporos de *N. fischeri*.

Conner & Beuchat (1987 b) enfatizam ainda que o conhecimento de fatores tais como, o tipo de ácido orgânico em sucos de frutas e o pH fornecem um melhor direcionamento dos procedimentos que podem ser utilizados, para mais efetivamente inativar ascosporos pelo calor em produtos

a base de frutas, reduzindo assim o risco de deterioração do produto.

Splittstoesser & Splittstoesser (1977) encontraram que em *Byssochlamys fulva* houve uma maior resistência ao calor (85° C por 120 minutos) quando os esporos foram aquecidos em soluções de pH=3,0 dos ácidos málico, tartárico e cítrico e uma menor resistência quando o meio de aquecimento foi uma solução dos ácidos fumárico, láctico, succínico e acético. Todos os ácidos mencionados foram testados separadamente. Os autores observaram ainda que, em *Aspergillus* a adição de ácidos orgânicos não aumentou e nem diminuiu a termorresistência dos esporos deste bolor.

2.3.4.6. Potencial Hidrogeniônico (pH)

O pH do meio, segundo Splittstoesser et al. (1969) é um fator que afeta a produção de ascosporos caso de *Byssochlamys fulva*. A máxima produção de ascosporos foi obtida no meio de caldo de extrato de malte, na faixa de pH 2 - 3.

Segundo Splittstoesser & Splittstoesser (1977) os ascosporos de *Byssochlamys fulva* apresentaram uma máxima resistência ao tratamento de 85°C por 60 minutos entre pH 3,0 e 4,0. Em pH maior, eles se mostraram mais sensíveis ao tratamento térmico. Em ascosporos de *Aspergillus fischeri* os autores observaram uma boa porcentagem de sobrevivência entre pH 3,0 e 5,5.

2.4. Fungos Imperfeitos - Sub reino Deuteromycotina

Os deuteromicetos ou fungos imperfeitos incluem importantes

contaminantes de alimentos, apresentando muitas espécies capazes de produzirem metabólitos tóxicos (Samson & Hoekstra, 1988). Produzem somente esporos assexuais ou “imperfeitos” que são quase sempre haplóides. A forma geral dos esporos dos deuteromicetos é o conídio, mas existem outros nomes especializados para tipos específicos de conídios. Por não apresentarem ascósporos, os deuteromicetos não são usualmente termorresistentes, mas os conídios podem ser muitos resistentes a agentes químicos (Pitt & Hocking, 1985).

2.4.1. *Paecilomyces variotii*

O *P. variotii* segundo Whitfield et al.(1997) pode converter o fungicida 2,4,6 tribromophenol em 2,4,6 tribromoanisol que possui um odor azedo, esse composto foi encontrado em uvas passas embaladas em bolsas de polietileno, após uma semana de estocagem, sendo o composto produzido a 22 ou 30°C.

É conhecida a utilização de ácido sórbico e seu sais como agentes antimicrobianos em margarinas e queijos processados e também que fungos e bactérias ácido-lácticas podem metabolizar os sorbatos por descarboxilação, produzindo trans-1,3 pentadieno ou trans-piperileno. Linhagens de *P. variotii* resistentes ao sorbato foram isoladas de amostras de queijos e margarina com “off flavor” onde foi encontrado o composto trans-1,3-pentadieno (Sensidoni et al., 1994). O *P. variotii* também foi causador de deterioração em óleos comestíveis (Hocking, 1994) e foi totalmente eliminado quando irradiado com 6 kGy em sementes de gergelim artificialmente contaminadas com esse fungo (Hammad et al., 1995).

2.5. Parâmetros de resistência térmica

Splittstoesser et al. (1972) verificaram que a ativação de ascósporos de *Byssoschlamys fulva* era influenciada pela temperatura e pelo meio no qual eles estavam. Os autores encontraram que a 60°C por 120 minutos o número de esporos ativados foi maior em pH 1,0, sendo que com o aumento do pH para 1,4 ocorreu uma diminuição de quase 90 % no número de esporos ativados. Os esporos ativados foram estocados em suspensão aquosa a 32°C, sendo que após períodos de tempos essa suspensão foi plaqueada e os autores observaram que 50% dos esporos voltaram ao estado de dormência.

Algumas pesquisas têm sido realizadas para a determinação dos parâmetros de resistência térmica em bolores, utilizando sucos de frutas e outros meios como substrato. Um resumo destes valores é apresentado na tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros de resistência térmica de bolores

Autor	Bolor	Valor de $D_{T^{\circ}C}$ (minutos)	Valor Z ($^{\circ}C$)	Método e Meio utilizado
Aragão (1989)	<i>Neosartorya fischeri</i>	$D_{80} = 59,5$ $D_{85} = 14,5$ $D_{90} = 2,6$ $D_{93} = 0,5$	6,17	Frasco de três bocas (Meio = Suco de morango com pH = 3,0 e 15°Brix)
	<i>Byssoscllamys nivea</i>	$D_{80} = 193,1$ $D_{85} = 34,6$ $D_{90} = 6,3$ $D_{93} = 1,7$	6,15	
	<i>Talaromyces flavus</i>	$D_{75} = 53,9$ $D_{80} = 17,9$ $D_{85} = 3,3$ $D_{90} = 0,9$	9,25	
	<i>Eupenicillium javanicum</i>	$D_{80} = 14,5$ $D_{85} = 3,7$ $D_{90} = 0,8$	7,79	
Doyle & Marth (1975 a)	<i>Aspergillus flavus</i>	$D_{55} = 3,1$	4,0	Frasco de três bocas (Meio = Solução Tampão com pH=7,0)
	<i>A. parasiticus</i> (conídios de 10 dias)	$D_{55} = 8,4$	3,9	
Doyle & Marth (1975 b)	<i>A. flavus</i>	$D_{55} = 3,7$ (pH = 4,5)	*	Frasco de três bocas Meio = Água tamponada com acetato de sódio e ácido acético
	<i>A. parasiticus</i>	$D_{55} = 17,7$ min. (pH = 3,5)		
Michener & King. Jr.(1974)	<i>Byssoscllamys fulva</i>	$D_{86} = 13$	*	Tubo TDT (Tempo de morte térmica) e Frasco de três bocas Meio = suco de uva
Bayne & Michener (1979)	<i>Byssoscllamys fulva</i> (1 mês)	$D_{90} = 1,2$ a 46 (3log ₁₀)	*	Tubos TDT. Meio = Solução de glicose 16°Brix + 0,033m de ácido tartárico, pH = 5,0
King. Jr. & Halbrook (1987)	<i>Talaromyces flavus</i> (1 mês)	$D_{90} = 2$ a 8	10,3	Tubos TDT. Meio = Glucose - ácido tartárico , pH= 5,0
Tournas & Traxler (1994)	<i>Neosartorya fischeri</i> (3 meses)	$D_{85} = 20,6$ $D_{88} = 12,6$ $D_{90} = 4,7$ $D_{95} = 2,8$	9,1	Put & De Jong (1982) (Meio = Água deionizada)

Ccontinuação da tabela 1 da página 39

King Jr. & Whitehand (1990)	<i>Talaromyces flavus</i>	D ₈₅ = 22 (meio líquido) D ₈₅ = 39 (meio sólido)	*	Tubos TDT fechados com calor (Meio = Solução de glicose 16°Brix + 0,033m de ácido tartárico, pH = 5,0)
Baglioni (1998)	<i>Neosartorya fischeri</i> 1 mês de idade	D ₉₀ = 6,14 D ₉₂ = 4,72 D ₉₄ = 2,62	10,8	Tubos TDT selados com aquecimento (meio = polpa de tomate, 8°Brix)
	3 meses de idade	D ₉₀ = 10,2 D ₉₂ = 6,31 D ₉₄ = 4,59	11,6	
Splittstoesser et al. (1993)	<i>Neosartorya aureola</i> <i>N.fischeri</i> var. <i>glabra</i> <i>N. pseudofischeri</i>	D ₈₅ = 10 D ₈₅ = 12 D ₈₅ = 12	*	Tubos capilares fechados com aquecimento (Meio= Suco de uva 4,5°Brix)
Gumerato (1995)	<i>Neosartorya fischeri</i> (1 mês de idade)	D ₈₅ = 15,11 D ₈₈ = 4,70 D ₉₀ = 2,63 D ₉₃ = 0,43	5,28	Tubos TDT fechados com tampão de algodão (meio = suco de maçã 15,5°Brix e pH = 3,0)
Nielsen & Samsom (1992)	<i>Neosartorya aureola</i> <i>N. pseudofischeri</i> <i>N. fischeri</i> var. <i>fischeri</i>	D ₈₅ = 10 D ₈₅ = 25 D ₉₀ = 2	12,0 7,0 9,0	Tubos com tampa rosqueável colocados em banho com agitação (Meio = Suco de maçã)

* = Valores de Z (°C) não foram apresentados no trabalho

2.6. Cinética da Inativação térmica (Método de linearização de Alderton & Snell , 1970)

A maior parte dos microrganismos apresenta uma taxa de inativação térmica logarítmica, ou seja, é obtida uma linha reta quando se constrói a curva de morte plotando-se o logaritmo do número de sobreviventes *versus* tempo de aquecimento a uma dada temperatura (King Jr. et al., 1979). Ao colocar os valores encontrados para os fungos

termorresistentes em gráficos, observa-se que a curva de inativação térmica não é logarítmica, apresentando um “ombro” no início, seguido de uma taxa de morte acelerada (parte logarítmica da curva). À medida que a temperatura de inativação aumenta, a fase “lag” ou “ombro” vai diminuindo, ficando a curva semelhante a uma reta (King Jr. et al. 1979; Bayne & Michener, 1979; King & Halbrook 1987; Kotzekidou, 1997, Baglioni, 1998). Um dos métodos utilizados para linearização da curva não logarítmica de sobrevivência é o método de Alderton & Snell (1970)

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

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

onde:

N_0 = Número inicial de esporos/ml

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

a = expoente para linearização

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

C = Constante e intercepto da curva linearizada

T = tempo (minutos)

O valor de “ a ” é o inverso do coeficiente angular da curva $\log (\log N_0 - \log N)$ versus $\log t$, sendo calculado para o menor tratamento térmico e pode ser aplicado na linearização das demais curvas. Se a taxa de morte segue a equação 1 e se não ocorrerem erros experimentais, “ C ” seria zero. Sendo assim, o valor de “ $1/k$ ” é derivado da equação 2:

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

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

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

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

2.7. Métodos para avaliação de resistência térmica em bolores

Basicamente são 4 os métodos utilizados para a avaliação de resistência térmica de esporos de microrganismos - método do frasco de três bocas, tubo TDT (selados ou não), tubo capilar e lata TDT, sendo que todos se baseiam no aquecimento do microrganismo nas temperaturas de estudo desejadas e verificação da posterior sobrevivência do mesmo. Nos ensaios para essa avaliação os parâmetros temperatura e tempo de processo devem ser rigorosamente controlados (Stumbo, 1973).

A metodologia utilizada para verificação da resistência térmica de fungos é realizada em várias etapas. A metodologia envolve produção de um lote de esporos, coleta, ativação e posterior aplicação de choques programados e subcultura em meio de recuperação adequado.

a – Produção e coleta de ascosporos

Para a produção de ascosporos de bolores termorresistentes foram utilizados por Aragão (1989) e Casella et al. (1990) os meios de cultura PDA e

MEA, porém Baglioni (1998) utilizou somente o MEA para bolores isolados de polpa de tomate processada assepticamente, água de lavagem e transporte. Kotzekidou (1997) utilizou o meio MEA para a obtenção de bolores de *Byssochlamys nivea*, *B. fulva* e *N. fischeri* isolados de pasta de tomate em lata. Rajashekhara et al. (1996) estudou o bolor *N. fischeri* isolado de mamão deteriorado e Suresh et al. (1996) estudou o *N. fischeri* isolado de uvas sendo que ambos utilizaram o meio PDA em placas para produção de ascosporos deste bolor. Scott & Bernard (1987) utilizaram o meio Ágar malte (M.A) para produção de esporos de *Talaromyces flavus* e *Neosartorya fischeri* isolados de sucos de abacaxi com “grapefruit” e de suco de maçã. King Jr & Whitehand (1990) utilizaram o meio MEA adicionado de 7,5 ppm de rosa bengala e incubados por 30 dias à 25°C para a produção de ascosporos de *Talaromyces flavus* var. *macrosporus*, isolada de sucos de frutas deteriorados. King Jr & Halbrook (1987) utilizaram o meio Caldo Extrato de Malte para a produção de ascosporos que eram homogeneizados continuamente com ajuda de um misturador.

Segundo Casella et al. (1990), houve um forte aumento nos valores de D com o aumento da idade de ascosporos de *Byssochlamys nivea* crescidos em meio de cultura MEA, este aumento foi menos pronunciado em ascosporos cultivados em PDA. O meio MEA é um meio mais nutritivo que o meio PDA e sendo assim ascosporos formados em meio mais nutritivo (MEA) foram mais resistentes à temperatura.

Splittstoesser & Splittstoesser (1977) observaram que não houve alteração na contagem da suspensão de ascosporos de *Byssochlamys fulva* causada pelo congelamento, sendo de 190×10^6 /ml antes e 200×10^6 /ml após

o congelamento e descongelamento de 9 vezes em 25 dias. As suspensões de ascosporos preparadas para o bolor *N. fischeri* por Rajashekhara et al. (1996) e Suresh et al. (1996) foram congeladas até a utilização posterior .

Aragão (1989) e Scott & Bernard (1987) após o tempo de 4 a 6 semanas de incubação coletaram os ascosporos por raspagem do micélio, filtração e estocados em garrafas contendo pérolas de vidro em geladeira (4°C) até a utilização. A presença de ascosporos e ascos foi verificada através de exame sob microscópio.

Na pesquisa de Aragão (1989), a coleta dos ascosporos da superfície do meio foi realizada adicionando-se pérolas de vidro e água estéril em cada garrafa, com agitação manual. A suspensão resultante foi filtrada através de várias camadas de gaze estéril e centrifugada a 5000 rpm por 15 minutos. Para se obter uma limpeza mais completa dos esporos, estes foram centrifugados com água estéril (duas vezes) e o precipitado ressuspendido em água estéril, para obtenção de uma contagem final entre 10^6 e 10^7 ascosporos/ml. Para todos os fungos em estudo o procedimento de centrifugação foi suficiente para liberar os ascosporos dos ascos, exceto para o *Byssochlamys nivea*, que foi submetido a vários procedimentos, porém, nenhum foi satisfatório, demonstrando segundo o autor, que essas estruturas possuem alta resistência física nesse bolor .

Baglioni (1998) utilizou uma bagueta de vidro estéril para raspagem do micélio e a suspensão resultante foi centrifugada 3 vezes para limpeza a $11962,6 \times g$ por 15 minutos a 4°C. Para a coleta de ascosporos de *N. fischeri* por Suresh et al. (1996) e Rajashekhara et al. (1996) foi utilizada água

destilada estéril contendo 0,1% de Tween 80 para evitar formação de grumos.

King Jr & Halbrook (1987) utilizaram água peptonada 0,1% para lavagem dos ascosporos de *T. flavus*. Os ascos e cleistotécia foram quebrados por pressão (até 8000 PSIG) como também em King Jr & Whitehand (1990) para ascosporos de *T. flavus* var *macrosporos*. Baglioni (1998) e Gumerato (1995) utilizaram água destilada estéril para lavagem dos ascosporos dos bolores isolados e para as suspensões que apresentavam grumos ou ascos inteiros utilizaram o processo de sonicação, sendo o tempo de 2 em 2 minutos, com observação sob microscópio, até ausência de grumos em Baglioni (1998) e por 20 minutos em Gumerato (1995) .

b - Ativação dos esporos

King Jr & Halbrook (1987) encontraram que a ativação térmica para as 3 culturas estudadas de *T. flavus* era de 12 - 15 minutos a 80°C, 6-8 minutos a 85°C e 1-2 minutos a 90°C.

O binômio ótimo (tempo x temperatura) para ativação do fungo termorresistente *N. fischeri* encontrado por Rajashekhara et al. (1996) foi 80°C por 30 minutos e Suresh et al. (1996) encontraram 15 a 60 minutos a 75°C ou 15 minutos a 80°C sendo que ambos utilizaram a metodologia do frasco de 3 bocas . King Jr. et al. (1979) utilizaram tubos TDT selados para ativação a 80°C por 20 minutos de ascosporos de *Byssoschlamys fulva* .

c- Determinação de resistência térmica

No caso de Aragão (1989), o método utilizado foi o do frasco de três bocas, como também por Doyle & Marth (1975 a e b) para determinar a resistência térmica de conídios de *Aspergillus* e Rajashekhara et al. (1996) e Suresh et al. (1996) para encontrar a resistência térmica de ascosporos de *Neosartorya fischeri*. Além deste método, Aragão (1989) testou também o método com tubos TDT, porém, os resultados obtidos não foram reprodutíveis.

King Jr & Halbrook (1987) utilizaram o meio de glicose – tartarato (5 mg/ml) 16° Brix como meio de aquecimento para determinar a resistência térmica de *T. flavus*, sendo esse meio de aquecimento utilizado para a comparação com estudos prévios de bolores termorresistentes. A curva de morte obtida não era logarítmica, porém, se aproximava da curva logarítmica em temperaturas mais elevadas. Os ensaios foram realizados utilizando-se tubos TDT selados como também em Scott & Bernard (1987), Kotzekidou (1997), King Jr & Whitehand (1990).

Casella et al. (1990) utilizaram bolsas de alumínio estéreis seladas com um dispositivo especial para os testes de resistência térmica, sendo que a suspensão de esporos nas bolsas atingiam a temperatura do teste em menos de 15 segundos, após imersão no banho de água pré aquecido.

A resistência térmica foi conduzida por Splittstoesser & Splittstoesser (1977) com esporos previamente ativados sendo utilizados tubos de rosca de 16x 150 mm. Após o aquecimento por um período de tempo

desejado, os tubos foram transferidos para banho de gelo até as suspensões serem plaqueadas.

King Jr. et al. (1979) utilizaram tubos TDT selados no maçarico para os ensaios de resistência térmica dos ascosporos de *B. fulva*. Os tempos de aquecimento foram corrigidos utilizando-se 1,7 min de subida da temperatura (“come up time”).

2.8. Meio de recuperação após ensaios de resistência térmica

No trabalho de Aragão (1989), foi colocado no interior do balão de três bocas o suco de morango estéril e este foi aquecido até a estabilização na temperatura desejada, colocando-se em seguida a suspensão de esporos previamente ativada. As amostras foram retiradas inicialmente e subsequente em tempos definidos, resfriadas e plaqueadas em PDA com rosa bengala e incubadas a 30°C.

Buchen & Marth (1977) avaliaram dois tipos de meios (ágar micológico e Meio de Moyer) para a recuperação de conídios de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, após experimento de resistência ao peróxido de hidrogênio, nas temperaturas de 20, 30 e 40°C. Os autores não encontraram diferenças na recuperação dos conídios nos dois meios. Com o resultado deste experimento é possível inferir que, o tipo de meio não foi um fator determinante para a recuperação de conídios após o tratamento, porém, nesse caso é preciso levar em consideração que as temperaturas de tratamento não eram altas. Segundo os autores, os conídios de *Aspergillus* não mostraram exigências específicas para a germinação e crescimento após o tratamento.

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

Gumerato (1995) utilizou a contagem em profundidade em meio MEA para determinar o número de sobreviventes de *N. fischeri* isolado de maçãs, após o tratamento térmico dos ascósporos a 85, 88, 90 e 93°C, sendo a leitura das colônias formadas realizada após 72 horas (+/- 4 horas) a 30°C (+/- 1°C).

Splittstoesser & Churey (1991), Splittstoesser et al. (1993) e Beauchat (1992) utilizaram o meio PDA para a recuperação de ascósporos após serem submetidos ao tratamento térmico.

Para espécies de *Byssochlamys* alguns autores (Bayne & Michener (1979), Splittstoesser & Splittstoesser, 1977) utilizaram o meio PDA para a recuperação de ascósporos após o tratamento térmico.

Banner et al. (1979) utilizaram o meio ágar extrato de levedura com triptona e glucose e 8,3µg/ml de rosa bengala para a estimativa dos ascósporos sobreviventes de *Byssochlamys fulva*, após o tratamento de resistência térmica a 85°C por 15, 30, 90 e 120 minutos.

Casella et al. (1990) utilizaram o meio ágar extrato de levedura,

extrato de malte, peptona e glucose (YMPG) suplementado com acetato de potássio para a recuperação de ascosporos de *Byssochlamys nivea* submetidos a tratamento térmico a 80, 85, 87, 88, 89, 90 e 95°C por 12 minutos. Segundo os autores, o meio YMPG com adição de acetato de potássio (0,01M) forneceu melhor recuperação que os meios MEA e PDA, sendo o mais indicado nesse caso.

Splittstoesser et al. (1993) estudaram a recuperação de ascosporos após tratamento térmico de 25 minutos a 85°C e observaram que a recuperação dos ascosporos era melhor em caldo com 3% de extrato de malte, utilizando o método do número mais provável (NMP) do que quando plaqueados em PDA, porém, os valores de D foram similares para os dois meios.

Poucos são os trabalhos encontrados na literatura, referentes aos melhores meios para a recuperação de bolores submetidos a ensaios de resistência térmica e comparando sua eficiência, sendo assim, pelo encontrado na literatura é possível observar que o meio PDA e MEA poderiam ser utilizados como meio de recuperação para bolores do gênero *Neosartorya* e *Byssochlamys*.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Levantamento de microrganismos presentes em laminado destinado à produção de embalagens Tetra brik®

Inicialmente, foi realizado um levantamento da contaminação na superfície do laminado (polietileno/cartão/polietileno/alumínio/polietileno) destinado à fabricação das embalagens Tetra Brik® para polpa de tomate 8°Brix, com capacidade de 520g e dimensões de 322 mm x 167mm. As coletas foram realizadas antes do banho de peróxido, na parte traseira das envasadoras Tetra Brik Aseptic®, TBA3 e TBA8, em duas indústrias processadoras de tomate (Plantas A e B) que utilizam o envase asséptico. Na realidade, o levantamento da contaminação foi realizado no polietileno que cobre o laminado na parte interna (figura 2). O método utilizado para este levantamento foi o de contato de superfície (SWAB) descrito por Sveum et al. (1992), sendo que foi amostrado 1 minuto de produção com o laminado em movimento, da máquina de envase TBA3 que produz 60 embalagens /minuto totalizando uma área amostrada de 0,7014m² na planta A, para cada amostragem. Na máquina TBA8 que produz 100 embalagens/minuto (dados do fabricante), foi analisada uma área amostrada de 1,19 m² na planta B, considerando-se uma produção de 102 embalagens /min, sendo esse dado obtido de 3 contagens com auxílio de um cronômetro (somente na planta B).

O ensaio foi realizado para os fungos não termorresistentes e para fungos termorresistentes em duplicata. Para o contato com a superfície, foi utilizada uma esponja estéril de celulose 3M (1 ½” x 3” x 5/8” antes da hidratação), previamente testada para determinar a presença de inibidores

(item 3.3), molhada inicialmente em 25 ml de diluente (água peptonada 0,1%), e após o contato colocada rapidamente em frasco estéril, com pequenas modificações do método descrito por Sveum et al. (1992), como o tamanho da esponja e a quantidade de diluente utilizado. Os frascos foram trazidos ao laboratório onde as esponjas foram cuidadosamente retiradas com auxílio de pinça estéril e colocadas em 50 ml de diluente (água peptonada 0,1%) em saco estéril para “Stomacher”. As esponjas foram massageadas pressionando-se o lado externo do saco para facilitar o desprendimento de esporos que poderiam estar agregados a ela.

Para as amostras trazidas ao laboratório, de cada lote em particular, duas foram destinadas à análise de bolores termorresistentes e outras duas para a análise de bolores não termorresistentes.

Foram realizadas 6 coletas para a planta A (24 amostras) durante a entressafra de 1998 e 11 coletas (44 amostras) para a planta B, durante a safra 1998/99, totalizando 68 amostras para as duas plantas estudadas.

3.2. Composição das embalagens amostradas

As embalagens amostradas pela técnica de contato de superfície das empresas participantes do projeto foram de 520 g e possuíam a seguinte composição:

Camada externa (polietileno ou cera)
Tinta de impressão
Papel Base (duplex ou camada única)
Camada laminada (polietileno)
Folha de alumínio
Camada interna 1(polietileno)
Camada interna 2 (polietileno)

Figura 2. Camadas da embalagem Tetra Brik (Värnamo,1982)

A estrutura básica do material utilizado para a confecção de embalagens assépticas é: polietileno / cartão / polietileno / Alumínio / polietileno. O polietileno externo é responsável pela proteção da impressão . O cartão utilizado é do tipo duplex, sendo a superfície externa branqueada e a interna não branqueada, e tem como principal função conferir rigidez à embalagem. A camada intermediária de polietileno auxilia na resistência da embalagem, além de unir a folha de alumínio ao cartão. A folha de alumínio é a principal responsável pelas características de barreira à luz e gases e é muito importante para a selagem transversal das embalagens. O polietileno interno é o responsável pelo fechamento hermético da embalagem. O polietileno interno é composto por duas camadas podendo ser polietileno/polietileno ou Surlyn / polietileno e a utilização de cada um depende das características do produto envasado (Värnamo, 1982).

3.2.1. Análise microbiológica do papelão componente da caixa de embalagem asséptica

Inicialmente foi efetuado um procedimento de limpeza na superfície das embalagens, que antes continha polpa de tomate, utilizando-se álcool 70% e hipoclorito de sódio 500 ppm, deixando-se em contato por aproximadamente 10 minutos, sendo essa análise realizada no interior da câmara de fluxo laminar vertical.

O procedimento utilizado foi o de delaminação física. Com o auxílio de um bisturi e uma pinça estéreis foram retiradas as camadas, até se separar o papelão, de onde foram feitos cortes nas dimensões de 2 x 2 cm. Foram depositados 4 quadrados em cada placa contendo meio PDA previamente solidificado, em duplicata. Os quadrados foram retirados em pontos aleatórios na embalagem. O mesmo esquema de análise foi realizado para as temperaturas incubação de 30°C e 25°C .

Para facilitar o corte do papelão foi utilizada uma superfície estéril de metal um bisturi com lâmina estéril e uma régua para a medida dos quadrados. O procedimento foi realizado utilizando-se luvas estéreis.

A delaminação química não foi utilizada devido aos reagentes empregados serem prejudiciais ao levantamento dos possíveis bolores existentes no papelão.

3.3. Teste de presença de inibidores nas esponjas de celulose utilizadas no método de contato com a superfície (SWAB)

No laboratório, as esponjas foram cortadas nas dimensões utilizadas na pesquisa, lavadas e secas em estufa a 60°C e esterilizadas a 121°C por 15 minutos. Paralelamente, em placas de Petri foi vertido o meio de cultura PDA, acidificado com ácido tartárico 10%. Após solidificação do meio de cultura nas placas, foi inoculado 0,1 ml de suspensão de esporos de *Neosartorya fischeri* (aproximadamente 10^7 esporos/ml) sobre a superfície e espalhado com espátula de Drigalsky. Após esse procedimento as esponjas foram depositadas sobre o meio contendo os esporos. As placas foram incubadas a 30 °C por 7 dias, sendo nesse período, observada a formação ou não de halo de inibição. Foram testadas 10 esponjas de celulose e 10 de poliuretano.

A seleção de esponja e não de cotonete foi de acordo com Pecorelli et al. (1993) que estudaram a amostragem de superfície com três métodos diferentes, entre eles cotonete e o método da esponja, sendo este último o mais efetivo na recuperação dos microrganismos com resultados mais representativos por amostrar uma superfície maior.

3.4. Quantificação de bolores termorresistentes

Os volumes de 50 ml de diluente referentes às amostras destinadas à análise dos bolores termorresistentes foram transferidos para tubo de rosca estéril e submetidos ao choque térmico de 80°C por 30 minutos (Beauchat & Pitt, 1992), para eliminar os organismos sensíveis ao calor e para

ativar os esporos dormentes. As amostras após o choque foram mantidas em banho de gelo por 1 minuto.

Após o choque térmico, 1 ml da amostra foi utilizada para diluições decimais em água destilada estéril até a diluição 10^{-3} , e semeadas em duplicata em profundidade em PDA de concentração simples com adição de ácido tartárico 10 % na proporção de 1,2 ml para 100 ml de meio para inibição do crescimento de bactérias (Tournas, 1994; Beauchat & Pitt, 1992; Pitt & Hocking, 1985). As placas foram embaladas em saco plástico e incubadas a 30°C por 10 dias. O restante da amostra, após a retirada da alíquota, foi filtrada em Membrana Millipore (Ester de celulose, 0,22 um de poro) com a utilização de seringa estéril. A membrana foi depositada em placa contendo meio PDA previamente solidificado e as placas incubadas a 30°C por 10 dias.

Cada colônia de bolor, presumivelmente termorresistente isolado foi transferida cuidadosamente, utilizando-se alça de inoculação e capela de fluxo laminar, para placas de Petri contendo o meio de cultura PDA em duplicata, e incubadas a 30°C por 10 dias.

Para a observação dos bolores sob microscópio foi utilizada a coloração com lactofucsina descrita por Pitt & Hocking (1985).

3.4.1. Manutenção e identificação das culturas de bolores

Com o procedimento de transferências das colônias, foram obtidas culturas puras utilizadas para o estoque dos fungos, utilizando-se os

métodos de preservação em sílica gel e estocagem sob óleo mineral, descritos por Smith & Onions (1983) além do método de estocagem em água descrito por Castellani (1939, 1967) e citado por Smith & Onions (1983). As culturas puras obtidas foram utilizadas para:

a - identificação dos microrganismos até o nível taxonômico de gênero através de análise microscópica e macroscópica (Aragão, 1989) ou com a utilização do programa de computador FUNG-HOM para identificação de fungos comuns em alimentos, desenvolvido por Gumerato (1995).

b - para a produção de esporos, a serem utilizados nos ensaios de resistência ao peróxido de hidrogênio.

3.4.1.1. Exame microscópico dos bolores isolados

Todos os bolores isolados foram observados sob microscópio óptico binocular utilizando-se para melhor visualização o corante lactofucsina (0,1% de ácido fucsínico dissolvido em ácido láctico 85% ou de maior pureza) recomendado por Pitt & Hocking, (1985). A parede fúngica e os esporos são altamente resistentes a corantes, e este, segundo os autores, é o corante mais efetivo para o uso em microbiologia de alimentos. Os aumentos utilizados para observação foram 250, 400 e 1000 vezes.

3.4.2. Produção de esporos

Para a produção de esporos, inicialmente foi realizada a transferência dos microrganismos das placas de PDA, com auxílio de alça de níquel cromo, para garrafas de Roux, contendo 200 ml de meio de cultura MEA esterilizado a 121°C por 15 minutos e solidificado. As garrafas foram

inoculadas com 0,5 ml de suspensão previamente preparada de cada bolor termorresistente. Essa suspensão foi preparada previamente transferindo-se, com auxílio de uma alça em “L” estéril, um fragmento do fungo para um tubo com tampa rosqueável de 13 X 100 mm contendo 2 ml de solução 0,05% de Tween 80 (para dispersão dos esporos), seguido de agitação. No presente estudo, deseja-se que os ascosporos tenham alta termorresistência, então o meio escolhido para a produção de esporos foi o MEA.

Após a inoculação dos fungos, as garrafas foram incubadas horizontalmente, em câmara escura à temperatura de 30 °C para os fungos termorresistentes (*N. fischeri* e *Talaromyces flavus*) e 25°C para os demais fungos, por 30 e 120 dias. Foram inoculadas 15 garrafas de Roux para cada microrganismo, e para cada idade do esporo, visando obter uma quantidade suficiente de suspensão de esporos para a realização dos testes posteriores.

3.4.2.1. Coleta, Ativação e Contagem dos esporos

A coleta dos esporos da superfície das garrafas de Roux contendo meio MEA foi realizada por raspagem delicada na superfície do meio, com utilização de bagueta estéril de vidro com ponta esférica e 25 ml de água estéril em cada garrafa, essa suspensão foi filtrada através de 3 camadas de gaze estéril para retenção de hifas e restos de meio de cultura.

As coletas de esporos foram realizadas com 1 e 4 meses de idade. Nos ensaios da primeira fase do trabalho (testes com peróxido de hidrogênio em temperatura ambiente) as suspensões de esporos para todos os fungos tinham 1 mês de idade, na segunda fase, onde foram testados o bolor *N.*

fischeri (controle) e o bolor escolhido como o mais resistente ao peróxido de hidrogênio e como o mais termorressistente após choques térmicos sucessivos, as suspensões de esporos possuíam 1 e 4 meses de idade.

Após a coleta dos esporos a suspensão obtida (bolors termorresistentes) foi submetida a uma centrifugação a 4°C por 15 minutos à 11962,6 x g (Tournas & Traxler, 1994) e o precipitado foi lavado em duas centrifugações com água estéril. Após a segunda centrifugação, a suspensão foi submetida ao processo de sonicação em banho de gelo (0-4 °C) por até 20 minutos, com observações periódicas sob microscópio, até obtenção de ascospores livres, sem a presença de grumos.

A suspensão final foi transferida para um frasco de diluição, previamente autoclavado com capacidade de 165 ml, contendo aproximadamente 30 pérolas de vidro.

Após cada coleta de esporos, foram realizadas observações sob microscópio óptico, para que se tivesse certeza de que a suspensão obtida continha o mínimo possível de hifas. As suspensões foram estocadas em geladeira a 4°C, por um período de 3 a 6 meses.

Para a ativação dos esporos dormentes foram transferidos 0,2 ml de suspensão de esporos e 1,8 ml de água destilada estéril para tubos TDT fechados com tampão de algodão. A suspensão foi submetida a vários binômios tempo x temperatura e plaqueada até a obtenção do binômio ótimo para a ativação do microrganismo. Para a obtenção da concentração desejada da suspensão foi realizada uma contagem por diluição e plaqueamento em

profundidade em MEA e as placas incubadas a 30°C por 7 dias para fungos termorresistentes (FT) ou 25 °C por 5 dias para fungos não termorresistentes (FNT).

Para os bolores não termorresistentes não foi necessário realizar os experimentos de sonicação e ativação, já que estes não são Ascomicetos e portanto não possuem ascos e ascosporos.

A coleta de esporos de *Epicoccum nigrum* foi realizada como já descrita no início do item, porém, com algumas modificações. A suspensão contendo hifas e esporos foi centrifugada a 11962,6 x g por 15 minutos a 4°C e o precipitado lavado com água destilada estéril, sonicado por 10 minutos com o objetivo de separar os esporos, que são conídios multicelulares e estão localizados em um arranjo chamado “sporodochia”, sendo muito difícil a total separação dos conídios de restos de hifas, seja por filtração ou centrifugação. Foram realizadas 3 filtrações com 1 , 2 e 3 camadas de gaze, para uma melhor separação dos conídios e “sporodochia” das hifas.

3.4.2.2. Concentração ótima de catalase utilizada para neutralização do peróxido nos testes de resistência dos esporos ao peróxido

Foram realizados testes iniciais para encontrar a concentração necessária de enzima para a neutralização de todo o peróxido, após os tratamentos. Para esses ensaios, utilizou-se os mesmos esquemas empregados posteriormente para testar a resistência dos esporos de bolores ao peróxido em temperatura ambiente (figura3) e com calor (figura 4), porém, o volume correspondente à suspensão de esporos foi substituído por água destilada e os

testes não foram realizados em ambiente estéril. Os testes foram realizados apenas para a concentração de peróxido de 45%, que foi a maior concentração testada nesta pesquisa. Após ter sido encontrada a concentração da enzima ideal para decompor todo o peróxido, esta foi padronizada e utilizada para as menores concentrações de peróxido testadas. Uma combinação das metodologias de Buchen & Marth (1977), Toledo et al.(1973) e Tsuchida e Tsuchido (1997) foi utilizada. As condições ótimas da enzima foram sempre respeitadas, como, por exemplo, a temperatura de 25°C e pH 7,0. Para a diluição da enzima foi utilizada solução salina 0,85% (Cloreto de sódio 0,85%)

Baseando-se na concentração utilizada por Toledo et. al.(1973) que foi de 0,5 mg /ml, foram realizados testes com outras concentrações maiores e menores daquela utilizada pelo autor. As concentrações testadas foram de 0,05 mg/ml; 0,5 mg/ml; 5 mg/ml e 15 mg/ml e para testar a decomposição do peróxido de hidrogênio. Após a retirada da alíquota para os testes microbiológicos foi adicionado 5 ml de iodeto de potássio e 1 ml de solução de amido 1% sendo a presença de peróxido indicada pelo aparecimento da coloração azul e a ausência do agente foi determinada quando a solução permaneceu incolor. Esses resultados foram confirmados com a aparelho Refloquant plus[®]. A densidade da catalase era 1,0 g/ml sendo assim 1,5 g foi igual a 1,5 ml. Na primeira fase utilizou-se uma solução contendo 1,5 ml da enzima e 99 ml de salina (concentração da enzima de 13.432 unidades/ml), enquanto, na segunda fase, essa solução foi composta de 0,3 ml da enzima e 19,5 ml de solução salina 0,85% (concentração da enzima de 13.500 unidades/ml).

Em geral, os trabalhos que utilizam a catalase para decomposição do peróxido, apenas citam que a quantidade da enzima utilizada foi “excessiva”, porém, sem a quantificação dessa informação. No presente trabalho, utilizou-se a enzima líquida de fígado bovino C-30, da Sigma. A solução contendo catalase foi preparada misturando-se a enzima com solução salina 0,85%, sendo o volume de enzima de 1,5 ml e 99 ml de solução salina nos testes com peróxido em temperatura ambiente e de 0,3 ml de enzima e 19,5 ml de solução salina nos testes com peróxido e calor.

3.4.2.3. Teste do efeito da catalase sobre os esporos de *N. fischeri* e *P. variotii*

Antes do início dos experimentos com o peróxido de hidrogênio, foi realizado um teste em triplicata, utilizando a enzima catalase na concentração de 15,15g/l (13432 unidades/ml). O objetivo destes ensaios foi observar se esta enzima poderia inibir o crescimento dos bolores. Para o teste utilizou-se o mesmo esquema da primeira fase do trabalho (figura 3), porém, substituindo o peróxido por água destilada e a concentração de enzima foi mantida. Também foram realizados experimentos sem a enzima (branco). As suspensões de esporos dos bolores *Neosartorya fischeri* (1 mês) e *Paecilomyces variotii* (1 mês), ambas com população de 10^7 esporos/ml, foram utilizadas para os testes.

A contagem dos esporos foi realizada em profundidade utilizando-se o meio de cultura MEA com incubação a 25°C para *P. variotii* por 5 dias e 30°C para *N. fischeri* por 7 dias.

3.4.3. Teste de resistência dos esporos de bolores ao peróxido de hidrogênio a temperatura ambiente

Foram testadas três metodologias para o teste com o peróxido e suspensão de esporos, seguindo as recomendações propostas por Tsuchida & Tsuchido (1997), Buchen & Marth (1977) e Toledo et al. (1973), sendo essa última escolhida por se apresentar mais detalhada e apropriada ao tipo de teste requerido no trabalho.

Na primeira fase dos ensaios de resistência ao peróxido, todos os bolores isolados da embalagem foram testados à temperatura ambiente. A partir dos resultados desse ensaio foi selecionado o bolor mais resistente, em conjunto com o *N. fischeri*, para a segunda fase da pesquisa onde foram testadas concentrações de peróxido de 35, 40 e 45 % e temperaturas de 40, 60 e 70°C. Para os testes preliminares, foram utilizados bolores com 1 mês de idade.

Na primeira fase, foram testados 1 ml da suspensão de esporos e 4 ml de solução de peróxido de hidrogênio, misturados com uma seringa de 5 ml. As concentrações de peróxido ensaiadas foram 5, 10, 20, 35 e 40% (p/p), em temperatura ambiente (25°C) e duplicata (Figura 3).

As soluções de peróxido de hidrogênio após o preparo são muito instáveis e, devido a este fato, foram preparadas e utilizadas no mesmo dia. As soluções foram preparadas a partir de peróxido de hidrogênio mais concentrado de 35% (Asepticper) e 50 % (IX[®]501), (peso/peso), da Peróxidos do Brasil Ltda, ambos de grau alimentício. Para o preparo das soluções, foi

utilizada água deionizada estéril (Tsuchida & Tsuchido, 1997). A solução estoque (comercial) foi analisada mensalmente por titulação iodométrica (Buchen & Marth, 1977). As concentrações de peróxido foram calculadas com base na razão 4:1. O pH das soluções de H_2O_2 com 5, 10, 20, 35 e 40% foram 3,0; 2,6; 2,03; 1,80; 1,60; respectivamente.

O tempo de contato entre os esporos e a solução de peróxido foi de 10 segundos para todas as concentrações. Após o contato com o peróxido, 1 ml de amostra foi colocada em 100,5 ml de uma solução concentrada (15,15g/l) de catalase de fígado bovino (Sigma – C-30) descrita por Toledo et al. (1973), para a decomposição do peróxido residual. Após 1 minuto de reação e retirada da alíquota para contagem, a eficiência da decomposição do peróxido foi testada pela adição no becker de 5 ml de Iodeto de potássio 1N e 1 ml de solução de amido 1% descritas em Toledo et al. (1973). O aparecimento de uma solução incolor indica a completa decomposição do peróxido, a cor azul indica que a solução ainda possui peróxido de hidrogênio que não foi totalmente decomposto pela catalase. Utilizou-se o reflectômetro RQflex plus - Reflectoquant[®] da Merck[®] para quantificar o residual de peróxido, para isso uma fita da Merck era mergulhada rapidamente no becker contendo a solução que deveria ser analisada, sendo a faixa de análise desse equipamento de 0,2 – 20 mg/l. O princípio do Reflectoquant[®] é a Refratometria (Luz incidente – Luz remanescente = Luz absorvida)

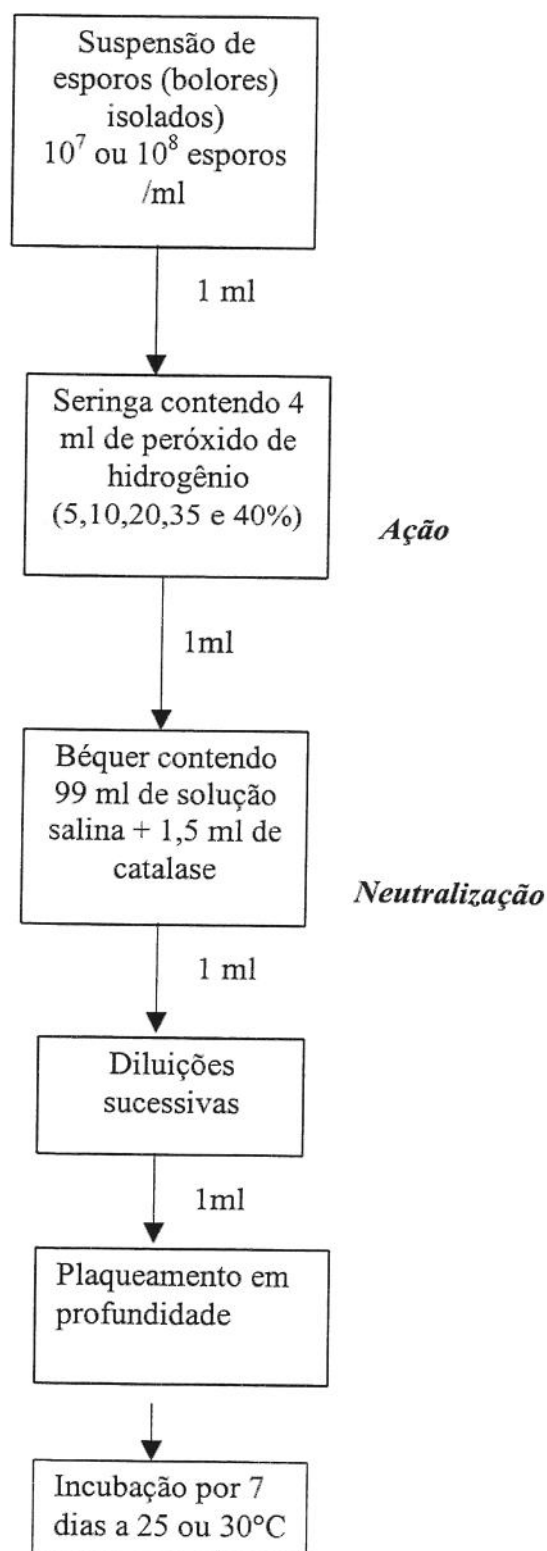


Figura 3. Esquema do ensaio realizado com esporos tratados com peróxido de hidrogênio - Primeira fase

Após o tempo de contato com a catalase, foi retirado assepticamente 1 ml da solução contendo os esporos e plaqueado em profundidade em meio de cultura MEA em diluição serial até 10^{-6} e duplicata. As placas foram incubadas a 25 ou 30°C por 7 dias. Segundo Splittstoesser & Churey (1993), estudos preliminares indicaram que o plaqueamento em profundidade e superfície mostram resultados similares na enumeração de ascosporos.

Os dois bolores que apresentaram contagem mais alta após tratamento com peróxido de hidrogênio foram submetidos à fase seguinte, que foi a aplicação dos choques térmicos sucessivos.

3.4.4. Aplicação de choques térmicos sucessivos

Foram utilizadas as suspensões de esporos de bolores previamente preparadas no item 3.4.2 e em uma concentração de 10^7 esporos/ml.

Com a aplicação de choques térmicos sucessivos (tabela 2) foi obtido o bolor mais termorresistente que foi utilizado para os ensaios posteriores, juntamente com o bolor *Neosartorya fischeri* utilizado como controle, por ser citado na literatura como o mais termorresistente (Splittstoesser et al. ,1993; Tournas & Traxler, 1994, Baglioni,1998).

Para a aplicação do procedimento de choques sucessivos foi colocado 0,2 ml de suspensão de esporos em um tubo TDT e 1,8 ml de água destilada estéril. Previamente foi determinado o atraso térmico (“come up

time”) para atingir a temperatura de choque dentro do tubo TDT. Em um tubo foi colocado um termopar, previamente aferido, e a temperatura foi acompanhada através de aquisitor de dados Omega modelo CL511. O termopar foi disposto, de modo que deveria permanecer centralizado no interior do tubo durante o ensaio. Após a determinação do atraso térmico os tubos foram levados ao banho de óleo nos binômios temperatura x tempo listados na tabela 2.

Tabela 2. Temperaturas (°C) e tempos (minutos) para os choques sucessivos.

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

Após a aplicação de cada choque, foi retirada uma amostra de 1 ml da suspensão de esporos, sendo diluída até 10^{-4} e semeada em profundidade no meio de cultura MEA, em duplicata. As placas foram embaladas em saco plástico e incubadas a 25°C por 5 dias. O *N. fischeri* foi também submetido aos choques térmicos sendo as placas incubadas a 30°C por 7 dias.

O fungo que sobreviveu ao mais alto choque térmico foi considerado o mais termorresistente e utilizado nas próximas etapas do trabalho.

3.4.5. Produção de esporos de diversas idades

O fungo isolado do laminado que foi mais resistente ao tratamento com peróxido e aos choques térmicos, juntamente com o *Neosartorya fischeri*, proveniente de culturas puras existentes no laboratório, foram transferidos para garrafas de Roux contendo 200 mL de meio MEA e incubados a 30°C por 4 e 16 semanas (Tournas & Traxler, 1994), sendo que, para cada idade (1 mês e 4 meses), foram realizadas todas as etapas subsequentes descritas para os fungos termorresistentes.

3.4.5.1. Coleta dos ascosporos

A coleta foi realizada como já descrito no item 3.4.2.1.

3.4.5.2. Ativação dos esporos

Para o *Neosartorya fischeri* foi realizado o procedimento de ativação, para obtenção da ativação ótima em solução aquosa, combinando-se várias temperaturas e tempos, que foram definidos com base nos dados da literatura. O outro bolor utilizado, apesar de ser resistente ao peróxido, não era um Ascomiceto não sendo necessário o processo de ativação.

O método para a construção das curvas de ativação foi o utilizado por Gumerato (1995).

3.4.6. Teste de resistência dos esporos ao peróxido de hidrogênio e ao calor

Inicialmente foi determinado o tempo de subida até a temperatura desejada, utilizando termopar flexível, procedimento realizado para todas as temperaturas estudadas.

Para cada lote de esporos do isolado mais termorresistente foram realizados os ensaios com o peróxido de hidrogênio, nas concentrações de 35, 40 e 45% (O pH das soluções foi de 1,75; 1,54 e 1,2, respectivamente) e nas temperaturas de 40, 60, 70°C (Figura 4). As concentrações de peróxido foram calculadas utilizando a razão 1,8 ml de peróxido e 0,2 ml de suspensão de esporos. Em um tubo de ensaio estéril (12 x 95 mm) foi adicionado 1,8 ml de solução de peróxido de hidrogênio na concentração a ser ensaiada. Os tubos foram colocados em banho de água com agitação, termostaticamente ajustado para a temperatura ensaiada. Após o atraso térmico, quando a solução atingiu a temperatura desejada foi adicionado 0,2 ml de solução de esporos do bolor, com uma concentração de 10^7 esporos/ml e homogeneizada (Buchen & Marth, 1977). Juntamente com o tubo estéril contendo a solução de peróxido, foi colocado um tubo contendo o mesmo volume de água e um termopar ajustado no centro do tubo, para o melhor acompanhamento do momento da obtenção da temperatura desejada para o teste.

Os tempos de contato entre a suspensão de esporos e o peróxido de hidrogênio foram 2, 4, 6, 8 e 10 segundos (tempos sugeridos pela empresa participante do projeto) foram medidos com auxílio de um cronômetro. Após o tempo de contato; 0,2 ml de amostra foi retirada e transferida para um frasco contendo 19,5 ml de solução salina 0,85% e 0,3 ml (270.000 unidades) de

catalase de fígado bovino (Sigma – C30) na concentração de 15,15 g/l. A verificação da completa decomposição do peróxido residual foi realizada como já descrito no item 3.4.3.

Imediatamente após o tratamento com a catalase foi retirado 1 ml de amostra, utilizado para diluição serial até 10^{-4} em 9 ml de água peptonada 0,1% estéril, semeada em profundidade em MEA com incubação a 30°C por 7 dias.

A partir dos resultados obtidos com a contagem dos sobreviventes aos tratamentos com peróxido de hidrogênio foram construídas curvas de sobreviventes, para cada idade do esporo, concentração de peróxido e temperatura. Os resultados foram plotados em gráfico sendo no eixo das abcissas o tempo de contato em minutos e na ordenada o número (logaritmo) de sobrevivente, a partir da curva de sobreviventes, foi determinado por regressão o parâmetro D, utilizando-se apenas a porção linear da curva. O parâmetro Z (°C) foi obtido a partir dos valores de D por regressão linear.

Todos os testes foram realizados em duplicata.

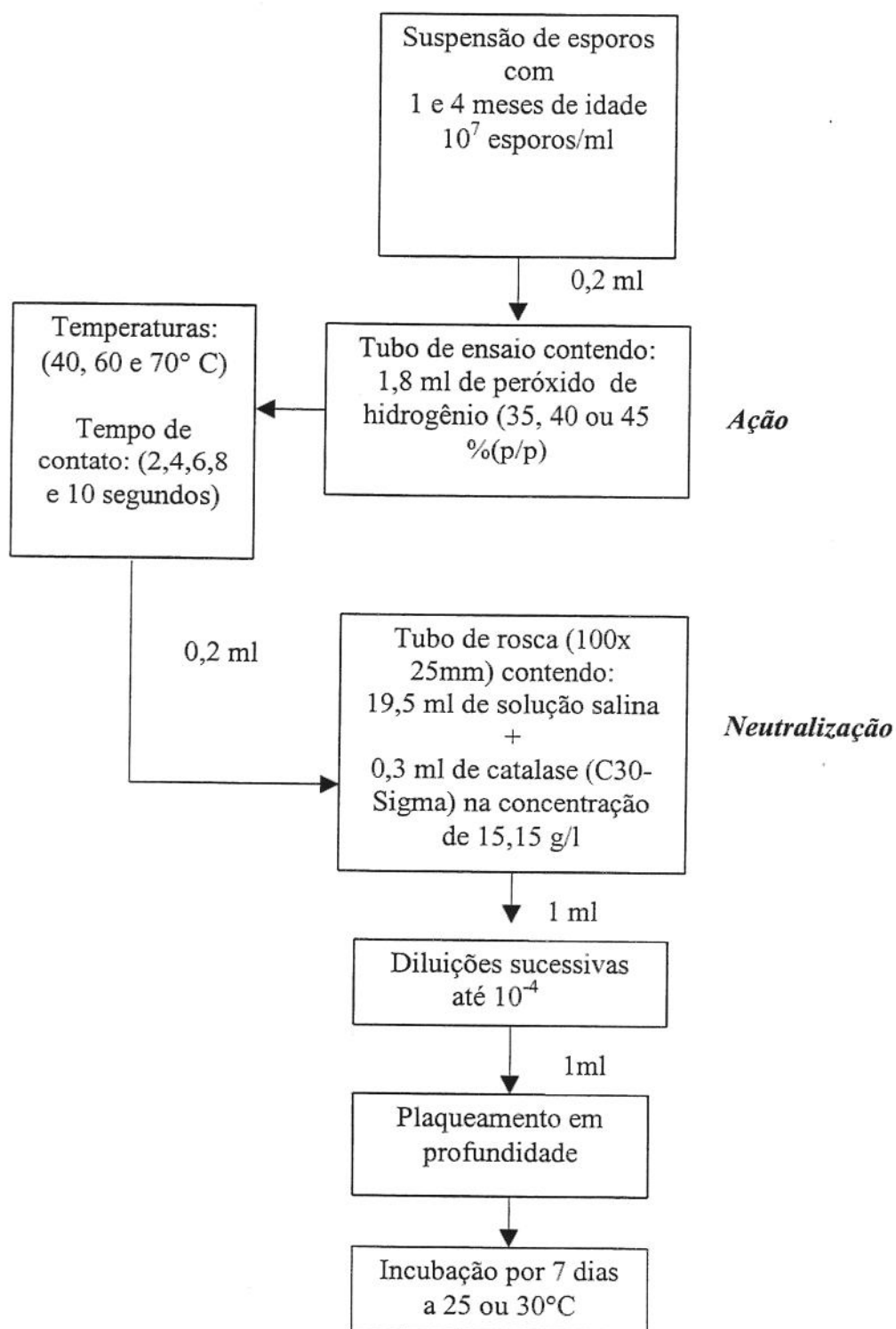


Figura 4. Esquema de ensaio de teste de resistência realizado com esporos tratados com peróxido de hidrogênio e calor - Segunda fase

3.5. Bolores não termorresistentes

Para o levantamento dos bolores não termorresistentes, presentes na superfície do laminado das embalagens Tetra brik[®] foram utilizadas as duas amostras de cada lote não submetidas ao choque térmico inicial, permitindo assim o isolamento de bolores não termorresistentes com a possibilidade de serem resistentes ao peróxido de hidrogênio.

3.5.1. Contagem e Isolamento

Do volume total de 50 ml (medido em proveta estéril), obtido após lavagem da esponja com água peptonada 0,1 %, foi retirado 1 ml da amostra contendo presumivelmente os microrganismos e que foi utilizada para a diluição serial até 10^{-4} , em duplicata, plaqueadas em meio de cultura PDA (ágar batata dextrose) adicionado de ácido tartárico 10% na proporção de 1,2 ml para 100 ml de meio. As placas foram embaladas em saco plástico e incubadas a 25°C por 10 dias. Após a retirada da alíquota para diluição, o volume restante da amostra foi filtrado utilizando-se uma seringa estéril em membrana de celulose Millipore com 0,22µm de poro. As membranas foram depositadas em meio PDA previamente solidificado e as placas incubadas a 25°C por 10 dias.

Os bolores que apresentaram crescimento nesse meio foram cuidadosamente transferidos com alça de inoculação para outras placas, contendo PDA acidificado e incubadas a 25°C por 3 a 10 dias. Foram isoladas culturas puras de cada bolor utilizadas para a identificação e estocadas conforme item 3.4.1.

3.5.2. Identificação e manutenção dos bolores isolados

Os procedimentos realizados para identificação, manutenção e observação sob microscópio dos bolores não termorresistentes isolados foram os mesmos descritos nos itens 3.4.1 e 3.4.1.1 para bolores termorresistentes.

3.5.3. Produção de esporos

Os bolores isolados foram transferidos para garrafas de Roux contendo 200 ml de meio MEA e incubados a 25°C por 30 dias. A coleta dos esporos foi realizada como já descrito no item 3.4.2.1, para os bolores termorresistentes, exceto para o bolor *Epicoccum nigrum*.

Para o bolor *Epicoccum nigrum* isolado do laminado, a produção de esporos foi realizada no meio Ágar aveia (OA), recomendado por Samsom & van Reenen Hoekstra (1988), em placas de Petri. O fungo foi inoculado e as placas levadas para estufa para o crescimento por 3 dias a 25°C. Após este período as placas foram transferidas para uma câmara contendo uma lâmpada de ultra violeta (comprimento de onda de 300 – 380 nm) por 30 dias. O comprimento de onda da luz utilizada para induzir a esporulação não é o mesmo da faixa de luz ultra violeta que pode ser letal ou mutagênica, que é de 200 a 300 nm. A garrafa de Roux não foi utilizada pois a esporulação era prejudicada, provavelmente devido aos desvios da radiação UV causados pela espessura do vidro. As culturas desse fungo freqüentemente permanecem estéreis, sendo a esporulação induzida pela exposição à luz negra (Samsom & van Reenen Hoekstra, 1988 e Smith & Onions, 1983).

Foram produzidos também esporos para os bolores *Aspergillus parasiticus*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium decumbens*, *Aspergillus sidowii*, *Penicillium citrinum*.

3.5.4. Suspensão de esporos

A suspensão de esporos com concentração de aproximadamente 10^7 esporos/ml foi acertada mediante contagem em profundidade em MEA a 25°C por 7 dias.

3.5.5. Teste com peróxido de hidrogênio em temperatura ambiente

Todos os bolores foram testados para a obtenção do mais resistente ao peróxido de hidrogênio, nas concentrações de 5, 10, 20, 35 e 40%, em temperatura ambiente e o tempo de contato de 10 segundos (Figura 3). A decomposição deste agente após o tratamento foi realizada com a enzima catalase, como já descrito no item 3.4.3.

Após o contato com a catalase, 1 ml da amostra foi utilizada para o preparo das diluições seriadas até 10^{-4} esporos/ml. O meio de cultura utilizado foi o MEA, o qual foi plaqueado em profundidade e em duplicata, sendo as placas embaladas em saco plástico e incubadas a 25°C durante 7 dias.

O bolor mais resistente ao peróxido de hidrogênio em temperatura ambiente foi identificado, submetido aos choques térmicos sucessivos como descrito no item 3.4.4, e escolhido para os ensaios posteriores, onde foi submetido à temperaturas de 40, 60 e 70°C em

concentrações de peróxido de hidrogênio de 35, 40 e 45% e nos intervalos de contato de 2, 4, 6, 8 e 10 segundos (Figura 4) ítem 3.4.3, juntamente com o bolor *Neosartorya fischeri*.

Todos os testes foram realizados em duplicata.

3.5.6. Resistência ao peróxido de hidrogênio e calor

Com o procedimento de tratamento da suspensão de esporos com peróxido de hidrogênio em várias concentrações, temperaturas e tempos de contato foi obtido o parâmetro D utilizando o mesmo procedimento do ítem 3.4.6.

Cabe ressaltar que todos os procedimentos realizados para os bolores termorresistentes foram exatamente os mesmos para os não termorresistentes, porém, sem o choque térmico inicial na amostra e a temperatura de incubação que foi de 25°C para os não termorresistentes.

3.6. Resistência térmica de *N. fischeri* e do bolor isolado do material de embalagem

A resistência térmica dos bolores foi determinada utilizando-se tubos TDT estéreis preenchidos com 1,8 ml de água destilada e inoculados com 0,2 ml de suspensão de esporos, seguido de homogeneização. Os tubos foram fechados com algodão e colocados em banho de óleo (Polystat® com +/- 0,1°C de precisão) ajustado na temperatura de 90°C para esporos com 4 meses de idade de *N. fischeri* e 85°C para os esporos com 4 meses do bolor

selecionado para os tratamentos com peróxido e calor, na segunda fase do trabalho. O tempo de subida até a temperatura desejada foi determinado previamente, utilizando termopar flexível para monitorar a temperatura em tubo TDT preenchido com água destilada. Em cada tempo de aquecimento definido, os tubos foram retirados do banho e resfriados imediatamente em banho de gelo.

Os tubos foram abertos assepticamente, em seguida foram feitas diluições seriadas e semeadas em profundidade com MEA em duplicata. As placas foram incubadas a 30°C para *N. fischeri* e 25°C para *P. variotii* por 7 dias e a leitura das colônias formadas, feitas a partir do terceiro até o sétimo dia de incubação. A contagem foi expressa em UFC/ml. Sabendo-se o número de sobreviventes e o tempo de aquecimento respectivo, foram construídas as curvas de morte. Como as curvas de morte apresentaram comportamento não logarítmico nas temperaturas empregadas. Foi utilizado o método de linearização de Alderton & Snell (1970) determinando-se os parâmetros equivalentes a “D”(1/k).

3.7. Análise das embalagens após o banho de peróxido

Foram coletadas amostras obtidas durante os testes iniciais de partida da máquina TBA8, após a higienização na Planta B. Com esse procedimento, foi possível coletar embalagens vazias que passaram pelo banho de peróxido nas condições normais de desinfecção e foram seladas, porém , sem serem envasadas com o produto. As embalagens foram coletadas aleatoriamente sendo posteriormente selecionadas aquelas com selagem adequada. Foram escolhidas 10 embalagens já fechadas e trazidas ao

laboratório, 5 foram destinadas à análise de bolores termorresistentes e 5 para bolores não termorresistentes .

As embalagens foram lavadas com 50 ml de água peptonada 0,1% e agitadas vigorosamente, após esse procedimento a solução foi retirada da embalagem e submetida ao choque térmico de 80°C por 30 minutos ou não, diluição serial e plaqueamento e o restante da amostra foi filtrado utilizando membrana de celulose Millipore 0,22 µm. As membranas foram transferidas, com auxílio de uma pinça estéril para placas de PDA solidificadas e incubadas em estufa a 30°C por 30 dias para fungos termorresistentes e 25°C por 7 dias para os fungos não termorresistentes. Foram realizadas 5 coletas num total de 50 amostras analisadas.

3.8. Teste em planta de envase asséptico utilizando o banho de desinfecção com 40% de concentração de peróxido de hidrogênio

Este teste foi realizado com a finalidade de medir o índice residual de peróxido no produto, após a aplicação de um procedimento de desinfecção da embalagem, utilizando uma solução de peróxido de hidrogênio com concentração de 40% (p/p) preparada pela Peróxidos do Brasil®. A máquina utilizada para o teste foi a TBA8 (6000 embalagens/h) e a temperatura do peróxido foi de 71°C e o tempo de contato entre o agente esterilizante e o material da embalagem foi de 6 segundos, que é o padrão da máquina.

Foram coletadas 20 embalagens envasadas com água e agitadas por 15 segundos. Imediatamente após a abertura das embalagens com estilete,

o residual de peróxido em mg/l (ppm) foi analisado na água (conforme metodologia indicada pelo FDA), utilizando-se o reflectômetro RQflex plus - Reflectoquant® (Merck).

3.9.Utilização do microscópio Confocal

Ascosporos de *N. fischeri* e *P. variotii* com 1 mês de idade foram tratados com soluções de peróxido de hidrogênio a 35% e 40% (p/p), a 70°C, com tempo de contato de 6 segundos. Com o objetivo de observar possíveis alterações morfológicas e/ou fisiológicas, utilizou-se um microscópio Confocal com varredura a laser (cripton/argônio) modelo MCR 10024 UV visível, fabricado pela Bio-rad e equipado com microscópio Zeiss Axovert completo e Software Lasersharp. Foram utilizados vários recursos disponíveis nesse aparelho, como o “zoom” para melhor visualização da imagem, a observação da imagem em três dimensões, o que não seria possível com a microscopia óptica comum.

3.9.1. Metodologia para montagem de lâminas

Para a preparação das lâminas, foram utilizados os procedimentos a seguir:

- a) Filtração dos esporos em membrana de polycarbonato 0,6 µm de poro, utilizando-se aparato para filtração à vácuo, após o tratamento com peróxido e neutralização em solução de catalase

- b) Após a retenção dos esporos na membrana, foram adicionados 2 ml do corante fluorescente acridine orange (excitação a 487 nm) a 0,025% (p/v) em tampão citrato 0,1M, pH 6,5, acertado com hidróxido de sódio (Pettipher et al, 1980), aplicado por 2 minutos nos ascosporos. Após esse tempo procedeu-se novamente a filtração;
- c) A membrana foi lavada com tampão citrato (pH= 6,5) para retirar o excesso de corante;
- d) A membrana foi retirada cuidadosamente do aparato de filtração com auxílio de uma pinça e deixada secar naturalmente dentro de uma placa de petri;
- e) Após a secagem, a membrana foi colocada sobre uma lâmina e coberta com uma lamínula. A lamínula foi fixada na lâmina com esmalte;
- f) Para observação no microscópio Confocal foi adicionada uma gota de óleo de imersão e as lâminas foram observadas com um aumento de 1000 vezes, utilizando-se o filtro verde para focalização da imagem. Após a focalização, trocou-se o filtro verde pela posição “laser” para a aquisição da imagem. Todas as lâminas foram observadas com o recurso de “zoom” utilizando-se o aumento de 3000 e 5000 vezes. Com a utilização do “zoom” de 5000 vezes ocorre uma distorção da imagem, devendo ser utilizado com cautela para a interpretação do material observado.

3.10. Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas para os dados de resistência ao peróxido e calor obtidos com os bolores *N. fischeri* e *Paecilomyces variotii* testados na segunda fase do trabalho.

O programa utilizado foi o “Statistica” versão 5.0 e o Módulo de Planejamento Experimental para modelos com fatores de 2 e 3 níveis .

Os efeitos das variáveis independentes foram analisados, sendo a importância de cada variável obtida pela Análise de Variância (Anova) com modelo final com significância de 95%. As variáveis regressoras (independentes) analisadas foram concentração de peróxido de hidrogênio (35,40 e 45%), temperatura (40, 60 e 70°C), idade (1 e 4 meses) e o valor de D (segundos) foi a variável dependente (tabela 3). Foram construídos gráficos dos efeitos estimados para os dois bolores.

Para encontrar um modelo que descrevesse o comportamento para cada um dos bolores foi utilizada a Regressão linear simples, e procedimento “backward” de seleção de variáveis no modelo, sendo as variáveis significativas a 95% mantidas e as não significativas eliminadas. Foi encontrada uma equação para o cálculo do valor de D (segundos) para os dois bolores e nas duas idades (1 e 4 meses). Para cada binômio temperatura e concentração de peróxido, a resposta obtida foi o valor D (segundos) que foram apresentados em gráficos de superfície de resposta .

Para checar o modelo foram construídos gráficos com os valores preditos pelo modelo e os observados no experimento.

Tabela 3. Variáveis independentes e dependentes (variável de resposta) utilizadas no modelo

Variáveis independentes	Variação das variáveis independentes	Variável dependente
Concentração de peróxido de hidrogênio	35%, 40% e 45%	Valor de D (segundos)
Temperatura	40,60 e 70°C	
Idade	1 e 4 meses	

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Teste de presença de inibidores nas esponjas de celulose utilizadas no método de contato com a superfície (SWAB)

As esponjas utilizadas para a realização da metodologia de contato com a superfície (SWAB) foram testadas com relação à presença de inibidores que poderiam impedir ou dificultar o isolamento de bolores provenientes do laminado. Esta análise foi realizada antes das coletas de amostras.

A esponja escolhida foi a de celulose (3M), pois segundo Llabres & Rose (1989) que compararam vários tipos de esponjas a de celulose absorvia maior quantidade de líquido e era mais recomendada para este tipo de análise. Estes autores ainda recomendam que antes do início de qualquer procedimento de amostragem as esponjas devem ser testadas com relação às suas propriedades inibitórias.

As placas de Petri foram observadas com relação à formação de halo de inibição ou não ao redor das esponjas. A esponja de celulose não apresentou halo de inibição, descartando-se a possibilidade de conter compostos inibidores. Recomenda – se porém, que estas sejam bem lavadas antes de sua utilização para testes de contato com a superfície, seguidas de esterilização. Foram testadas também algumas esponjas de poliuretano em apenas uma houve a formação de um discreto halo de inibição de 1-2 mm.

4.2. Análise do papelão componente da embalagem

A finalidade da execução desta análise foi o levantamento de bolores que poderiam estar presentes no papelão que constitui a segunda camada do laminado. Essa análise foi realizada no início do trabalho e foram retiradas 5 caixas de cada lote e amostrados 4 lotes num total de 20 caixas analisadas.

Das 20 embalagens analisadas (5 embalagens para cada lote) para a verificação da possível presença de bolores no papelão, um dos componentes do laminado destinado à fabricação de embalagens assépticas. Não foram isolados bolores provenientes desse material.

4.3. Levantamento dos microrganismos existentes no laminado destinado à confecção de embalagens assépticas

Foram realizadas 17 coletas em 2 empresas, sendo 6 amostragens na primeira (Planta A) de 27/3 a 28/05/98 e 11 na segunda (Planta B) de 5/08 a 7/01/99. Os resultados obtidos das coletas são apresentados na Tabela 4 e 5.

Na planta A, o laminado destinava-se à confecção de embalagens de Polpa de tomate (520g), na máquina de envase TBA3 (Tetra Brik Aseptic) com produção de 60 embalagens/minuto.

Na planta B, o laminado destinava-se à confecção de embalagens de Purapolpa (520 gramas, 8,5-9,0 °Brix) na máquina de envase TBA8 (produção de 100 embalagens/minuto).

Os códigos utilizados para os bolores são por exemplo:

F= Fungo

Número = número do isolado

A= Planta A

E = Planta B

Número = Número da amostragem

Ex: F1A1 = Isolado 1 na planta A da primeira amostragem

F3E2 = Isolado 3 na planta B da segunda amostragem

Tabela 4. Resultados dos bolores isolados da superfície interna do laminado na planta A utilizando técnica de contato de superfície .

Data da coleta	Quantidade de amostras analisadas	Total de amostras com presença de bolores	Contagem estimada em UFC/ 0,7014m ²	Contagem estimada em UFC/ 100cm ²	Identificação dos bolores termorresistentes (código)	Identificação dos bolores não termorresistentes (código)
27/03/1998	4	1	71,28	1,016	—	<i>Paecilomyces variotii</i> (F1A1)
2/04/98	4	0	0	-----	-----	-----
24/04/98	4	0	0	-----	-----	-----
30/04/98	4	0	0	-----	-----	-----
14/05/98	4	0	0	-----	-----	-----
28/05/98	4	1	71,28	1,016	-----	<i>Aspergillus parasiticus</i> (F2A6)

Tabela 5. Resultados dos bolores isolados da superfície interna do laminado da planta B utilizando a técnica de contato de superfície

Data da coleta	Quantidade de amostras analisadas em cada lote	Total de amostras com presença de bolores	Contagem estimada em UFC/1,19m ²		Contagem estimada em UFC/100cm ²	Identificação dos bolores termorresistentes isolados	Identificação dos bolores não termorresistentes isolados
5/08/98	4	0	—		—		—
20/08/98	4	4	Amostra 1	42,01	0,353	----	<i>Epicoccum nigrum</i> (F3E2)
			Amostra 2	84,3	0,71	{ ---- <i>Talaromyces flavus</i> (F5E2) ----	<i>Penicilium decumbens</i> (F4E2)
			Amostra 3	42,01	0,353		<i>Aspergillus sydowii</i> (F6E2)
			Amostra 4	42,01	0,353		<i>Penicilium citrinum</i> (F7E2)
18/09/98	4	0	-----		-----	-----	-----
6/10/98	4	0	-----		-----	-----	-----
21/10/98	4	0	-----		-----	-----	-----
16/11/98	4	0	-----		-----	-----	-----
23/11/98	4	0	-----		-----	-----	-----
28/11/98	4	0	-----		-----	-----	-----
17/12/98	4	0	-----		-----	-----	-----
7/01/99	4	0	-----		-----	-----	-----
2/03/99	4	0	-----		-----	-----	-----

Análises realizadas por von Bockelmann & von Bockelmann (1986) mostraram que, a contagem média total de microrganismos em superfícies de polietileno, em contato com o alimento, em embalagens cartonadas foi de 2 a 5 microrganismos/100cm², sendo desse total, 10,6% leveduras, 20,6% bolores e 68,8% bactérias. Considerando – se o aparecimento de 20,6% de bolores e o número total de microrganismos encontrados pelos autores (2 - 5 microrganismos/100 cm²) tem-se então aproximadamente de 0,412 – 1,03 bolores/100cm². Para esses autores, a quantidade total de microrganismos na superfície em contato com o alimento é

importante, porém, os tipos presentes e suas contagens são muito mais importantes.

No levantamento inicial da contaminação existente no laminado destinado à confecção de embalagens, no presente trabalho, as maiores contagens encontradas foram 1,02 bolores/ 100cm² para a planta A e 0,71 bolores/100 cm² para a planta B, sendo que a planta A e B se encontram na faixa mencionada por von Bockelmann & von Bockelmann (1986).

Somente 2 amostras de um total de 24 coletadas para a planta A e 1 amostra para a planta B de 44 amostras coletadas apresentaram crescimento de bolores, antes do banho de peróxido, ou seja, 8,33% das amostras para planta A e 2,27% das amostras para a planta B. Foram coletadas um total de 68 amostras nas duas plantas examinadas, sendo que apenas 6 apresentaram bolores, ou seja 8,82%.

Os dados relatados por von Bockelmann & von Bockelmann (1986), do levantamento da contaminação do polietileno, foram obtidos imediatamente após a produção do material de embalagem, não levando em consideração as infecções posteriores nos locais de estocagem e utilização do material. No presente trabalho, as embalagens amostradas tinham em média 7 dias de estocagem em planta. Com mais esse dado, foi possível observar que as condições microbiológicas do material de ambas as plantas estudadas no presente trabalho eram boas, e apresentaram uma contaminação por bolores baixa.

4.3.1. Características dos bolores isolados

Dos bolores encontrados, apenas o *Talaromyces flavus* é reconhecidamente considerado termorresistente (Tournas, 1994), freqüentemente ocorrendo em sucos de frutas, sendo que os ascosporos podem estar no solo contaminando o fruto. A ocorrência deste bolor é geralmente em solos de climas tropicais (Pitt & Hocking, 1985). Produzem ascosporos que são resistentes ao calor. Para o isolamento de algumas espécies, é necessário estimular a germinação de ascosporos dormentes (ativação).

O *Paecilomyces variotii* (Fig.6) é um contaminante comum do ar, podendo apresentar crescimento em ambientes termofílicos, e também, tem sido reportado recentemente como um bolor resistente a preservantes como o ácido sórbico, benzóico e propiônico utilizados em alimentos (Pitt & Hocking, 1985) e, também, ao borato utilizado na preservação de madeiras, sendo capaz de crescer em bórax na concentração de até 8g/l em meios sólidos (Ágar malte) e líquidos (extrato de malte) e em pinheiro tratado com o preservante. Para isso produz uma enzima, a beta-D-1,4-glucosidase que possibilita maior absorção de glicose para o crescimento (Parker et al, 1999). É um bolor fracamente xerofílico com crescimento registrado abaixo de 0,84 de a_w . Possui habilidade de crescer em baixas tensões de oxigênio. O ótimo de crescimento é de 35 a 40°C. É um contaminante freqüente de alimentos, matérias-primas e meios de cultura, porém, é difícil encontrar registros desse bolor na deterioração de alimentos. Segundo Lund et al. (1996) este bolor foi predominante na micoflora de pão embalado, a fonte de contaminação era a máquina de fatiar os pães.

O bolor *Penicillium citrinum* não é termorresistente, porém, produtor de uma micotoxina chamada citrinina. O habitat mais comum para esse bolor são os grãos, farinhas e cereais, especialmente arroz e milho (ICMSF, 1996). Esta espécie é mesofílica com temperatura ótima de crescimento entre 26 a 30°C. Este bolor é muito mais que um contaminante, pois, devido à sua natureza mesofílica e ainda sua habilidade de crescer abaixo de 0,80 de a_w , apresenta capacidade de viver em um grande número de habitats (Pitt & Hocking, 1985).

O *Penicillium decumbens* é uma das poucas espécies de *Penicillium* que cresce entre 5 e 37°C, pode ser encontrado freqüentemente em alimentos desidratados e por isso pode ser considerado um xerófilo. Este bolor tem sido isolado de uma grande variedade de alimentos (Pitt & Hocking, 1985) como por exemplo o pão de forma embalado (Lund et al, 1996).

O gênero *Aspergillus* está entre os mais conhecidos e mais freqüentemente encontrados e possui um grande significado na deterioração de alimentos e produção de micotoxinas. O *Aspergillus parasiticus* não é um bolor termorresistente e é rara sua ocorrência em alimentos. É muito semelhante ao *Aspergillus flavus* e tem sido confundido muitas vezes com esta espécie por muitos pesquisadores, podendo ser devido a isso a baixa incidência encontrada em alimentos (ICMSF, 1996). A maior ocorrência de *A. parasiticus* é em regiões tropicais (Pitt & Hocking, 1985) e este fungo é conhecido pela produção de aflatoxinas que são cronicamente tóxicas para animais, incluindo o homem. Grandes concentrações de sal e açúcar têm efeito altamente protetor para esse esporos (ICMSF, 1996).

Aspergillus sydowii é uma espécie com grande distribuição na natureza, porém, com rara ocorrência em alimentos e como causa de deterioração (Pitt & Hocking, 1985). É estreitamente relacionado ao *Aspergillus versicolor* e possui propriedades fisiológicas semelhantes. Foi reportado na literatura uma a_w de 0,78 como sendo a mínima para o crescimento e, com relação à temperatura, apenas uma pequena porcentagem de conídios sobreviveram ao aquecimento de 50°C por 10 minutos. O *Aspergillus sydowii* é amplamente distribuído, porém, não é isolado freqüentemente de alimentos, como muitas outras espécies de *Aspergilli*. Ele parece contaminar principalmente alimentos, tais como a soja e o feijão (Pitt & Hocking, 1985).

O bolor *Epicoccum nigrum* (Fig 7) pertencente aos Hyphomicetos, é um saprófito, invasor secundário de tecidos mortos. É amplamente distribuído no ar, no solo e na vegetação em decomposição. Sua grande distribuição no ambiente significa que sua presença é comum em alimentos, mas ele raramente causa deterioração. É encontrado comumente em vegetais frescos, nozes e cereais (Pitt & Hocking, 1985). As culturas freqüentemente permanecem estéreis sendo a esporulação induzida por exposição em luz UV (Samsom & van Reenen - Hoekstra, 1988). O *E. nigrum* poderia ser possivelmente utilizado na indústria de alimentos, pois produz um pigmento amarelo hidrossolúvel de natureza carotenóide, inodoro e insípido e muito apropriado para aplicação em alimentos, sendo que esse pigmento possui alta resistência à degradação, sendo significativamente superior a outros produtos comerciais similares (Stricker et al. 1981).

As identificações destes bolores através do programa FUNG-

HOM (Gumerato, 1995) encontram-se no Apêndice 1 exceto para o bolor *Epicoccum nigrum* identificado pelo Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS) – Holanda ,1999 (Comunicação pessoal).

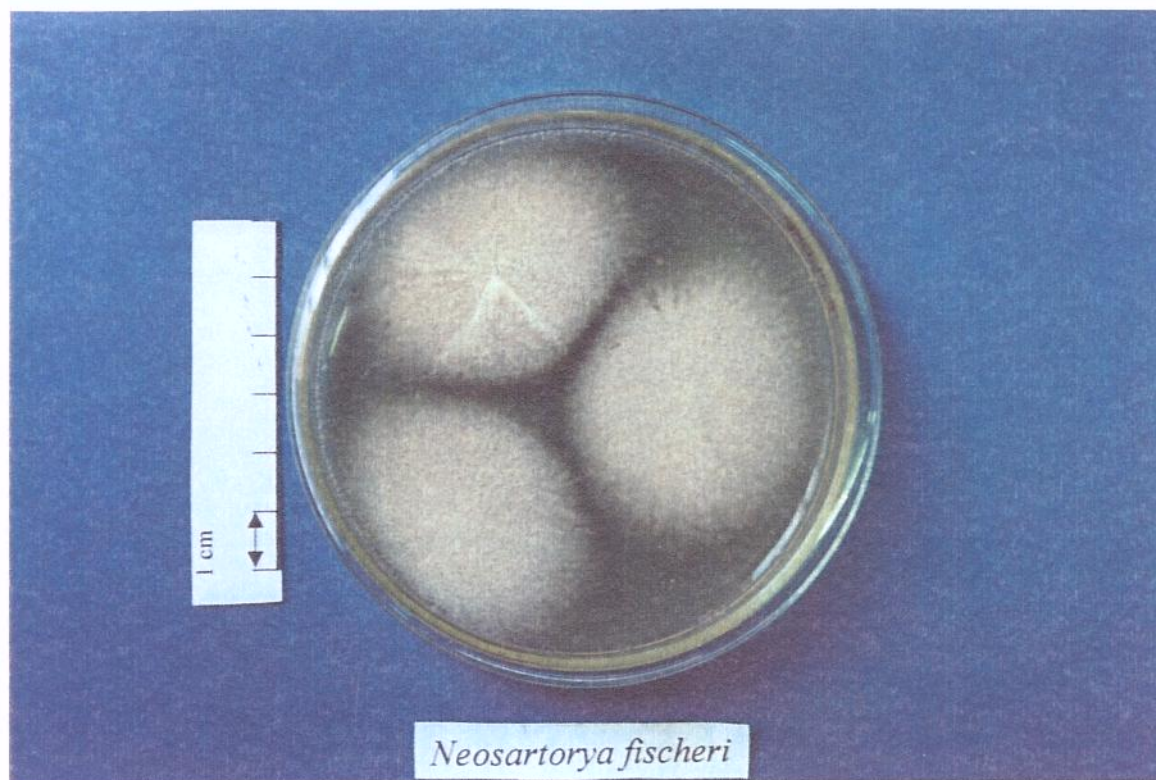


Figura 5 .*Neosartorya fischeri* em MEA (5 dias) a 30°C

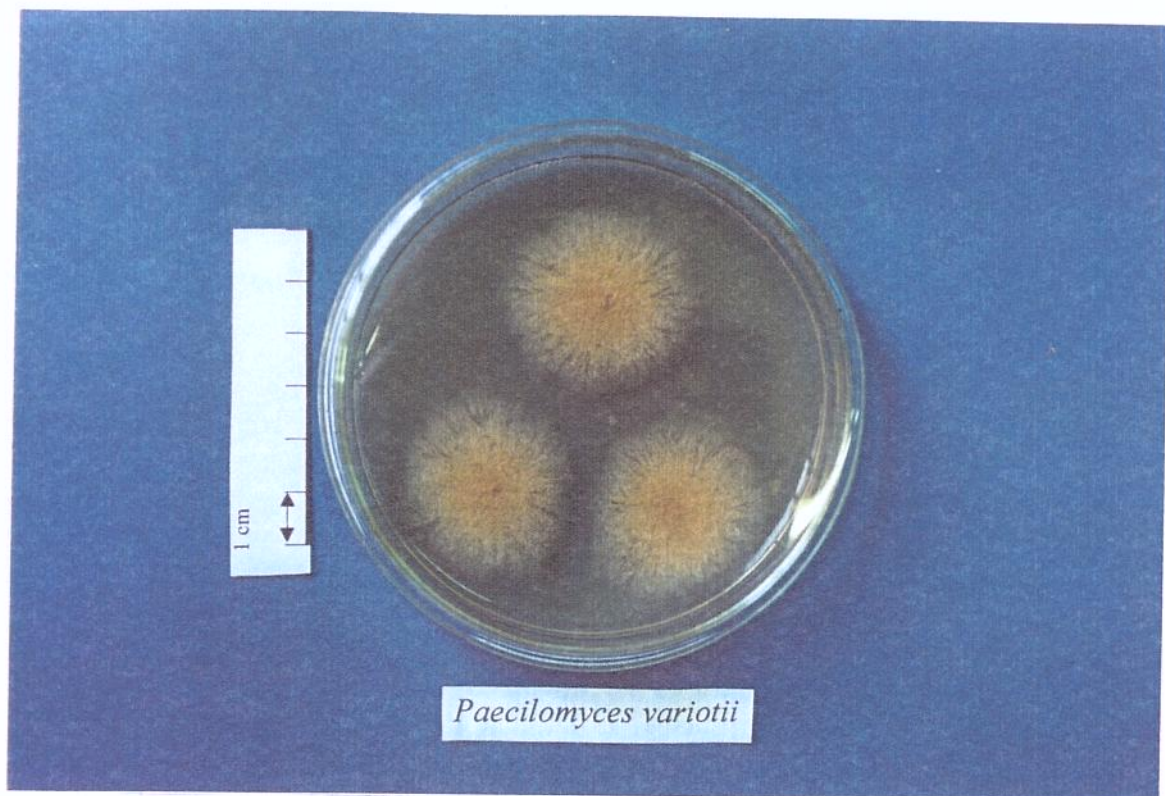


Figura 6. *Paecilomyces variotii* em MEA (5 dias) a 30°C

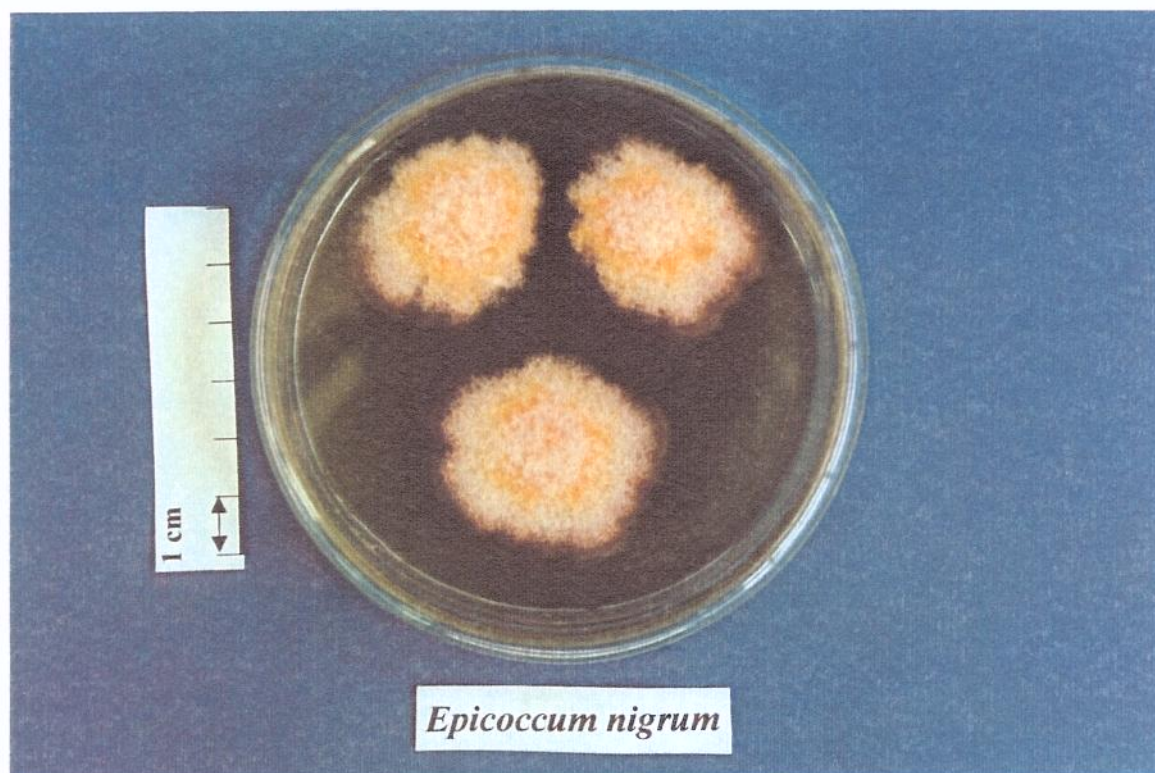


Figura 7. *Epicoccum nigrum* em MEA (7 dias) a 25°C

4.4. Ativação dos ascosporos

Os ascosporos dos Ascomicetos, como por exemplo o *Neosartorya fischeri*, (Fig 5) apresentam dormência, sendo que esta pode ser quebrada com a realização de um tratamento de ativação, que pode ser com utilização de baixas temperaturas, irradiação, porém, o mais utilizado são as altas temperaturas (choques térmicos). Os tratamentos para ativação dos diferentes fungos são apresentados a seguir.

4.4.1. Ativação do bolor *N. fischeri*

Foram aplicados choques térmicos programados, seguidos de contagem, sendo possível assim encontrar o tempo *versus* temperatura para a ativação ótima. As figuras 8 e 9 mostram as curvas obtidas para esporos com tempo de incubação (idade) de 1 e 4 meses, respectivamente.

Foram realizadas contagens em câmara de Neubauer (tabela 6) que dá uma idéia da população total, que ficou em torno de 10^7 esporos/ml , incluindo esporos que podiam não estar viáveis para germinação. Essa contagem foi utilizada para os cálculos de porcentagem (%) de ascosporos ativados mostrados nas tabelas 7 e 8.

Tabela 6. Contagem direta dos ascopóros (Câmara de Neubauer) de *Neosartorya fischeri* com 1 e 4 meses de idade

Idade da suspensão de ascopóros (meses)	Ascopóros/ ml de suspensão
1	$4,3 \times 10^7$
4	$6,0 \times 10^7$

Tabela 7. Recuperação em MEA (profundidade) dos ascopóros de *N. fischeri* com 1 mês de idade e a porcentagem (%) de ascopóros ativados em relação à contagem direta (Câmara de Neubauer)

Choque térmico (°C/minutos)	Ascopóros/ ml de suspensão	% de ascopóros ativados
Sem choque térmico	$1,5 \times 10^6$ *	—
80°C/5 min.	$1,0 \times 10^7$	23,25
80°C/10 min.	$2,0 \times 10^5$	0,46
80°C/12min.	$1,5 \times 10^5$	0,35
80°C/22 min.	$1,0 \times 10^5$	0,23
80°C/30 min.	$5,0 \times 10^4$	0,12

* = Contagem em câmara de Neubauer

Tabela 8. Recuperação em MEA (profundidade) dos ascósporos de *N. fischeri* com 4 meses de idade e a porcentagem (%) de ascósporos ativados em relação à contagem direta (Câmara de Neubauer)

Choque térmico (°C/minutos)	Ascósporos/ ml de suspensão	% de ascósporos ativados
Sem choque térmico	1,5x10 ⁶ *	—
85°C/ 5min.	2,0x10 ⁶	3,33
85°C/10min.	3,0x10 ⁶	5,0
85°C/15 min.	8,0x10 ⁶	13,3
85°C/20min.	2,0x10⁷	40,0
85°C/25min.	3,5x10 ⁶	5,83
85°C/30min.	4,5x10 ⁶	7,5

* = Contagem em câmara de Neubauer

Como foi possível observar nas tabelas 7 e 8, a contagem em câmara de Neubauer foi de 1,5 x10⁶ UFC/ml quando os esporos não foram submetidos ao choque térmico, para ambas as idades, e com a ativação ótima para *N. fischeri* (1 mês) houve quase um ciclo logarítmico de incremento a 80°C por 5 minutos, mais precisamente 0,82 e a contagem foi realizada em MEA (profundidade). Para o *N. fischeri* (4 meses) foram obtidos 1,12 ciclos logarítmicos de incremento quando esses ascósporos foram submetidos à sua temperatura e tempo de ativação ótimo (85°C por 20 minutos) .

Segundo Splittstoesser & Splittstoesser (1977), para o bolor *Aspergillus fischeri*, em água, uma alta porcentagem de esporos permaneciam dormentes, mesmo quando aquecidos a 80°C por um período bastante longo, como por exemplo 90 minutos, o que pode ter acontecido na presente pesquisa quando se utilizou água como meio de aquecimento.

Cabe ressaltar que o bolor *N. fischeri* não foi isolado do material de embalagem, mas da polpa de tomate e, nesta pesquisa, foi usado como controle.

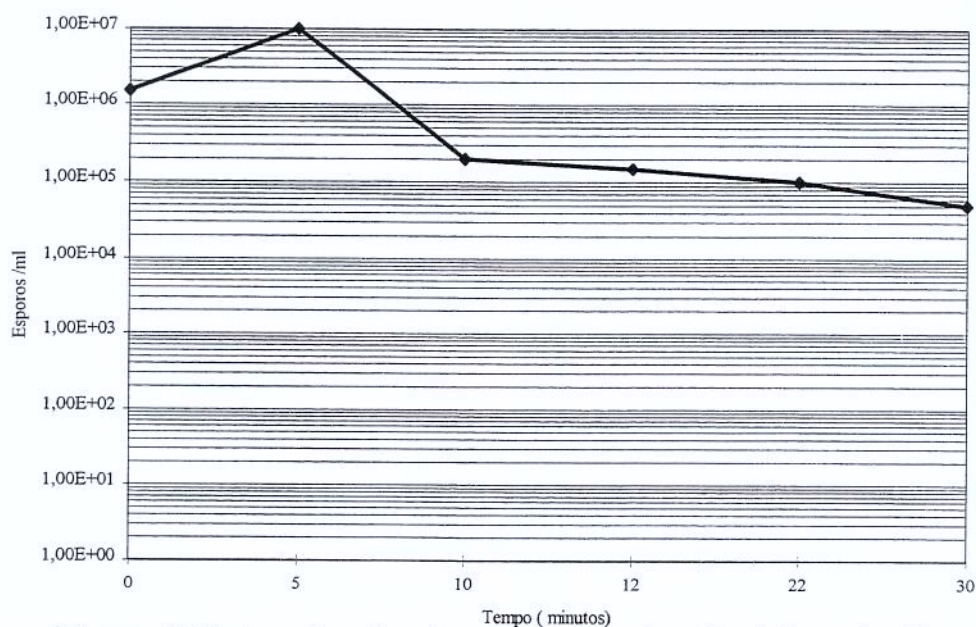


Figura 8. Determinação do tempo de ativação ótimo de *Neosartorya fischeri* (1 mês) em água destilada a 80°C.

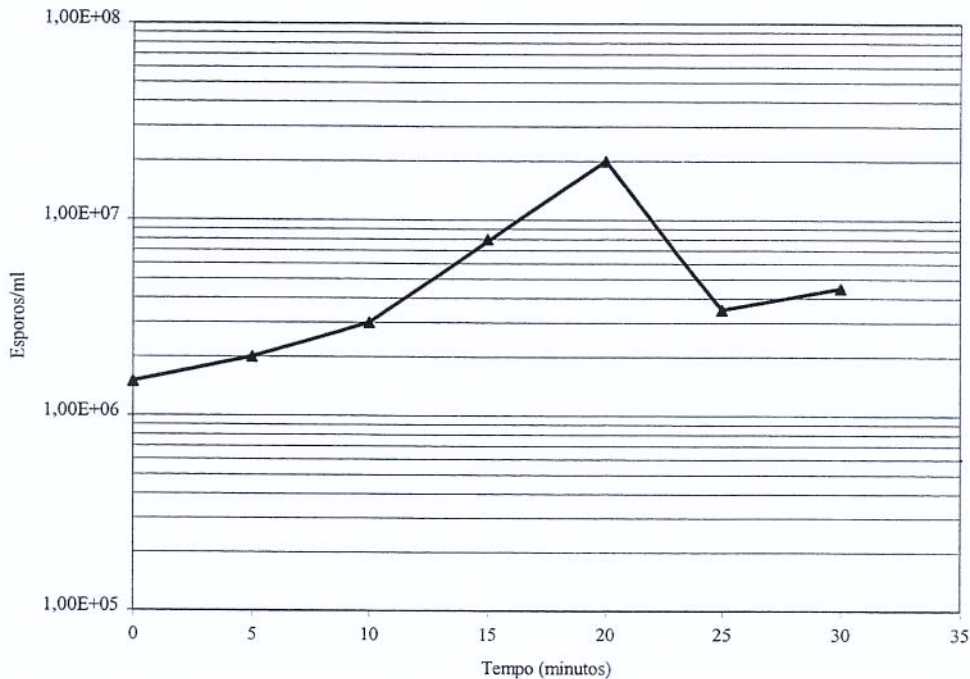


Figura 9. Determinação do tempo de ativação ótimo de *Neosartorya fischeri* (4 meses) em água destilada a 85°C.

Para o bolor *Neosartorya fischeri* de 4 meses, o tempo (minutos) *versus* temperatura (°C) ótimo de ativação foi de 20 minutos a 85°C, em água destilada, sendo obtida a contagem de 2×10^7 esporos/ml após a ativação (Figura 9 e Tabela 8) e para *N. fischeri* com 1 mês foi de 80°C por 5 minutos obtendo-se uma contagem de $1,0 \times 10^7$ (Figura 8 e Tabela 7), comprovando-se maior dormência nos esporos mais velhos.

Aragão (1989) encontrou que a ativação ótima para *Neosartorya fischeri* (1 mês) em suco de morango foi de 80°C por 10 minutos, havendo um incremento de 1 ciclo logarítmico com relação à contagem inicial sem ativação, o mesmo acréscimo encontrado por Conner & Beachat (1987) quando este fungo foi submetido à temperatura de 84°C por 30 e 60 minutos em meio de suco de maçã, suco de uva e tampão fosfato. No presente trabalho, foi obtido um incremento de 1 ciclo logarítmico para *N. fischeri* com 1 e 4 meses de idade em água destilada. Gumerato (1995) obteve um incremento de 3 ciclos logarítmicos para *N. fischeri* em água destilada a 85°C por 5 minutos.

Splittstoesser & Churey (1991) compararam a ativação em suco de uva 5° Brix e em água destilada para ascosporos de *N. fischeri* com 1 mês de idade e encontraram que em água a porcentagem de recuperação dos esporos, em relação à contagem através da microscopia direta, foi geralmente menor que quando o meio de aquecimento foi o suco de uva..

4.4.2. Ativação do bolor *Talaromyces flavus*

Para o bolor *Talaromyces flavus*, foram ensaiadas as temperaturas

de 70°C e 85°C por 5, 10, 15, 20 e 30 minutos e 80°C por 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos. As temperaturas e tempos escolhidos foram baseados na literatura. No binômio de 80°C por 25 minutos houve incremento de 2,4 ciclos logarítmicos, já que a contagem inicial foi de $1,0 \times 10^5$ esporos/ml e após ativação ótima foi de $2,5 \times 10^7$ esporos/ml. O *T. flavus* é termorresistente, sendo assim é muito importante a ativação para obtenção da contagem de esporos germinados, já que muitos são dormentes. Para os demais bolores apresentados na Tabela 9 não foi necessária essa etapa, já que eles não são Ascomicetos e não possuem esporos dormentes.

Aragão (1989) encontrou 80°C por 5 minutos como sendo melhor binômio para ativação de *T. flavus* com 1 mês de idade, em suco de morango, com incremento de 2 ciclos logarítmicos em relação à contagem inicial. Para King Jr & Halbrook (1987) o tempo *versus* temperatura ótimo para 3 linhagens de *T. flavus* foi de 12 – 15 minutos a 80°C e para Beuchat (1986) foram 15 – 30 minutos a 85°C e 45-120 a 80°C em tampão fosfato (0,1M, pH 7,0). O valor de ativação encontrado no presente trabalho, está coerente com os valores descritos na literatura, sendo levadas em consideração diferenças na linhagem do microrganismo, meios de aquecimento e métodos utilizados na determinação.

4.5. Concentração das suspensões de esporos utilizadas nos ensaios com peróxido de hidrogênio

As suspensões de esporos utilizadas nos ensaios com peróxido de hidrogênio possuíam as concentrações citadas na tabela 9, após contagem em

profundidade em MEA, com incubação por 7 dias a 25 ou 30°C. Para a execução dos testes foi requerida uma população inicial alta para o estabelecimento com precisão do número de reduções ocasionadas pelo agente esterilizante.

Tabela 9. Contagem das suspensões de esporos utilizadas nos testes com peróxido de hidrogênio

Fungo	Contagem (UFC/ml)
<i>N. fischeri</i> (1 mês) **	$1,0 \times 10^7$ *
<i>N. fischeri</i> (4 meses)	$2,0 \times 10^7$ *
<i>Paecilomyces variotii</i> (4 meses)	$1,65 \times 10^7$
<i>Paecilomyces variotii</i> (1 mês)***	$2,0 \times 10^7$
<i>Penicillium decumbens</i> (1 mês)	$4,9 \times 10^8$
<i>Aspergillus parasiticus</i> (1 mês)	$3,3 \times 10^8$
<i>Penicillium citrinum</i> (1 mês)	$3,45 \times 10^8$
<i>Epicoccum nigrum</i> (1 mês)	$1,0 \times 10^4$
<i>Talaromyces flavus</i> (1 mês)	$2,5 \times 10^7$ *
<i>Aspergillus sidowii</i> (1 mês)	$2,5 \times 10^8$

* Após ativação

** Na primeira fase do trabalho (temperatura ambiente) a suspensão de *N. fischeri* (1 mês) utilizada para os testes possuía a concentração de $7,0 \times 10^7$ esporos/ml após a ativação.

*** Na primeira fase do trabalho foi utilizada a suspensão estoque de *Paecilomyces variotii* que estava com concentração $2,0 \times 10^8$, porém, foi necessária a obtenção de uma suspensão de trabalho com $2,0 \times 10^7$ esporos/ml, obtida a partir da suspensão original, para se ter um maior volume, suficiente para a realização de todos os testes da segunda fase do trabalho, e também para evitar contaminação da suspensão original (“mãe”).

4.6. Levantamento da contaminação por bolores após o banho de peróxido

Foram realizadas 5 amostragens na indústria B, sendo que em cada uma foram coletadas 5 caixas para a análise de bolores termorresistentes e 5 para bolores não termorresistentes, totalizando 50 embalagens analisadas. Os resultados dessas análises se encontram na tabela 10. Não foram isolados bolores após o banho de peróxido.

Tabela 10. Análise de embalagens vazias, fechadas hermeticamente da indústria B (520g) e coletadas após o banho de peróxido.

Datas das coletas	Número de amostras analisadas	Contagem dos bolores isolados (UFC/ml) termorresistentes ou não
6/10/98	10	<1
21/10/98	10	<1
16/11/98	10	<1
28/11/98	10	<1
17/12/98	10	<1

Estes resultados sugerem que o tratamento atual com peróxido praticado na indústria é eficiente na eliminação da contaminação por fungos da superfície do laminado, mas não garante que a contaminação encontrada em 2,2% das amostras seja eliminada.

4.7. Verificação da metodologia de avaliação da superfície de contato mediante inoculação induzida.

Devido às baixas contagens encontradas a partir das análises dos swabs suspeitou - se que isso pudesse ser devido à metodologia utilizada, verificou-se então a eficiência da recuperação de esporos pela água de lavagem da esponja.

As contagens obtidas após o procedimento de lavagem com 20 e 50 ml foram $6,5 \times 10^0$ e $2,0 \times 10^0$, respectivamente, sendo esses valores inseridos na equação 4 para o cálculo da recuperação dos esporos inoculados na área de $1,19 \text{ m}^2$.

O total de microrganismos recuperados após a lavagem com 20 ml de água peptonada 0,1% (p/v) foi de $1,1 \times 10^2$ (UFC/ $1,19 \text{ m}^2$) e para 50 ml foi de $8,4 \times 10^1$ (UFC/ $1,19 \text{ m}^2$). A fórmula utilizada para o cálculo foi:

(Eq. 4)

$$\text{Total de microrganismos (UFC/1,19m}^2\text{)} = \text{contagem (UFC/ml)} \times \text{V(ml)/1,19m}^2$$

onde:

V =volume de água de lavagem da esponja

A metodologia provou ser efetiva para o isolamento de bolores em superfícies com baixas contagens, ou seja, quando foi inoculado 1 ml de uma população com 1×10^2 esporos/ml do bolor *Paecilomyces variotii* (1 mês) em uma área de $1,19 \text{ m}^2$ (mesma área amostrada na indústria) a recuperação

foi de 84% dos microrganismos inoculados quando a esponja foi lavada com 50 ml de água peptonada e de 100% quando o volume da água peptonada foi de 20ml. Certamente 20 ml de diluente seria então o volume mais recomendado para lavar a esponja.

A recuperação dos esporos inoculados foi ligeiramente maior quando utilizado um volume de diluente menor (20 ml) para a lavagem da esponja, porém, com a filtração da água de lavagem foi comprovado que alguns dos esporos ficam retidos na membrana Millipore® de 0,22µm de poro, principalmente pelo tamanho dos esporos fúngicos que está na faixa de 5µm, apresentando crescimento positivo quando a membrana foi incubada em meio PDA por 7 dias a 25°C, excluindo-se a possibilidade dos esporos não serem detectados, em ambos os volumes utilizados para a lavagem da esponja após o swab.

4.8. Resultado do ensaio para a escolha da concentração necessária de catalase para neutralizar 45% de peróxido de hidrogênio

A neutralização do peróxido de hidrogênio pela catalase é uma etapa muito importante em testes de avaliação da atividade esporicida deste agente. O objetivo é cessar a reação do peróxido de hidrogênio após o tempo de contato desejado com os esporos, para isso, utiliza-se a enzima catalase que catalisa a transformação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, sendo assim, a suspensão de esporos após o tratamento pode ser diluída e plaqueada sem a presença de residual de peróxido, o que tornaria difícil a interpretação dos resultados.

A solução de enzima utilizada nesta pesquisa apresenta concentração superior àquela empregada por Tsuchida e Tsuchido (1997), que utilizaram uma solução de catalase com 5600 unidades/ml para inativar a solução de peróxido de hidrogênio 10%, sendo que, nessa pesquisa, foi de 13.432 unidades/ ml na primeira fase e 13.500 unidades/ml na segunda fase da pesquisa.

Segundo Reed (1975), o estudo da cinética da decomposição catalítica do peróxido de hidrogênio é complicada, uma vez que, enquanto a catalase está agindo no seu substrato (H_2O_2), ao mesmo tempo está sendo inativada por ele. O resultado é uma mudança de concentração da enzima e do substrato, e isto não somente complica o estudo da cinética enzimática, mas também os procedimentos analíticos .

A tabela 11 apresenta os resultados dos testes com diversas concentrações da enzima catalase para inativar 45% de peróxido de hidrogênio

Tabela 11. Resultados dos testes com diversas concentrações da enzima catalase para inativar 45% de peróxido de hidrogênio

Concentração da catalase ensaiada (mg de enzima /ml de salina)	Concentração de peróxido (%)	Resultados do teste iodométrico : aparecimento de cor azul (+) , incolor (-)
0,05	45	+
0,5	45	+
5,0	45	+
15,0*	45	—

* = 13.432 unidades/ml na primeira fase da pesquisa e 13.500 unidades/ml na segunda fase.

O aparecimento de solução incolor após tratamento com a enzima catalase indica ausência de peróxido residual.

O tratamento mais adequado para inativar 45% de peróxido de hidrogênio foi com 15mg de enzima/ ml de salina, permanecendo a solução incolor após os testes iodométricos e portanto sendo o escolhido para a utilização nesta pesquisa.

4.8.1. Resultados do efeito da concentração de catalase utilizada no ensaios com os bolores *N. fischeri* e *P. variotii* com 1 mês de idade

Este ensaio teve como finalidade estabelecer se a ação da catalase adicionada para inativar o peróxido tinha algum efeito nos microrganismos ensaiados.

Os testes do efeito da catalase sobre os bolores *N. fischeri* e *P. variotii* com 1 mês de idade (tabela 12) foram realizados em triplicata antes do início dos experimentos com peróxido de hidrogênio.

Observa-se, pelos resultados da tabela 12, que não houve grande diferença entre as contagens dos esporos na presença e ausência da catalase. Apesar dos dados não terem sido analisados estatisticamente, é evidente que não há interferência da enzima catalase na germinação dos esporos dos bolores testados, excluindo assim, a possibilidade desta ser um interferente na interpretação dos resultados dos ensaios com peróxido.

Tabela 12. Efeito da catalase sobre os esporos de *N. fischeri* e *P. variotii* com 1 mês de idade (média de 3 experimentos)

Fungo	Experimento com 13.432 unidades de catalase/ml de salina	Experimento com água destilada (sem catalase) - Branco
	----- UFC/ml -----	
<i>Neosartorya fischeri</i> (1 mês)*	$2,7 \times 10^4$	$3,1 \times 10^4$
<i>Paecilomyces variotii</i> (1 mês)*	$2,9 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4$

* = Suspensão de esporos com nível de inóculo de 10^7 esporos/ml

4.9. Resultados dos ensaios com peróxido de hidrogênio – Primeira fase

Todos os bolores isolados foram testados com peróxido de hidrogênio na primeira fase do trabalho, utilizando concentrações de 5, 10, 20, 35 e 40% a temperatura ambiente (25°C) e com 10 segundos de contato peróxido/bolor.

Os testes com os bolores no presente trabalho foram realizados utilizando esporos em suspensão (esporos úmidos). Ito et al. (1973) encontraram que esporos secos de *Clostridium botulinum* 169B eram mais resistentes aos tratamentos com peróxido do que esporos úmidos. Toledo et al. (1973), trabalhando com *Bacillus subtilis* SA22, e Smith & Brown (1980) com *B. subtilis* variedade *globigii*, mostraram que os esporos úmidos eram mais resistentes aos tratamentos com H_2O_2 . Buchen & Marth (1977) utilizaram esporos de *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* em suspensão para testes com peróxido de hidrogênio.

Os bolores *Penicillium decumbens* e *Aspergillus parasiticus* não foram resistentes a 35% de peróxido, pois foram obtidas mais de 7,0 reduções logarítmicas com esse tratamento (tabela 16).

O fungo *Epicoccum nigrum* foi o que apresentou a mais baixa resistência ao peróxido, sendo que, quando exposto a uma solução com 10 % de peróxido já foram obtidas mais que 4,0 reduções logarítmicas (tabela 20).

Para comparar os tratamentos, foi calculado o número de reduções decimais γ para cada um, sendo $\gamma = -\log (N/N_0)$, onde N é a população após o tratamento e N_0 a população inicial, sem o tratamento (Tabelas 13 a 20).

Para o bolor *Paecilomyces variotii*, a concentração de peróxido de hidrogênio onde foi encontrada a maior redução ($\gamma = 2,90$) da população foi a de 40%, em temperatura ambiente, com tempo de contato de 10 segundos. Era esperado que em temperatura ambiente o efeito do peróxido fosse baixo pois segundo Buchen & Marth (1977) a temperatura na qual ocorre o tratamento com peróxido de hidrogênio tem um efeito marcante na inativação dos esporos, com o aumento da temperatura, a resistência do esporo diminui. Na tabela 13 foi possível observar que com uma concentração de peróxido de 35% (p/p), geralmente praticada pela indústria, o efeito a temperatura ambiente é de apenas 1,9 reduções.

Swartling & Lindgren (1962) citados por Toledo et al. (1973) encontraram que os esporos de *Bacillus subtilis* não foram inativados quando tratados com 22% de H_2O_2 e 11 segundos de contato em temperatura

ambiente, porém, quando estes esporos foram ensaiados com o H_2O_2 e expostos ao ar quente a $125^\circ C$ por 8 a 10 segundos, ocorreu 99,2% de destruição da população de esporos.

Na tabela 14 estão os resultados da análise com o peróxido de hidrogênio para o bolor *Neosartorya fischeri*, que sobreviveu ao choque de $100^\circ C$ por 25 minutos em polpa de tomate (Baglioni, 1998). Foi possível observar que este bolor se mostrou muito resistente ao peróxido, sendo o maior γ apresentado de 2,60 ciclos logarítmicos, na concentração de 40% de peróxido, mostrando que, pelas análises realizadas na primeira fase do trabalho, esse bolor, juntamente com o *Paecilomyces variotii* e *Penicillium citrinum* são os mais resistentes ao agente químico testado.

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

Como pode ser observado nas tabelas 15 e 16, os bolores *Aspergillus sidowii* e *Aspergillus parasiticus* estão entre os menos resistentes ao peróxido, sendo que quando expostos à solução de 35% de peróxido foram obtidas 4 reduções de ciclos logarítmicos. Este fato pode ser explicado segundo Buchen & Marth (1977) pela desnaturação protéica, devido à grande quantidade de proteína nos esporos de *Aspergillus*, sendo 19 % na capa do

esporo e 5 % na parede do esporo de *Aspergillus oryzae*, como determinado por Horikoski e Iida (1964), sendo assim, o esporo de *Aspergillus* seria muito susceptível à oxidação pelo peróxido, que é um forte agente oxidante.

Tabela 13. Valores γ para o tratamento com peróxido de hidrogênio sobre conídios de *Paecilomyces variotii* (1 mês) à temperatura ambiente.

H ₂ O ₂ (%)	Sobreviventes N (UFC/ml)	$\gamma = -\log N/N_0$
0 *	1,0x10 ⁷	
5	8,4x10 ⁶	0,08
10	4,6x10 ⁶	0,34
20	1,3x10 ⁶	0,90
35**	1,3x10⁵	1,90
40	1,3x10 ⁴	2,90

* 0 = N₀ (experimento sem peróxido)

** = Concentração usada na indústria

Tabela 14. Valores γ para o tratamento com peróxido de hidrogênio sobre ascósporos de *Neosartorya fischeri* (1 mês) à temperatura ambiente

H ₂ O ₂ (%)	Sobreviventes N (UFC/ml)	$\gamma = -\log N/N_0$
0 *	1,8 x10 ⁷	
5	1,5x10 ⁷	0,08
10	1,8x10 ⁶	1,00
20	1,8x10 ⁶	1,00
35**	1,3x10 ⁵	2,14
40	4,6x10 ⁴	2,59

* 0 = N₀ (Experimento sem peróxido)

** = Concentração usada na indústria

Tabela 15. Valores γ (redução de ciclos logarítmicos) para o tratamento com peróxido de hidrogênio sobre conídios de *Aspergillus sidowii* (1 mês) à temperatura ambiente

H ₂ O ₂ (%)	Sobreviventes N (UFC/ml)	$\gamma = -\log N/N_0$
0 *	1,8x10 ⁷	
5	1,0x10 ⁷	0,25
10	1,0x10 ⁷	0,25
20	9,9x10 ⁶	0,26
35**	1,8x10 ³	4,00
40	<1	>7,0

* 0 = N₀ (Experimento sem peróxido)

** = Concentração usada na indústria

Para o bolor *Aspergillus parasiticus* não houve crescimento após ter sido tratado com 35% e 40% (p/p) de peróxido de hidrogênio (Tabela 16), assim como para o *Penicillium decumbens* (Tabela 17)

Tabela 16. Valores γ para o tratamento com peróxido de hidrogênio sobre conídios de *Aspergillus parasiticus* (1 mês) à temperatura ambiente

H ₂ O ₂ (%)	Sobreviventes N (UFC/ml)	$\gamma = -\log N/N_0$
0*	1,7x10 ⁷	
5	1,4x10 ⁷	0,08
10	9,1x10 ⁶	0,28
20	1,3x10 ⁶	1,12
35**	<1	>7,00
40	<1	>7,00

* 0 = N₀ (Experimento sem peróxido)

** = Concentração usada na indústria

Tabela 17. Valores γ para o tratamento com peróxido de hidrogênio sobre conídios de *Penicillium decumbens* (1 mês) à temperatura ambiente

H ₂ O ₂ (%)	Sobreviventes N (UFC/ml)	$\gamma = -\log N/N_0$
0*	2,5x10 ⁷	
5	1,8x10 ⁷	0,14
10	1,8x10 ⁷	0,14
20	2,0x10 ⁵	2,10
35**	<1	>7,0
40	<1	>7,0

* 0 = N₀

** = Concentração usada na indústria

Para o bolor *Penicillium citrinum* (tabela 18) e *Talaromyces flavus* (tabela 19) não houve crescimento quando estes foram submetidos a 40% (p/p) de peróxido de hidrogênio

Tabela 18. Valores γ para o tratamento com peróxido de hidrogênio sobre conídios de *Penicillium citrinum* (1 mês) à temperatura ambiente

H2O2 (%)	Sobreviventes N (UFC/ml)	$\gamma = -\log N/N_0$
0 *	$1,5 \times 10^7$	
5	$1,0 \times 10^7$	0,20
10	$7,6 \times 10^6$	0,30
20	$4,6 \times 10^6$	0,51
35**	$4,1 \times 10^5$	1,56
40	<1	>7,0

* $0 = N_0$

** = Concentração usada na indústria

Tabela 19. Valores γ para o tratamento com peróxido de hidrogênio sobre ascósporos de *Talaromyces flavus* (1 mês) à temperatura ambiente

H ₂ O ₂ (%) (p/p)	Sobreviventes N (UFC/ml)	$\gamma = -\log N/N_0$
0 *	$1,5 \times 10^6$	
5	$4,1 \times 10^5$	0,56
10	$3,8 \times 10^5$	0,60
20	$6,6 \times 10^4$	1,36
35**	$3,0 \times 10^3$	2,70
40	<1	>6,0

* $0 = N_0$

** = Concentração usada na indústria

Tabela 20. Valores γ para o tratamento com peróxido de hidrogênio sobre conídios de *Epicoccum nigrum* (1 mês) à temperatura ambiente

H ₂ O ₂ (%) (p/p)	Sobreviventes N (UFC/ml)	$\gamma = -\log N/N_0$
0 *	1,0x10 ⁴	
5	4,0x10 ²	1,40
10	<1	>4,0
20	<1	>4,0

* 0 = N₀ (Experimento sem peróxido)

De todos os bolores isolados e ensaiados com peróxido de hidrogênio na primeira fase do trabalho, os mais resistentes foram o *Neosartorya fischeri* (controle), *Paecilomyces variotii* e *Penicillium citrinum*, porém, os dois últimos não são conhecidos como termorresistentes, sendo assim, e com a finalidade de determinar qual era o bolor mais resistente ao calor e ao peróxido foram testados com relação à sua resistência térmica, aplicando choques térmicos a partir de 80°C por 20, 85°C por 15 e 90°C por 10 minutos. Não foram testados outros choques pois o choque a 90°C já foi suficiente para eliminar os bolores, principalmente o *P. citrinum*. Após os choques térmicos, o bolor de maior resistência térmica, no caso o *Paecilomyces variotii* (tabela 21), foi escolhido para a segunda fase do trabalho, juntamente com o *Neosartorya fischeri* que é reconhecidamente termorresistente.

O outro bolor testado, *Talaromyces flavus*, que segundo a literatura é termorresistente, não apresentou alta resistência ao peróxido.

Tabela 21. Choques térmicos para os esporos de *Paecilomyces variotii* com 1 mês de idade (média de dois experimentos) em água destilada

Tratamento	População inicial UFC/ml	Contagem após o tratamento UFC/ml
80°C – 20 minutos	$2,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$
85°C – 15 minutos	$4,5 \times 10^4$	$1,0 \times 10^3$
90°C- 10 minutos	$2,5 \times 10^4$	<1

O bolor *Penicillium citrinum* foi resistente ao peróxido, porém, ele não foi resistente à temperatura (tabela 22).

Tabela 22. Choques térmicos para o *Penicillium citrinum* com 1 mês de idade (média de dois experimentos) em água destilada

Tratamento	População inicial UFC/ml	Contagem após o tratamento UFC/ml
80°C – 20 minutos	$4,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^0$
85°C – 15 minutos	$9,5 \times 10^3$	<1
90°C- 10 minutos	$1,0 \times 10^0$	<1

4.9.1. Resistência térmica de esporos de *Neosartorya fischeri* e *Paecilomyces variotii* com 4 meses de idade

Nesta fase do trabalho foram encontradas as resistências térmicas para o *N. fischeri* e *P.variotii*. Para *N. fischeri* os ensaios foram realizados somente com a temperatura de 90°C, e para *P.variotii* a temperatura foi de 85°C, devido a sua baixa resistência a 90°C. O objetivo principal foi

demonstrar que esses microrganismos possuíam uma alta resistência térmica quando o tratamento era somente com o calor.

Os valores de resistência térmica foram encontrados apenas para os bolores com 4 meses, por se tratarem dos mais resistentes à temperatura quando comparados aos mais jovens (Tournas , 1994).

As curvas de inativação térmica para ambos os bolores se apresentam não logarítmicas (Figuras 10 e 13), sendo assim, foi aplicado o método Alderton & Snell (1970) para linearização das mesmas, sendo este utilizado por Bayne & Michener (1979), Aragão (1989), Baglioni (1998) e Splittstoesser & Splittstoesser (1977) os quais encontraram curvas não logarítmicas para resistência térmica em suco de uva 5° Brix e pH = 3,5 para *Byssosclamyces fulva* e *Aspergillus fischeri*. Segundo os autores, esse fato não se deve ao aglomerado dos ascosporos, à ativação de esporos dormentes nem ao método de aquecimento utilizado, pois todos esses parâmetros foram checados, sendo este fato devido ao efeito protetor de alguns sucos de frutas, causado principalmente pelos açúcares e ácidos orgânicos que estão em grande quantidade nesses produtos.

O fungo *Neosartorya fischeri* é um fungo termorresistente, sendo que o meio no qual ele sofre tratamento térmico é muito importante para sua resistência, pois em meios com maior quantidade de sólidos solúveis a resistência à temperatura tende a ser maior. Ao comparar dados de resistência térmica de fungos, é importante observar o meio de aquecimento, idade e o método utilizado.

A figura 11 refere-se à obtenção do expoente de linearização a , através da curva $\log (\log N_0 - \log N)$ versus $\log t$ dos dados da tabela 23, na temperatura de 90°C, sendo este expoente aplicado na linearização da curva. A figura 12 mostra a curva de linearização pelo método de Alderton & Snell (1970) para ascosporos de *N. fischeri* com 4 meses de idade.

Tabela 23 – Contagem do número de sobreviventes com o tempo de aquecimento, em água destilada, de ascosporos de *N. fischeri* com 4 meses de idade a 90°C, média de dois experimentos.

Tempo de aquecimento (minutos)	Número de sobreviventes (UFC/ml)
0	$2,5 \times 10^7$
2	$4,5 \times 10^6$
4	$3,5 \times 10^6$
6	$4,5 \times 10^5$
8	$3,0 \times 10^5$
10	$1,5 \times 10^5$

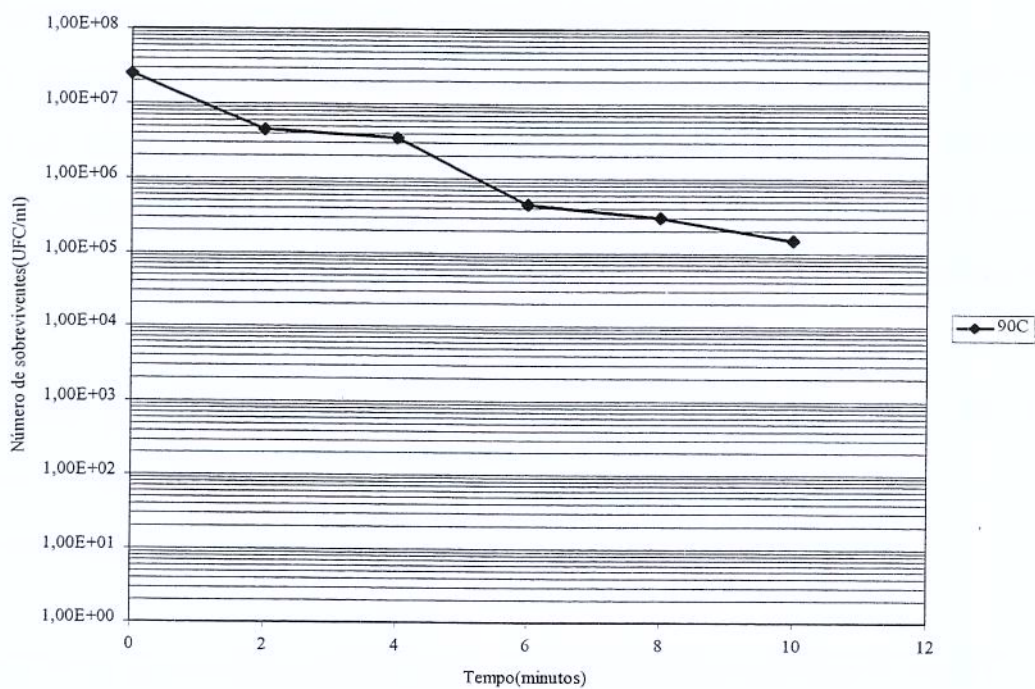


Figura 10. Curva de inativação térmica em água destilada a 90°C para ascospores de *N. fischeri* com 4 meses

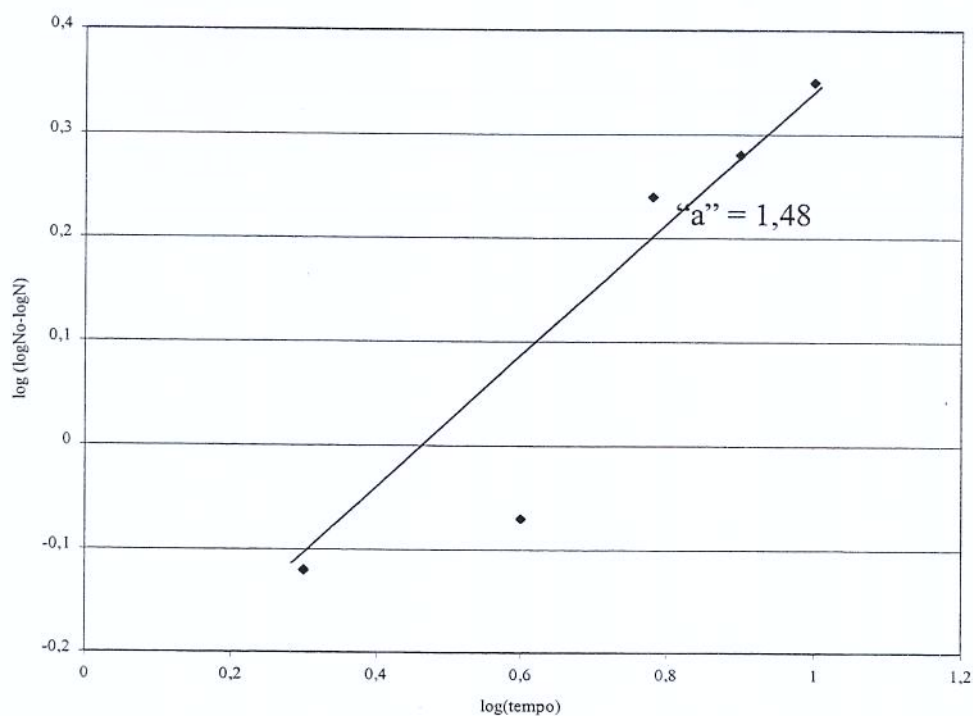


Figura 11. Determinação do valor de "a" para ascospores de *N. fischeri* com 4 meses de idade a 90°C

O valor do parâmetro “a” para os ascospores de *N. fischeri* com 4 meses foi de 1,48 com $R^2 = 0,9915$.

O valor de D_{90} (minutos) encontrado no presente trabalho para o *N. fischeri* (4 meses de idade) foi de 3,11 minutos em água destilada (tabela 24) utilizando-se Alderton & Snell (1970), sendo que, encontrando-se o valor de D pela reta da regressão dos valores este foi de 4,5 minutos com R^2 de 0,9531, sendo encontrado por Tournas & Traxler (1994) para *N. fischeri* com 3 meses de idade um $D_{90^\circ\text{C}}$ de 4,7 minutos em água destilada e 7,6 minutos em suco de abacaxi concentrado (pH = 3,4 e 42,7° Brix). Beuchat (1986) testou 3 linhagens de *N. fischeri* com 2 meses de idade a 91°C em 5 tipos de geléias de frutas e os valores de D (min) encontrados para todos os casos foi menor que 2,0 minutos. Baglioni (1998) encontrou para *N. fischeri* com 3 meses de idade em polpa de tomate (8°Brix) um $D_{90^\circ\text{C}}$ de 10,2 minutos e Rajashekhara et al

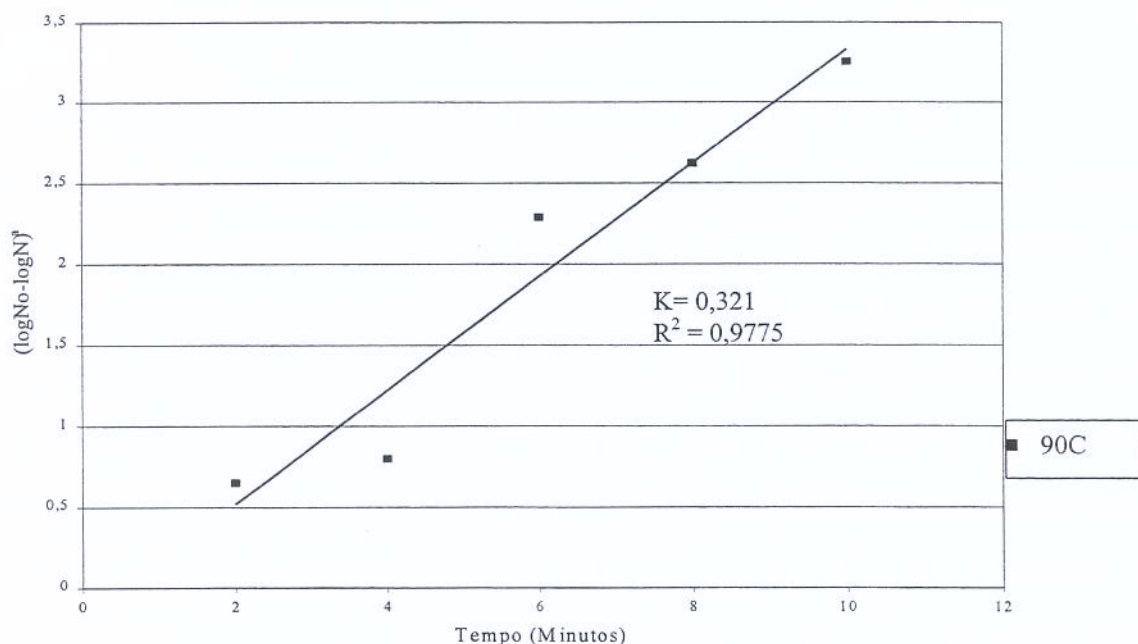


Figura 12. Curva de linearização da inativação térmica de *N. fischeri* em água destilada a 90°C para ascospores com 4 meses de idade

(1996) encontraram um $D_{89^{\circ}\text{C}}$ de 3,90 minutos em tampão fosfato para *N. fischeri* com 1 mês de idade, valor coerente ao estabelecido nesta pesquisa. Gumerato (1995) encontrou um $D_{90^{\circ}\text{C}}$ de 2,63 minutos para *N. fischeri* com 1 mês de idade em suco de maçã (15,5 Brix e pH=3,0).

Tabela 24. Valores de resistência térmica para ascosporos de *N. fischeri* com 4 meses de idade a 90°C

Temperatura	K (min.^{-1})	C	R^2	l/k (min)
90°C	0,321	0,116	0,9775	3,11

As diferenças de valores de resistência térmica podem estar relacionadas à linhagem utilizada, método de produção de esporos, método para determinar a resistência térmica, e / ou o produto no qual os esporos foram aquecidos, porém, o valor de $D_{90^{\circ}\text{C}}$ para *N. fischeri* (4 meses) está próximo dos valores citados na literatura.

Como o bolor *Paecilomyces variotii* apresentou também uma morte térmica não logarítmica foi também utilizado método de linearização de Alderton & Snell (1970). A figura 13 mostra a curva de inativação térmica, na figura 14 pode ser visto a curva de determinação do valor “a” e na figura 15 foi construída a curva de linearização da inativação térmica. Na tabela 25 são mostrados o número de sobreviventes (UFC/ml) após cada tempo de aquecimento a 85°C . Na tabela 26 está o valor de $D_{85^{\circ}\text{C}}$ de 3,44 minutos para o *P. variotii*, que pode ser considerado alto, já que a maioria dos fungos possui uma baixa resistência térmica.

Tabela 25– Contagem do número de sobreviventes com o tempo de aquecimento, de ascosporos de *Paecilomyces variotii*; em água destilada, com 4 meses de idade a 85°C, média de dois experimentos.

Tempo de aquecimento (minutos)	Número de sobreviventes (UFC/ml)
0	$1,0 \times 10^4$
2	$2,5 \times 10^3$
4	$1,1 \times 10^3$
6	$1,0 \times 10^3$
8	$1,0 \times 10^2$
10	$2,0 \times 10^1$

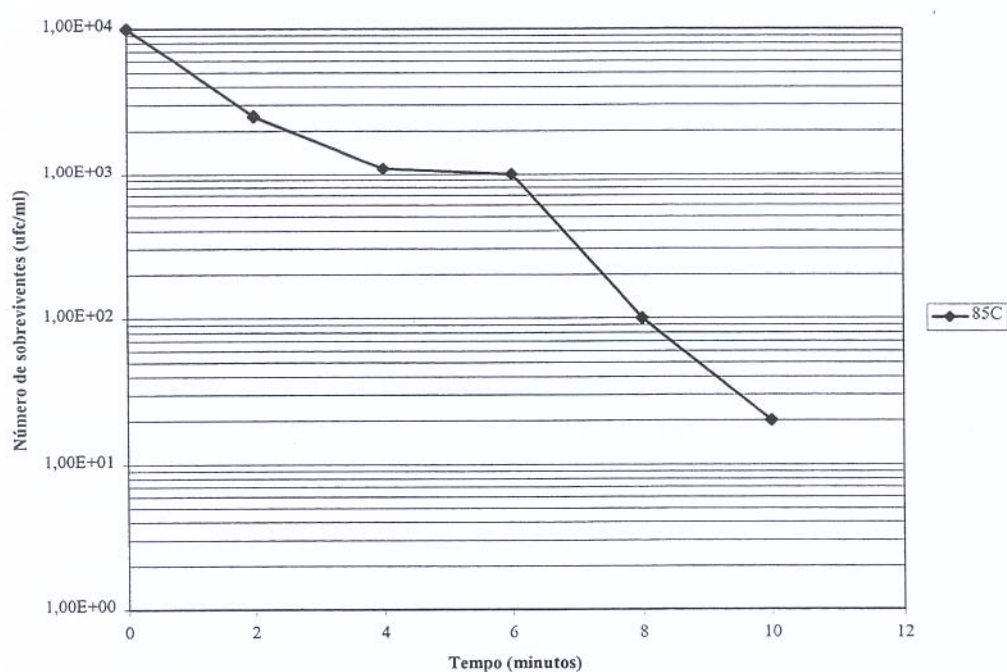


Figura 13. Curva de inativação térmica para conídios de *Paecilomyces variotii* (4 meses) em água destilada a 85°C

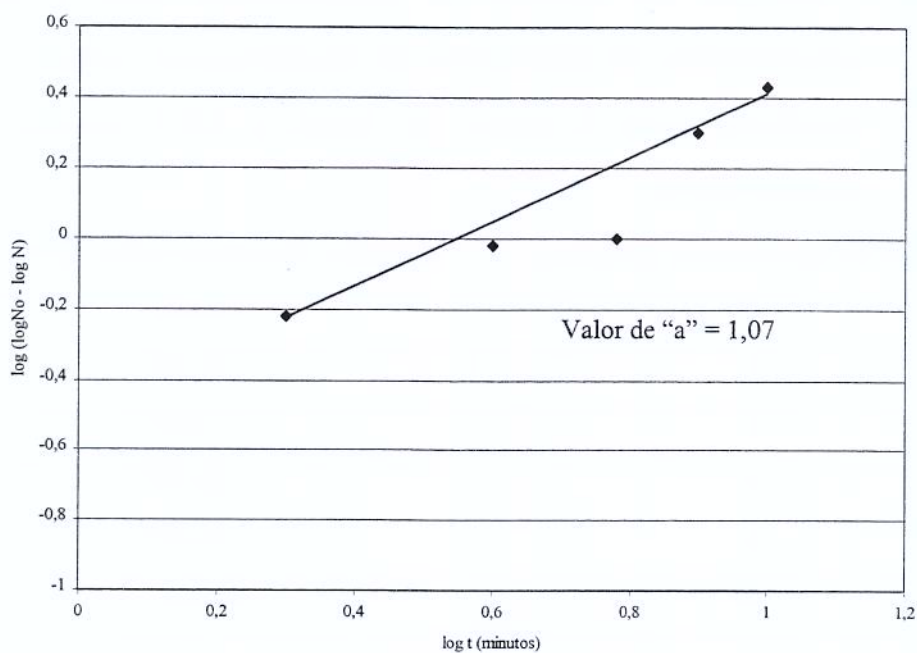


Figura 14. Determinação do valor de "a" para conídios de *Paecilomyces variotii* com 4 meses de idade

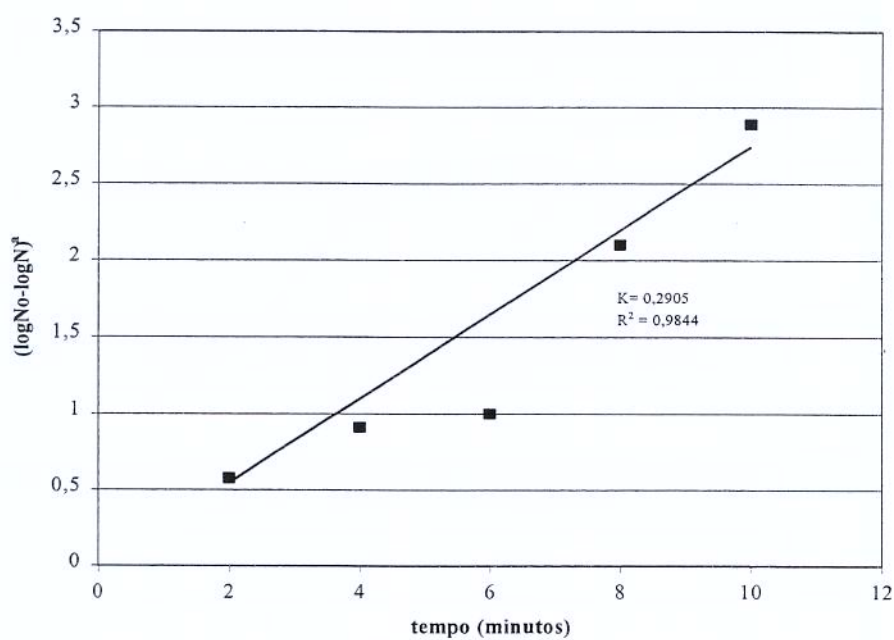


Figura 15. Curva de linearização da inativação térmica de conídios de *Paecilomyces variotii* com 4 meses de idade

Tabela 26. Valores de resistência térmica para conídios de *Paecilomyces variotii* com 4 meses de idade a 85°C

Temperatura	K (min. ⁻¹)	C	R ²	l/k (min)
85°C	0,2905	-0,123	0,9844	3,44

Foi encontrada a resistência térmica a 85°C para o bolor *Paecilomyces variotii*, pois quando este foi submetido à temperatura de 90°C por 1 minuto não houve recuperação de sobreviventes, provavelmente o D para esse microrganismo a 90°C seja menor que 1 minuto.

O fungo *N. fischeri* com 4 meses de idade foi submetido à temperatura de 70°C, porém, nessa temperatura ele se mostrou altamente resistente, sendo que após 24 horas de aquecimento observou-se apenas uma ligeira queda na população. A resistência térmica a 70°C foi realizada apenas para que se pudesse visualizar a inativação desse bolor quando submetido somente à ação da temperatura e comparar sua resistência quando o fungo foi tratado com uma solução de H₂O₂ a 70°C. É conhecido pela literatura que 70°C funciona como uma temperatura de ativação e não de morte para esse bolor. O valor D (segundos) para o *N. fischeri* (4 meses) exposto a tratamento combinado de peróxido de hidrogênio 35% e 70°C foi de apenas 11,36 segundos (Figura 29), com isso foi demonstrado que a resistência do microrganismo diminui muito com a exposição ao peróxido, principalmente devido à formação de radicais (OH[•]), reação que é catalisada pela temperatura.

4.10. Ensaio com 35%, 40% e 45% de peróxido de hidrogênio nas temperaturas de 40, 60 e 75°C para *Paecilomyces variotii* e *Neosartorya fischeri* com 1 e 4 meses de idade =Segunda Fase

As contagens dos sobreviventes foram realizadas sempre após a inativação do peróxido em solução de catalase.

Para os dados obtidos, foram calculados os valores de D (segundos), considerando apenas a parte linear das curvas obtidas, o valor Z (°C) e as reduções de ciclos logarítmicos foram calculados utilizando – se a população inicial (N_0) e a população após o tratamento. Foram realizadas as análises estatísticas dos dados e estas foram inseridas juntamente com a análise dos dados observados e serviram para corroborar tendências já observadas.

Nas tabelas 27 a 38 são apresentadas as reduções de ciclos logarítmicos após cada tratamento com peróxido, para os dois bolores estudados, sendo possível a visualização do efeito deste agente sobre esses microrganismos.

Tabela 27. Redução decimais (γ) para o tratamento de esporos de *Paecilomyces variotii* (4 meses) com 35 % de peróxido de hidrogênio em diferentes tempos de contato e temperaturas

Temperatura (°C)	Tempo de contato (segundos)	Sobreviventes N (UFC/ml)	$\gamma = -\log N/N_0$
40	0	$3,75 \times 10^6$	
	2	$7,0 \times 10^5$	0,73
	4	$6,0 \times 10^5$	0,79
	6*	$6,5 \times 10^5$	0,76
	8	$6,0 \times 10^5$	0,79
	10	$4,5 \times 10^5$	0,92
60	0	$1,5 \times 10^6$	
	2	$6,0 \times 10^5$	0,40
	4	$4,75 \times 10^5$	0,50
	6*	$3,0 \times 10^5$	0,70
	8	$1,3 \times 10^5$	1,06
	10	$3,00 \times 10^4$	1,70
70	0	$2,0 \times 10^6$	
	2	$3,75 \times 10^5$	0,73
	4	$6,0 \times 10^4$	1,52
	6*	$2,0 \times 10^4$	2,00
	8	$4,15 \times 10^3$	2,68
	10	$1,5 \times 10^3$	3,12
75	0	$1,5 \times 10^6$	
	2	$2,25 \times 10^5$	0,82
	4	$2,5 \times 10^4$	1,78
	6*	$3,75 \times 10^3$	2,60
	8	$1,75 \times 10^3$	2,93
	10	$1,00 \times 10^3$	3,18

* = Tempo de contato utilizado na indústria

Tabela 28. Redução decimais (γ) para o tratamento de esporos de *Paecilomyces variotii* (4 meses) com 40 % de peróxido de hidrogênio em diferentes tempos de contato e temperaturas

Temperatura (°C)	Tempo de contato (segundos)	Sobreviventes N (UFC/ml)	$\gamma = -\log N/N_0$
40	0	$2,75 \times 10^6$	
	2	$3,3 \times 10^5$	0,92
	4	$2,75 \times 10^5$	1,00
	6*	$2,25 \times 10^5$	1,09
	8	$2,0 \times 10^5$	1,14
	10	$4,1 \times 10^4$	1,83
60	0	$3,7 \times 10^6$	
	2	$2,3 \times 10^5$	1,21
	4	$2,0 \times 10^4$	2,27
	6*	$1,5 \times 10^4$	2,39
	8	$3,5 \times 10^3$	3,02
	10	$7,5 \times 10^2$	3,69
70	0	$1,25 \times 10^6$	
	2	$5,0 \times 10^4$	1,40
	4	$1,25 \times 10^4$	2,0
	6*	$1,0 \times 10^3$	3,09
	8	<1	>3,09
	10	<1	>3,09

* = Tempo de contato utilizado na indústria

Tabela 29. Redução decimais (γ) para o tratamento de esporos de *Paecilomyces variotii* (4 meses) com 45 % de peróxido de hidrogênio em diferentes tempos de contato e temperaturas

Temperatura (°C)	Tempo de contato (segundos)	Sobreviventes N (UFC/ml)	$\gamma = -\log N/N_0$
40	0	$2,15 \times 10^6$	
	2	$6,25 \times 10^5$	0,54
	4	$2,45 \times 10^5$	0,94
	6*	$1,5 \times 10^5$	1,16
	8	$1,47 \times 10^5$	1,16
	10	$2,0 \times 10^4$	2,03
60	0	$1,7 \times 10^6$	
	2	$2,8 \times 10^4$	1,78
	4	$2,5 \times 10^3$	2,83
	6*	$7,5 \times 10^2$	3,35
	8	<1	>3,35
	10	<1	>3,35
70	0	$2,45 \times 10^6$	
	2	$1,0 \times 10^4$	2,40
	4	<1	>2,40
	6*	<1	>2,40
	8	<1	>2,40
	10	<1	>2,40

* = Tempo de contato utilizado na indústria

Tabela 30. Redução decimais (γ) para o tratamento de esporos de *Neosartorya fischeri* (4 meses) com 35% de peróxido de hidrogênio em diferentes tempos de contato e temperaturas

Temperatura (°C)	Tempo de contato (segundos)	Sobreviventes N (UFC/ml)	$\gamma = -\log N/N_0$
40	0	$3,0 \times 10^6$	
	2	$1,25 \times 10^5$	1,38
	4	$4,50 \times 10^4$	1,82
	6*	$3,50 \times 10^4$	1,93
	8	$3,25 \times 10^4$	1,96
	10	$2,4 \times 10^4$	2,10
60	0	$3,50 \times 10^6$	
	2	$4,75 \times 10^4$	1,87
	4	$3,00 \times 10^4$	2,07
	6*	$2,0 \times 10^4$	2,24
	8	$1,75 \times 10^4$	2,30
	10	$1,25 \times 10^4$	2,45
70	0	$2,5 \times 10^6$	
	2	$2,5 \times 10^4$	2,00
	4	$1,25 \times 10^4$	2,30
	6*	$1,0 \times 10^4$	2,40
	8	$7,25 \times 10^3$	2,54
	10	$6,75 \times 10^3$	2,57
75	0	$2,0 \times 10^6$	
	2	$2,0 \times 10^4$	2,0
	4	$1,0 \times 10^4$	2,30
	6*	$7,0 \times 10^3$	2,45
	8	$3,5 \times 10^3$	2,76
	10	$3,5 \times 10^3$	2,76

* = Tempo de contato utilizado na indústria

Tabela 31. Redução decimais (γ) para o tratamento de esporos de *Neosartorya fischeri* (4 meses) com 40 % de peróxido de hidrogênio em diferentes tempos de contato e temperaturas

Temperatura (°C)	Tempo de contato (segundos)	Sobreviventes N (UFC/ml)	$\gamma = -\log N/N_0$
40	0	$4,5 \times 10^6$	
	2	$2,25 \times 10^5$	1,30
	4	$2,0 \times 10^5$	1,35
	6*	$5,5 \times 10^4$	1,91
	8	$4,75 \times 10^4$	1,98
	10	$3,0 \times 10^4$	2,18
60	0	$4,5 \times 10^6$	
	2	$2,0 \times 10^5$	1,35
	4	$1,5 \times 10^5$	1,48
	6*	$2,5 \times 10^4$	2,25
	8	$2,0 \times 10^4$	2,35
	10	$1,5 \times 10^3$	3,48
70	0	$2,82 \times 10^6$	
	2	$1,8 \times 10^5$	1,19
	4	$1,65 \times 10^5$	1,23
	6*	$1,90 \times 10^4$	2,14
	8	$5,5 \times 10^3$	2,71
	10	$2,0 \times 10^2$	4,15
75	0	$2,5 \times 10^6$	
	2	$1,0 \times 10^5$	1,39
	4	$2,0 \times 10^4$	2,10
	6*	$3,5 \times 10^3$	2,85
	8	$8,0 \times 10^2$	3,49
	10	$1,0 \times 10^2$	4,40

* = Tempo de contato utilizado na indústria

Tabela 32. Redução decimais (γ) para o tratamento com esporos de *Neosartorya fischeri* (4 meses) com 45% de peróxido de hidrogênio em diferentes tempos de contato e temperaturas

Temperatura (°C)	Tempo de contato (segundos)	Sobreviventes N (UFC/ml)	$\gamma = -\log N/N_0$
40	0	$4,0 \times 10^6$	
	2	$9,5 \times 10^5$	0,62
	4	$3,0 \times 10^5$	1,12
	6*	$1,0 \times 10^5$	1,60
	8	$3,1 \times 10^4$	2,11
	10	$1,0 \times 10^4$	2,60
60	0	$4,50 \times 10^6$	
	2	$3,5 \times 10^5$	1,11
	4	$8,9 \times 10^4$	1,70
	6*	$2,5 \times 10^3$	3,25
	8	$3,0 \times 10^3$	3,18
	10	<1	>3,18
70	0	$6,5 \times 10^6$	
	2	$6,5 \times 10^5$	1,0
	4	$5,0 \times 10^4$	2,11
	6*	$3,5 \times 10^3$	3,27
	8	$1,0 \times 10^3$	3,81
	10	<1	>3,81

* = Tempo de contato utilizado na indústria

Tabela 33.Redução decimais (γ) para o tratamento de esporos de *Paecilomyces variotii* (1 mês) com 35 % de peróxido de hidrogênio em diferentes tempos de contato e temperaturas

Temperatura (°C)	Tempo de contato (segundos)	Sobreviventes N (UFC/ml)	$\gamma = -\log N/N_0$
40	0	$5,25 \times 10^6$	
	2	$2,2 \times 10^5$	1,38
	4	$4,0 \times 10^4$	2,12
	6*	$2,5 \times 10^4$	2,32
	8	$2,0 \times 10^4$	2,42
	10	$3,5 \times 10^3$	3,18
60	0	$8,5 \times 10^6$	
	2	$1,95 \times 10^5$	1,64
	4	$4,0 \times 10^3$	3,33
	6*	$1,0 \times 10^2$	4,93
	8	$1,0 \times 10^2$	4,93
	10	<1	>4,93
70	0	$3,5 \times 10^6$	
	2	$1,7 \times 10^3$	3,31
	4	$1,0 \times 10^2$	4,54
	6*	<1	>4,54
	8	<1	>4,54
	10	<1	>4,54

* = Tempo de contato utilizado na indústria

Tabela 34. Redução decimais (γ) para o tratamento de esporos de *Paecilomyces variotii* (1 mês) com 40 % de peróxido de hidrogênio em diferentes tempos de contato e temperaturas

Temperatura (°C)	Tempo de contato (segundos)	Sobreviventes N (UFC/ml)	$\gamma = -\log N/N_0$
40	0	$5,75 \times 10^6$	
	2	$1,3 \times 10^5$	1,64
	4	$6,25 \times 10^4$	1,96
	6*	$2,75 \times 10^4$	2,32
	8	$1,4 \times 10^4$	2,61
	10	$5,50 \times 10^3$	3,02
60	0	$3,5 \times 10^6$	
	2	$6,0 \times 10^4$	1,77
	4	$4,0 \times 10^3$	2,94
	6*	$8,0 \times 10^2$	3,64
	8	<1	>3,64
	10	<1	>3,64
70	0	$1,70 \times 10^6$	
	2	<1	>4,0
	4	<1	>4,0
	6*	<1	>4,0
	8	<1	>4,0
	10	<1	>4,0

* = Tempo de contato utilizado na indústria

Tabela 35. Redução decimais (γ) para o tratamento de esporos de *Paecilomyces variotii* (1 mês) com 45 % de peróxido de hidrogênio em diferentes tempos de contato e temperaturas

Temperatura (°C)	Tempo de contato (segundos)	Sobreviventes N (UFC/ml)	$\gamma = -\log N/N_0$
40	0	$2,0 \times 10^6$	
	2	$1,5 \times 10^4$	2,12
	4	$5,5 \times 10^3$	2,56
	6*	$1,7 \times 10^3$	3,07
	8	$7,5 \times 10^2$	3,42
	10	$2,5 \times 10^2$	3,90
60	0	$3,5 \times 10^6$	
	2	$5,5 \times 10^3$	2,80
	4	$5,5 \times 10^2$	3,80
	6*	<1	>3,80
	8	<1	>3,80
	10	<1	>3,80
70	0	$4,5 \times 10^6$	
	2	<1	>4,0
	4	<1	>4,0
	6*	<1	>4,0
	8	<1	>4,0
	10	<1	>4,0

* = Tempo de contato utilizado na indústria

Tabela 36. Redução decimais (γ) para o tratamento de esporos de *Neosartorya fischeri* (1 mês) com 35 % de peróxido de hidrogênio em diferentes tempos de contato e temperaturas

Temperatura (°C)	Tempo de contato (segundos)	Sobreviventes N (UFC/ml)	$\gamma = -\log N/N_0$
40	0	$4,0 \times 10^6$	
	2	$2,0 \times 10^5$	1,30
	4	$1,70 \times 10^5$	1,37
	6*	$4,5 \times 10^4$	1,95
	8	$4,0 \times 10^4$	2,00
	10	$3,2 \times 10^4$	2,10
60	0	$4,5 \times 10^6$	
	2	$1,75 \times 10^5$	1,41
	4	$5,0 \times 10^4$	1,95
	6*	$2,5 \times 10^4$	2,25
	8	$2,0 \times 10^4$	2,35
	10	$2,0 \times 10^4$	2,35
70	0	$3,75 \times 10^6$	
	2	$1,75 \times 10^5$	1,33
	4	$2,25 \times 10^4$	2,22
	6*	$1,5 \times 10^4$	2,40
	8	$1,0 \times 10^4$	2,57
	10	$8,25 \times 10^3$	2,66
75	0	$4,0 \times 10^6$	
	2	$1,0 \times 10^5$	1,60
	4	$1,5 \times 10^4$	2,42
	6	$6,0 \times 10^3$	2,82
	8	$2,0 \times 10^3$	3,30
	10	$2,0 \times 10^3$	3,30

* = Tempo de contato utilizado na indústria

Tabela37. Redução decimais (γ) para o tratamento de esporos de *Neosartorya fischeri* (1 mês) com 40% de peróxido de hidrogênio em diferentes tempos de contato e temperaturas

Temperatura (°C)	Tempo de contato (segundos)	Sobreviventes N (UFC/ml)	$\gamma = -\log N/N_0$
40	0	$2,75 \times 10^6$	
	2	$1,75 \times 10^5$	1,20
	4	$5,0 \times 10^4$	1,74
	6*	$2,8 \times 10^4$	1,99
	8	$1,0 \times 10^4$	2,44
	10	$6,0 \times 10^3$	2,66
60	0	$3,95 \times 10^6$	
	2	$1,25 \times 10^5$	1,50
	4	$2,65 \times 10^4$	2,17
	6*	$8,0 \times 10^3$	2,69
	8	$4,05 \times 10^3$	2,99
	10	$3,0 \times 10^3$	3,12
70	0	$4,75 \times 10^6$	
	2	$1,0 \times 10^5$	1,68
	4	$1,62 \times 10^4$	2,47
	6*	$3,0 \times 10^3$	3,20
	8	$1,3 \times 10^3$	3,56
	10	$6,0 \times 10^2$	3,90

* = Tempo de contato utilizado na indústria

Tabela 38. Redução de ciclos logarítmicos (γ) para o tratamento de esporos de *Neosartorya fischeri* (1 mês) com 45% de peróxido de hidrogênio em diferentes tempos de contato e temperaturas

Temperatura (°C)	Tempo de contato (segundos)	Sobreviventes N (UFC/ml)	$\gamma = -\log N/N_0$
40	0	$6,5 \times 10^6$	
	2	$6,0 \times 10^5$	1,03
	4	$5,5 \times 10^5$	1,07
	6*	$2,0 \times 10^5$	1,51
	8	$8,0 \times 10^4$	1,91
	10	$3,5 \times 10^4$	2,27
60	0	$6,5 \times 10^6$	
	2	$2,9 \times 10^5$	1,35
	4	$2,65 \times 10^5$	1,39
	6*	$1,3 \times 10^5$	1,70
	8	$2,0 \times 10^4$	2,51
	10	$4,0 \times 10^3$	3,21
70	0	$4,5 \times 10^6$	
	2	$1,47 \times 10^5$	1,48
	4	$1,1 \times 10^5$	1,61
	6*	$2,0 \times 10^4$	2,35
	8	$2,0 \times 10^3$	3,35
	10	<1	>3,35

* = Tempo de contato e temperatura utilizados na indústria

Para o bolor *Paecilomyces variotii* com 1 mês de idade ensaiado com a concentração de 35 % de peróxido a 70°C e 4 segundos de contato foram obtidas 4,54 reduções de ciclos logarítmicos (tabela 33) com D de 1,62 segundos (Figura 31). O tratamento com peróxido a 35% mostrou-se eficiente para esse bolor com essa idade e nas condições descritas. Para o tempo de contato de 6 segundos a 70°C, que é o utilizado pela indústria, houve mais que 4,54 ciclos logarítmicos de redução, sendo este tempo de contato suficiente para a eliminação deste bolor a 70°C. Levando-se em consideração que a contaminação do laminado por esse bolor é de 1UFC/100cm² e nos testes realizados em laboratório foram obtidas mais que 4 reduções decimais para esses parâmetros, o tratamento industrial pode ser considerado eficiente para a eliminação principalmente dos esporos jovens (1 mês de idade) desse bolor, que foi isolado no material de embalagem.

Com os resultados obtidos na tabela 27 foi possível observar que o bolor *P. variotii* com 4 meses de idade foi mais resistente do que o *P. variotii* com 1 mês de idade. Para o bolor mais jovem houve 4,54 ciclos logarítmicos de redução com 4 segundos de contato na temperatura de 70°C e 35% de peróxido de hidrogênio (tabela 33) e para o mais velho nessa mesma temperatura, tempo de contato e concentração de peróxido foram obtidos apenas 1,52 ciclos logarítmicos de redução e com 6 segundos de contato obteve-se apenas 2 ciclos de redução (tabela 27). Com o aumento do tempo de contato para 10 segundos, foram obtidas 3,12 reduções de ciclos logarítmicos.

Devido à resistência do *P. variotii* na concentração de 35% de peróxido de hidrogênio a 70°C foi ensaiada a temperatura de 75°C, sendo que com 6 e 10 segundos de contato foram obtidas, respectivamente, 2,60 e 3,18

reduções logarítmicas (tabela 27).

Como pode ser observado na tabela 39, com a concentração de 40% de peróxido de hidrogênio e 10 segundos de contato a 70°C, foi possível a obtenção de mais que 4 reduções decimais para o *P. variotii* com 1 mês de idade e mais que 3 reduções decimais para o mesmo bolor com 4 meses de idade, sendo este bolor isolado do laminado, e esta seria uma alternativa, principalmente em casos onde se tem uma população inicial mais alta (maior que 10^3 esporos/100cm²), porém, este aumento no tempo de contato tem a limitação de causar uma redução na velocidade de produção da máquina TBA, já que o padrão são 6 segundos de contato. No presente trabalho, o tempo de contato de 6 segundos foi suficiente, já que a população inicial isolada do laminado foi baixa, (menor que 10^2 esporos/100cm²) sendo esta a situação mais comum. O *N. fischeri* foi mais resistente ao tratamento com 40% de H₂O₂ e como pode ser observado com 6 segundos não foram obtidos 4 ciclos de redução logarítmica, tendo isso ocorrido com 10 segundos de contato.

Para contaminações menores que 10^2 esporos/ml o tratamento com uma solução 35% de peróxido de hidrogênio, 6 segundos de contato a 70°C foi suficiente para a diminuição de no mínimo dois ciclos logarítmicos para os dois bolors estudados.

Tabela39. Comparação da redução de ciclos logarítmicos para o *P. variotii* e *N. fischeri* expostos a 40% de peróxido de hidrogênio a 70°C nos tempos de 6 e 10 segundos.

Fungo/ idade	Tempos de contato (segundos)	Redução de ciclos logarítmicos (γ)
<i>Paecilomyces variotii</i> (1 mês)	6	> 4,0
	10	>4,0
<i>Paecilomyces variotii</i> (4 meses)	6	3,09
	10	>3,09
<i>Neosartorya fischeri</i> (1 mês)	6	3,2
	10	3,9
<i>Neosartorya fischeri</i> (4 meses)	6	2,14
	10	4,15

4.10.1. Efeito do aumento da concentração de H_2O_2 nos valores de D

Em todas as curvas de sobreviventes apresentadas nesta pesquisa as linhas pontilhadas correspondem às curvas experimentais e as linhas cheias às retas de regressão obtidas utilizando o software Excel.

No presente trabalho, os valores de D diminuíram com o aumento nas concentrações de peróxido de hidrogênio, como o encontrado por Buchen & Marth (1977) para fungos e Swartling & Lindgreen (1968), Tsuchida & Tsuchido (1997) e Toledo et al.(1973) para bactérias. Cabe ressaltar que, neste caso, o valor D refere-se ao parâmetro de resistência ao tratamento termoquímico.

Os conídios de *Aspergillus parasiticus* (linhagens NRRL 2999 e NRRL 3315) e *Aspergillus flavus* NRRL3353 foram tratados por Buchen & Marth (1977) com 2, 4 e 6% de peróxido de hidrogênio nas temperaturas de 20, 30 e 40°C, sendo que, para todas as linhagens e temperaturas ensaiadas, houve uma grande diminuição no valor de D quando se aumentou a concentração de peróxido de 2 para 4%, exceto para a linhagem NRRL 3353 a 20°C que não apresentou diminuição no valor de D. Para a linhagem NRRL2999 os valores de D (minutos) com 2% de H₂O₂ e 20, 30 e 40°C foram, respectivamente, 39,5, 23,2 e 9,0 minutos e com 4% de peróxido foram a 20, 30 e 40°C de 18,3; 8,6 e 4,9, respectivamente. Quando a concentração foi elevada de 4 para 6% houve diminuição no valor de D, porém, com menos intensidade para as linhagens NRRL 2999 e NRRL 3315, porém, para a linhagem NRRL 3353 os valores de D diminuíram pela metade quando se aumentou a concentração de 4 para 6 % de peróxido.

As figuras 16 e 17 mostram a diminuição do valor de D para o *P.variotti* com 4 meses de idade quando a concentração de peróxido de hidrogênio ensaiada foi elevada de 40 para 45% (p/p). Conforme foi observado nas figuras 16 e 17 para o bolor *P.variotii* com 4 meses, o aumento da concentração de peróxido exerce influência significativa nos valores de D, o que pode ser observado também para o *P. variotii* com 1 mês de idade (figuras 33 e 34). Na figura 19, foi possível observar que, com o aumento da concentração de peróxido de hidrogênio, diminui a diferença da resistência entre as duas idades de *P.variotii*, com nível de significância de 95%, este fato é mais notório a 40°C. Para melhor visualização da figura 19 observar as distâncias entre as idades, sendo a idade de 4 meses representada por um quadrado e a de um mês por um círculo.

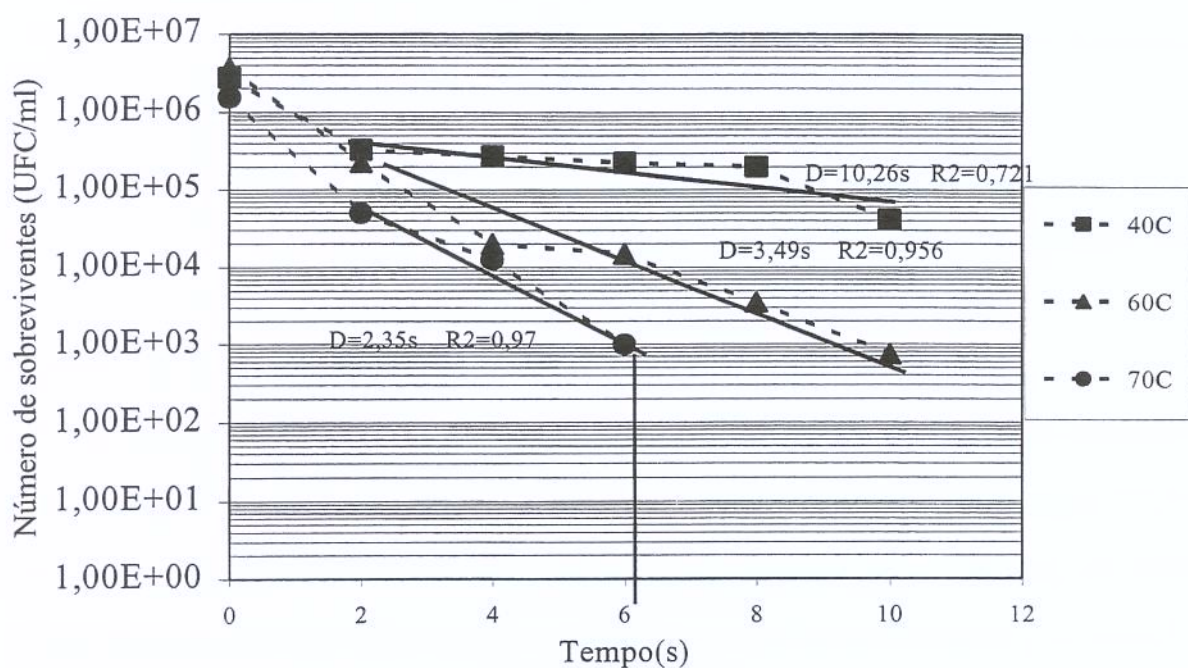


Figura 16. Curvas de sobreviventes para *Paecilomyces variotii* (4 meses) exposto a 40% de H_2O_2 a 40, 60 e 70°C

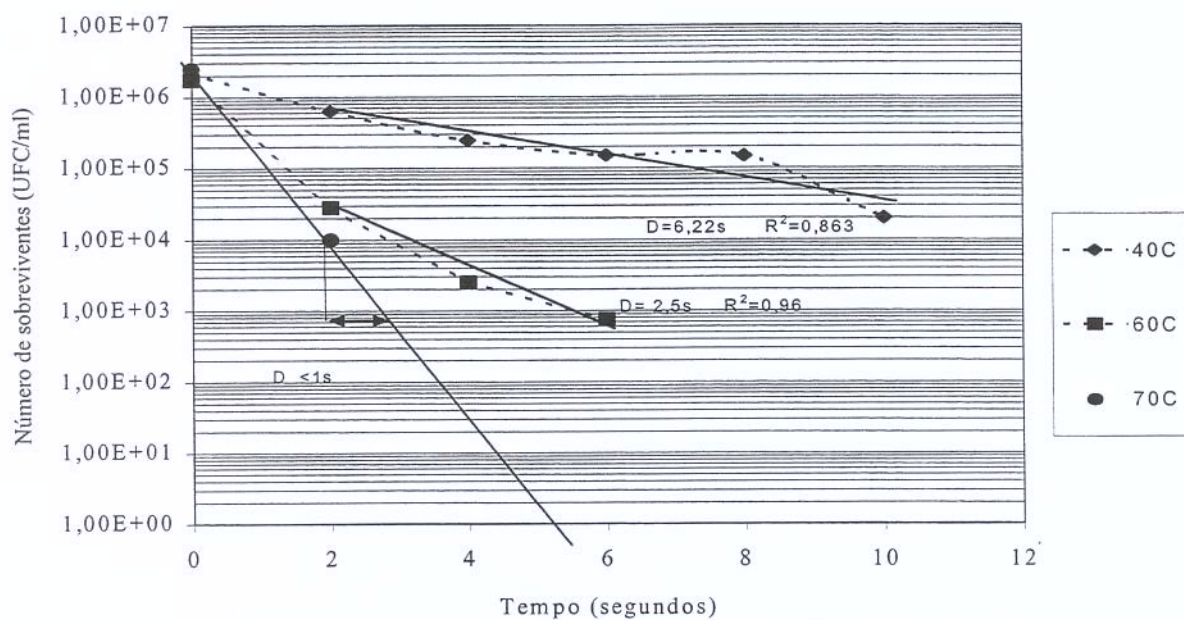


Figura 17. Curvas de sobreviventes para *Paecilomyces variotii* (4 meses) exposto a 45% de H_2O_2 a 40,60 e 70°C

Para o bolor *Paecilomyces variotii*, as interações entre idade *versus* peróxido e temperatura *versus* peróxido foram significativas a 95% (tabela 6 - apêndice 2)

A variável concentração de peróxido foi altamente significativa (95%) para *N. fischeri* ver ANOVA (tabela 3 - apêndice 2).

Conforme foi observado para o bolor *N. fischeri* (4 meses) ensaiado com 35 % de peróxido, os valores de $D_{40^{\circ}\text{C}}$ e $D_{60^{\circ}\text{C}}$ foram 23,5 e 14,35 segundos (Fig.18), respectivamente. Quando este bolor foi tratado com 40% de peróxido, os valores de $D_{40^{\circ}\text{C}}$ e $D_{60^{\circ}\text{C}}$ foram 8,42 e 3,90 segundos (Figura 21), respectivamente, ocorrendo uma grande diminuição no valor de D quando houve um aumento na concentração do agente esterilizante.

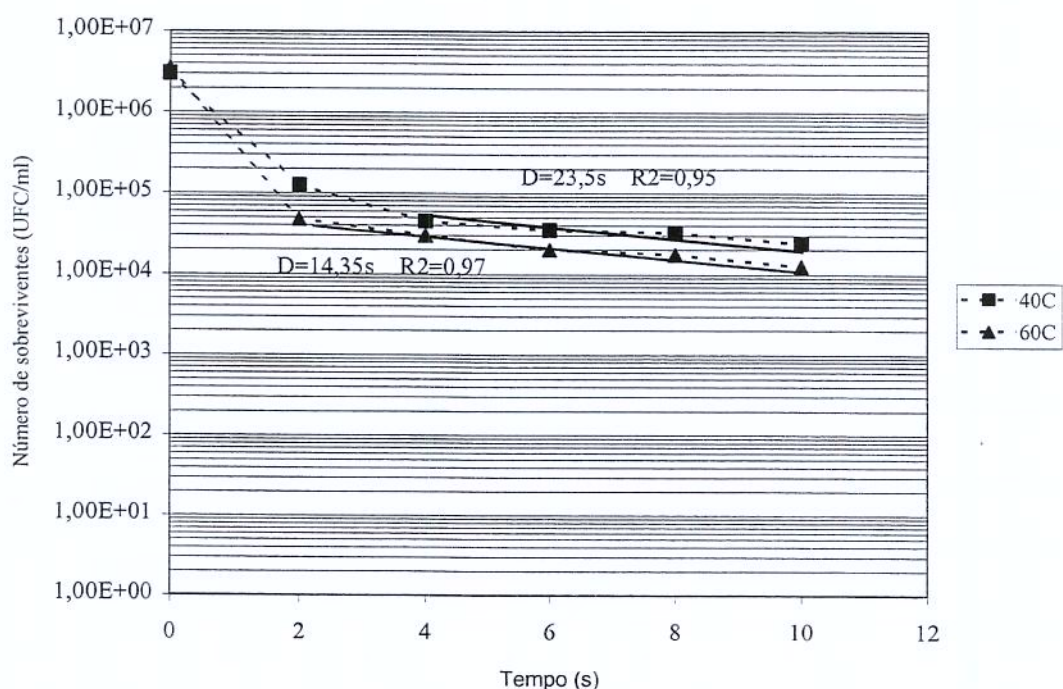


Figura 18. Curvas de sobreviventes de *Neosartorya fischeri* (4 meses) exposto a 35% de H_2O_2 a 40 e 60°C

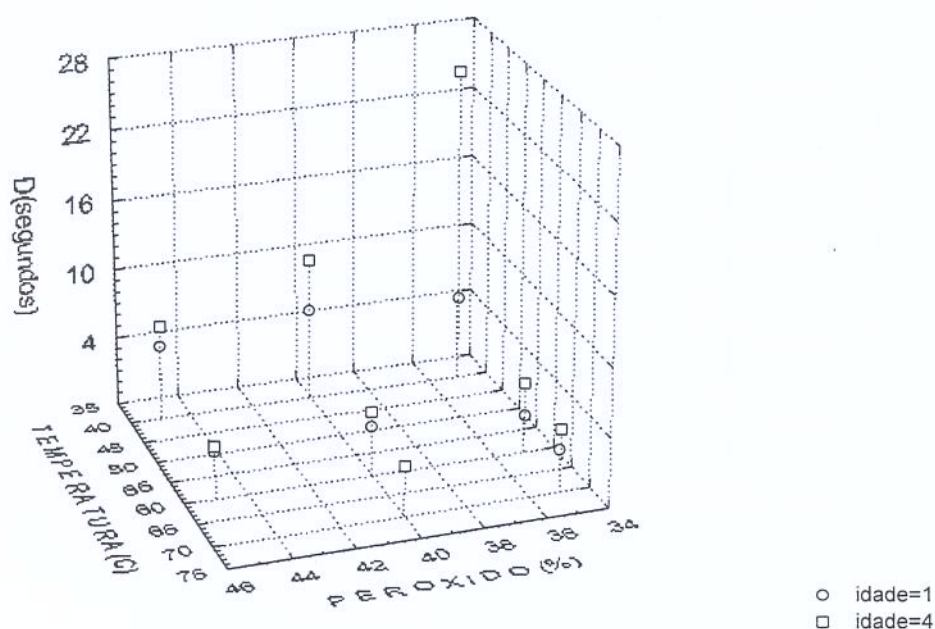


Figura 19. Gráfico tridimensional dos valores de D para *P. variotii* (1 e 4 meses) exposto a 35,40 e 45% de peróxido de hidrogênio nas temperaturas de 40, 60 e 70°C

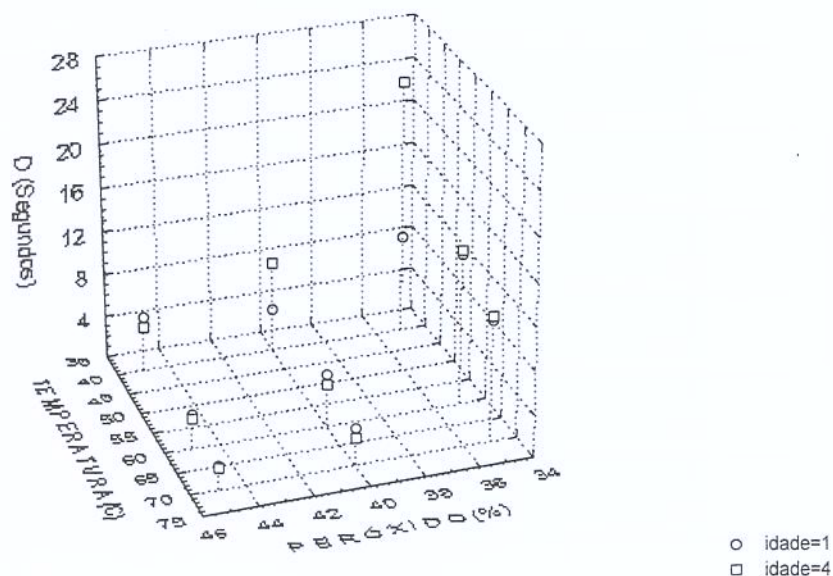


Figura20 . Gráfico tridimensional dos valores de D para *N. fischeri* (1 e 4 meses) exposto a 35,40 e 45% de peróxido de hidrogênio nas temperaturas de 40,60 e 70°C

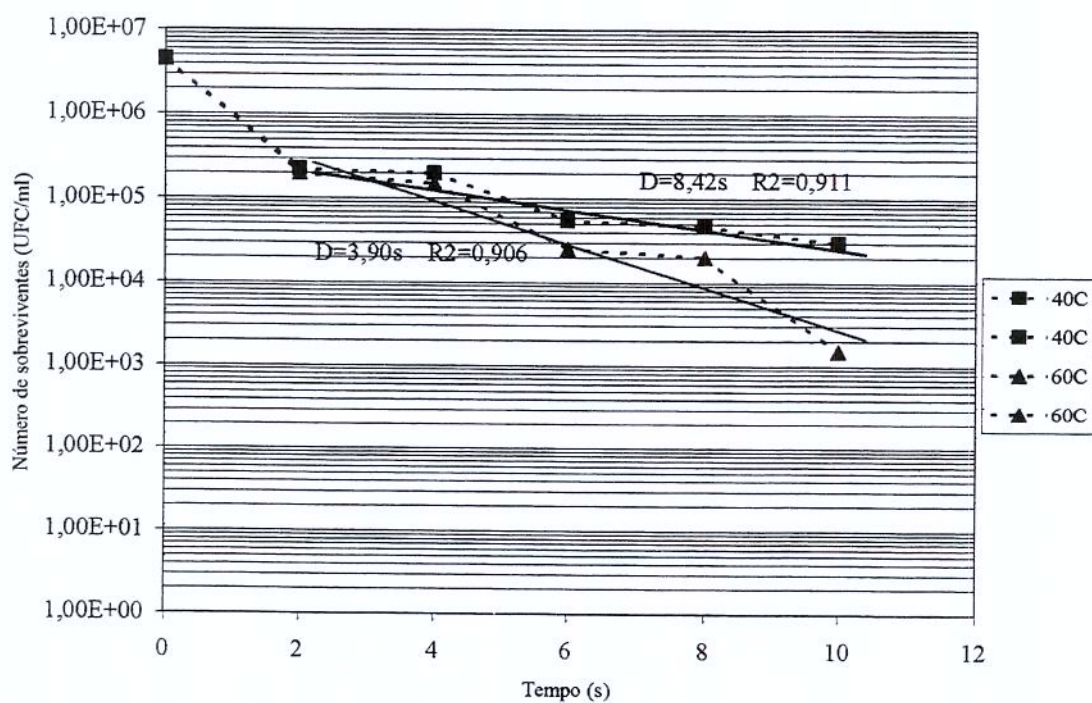


Figura 21. Curvas de sobreviventes de *Neosartorya fischeri* (4 meses) exposto a 40% de H_2O_2 a 40 e 60°C

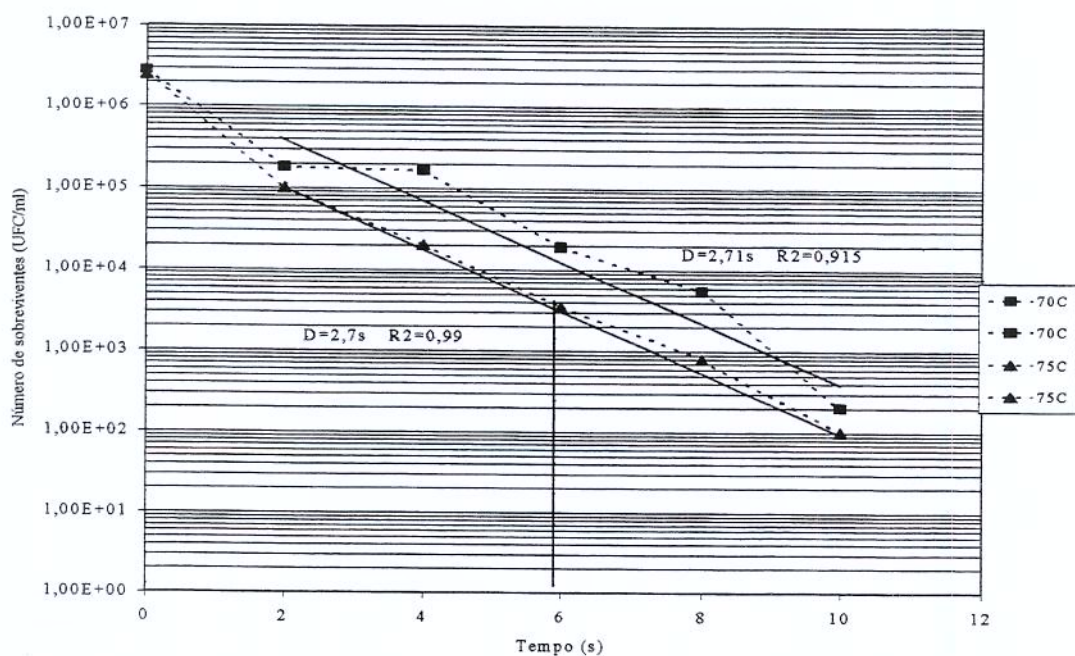


Figura 22. Curvas de sobreviventes de *Neosartorya fischeri* (4 meses) exposto a 40% de H_2O_2 a 70 e 75°C

Conforme eleva-se a concentração de peróxido para o *N. fischeri*, a diferença de comportamento em relação à temperatura diminui para ambas as idades (Figura 20 e figura 1 do Apêndice 2) com 95% de significância, o mesmo ocorrendo com os valores de D obtidos a partir dos dados observados para *N.fischeri* (1 e 4 meses) ensaiado com 45% de peróxido de hidrogênio, sendo que os valores são bem próximos para as duas idades nessa concentração (figuras 23 e 24) . Esta diferença de comportamento é devida a interação idade *versus* peróxido ser significativa a 95% (Tabela3- Apêndice2)

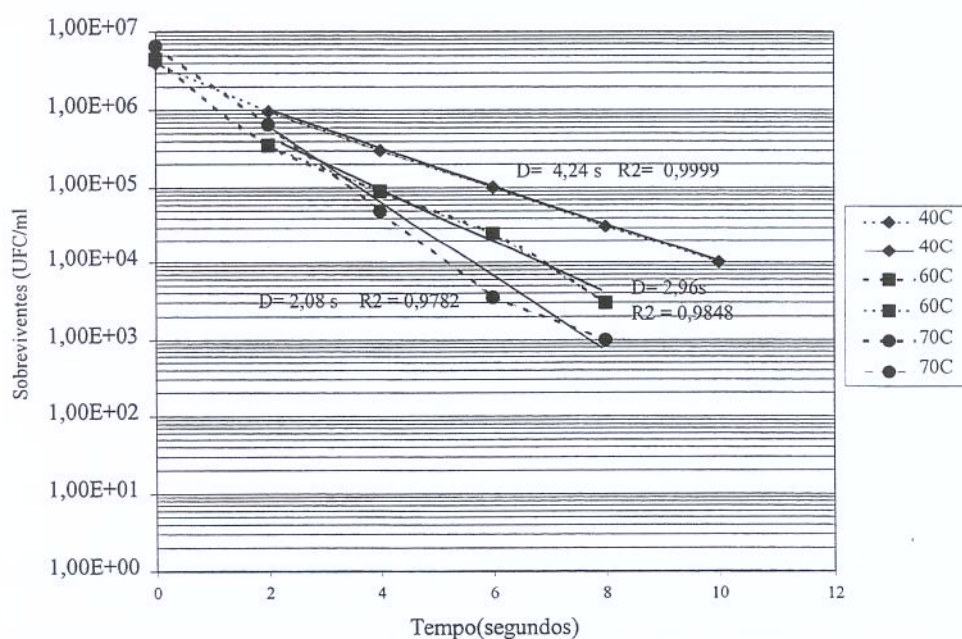


Figura 23. Curvas de sobreviventes de *Neosartorya fischeri* (4 meses) exposto a 45% de H_2O_2 a 40, 60 e 70°C

O bolor *N. fischeri* (1 e 4 meses) foi mais resistente à concentração de 45% de peróxido do que o *P. variotii*, apresentando 2,35 e

3,27 reduções logarítmicas, respectivamente, com 6 segundos de tratamento (tabela 33 e 38). A figura 24 mostra o bolor *N. fischeri* com 1 mês submetido a concentração de 45% de peróxido.

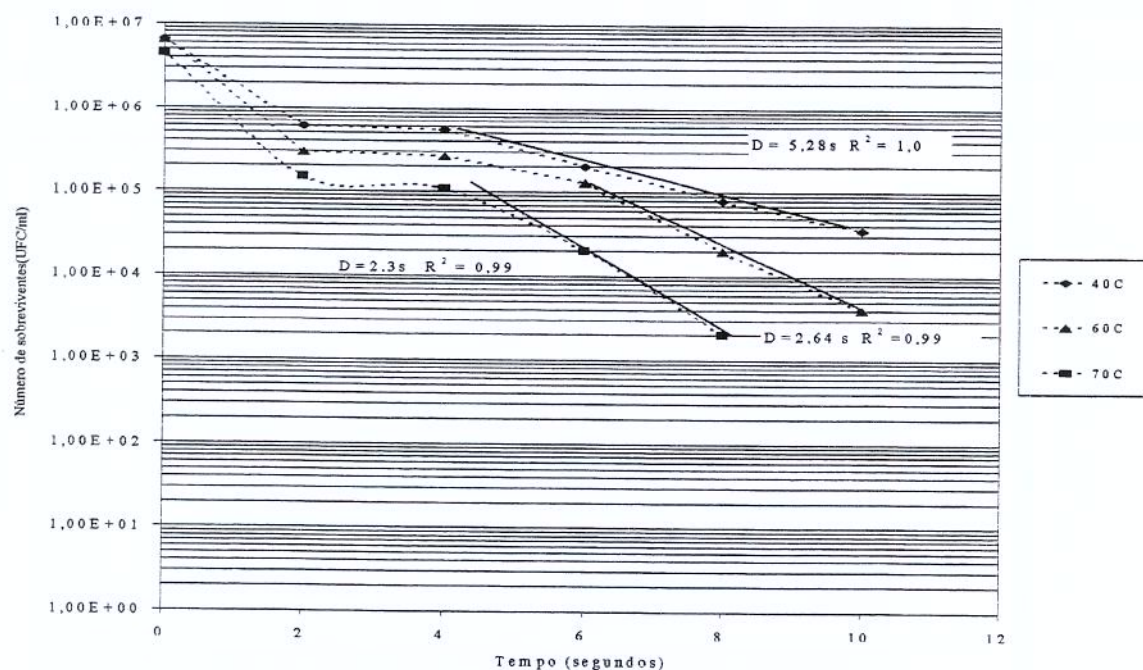


Figura 24. Curvas de sobreviventes para *N.fischeri* (1 mês) exposto a 45% de peróxido de hidrogênio nas temperaturas de 40,60 e 70°C

Na figura 25 observa-se a diferença entre valores de D das 3 concentrações de peróxido estudadas, sendo que essa diferença foi devido à concentração de peróxido e não à temperatura ou idade, pois é possível observar na tabela 3 (Anova) no apêndice 2 que a variável concentração de peróxido foi altamente significativa para esse bolor.

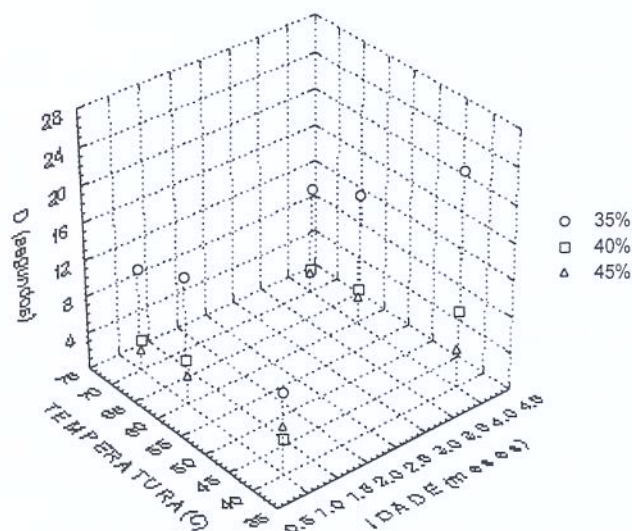


Figura 25. Gráfico tridimensional dos valores de D para *N. fischeri* (1 e 4 meses de idade) nas temperaturas de 40, 60 e 70°C e nas concentrações de 35,40 e 45%

A concentração de 45% de H_2O_2 foi bastante letal para os esporos de *P. variotii*, sendo que para os esporos com 1 mês quando expostos a essa concentração e à 70°C não foram recuperados sobreviventes, mesmo em tempos de contato muito pequenos, como 2 segundos (tabela 35). Para esporos com 4 meses, houve recuperação pelo método utilizado quando estes foram submetidos ao tempo de contato de 2 segundos, porém, com 4 segundos não foram encontrados sobreviventes.

A concentração de 45% dificilmente seria utilizada industrialmente, no caso de desinfecção de embalagens, principalmente pela liberação de vapores irritantes com o aquecimento e a dificuldade de eliminação total do agente com permanência de resíduos, muito prejudicial

para certos produtos, principalmente os ricos em vitamina C.

Ito et al. (1973) compararam a resistência de alguns microrganismos expostos a 35% de peróxido de hidrogênio e foi encontrado que o *Clostridium botulinum* 169B possuía um valor $D_{71,1^{\circ}\text{C}}$ de 5 segundos e $D_{87,8^{\circ}\text{C}}$ de 3 segundos, já para o *Bacillus stearothermophilus* 1518 o $D_{87,8^{\circ}\text{C}}$ foi de 14 segundos, sendo o segundo mais resistente ao tratamento com essa concentração de peróxido. Denny (1973)¹ citado por Toledo (1975) encontrou que o *Clostridium botulinum* 169B foi a mais resistente das linhagens, com $D_{88^{\circ}\text{C}}$ de 1,8 segundos, quando expostos a 35% de H_2O_2 .

Segundo Cerf & Hermier (1972) o índice de redução decimal (valor D) para *Bacillus cereus* quando submetido ao tratamento com 15% de H_2O_2 a 80°C e $\text{pH} = 2,0$ foi de 5 segundos e as curvas encontradas não eram logarítmicas, como as encontradas nesta pesquisa que mostraram um rápido decréscimo inicial predominando as curvas com concavidade para cima. Cerf e Hermier (1972) encontraram 4 tipos diferentes de curvas para o gênero *Bacillus* podendo ser uma reta, uma reta precedida de ombro, uma reta precedida por uma concavidade por mais de um ciclo de redução decimal, porém, a predominância foi de curvas côncavas para cima e algumas linhagens mostraram “tailing”.

Para melhorar a desinfecção poderia ser indicado o aumento da concentração de 35% (p/p) para 40% (p/p) no banho de peróxido, sendo que esta mudança é viável porque o residual verificado para essa concentração foi em média 0,385 ppm, abaixo do exigido pelo FDA.

¹ Denny, C. Personal communication. National canners Association., Washington D.C., 1973.

4.10.2. Efeito da idade dos esporos de bolores no valor de D

Como foi possível observar nas figuras 21 e 22, para o fungo *N. fischeri* com 4 meses de idade submetido ao tratamento com 40% (p/p) de peróxido de hidrogênio os valores de $D_{40^{\circ}\text{C}}$, $D_{60^{\circ}\text{C}}$ e $D_{70^{\circ}\text{C}}$ foram, 8,42; 3,90 e 2,7 segundos, respectivamente, e para o mesmo fungo com 1 mês de idade os valores de $D_{40^{\circ}\text{C}}$, $D_{60^{\circ}\text{C}}$ e $D_{70^{\circ}\text{C}}$ foram 4,05; 4,93 e 3,61, respectivamente (figura 27). Foi possível observar uma grande diferença dos valores de D com relação à idade para a concentração de 40% de H_2O_2 , na temperatura de 40°C , sendo que nas temperaturas mais altas esse efeito não foi muito marcante. O efeito da idade também foi altamente visível na concentração de 35% de peróxido e na temperatura de 40°C , nesse caso o valor D para *N. fischeri* com 4 meses foi de 23,5 segundos e para *N. fischeri* com 1 mês foi de 9,0 segundos. Quando eleva-se a concentração de peróxido e a temperatura o efeito da idade fica mascarado para esse bolor, conforme corroborado pelas análises estatísticas (figura 20 e tabela 3 no Apêndice 2) onde as interações idade *versus* peróxido e idade *versus* temperatura foram significativas.

Segundo Tournas & Traxler (1994) a menor resistência térmica demonstrada por esporos mais jovens de *N. fischeri* pode ser devido à maturação incompleta e maior conteúdo de água. No presente trabalho, nos resultados de resistência ao peróxido de hidrogênio encontrados para *N. fischeri* (1 e 4 meses de idade), considerando-se todas as concentrações analisadas, não se observou uma grande diferença de comportamento entre as duas idades. Provavelmente, os esporos mais jovens (1 mês) já possuam maturidade e baixa atividade de água, suficiente para conferir uma maior resistência ao peróxido.

Para o *Paecilomyces variotii*, foi possível observar uma grande diferença no comportamento dos esporos com relação à idade na temperatura mais baixa (40°C). Em temperaturas e concentrações de peróxido mais altas o efeito sinérgico dessas duas variáveis foi tão grande que não foi observada diferença de comportamento entre as idades (Figura 19 e Figura 3 no Apêndice 2). Provavelmente, os esporos de 1 mês possuem uma maturação mais tardia e maior atividade de água e, portanto, menor resistência ao peróxido do que os esporos com 4 meses de idade. Sendo assim, como não se sabe quanto tempo os esporos ficam na natureza é importante evitar formas de contaminação do laminado, principalmente pela estocagem inadequada. Cabe ressaltar que os esporos de *P. variotii* são conídios, obtidos por reprodução assexuada e os esporos de *N. fischeri* são ascósporos obtidos por reprodução sexuada, havendo portanto diferenças entre eles que podem ser responsáveis por diferenças de comportamento.

Bundgaard - Nielsen & Nielsen (1995) encontraram que a resistência dos ascósporos de *Monascus ruber*, *Eurotium repens* e *Neosartorya pseudofischeri* ao tratamento com etanol 70% por 10 minutos aumentou com a idade (21, 35 e 110 dias), porém, a idade não afetou a resistência de conídios de 5 linhagens de *Penicillium* submetidas ao mesmo tratamento. Os autores observaram ainda nesse estudo que havia variação na resistência aos fungicidas testados entre diferentes isolados de uma mesma espécie.

Conner & Beauchat (1987b) inferem que o aumento nas concentrações de glicerol, manitol e trealose que ocorrem nos ascósporos de 11 para 25 dias do bolor *N. fischeri*, pode ser o mecanismo pelo qual o ascósporo diminui sua atividade de água interna, mantendo assim a sua

viabilidade enzimática e também melhorando sua resistência ao “stress” ambiental, fato que pode ter ocorrido no presente trabalho .

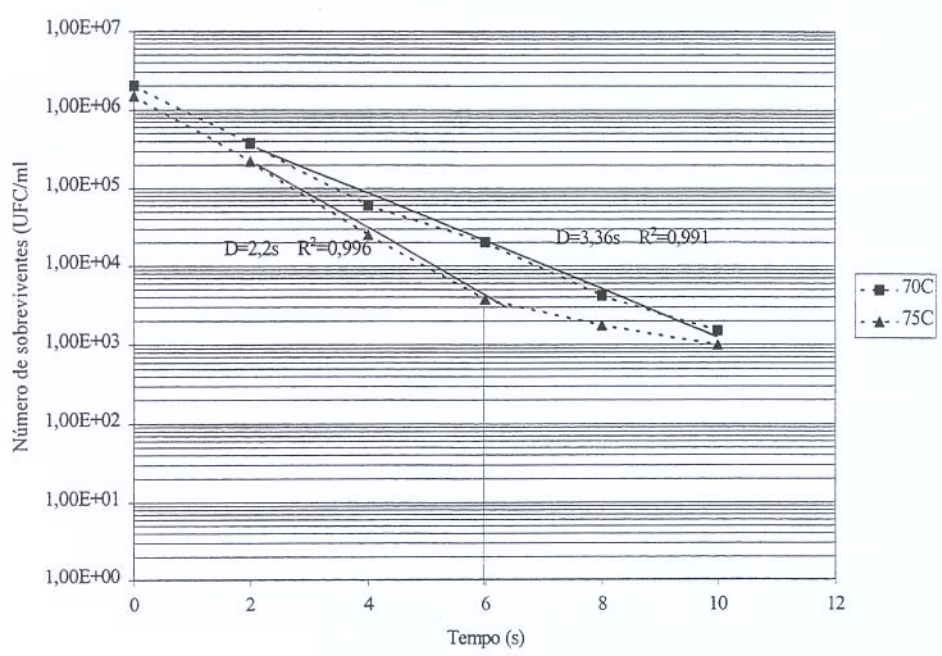


Figura 26. Curvas de sobreviventes de *Paecilomyces variotii* (4 meses) exposto a 35% de H₂O₂ a 70 e 75 °C

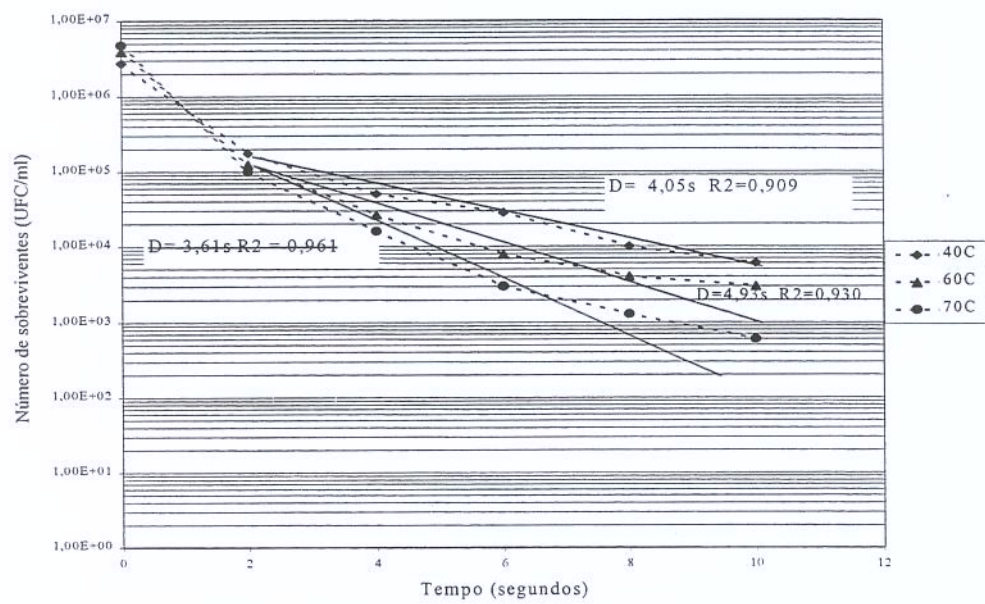


Figura 27. Curvas de sobreviventes de *Neosartorya fischeri* (1 mês) exposto a 40% de H₂O₂ a 40, 60 e 70 °C

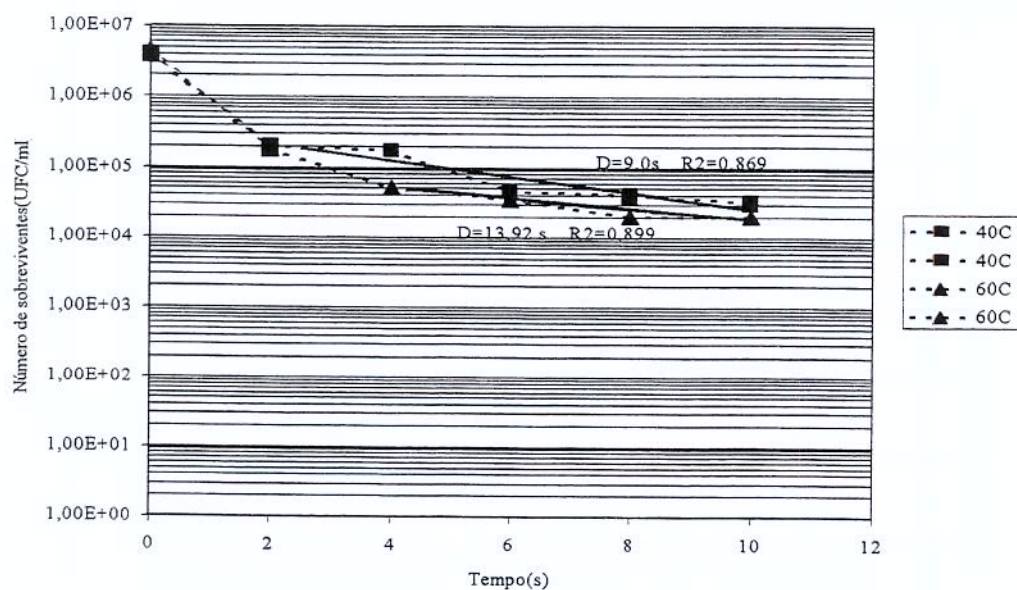


Figura 28. Curvas de sobreviventes de *Neosartorya fischeri* (1 mês) exposto a 35% de H_2O_2 a 40 e 60° C

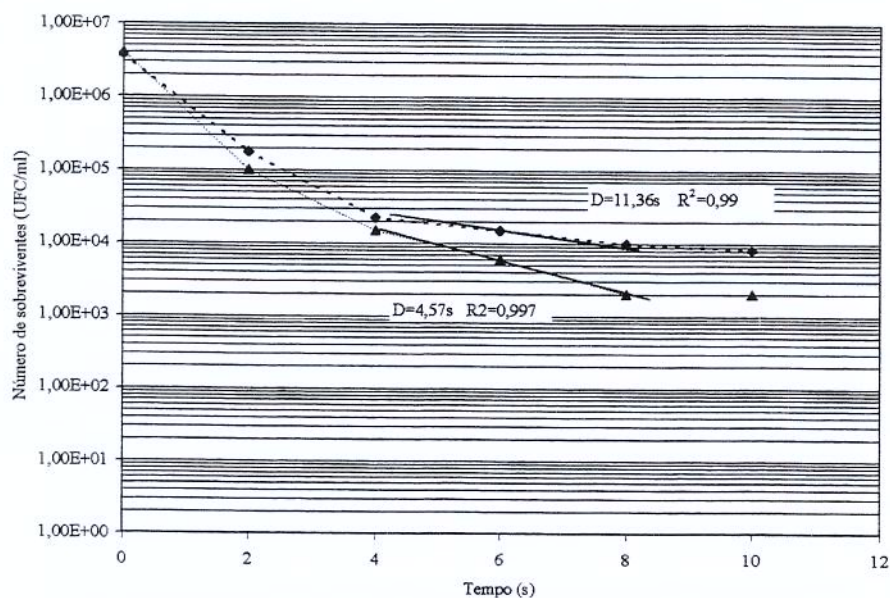


Figura 29. Curvas de sobreviventes de *Neosartorya fischeri* (1 mês) exposto a 35% de H_2O_2 a 70 e 75° C

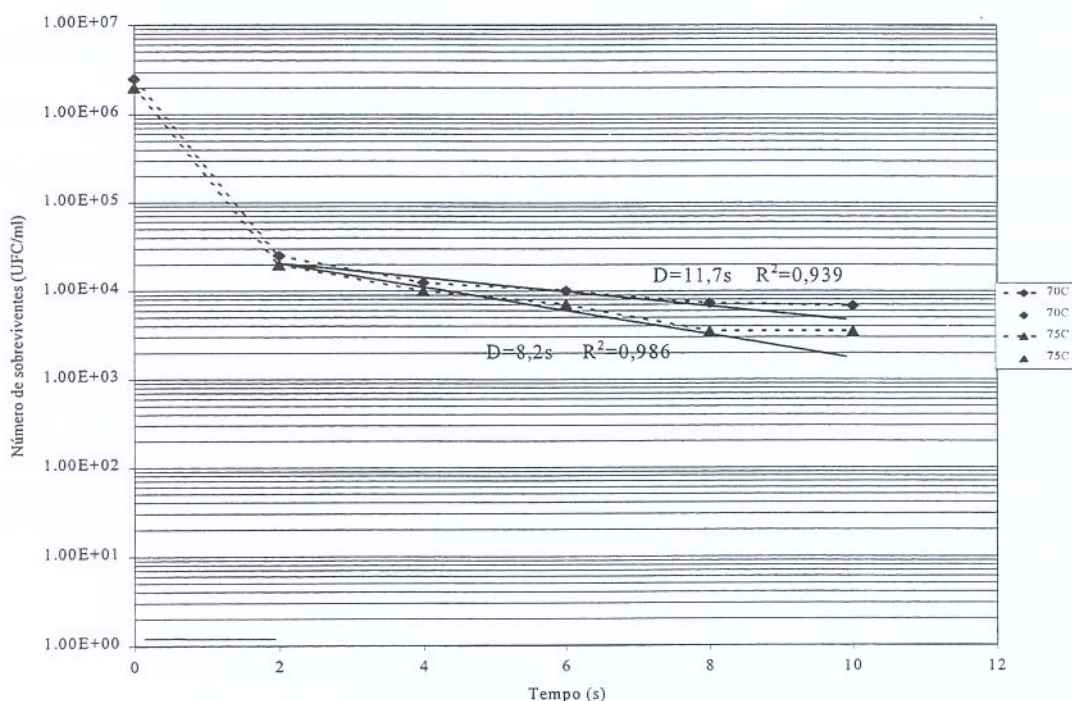


Figura 30. Curvas de sobreviventes de *N.fischeri* (4 meses) exposto a 35% de H_2O_2 a 70 e 75°C

Buchen & Marth (1977) encontraram que para a linhagem de *Aspergillus parasiticus* (NRRL 2999) a resistência dos conídios não foi afetada pela idade da cultura, porém, para linhagens de *Aspergillus parasiticus* (NRRL 3315) e *Aspergillus flavus* (NRRL 3353) os conídios mais velhos (10 e 14 dias) foram aparentemente mais resistentes do que os produzidos com 7 dias, mas essa diferença não ficou evidente e, segundo os autores, outras variáveis como a temperatura e a concentração de peróxido devem ser levadas em consideração, sendo esta observação muito importante para a presente pesquisa.

Foi observada uma diferença nos valores de D relacionada com a idade dos esporos, por exemplo a 35% de peróxido de hidrogênio e 40°C para

o *Paecilomyces variotii* com 1 e 4 meses os valores de D foram 5,13 e 25,05 segundos, respectivamente, (figuras 31.e 32), porém, esta diferença não foi significativa para a variável idade sozinha sendo significativa para as interações. Provavelmente, essa relação da idade e aumento de resistência ao peróxido de hidrogênio somente seja observada quando os esporos são coletados em um intervalo maior, como no caso do presente trabalho (1 e 4 meses), podendo também depender do microrganismo e da linhagem estudada. Na pesquisa de Buchen & Marth (1977), os intervalos de coleta de 7, 10 e 14 dias podem ter sido insuficientes para observação dessa diferença em algumas linhagens estudadas.

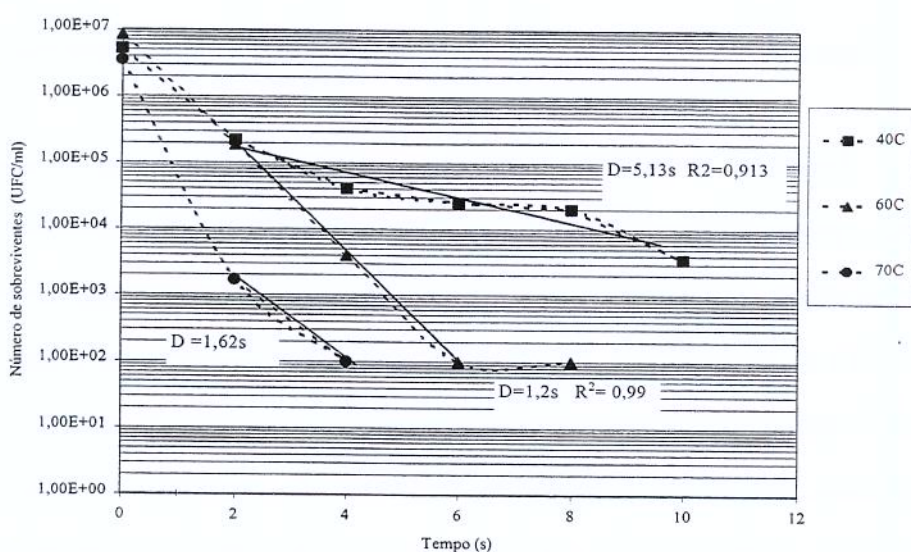


Figura 31. Curvas de sobreviventes de *Paecilomyces variotii* (1 mês) exposto a 35% de H_2O_2 a 40, 60 e 70°C

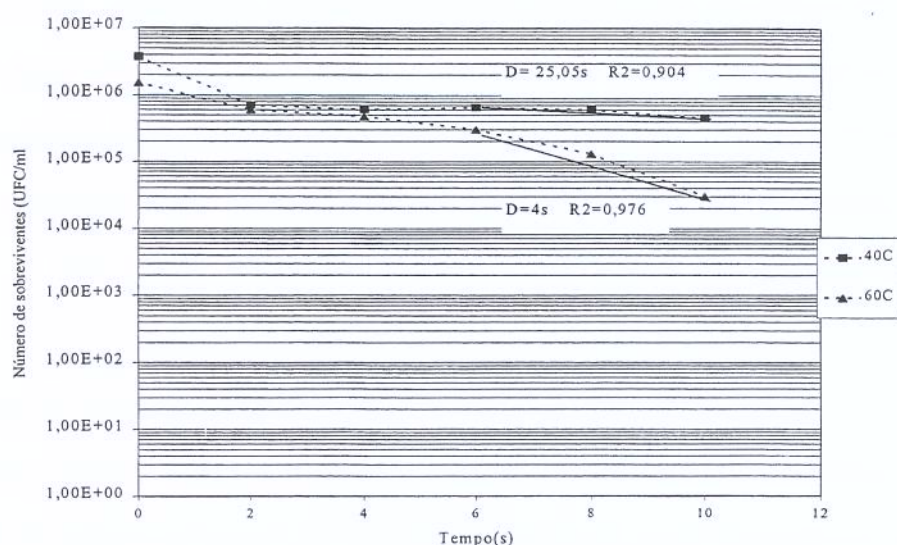


Figura 32. Curvas de sobreviventes de *Paecilomyces variotii* (4 meses) exposto a 35% de H_2O_2 a 40 e 60 °C

4.10.3. Influência da temperatura nos valores de D

Na máquina TBA3, o banho de peróxido ocorre à temperatura ambiente, porém, logo após o banho, a superfície da embalagem é submetida a uma temperatura de 120°C na camada de polietileno na superfície da embalagem. O aquecimento se faz por uma resistência, cuja temperatura varia entre 400 – 600°C, conforme indicações de Värnamo (1982). Esse procedimento faz a remoção de resíduos de peróxido na superfície da embalagem. Na máquina TBA8, a temperatura do banho é ajustada a 70°C e controlada por um sensor e o material de embalagem após desinfecção com peróxido passa por um sistema de rolos espremedores para a retirada dos resíduos de peróxido (Tetra Pak – comunicação pessoal).

O efeito esporicida do peróxido de hidrogênio foi incrementado com a elevação da temperatura. Para o bolor *Neosartorya fischeri* com 1 e 4

meses em todas as concentrações de peróxido utilizadas, observou-se que, quando a temperatura foi elevada de 40 para 70°C houve uma redução no valor de D de no mínimo a metade. Por exemplo, para *N. fischeri* (4 meses) tratado com 35% de peróxido, o valor $D_{40^{\circ}\text{C}}$ foi de 23,5 segundos (figura 18) enquanto que, o valor de $D_{70^{\circ}\text{C}}$ foi de 11,7 segundos (figura 30).

A influência do aumento de temperatura para o *P. variotii* 1 e 4 meses também foi consideravelmente grande para todas concentrações testadas, ocorrendo uma diminuição de até 10 vezes no valor de D quando a temperatura foi elevada de 40 para 70°C (figuras 16, 17, 33 e 34).

O efeito do valor de D com a elevação da temperatura observada no presente trabalho, é corroborada pelas análises estatísticas. Para o *P. variotii* a temperatura foi significativa a 95% quando considerada a interação peróxido *versus* temperatura (tabela 6-apêndice 2). Para o *N. fischeri* a variável temperatura individualmente foi significativa a 95%, bem como a interação entre idade *versus* temperatura (tabela 3 –apêndice 2).

A temperatura exerceu um importante papel como catalisador para o peróxido de hidrogênio na formação de radicais (radicais OH[•]) e, são esses radicais, que supostamente reagem com os componentes do esporo, tal como afirmam Shin et al. (1994). A ação sinérgica temperatura *versus* concentração de peróxido parece exercer uma grande influência na diminuição da resistência do microrganismo.

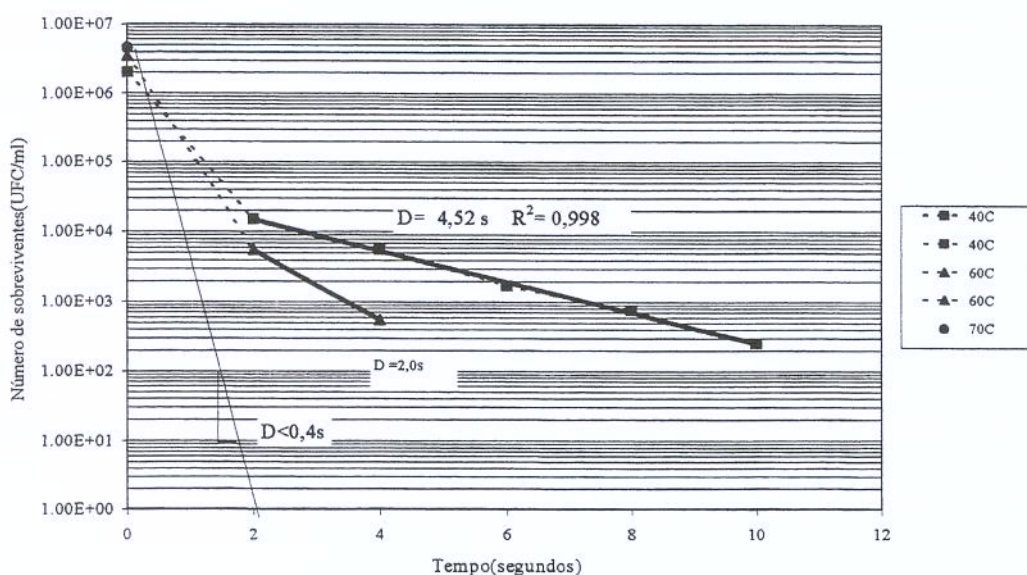


Figura 33. Curvas de sobreviventes de *Paecilomyces variotii* (1 mês) exposto a 45% de peróxido de hidrogênio a 40, 60 e 70°C

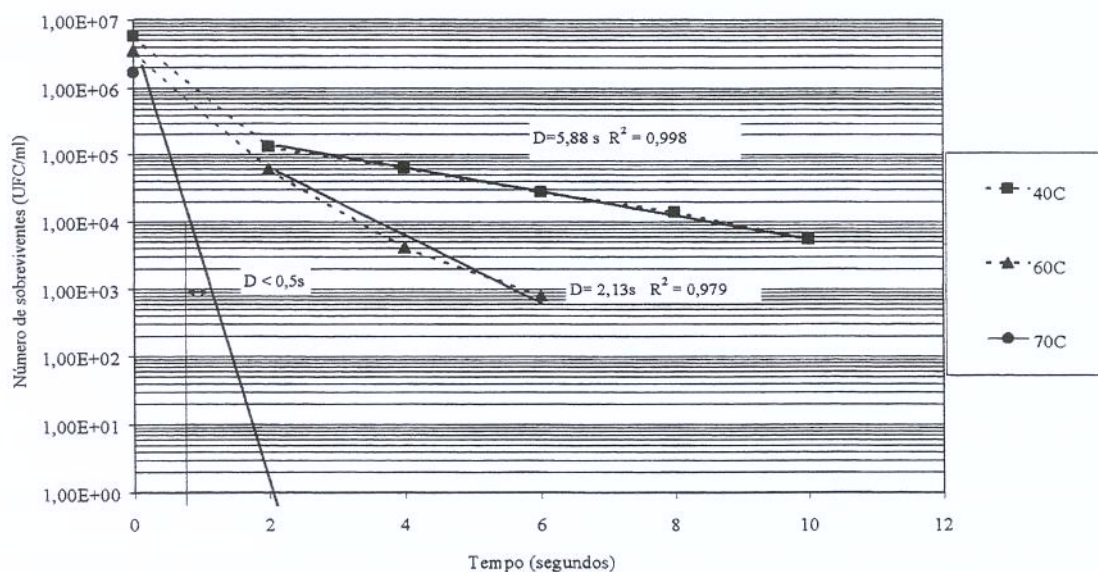


Figura 34. Curvas de sobreviventes de *Paecilomyces variotii* (1 mês) exposto a 40% de peróxido de hidrogênio a 40, 60 e 70°C

Conforme pode ser observado nas figuras 29 e 30 para *N. fischeri* 1 e 4 meses, respectivamente, quando ocorreu um aumento na temperatura de 5° C obteve-se uma diminuição evidente do valor de D para *Neosartorya fischeri* (1 mês), sendo $D_{70^{\circ}\text{C}}$ de 11,36 segundos e $D_{75^{\circ}\text{C}}$ de 4,57 segundos. Para *N. fischeri* com 4 meses quando ensaiado com 35% de H_2O_2 a diminuição no valor de D não foi muito grande sendo $D_{70^{\circ}\text{C}}$ e $D_{75^{\circ}\text{C}}$ de 11,7 e 8,2 segundos, respectivamente. Esta diminuição do valor de D não foi tão evidente para *Paecilomyces variotii* com 4 meses de idade e 35% de peróxido de hidrogênio sendo $D_{70^{\circ}\text{C}}$ de 3,36 e $D_{75^{\circ}\text{C}}$ de 2,2 segundos (figura 26).

Na figura 22, podemos observar que a mudança de 70 para 75°C em esporos de *N.fischeri* com 4 meses tratados com 40% de peróxido praticamente não alterou o valor de D deste microrganismo, o mesmo ocorrendo para os esporos com mesma idade e 35% de H_2O_2 , onde a alteração foi pequena não justificando portanto esse aumento de temperatura.

Ito et al. (1973) encontraram que esporos de *Clostridium botulinum* 62 A tratados com 20% de peróxido de hidrogênio tinham sua resistência diminuída quando a temperatura era elevada de 20 para 40 e 55°C. Com a elevação da temperatura a curva de sobreviventes mostrou uma diminuição do “lag” inicial e do “tailing”, aproximando-se mais de uma reta, fato que também ocorreu com os tratamentos onde houve o aumento nas concentrações de peróxido. Uma situação similar pode ser observada na figura 31 para o *P.variotii* (1 mês).

Para os dois bolores estudados a temperatura foi significativa a

95% na diminuição da resistência do microrganismo (Tabelas 3 e 6 no apêndice 2), sendo assim, para melhorar a desinfecção sugere-se uma correta manutenção e controle da temperatura do banho de peróxido de hidrogênio mantendo-se a concentração do agente esterilizante utilizada comercialmente (35%) que foi estabelecida pelo FDA.

4.10.4. Modelo de regressão linear ajustado para os valores de D para os bolores *N. fischeri* e *P. variotii*

Utilizou-se a regressão linear simples para tratamento dos dados observados de *N. fischeri* e *P. variotii*, com inclusão das componentes quadráticas para peróxido, linear para idade, temperatura e peróxido e interação entre peróxido *versus* idade e peróxido *versus* temperatura para *N. fischeri* e procedimento “backward” de seleção de variáveis no modelo, ou seja, as variáveis que não foram significativas a 95% foram omitidas do modelo. Para o *P. variotii* foram incluídas as componentes lineares para idade, peróxido e temperatura, a temperatura quadrática foi mantida para dar estabilidade ao modelo, e todas as interações entre os efeitos lineares.

O modelo encontrado para o bolor *Neosartorya fischeri* descreve satisfatoriamente o fenômeno e apresenta um R^2 de 0,9153 (Tabela 3 - Apêndice 2) podendo ser utilizado para os bolores estudados dentro das condições estabelecidas nesta pesquisa.

Para a região experimental contendo os limites:

$1\text{mês} \leq \text{idade} \leq 4\text{meses}$

$35\% \leq \text{concentração de peróxido} \leq 45\%$

$40^\circ\text{C} \leq \text{temperatura} \leq 70^\circ\text{C}$

O valor de D dos experimentos para o *Neosartorya fischeri* com 1 mês pode ser estimado pelas equações 5 (modelo completo) e 6 (modelo simplificado) e para *N. fischeri* com 4 meses pelas equações 7 e 8.

N. fischeri com 1 mês de idade (I = 1):

$$D=282,3781+12,23.I-13,5712.P+0,1622.P^2+0,0725.T-0,1861.I.P-0,0738.I.T \quad (\text{Eq 5})$$

$$D=294,61 - 13,76.P - 0,0013.T + 0,1622.P^2 \quad (\text{Eq.6})$$

N. fischeri com 4 meses de idade (I = 4):

$$D=282,3781+12,23.I-13,5712.P+0,1622.P^2+0,0725.T-0,1861.I.P-0,0738.I.T \quad (\text{Eq 7})$$

$$D= 331,3 - 14,316.P - 0,2225. T + 0,1622 . P^2 \quad (\text{Eq. 8})$$

Onde:

I = idade (meses)

P = Concentração de peróxido (%)

T= Temperatura em graus Celsius

D= Tempo (segundos) para reduzir em 90% a concentração inicial de microrganismos

Para a região experimental contendo os limites:

1mês ≤ idade ≤ 4meses

35% ≤ concentração de peróxido ≤ 45%

40°C ≤ temperatura ≤ 70°C

Os valores de D (segundos) dos experimentos para o *Paecilomyces variotii* com 1 mês podem ser estimados pelas equações 9 (modelo completo) ou 10 (modelo simplificado) e *Paecilomyces variotii* com 4 meses pelas equações 11 ou 12.

Para os modelos ajustados dos dois bolores foram contruídos gráficos de superfícies de resposta.

Na figura 35 mostra-se a relação tridimensional de efeito de peróxido de hidrogênio, idade e resistência térmica do *N. fischeri* com 1 mês de idade. Nota-se que em baixas concentrações de H_2O_2 e idade maior se registram os mais altos valores de D.

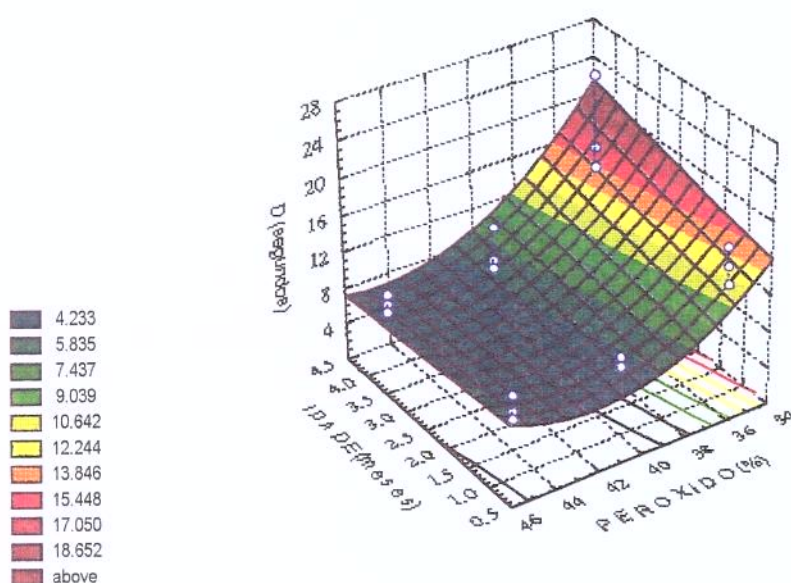


Figura 35. Superfície de resposta para o modelo ajustado de *N. fischeri* (1 e 4 meses)

Na figura 36 é mostrada a relação tridimensional do efeito da

idade e temperatura na resistência do *N. fischeri* (1 e 4 meses) onde a diferença observada entre os três pontos foi devida a concentração de peróxido e não a temperatura ou a idade, pois o efeito do peróxido de hidrogênio é muito forte. A superfície de resposta da figura 37 mostra o comportamento médio entre temperatura e peróxido de hidrogênio para *N. fischeri* nas duas idades, sendo possível observar a diferença de comportamento entre as duas idades apenas na temperatura mais baixa (40°C).

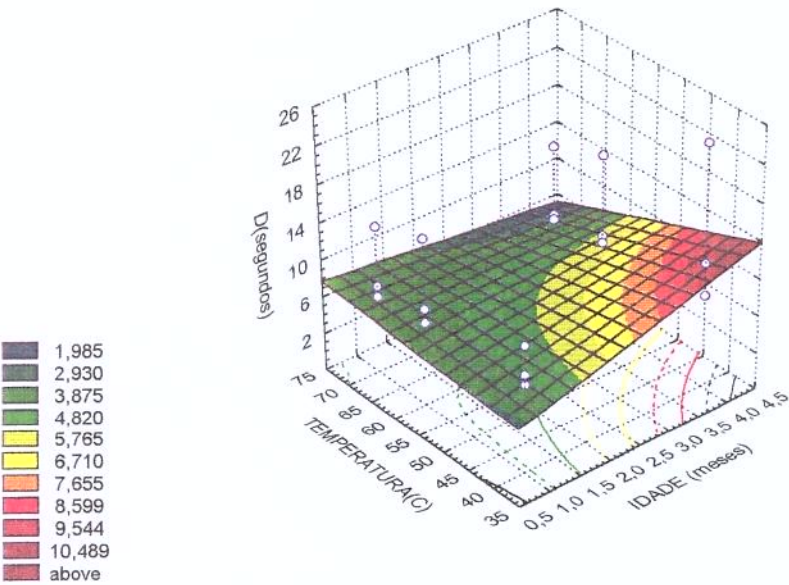


Figura 36. Superfície de resposta para o modelo ajustado de *N. fischeri*

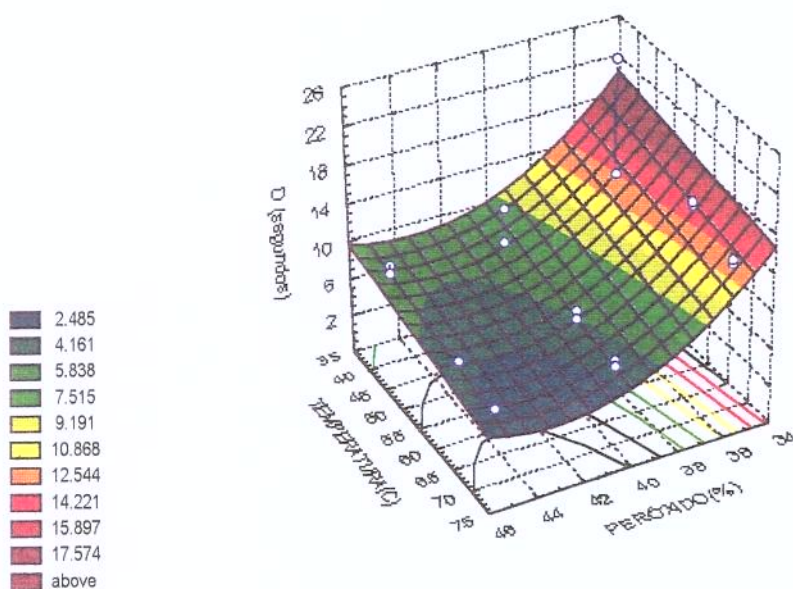


Figura 37. Comportamento médio entre temperatura e peróxido de hidrogênio para *N. fischeri* com 1 e 4 meses de idade

Paecilomyces variotii com 1 mês de idade (I = 1)

$$D=120,56+21,4931.I-1,9159.P-3,5155.T+0,0170.T^2-0,3348.I.P-0,1291.I.T+0,0448.P.T$$

(Eq 9)

$$D= 142,0531 -2,2507.P - 3,6446.T +0,0448.P.T + 0,0170.T^2$$

(Eq.10)

Paecilomyces variotii com 4 meses de idade (I= 4)

$$D=120,56+21,4931.I-1,9159.P-3,5155.T+0,0170.T^2-0,3348.I.P-0,1291.I.T+0,0448.P.T$$

(Eq 11)

$$D = 206,5324 - 3,2551.P - 4,0319.T + 0,0448.P.T + 0,0170.T^2 \quad (\text{Eq. 12})$$

onde:

I = idade (meses)

P = Concentração de peróxido em porcentagem (%)

T = Temperatura em graus Celsius

D = Tempo (segundos) para reduzir em 90% a concentração inicial de microrganismos

Com os tratamentos mais drásticos (temperaturas e concentrações de peróxido mais altas), a morte dos microrganismos foi tão rápida que o método de contagem não foi suficientemente sensível para detectar os possíveis sobreviventes, que provavelmente estariam abaixo da região quantal (menor que 1UFC/ml).

Para o bolor *Paecilomyces variotii* o valor de R quadrado foi de 0,89325 sendo o modelo considerado satisfatório, principalmente por se tratar de um experimento biológico e com tempos de contato entre o agente esterilizante e os esporos muito curtos, medidos em segundos como o realizado por Swartling & Lindgreen (1968) que citam os problemas em se trabalhar com tempos de contato muito curtos, principalmente pela dificuldade de reprodutibilidade dos experimentos.

Cabe indicar que os modelos propostos somente são válidos para os bolores e condições estudadas no presente trabalho.

Para o bolor *P. variotii* com 1 e 4 meses a superfície de resposta é apresentada na figura 38, para o comportamento entre temperatura e peróxido. É possível observar a diferença acentuada entre as idades apenas em temperatura baixa (40°C).

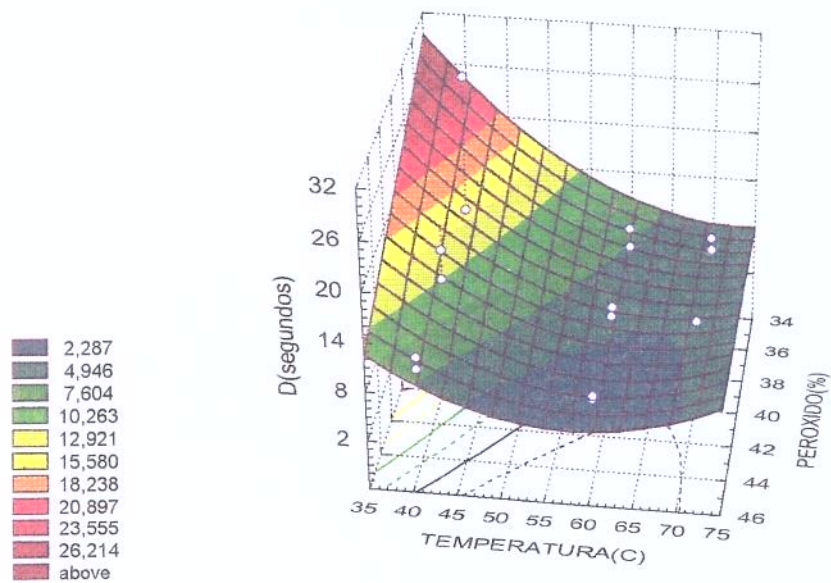


Figura 38. Superfície de resposta para o modelo ajustado de *Paecilomyces variotii* com 1 e 4 meses de idade

Na tabela 40 são apresentados para o *P. variotii*, nas duas idades os valores de D encontrados pelo cálculo da regressão na porção linear das curvas (valores observados) e os valores encontrados pela aplicação dos modelos (valores preditos) e podem ser vistos na figura 39. Os dados de *N. fischeri* ficaram muito bem distribuídos ao longo da linha de 45 graus e podem ser vistos na figura 40. Para o *P. variotii* pelo fato de ser menos resistente a

ausência de valores em altas temperaturas e concentrações de peróxido é notório, sendo que os dados de valores de D ficaram concentrados na porção inferior da reta de 45 graus para este bolor.

Para *P. variotii* (1 mês) exposto a 35% de peróxido de hidrogênio e 70°C o valor de D observado e o calculado pelo modelo foi de 1,62 e 1,22 segundos, respectivamente e para *P. variotii* (4 meses) o valor de D observado e o calculado pelo modelo foi 3,36 e 3,43 segundos, respectivamente (tabela 40). Observa-se que não houve grande diferença entre eles, e nas outras temperaturas e concentrações de peróxido a diferença do valor de D observado menos o valor de D predito variou de - 3,67 a 3,8 segundos. Os valores negativos significam que o D observado foi menor que o D predito pelo modelo.

Para o *P. variotii* com 1 mês e exposto a 40% de H₂O₂ e 70°C não foi calculado o valor de D pois não foram recuperados sobreviventes, pois a população remanescente estava abaixo da região que podia ser quantificada pelo método de contagem em profundidade (tabela 40).

Para *N. fischeri*, de 18 valores de D preditos pelo modelo 55,6% são maiores que os observados e para *P. variotii* de 15 valores calculados 46,7% dos D preditos são maiores que os observados. Apenas três valores para *N. fischeri* e para *P. variotii* apresentam um porcentagem de variação (tabelas 40 e 41) maior que 50% entre os valores de D observados e calculados pelo modelo.

Tabela 40. Valores observados e Valores preditos de D para o bolor *Paecilomyces variotii* com 1 e 4 meses de idade

Idade	H ₂ O ₂ (%)	Temperatura (°C)	Valores de D (segundos)		Diferença Obs – Calc.*	% Variação**
			Observado	Calculado		
1	35	40	5,13	7,41	-2,28	44,44
1	35	60	1,20	-0,12	1,08	90,00
1	35	70	1,62	1,22	0,4	24,70
1	40	40	5,88	5,12	0,76	12,92
1	40	60	2,13	2,07	0,06	2,82
1	40	70	—	—	—	—
1	45	40	4,52	2,82	1,7	37,61
1	45	60	2,05	4,25	-2,2	107,3
1	45	70	—	—	—	—
4	35	40	25,05	21,25	3,8	15,16
4	35	60	4,0	5,97	-1,97	49,25
4	35	70	3,36	3,43	-0,07	2,08
4	40	40	10,26	13,93	-3,67	35,77
4	40	60	3,49	3,13	0,36	10,32
4	40	70	2,35	2,83	-0,48	20,42
4	45	40	6,22	6,61	-0,39	6,27
4	45	60	2,0	0,29	1,71	85,5
4	45	70	—	—	—	—

* = Diferença entre os valores observados menos os calculados

** = % (porcentagem) de variação = $\left| \frac{D \text{ observado} - D \text{ calculado}}{D \text{ observado}} \right| \times 100$

Tabela 41. Valores Observados e Valores Preditos de D para o bolor *Neosartorya fischeri* com 1 e 4 meses de idade

Idade	H ₂ O ₂ (%)	Temperatura (°C)	Valor de D (segundos)		Diferença Obs – Calc.*	% variação**
			Observado	Calculado		
1	35	40	9,0	11,65	-2,65	29,44
1	35	60	13,92	11,62	2,3	16,52
1	35	70	11,36	11,61	-0,25	2,20
1	40	40	4,05	3,68	0,37	9,14
1	40	60	4,93	3,65	1,28	15,96
1	40	70	3,61	3,64	-0,03	0,83
1	45	40	5,02	3,81	1,21	24,10
1	45	60	2,68	3,78	-1,1	41,00
1	45	70	2,30	3,77	-1,47	63,91
4	35	40	23,5	19,89	3,61	15,36
4	35	60	14,35	15,44	-1,09	7,60
4	35	70	11,70	13,22	-1,52	12,99
4	40	40	8,42	9,12	-0,7	8,31
4	40	60	3,90	4,67	-0,77	19,74
4	40	70	2,71	2,45	0,26	9,59
4	45	40	4,24	6,63	-2,39	56,37
4	45	60	2,96	2,18	0,78	26,35
4	45	70	2,08	-0,04	2,04	98,10

* = Diferença entre o valores observados menos os calculados pelo modelo

** = % (porcentagem) de variação = $\frac{|D \text{ observado} - D \text{ calculado}|}{D \text{ observado}} \times 100$

O valor de D observado e D calculado pelo modelo para *N. fischeri* (1 mês) exposto a 35% de peróxido de hidrogênio e 70°C foi de 11,36 e 11,61 segundos, respectivamente. Para *N. fischeri* com 1 mês e exposto a

40% de H_2O_2 os valores de D observados e D calculados foram de 3,61 e 3,64 segundos, respectivamente (Tabela 40).

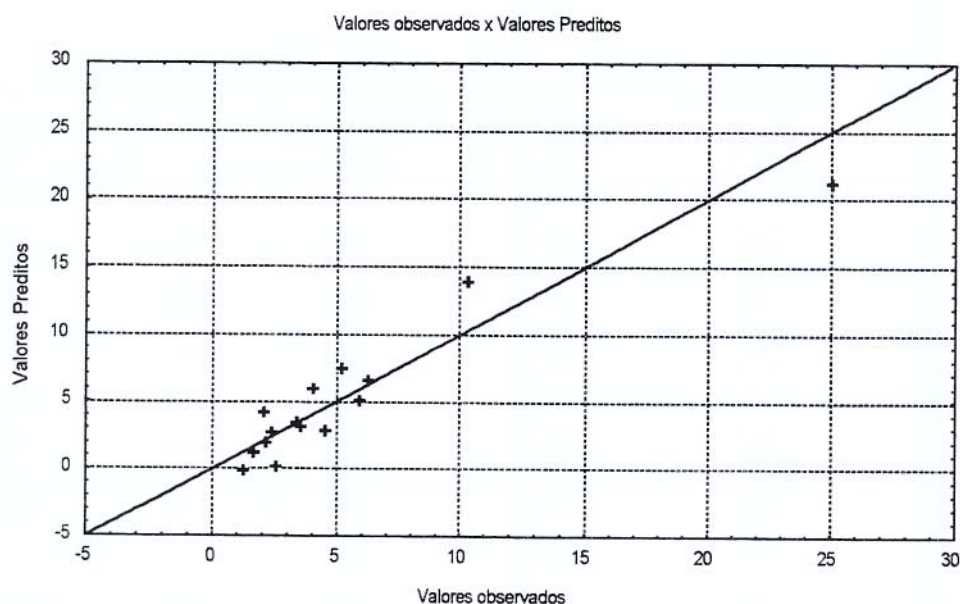


Figura 39. Valores observados e preditos (linha contínua) para *Paecilomyces variotii* com 1 e 4 meses de idade ensaiados com peróxido de hidrogênio nas concentrações de 35,40 e 45% nas temperaturas de 40, 60 e 70°C

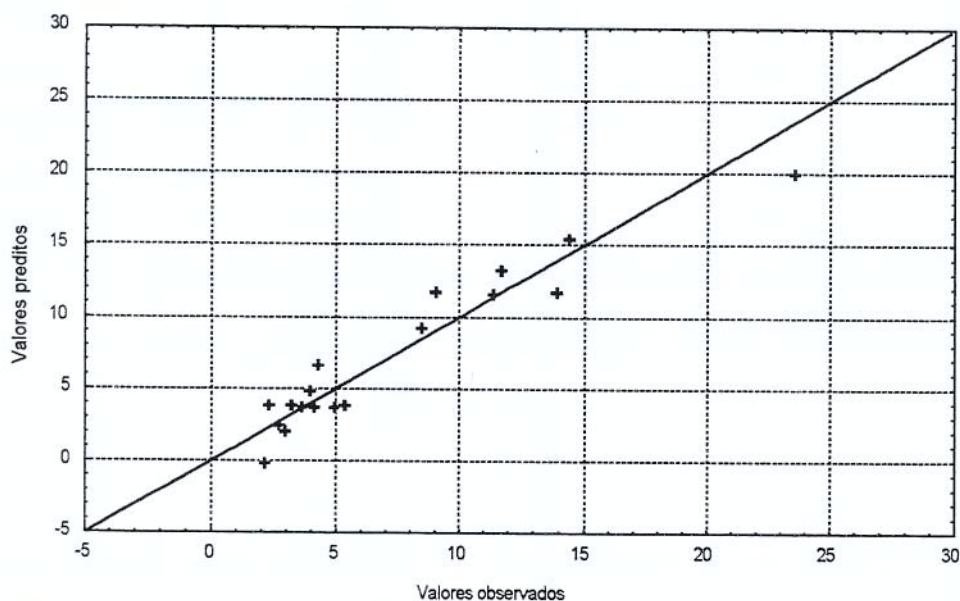


Figura 40. Valores observados e valores preditos (linha contínua) para *N. fischeri* (1 e 4 meses) ensaiados com 35, 40 e 45% de peróxido de hidrogênio nas temperaturas de 40, 60 e 70°C

Para o *N. fischeri* com 4 meses o valor de D observado e D calculado pelo modelo foi de 11,70 e 13,22 segundos, respectivamente, quando esse bolor foi exposto a 35% de peróxido e 70°C. Para a concentração de 40% de peróxido, os valores de D observado e D calculado foram 2,71 e 2,45 segundos, respectivamente (tabela 41). Foi possível observar pela Tabela 41 que as diferenças entre os valores observados e calculados variaram de -2,65 a 3,65 segundos para o *N. fischeri* o que torna possível a utilização do modelo para o cálculo de valores de D para esse bolor nas condições estudadas. O gráfico de valores preditos e calculados para *N.fischeri* pode ser visto na figura 40.

4.10.5 . Parâmetros D e Z

Na presente pesquisa, após terem sido calculados os valores de D para os dois bolores, calculou-se os tempo totais de exposição ao agente esterilizante (tabela 42), para que ocorra uma queda de 4 ciclos logarítmicos na população inicial, assumindo a população inicial contaminando a embalagem de 1 esporo/100cm² esta seria reduzida até 10⁻⁴ esporos/100cm², segundo Toledo (1973) este valor pode ser calculado pela equação 13:

$$\text{Tempo total} = \text{Tempo(s) para diminuir um ciclo logarítmico inicial} + 3D \quad \text{Eq. 13}$$

de exposição

Esta equação leva em conta que durante o período inicial de inativação a maioria das curvas de destruição apresentam uma curvatura côncava para cima e depois seguem a ordem logarítmica de morte. No caso de inativação bacteriana, as curvas de Toledo (1973) mostram uma concavidade para baixo.

Tabela 42. Tempo total de exposição requerido (segundos) para uma diminuição de 4 ciclos logarítmicos (4D)

Bolor	Idade (meses)	Concentração de peróxido (%)	Tempo (segundos)			
			Temperatura (°C)			
			40	60	70	75
<i>N. fischeri</i>	1	35	28,60	43,36	35,61	14,95
		40	13,76	16,18	12,13	—
<i>N. fischeri</i>	4	35	71,9	44,07	36,13	25,58
		40	26,76	13,2	9,8	—
<i>P. variotii</i>	1	35	16,74	4,9	5,36	—
		40	18,93	7,68	1,77*	—
<i>P. variotii</i>	4	35	80,3	16,98	12,75	8,91
		40	32,74	12,04	9,05	—

* = Esse valor foi estimado, já que o valor de D, calculado graficamente, foi menor que 0,5s, utilizou - se assim 0,5s para os cálculos.

O tempo total de exposição calculado significa quanto tempo é necessário de contato com o peróxido de hidrogênio para que a população inicial diminua em 4 ciclos logarítmicos, nas condições de cada concentração de peróxido de hidrogênio e temperaturas ensaiadas. Na presente pesquisa, a maior contaminação por bolores encontrada foi de 1,02 esporos/100cm² para a planta A e 0,71 esporos/100 cm² para a planta B e são valores considerados baixos.

Para o *P.variotii* isolado do material de embalagem o tempo total de exposição requerido nas condições industriais (35% de H₂O₂ e 70°C) foi de 5,36 e 12,75 segundos para esporos com 1 e 4 meses, respectivamente.

Considerando que a população de bolores isolados no presente trabalho foi baixa, o tempo de 6 segundos seria suficiente para eliminar esse bolor, porém, se a população for alta $\geq 10^3$ esporos/100cm²) devido a práticas inadequadas de armazenagem do material de embalagem, o tempo padrão pode ser insuficiente para eliminar os bolores presentes e com isso estes podem estar presentes no material de envase.

Para o bolor *N. fischeri*, utilizado como controle nesta pesquisa, o tempo total de exposição requerido para diminuição de 4 ciclos logarítmicos nas condições industriais (70°C, 35% H₂O₂ (p/p) e 6 segundos de contato) seria de 35,61 e 36,13 segundos, para esporos com 1 e 4 meses, respectivamente, esse tempo é muito extenso comprometendo a velocidade de produção. Entretanto, esse tempo pode ser diminuído com um tratamento a 70°C e aumento da concentração de peróxido de hidrogênio para 40% (p/p) (tabela 42).

Tournas & Traxler (1994) encontraram em testes para determinação de resistência térmica de *N. fischeri* em água destilada, suco de abacaxi e suco concentrado de abacaxi uma correlação negativa entre os valores de Z e a resistência térmica dos ascosporos, ou seja, houve uma diminuição do valor de Z enquanto a resistência térmica aumentou, assim como Beuchat (1986), reportou uma possível correlação entre o aumento de resistência térmica e diminuição dos valores de Z, para os bolores *T. flavus* e *N. fischeri* com 2 meses de idade.

Na presente pesquisa, os valores Z (°C) obtidos após o tratamento com o peróxido de hidrogênio nas temperaturas ensaiadas podem estar

mostrando essa correlação negativa, ou seja, os maiores valores de Z podem estar relacionados a uma menor resistência ao peróxido. Foi possível observar este fato principalmente para a concentração de 45%, onde os valores de Z foram maiores quando comparados com as outras concentrações testadas, este fato pode ser visto na tabela 43 .

Tabela 43. Coeficiente térmico ($^{\circ}\text{C}$) de *P.variotii* e *N.fischeri* expostos a H_2O_2 nas concentrações de 35, 40 e 45% nas temperaturas de 40, 60 e 70°C

Valores de coeficiente térmico (°C)				

Os valores de Z ($^{\circ}\text{C}$) não foram determinados para o *P. variotii* com 1 mês de idade, pois nas concentrações de peróxido de 40 e 45% a 70°C (Tabela 43) pois não foram obtidos sobreviventes com o método utilizado, sendo assim, para o cálculo de Z é necessário que se tenha o valor de D em

pelo menos três temperaturas diferentes, o que não ocorreu no presente trabalho para as condições já citadas, onde o $D_{70^{\circ}\text{C}}$ a 40 e 45% de peróxido foi obtido graficamente e não pode ser utilizado para o cálculo de Z.

Smith & Brown (1980) encontraram os valores de Z para esporos de *Bacillus subtilis* variedade *globigii* para as concentrações de peróxido de 10, 12,5, 20, 25 e 30 % como sendo 30,4; 24,2; 28,1; 31,5 e 23,8°C . Toledo et al (1973) obtiverem um valor Z de 40°C para a mesma linhagem utilizada por Smith & Brown (1980), porém, os esporos foram tratados com 25,8% de peróxido de hidrogênio .

Swartling & Lindgreen (1968), utilizando somente as porções lineares das curvas para os cálculos de D e Z, encontraram para esporos úmidos de *B. subtilis*, tratados com 10, 15 e 20% de peróxido de hidrogênio, os valores de Z (°C) de 46, 52 e 47°C, respectivamente.

Nas figuras 41 e 42 são apresentados os gráficos com os valores de Z para *P.variotii* e *N.fischeri*, respectivamente, ambos com 4 meses de idade.

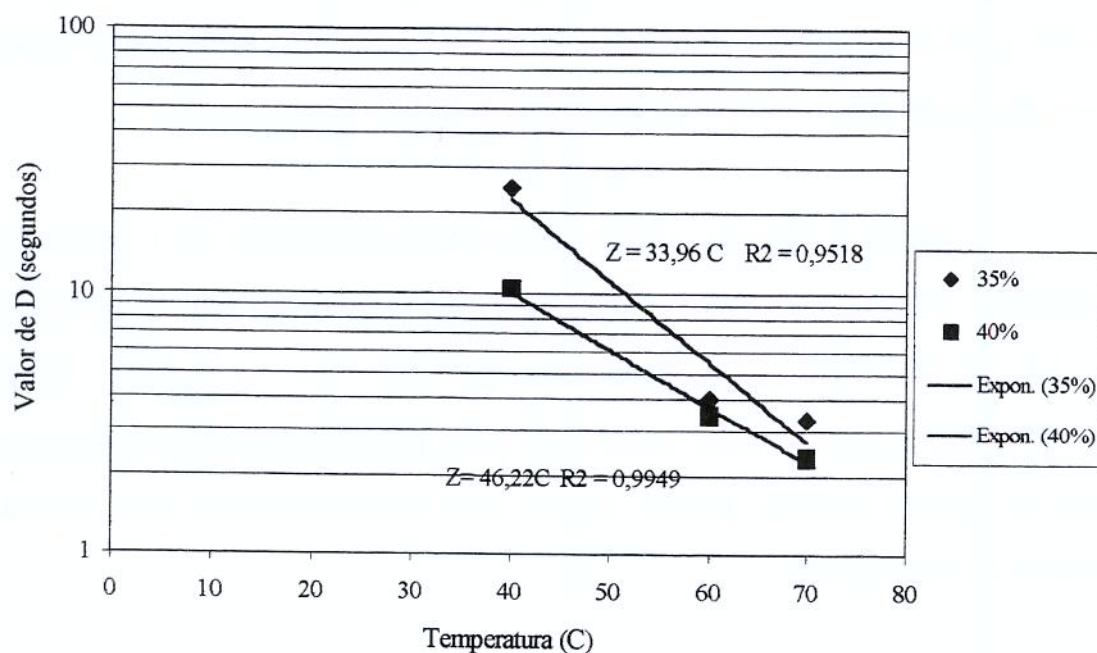


Figura 41. Curva fantasma de *Paecilomyces variotii* (4 meses) exposto a 35 e 40 % de peróxido a 40, 60 e 70°C

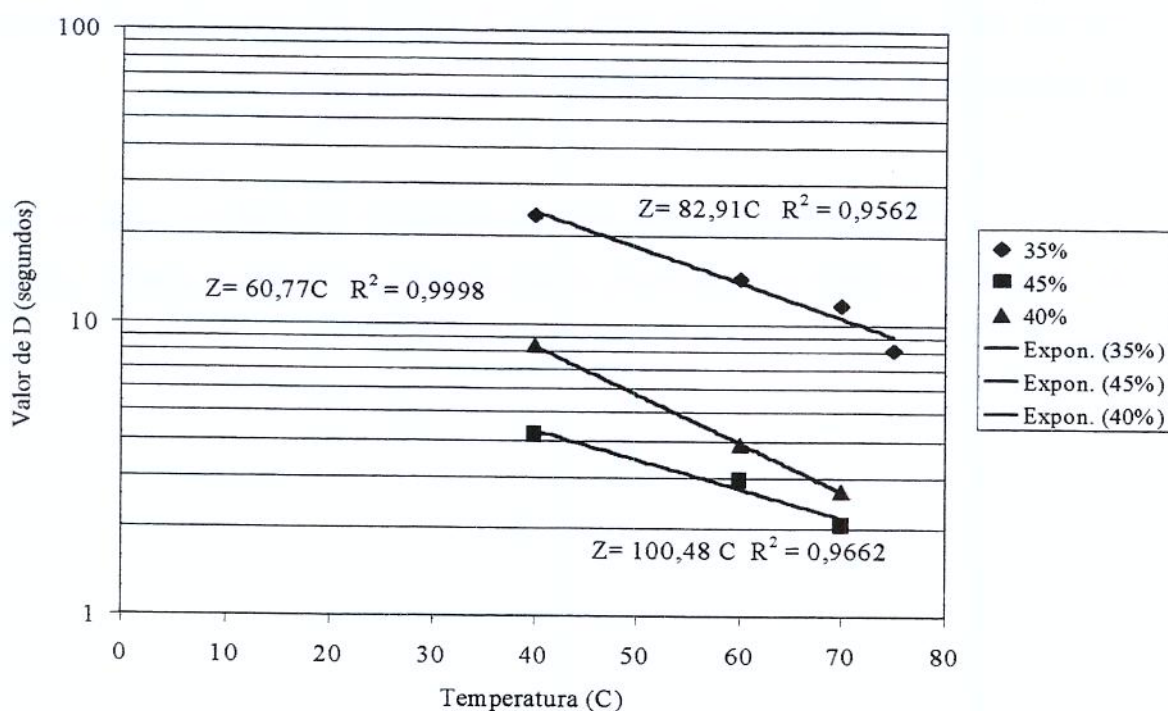


Figura 42. Curva fantasma de *Neosartorya fischeri* (4 meses) exposto a 35, 40 e 45% de peróxido nas temperaturas de 40, 60 e 70°C

Não foram encontrados valores de Z (°C) na literatura para bolores submetidos a tratamentos com peróxido de hidrogênio, para serem comparados com os encontrados no presente trabalho, pois praticamente todos os trabalhos encontrados se referem a experimentos com peróxido de hidrogênio e bactérias, principalmente *Bacillus subtilis* var. *globigii* que é considerado o mais resistente aos tratamentos com peróxido.

4.10.6. Teste em planta de envase asséptico, com solução de 40%(p/p) de peróxido de hidrogênio, no banho de esterilização do material de embalagem de máquina TBA8

A concentração de 40 % de peróxido de hidrogênio foi testada em planta de envase asséptico por terem sido encontrados bons resultados nos ensaios em laboratório para essa concentração, lembrando-se que a concentração utilizada na indústria é de 35% de peróxido de hidrogênio. Sendo assim, 40% (p/p) seria uma concentração para uso alternativo, para a eliminação de bolores de superfície de material de embalagem, desde que o residual de peróxido seja menor que 0,5 ppm.

Analizou-se 20 embalagens e as leituras do residual de peróxido são apresentadas na tabela 44. A média das vinte análises foi de 0,385 ppm, valor que se encontra na faixa exigida pelo FDA, que é no máximo de 0,5 ppm, medidos em embalagens com água imediatamente após o envase, procedimento utilizado no presente trabalho. O desvio padrão da análise das 20 amostras foi 0,198.

Com os resultados obtidos foi possível sugerir alternativamente a

concentração de 40% para desinfecção de superfícies com elevadas contaminações (maior que 10^3 esporos/100cm²) utilizando a temperatura de 70°C e pelo menos de 10 a 15 segundos de contato. Outra alternativa para a diminuição da resistência desse bolor seria a elevação da temperatura do banho de peróxido, não sendo assim necessária a alteração da concentração de peróxido estabelecida pelo FDA que é de 35% (p/p) sendo esta uma mudança muito mais difícil.

Tabela 44. Análise do residual de peróxido de hidrogênio após teste em planta de envase asséptico com solução de 40% de peróxido de hidrogênio no banho de desinfecção

Número da Amostra	Residual de H ₂ O ₂ (ppm)	Número da Amostra	Residual de H ₂ O ₂ (ppm)	Número da Amostra	Residual de H ₂ O ₂ (ppm)
1	0,3	8	0,4	15	0,7
2	0,3	9	0,5	16	0,8
3	0,2	10	0,6	17	0,3
4	0,2	11	0,4	18	0,2
5	0,3	12	0,6	19	0,1
6	0,3	13	0,3	20	0,2
7	0,3	14	0,7		

Para o *N. fischeri*, foi obtido pelas análises estatísticas que a concentração de peróxido foi altamente significativa na diminuição do valor de D sendo $p= 0.000002$ (Tabela 3 – Apêndice 2), e para o *P. variotii* a variável concentração de peróxido foi significativa a 95% na interação com a idade e com a temperatura, sendo assim uma alternativa para a diminuição da

resistência de ambos os fungos seria o aumento da concentração de peróxido de hidrogênio de 35 para 40% (p/p), principalmente para superfícies com contaminações maiores que 10^3 esporos/100cm².

Os problemas na utilização de altas concentrações de H₂O₂, principalmente para desinfecção do material destinado à produção de embalagens, são os vapores irritantes produzidos e o efeito que o residual de peróxido pode ter sobre o ácido ascórbico e outras vitaminas oxidáveis presentes no produto a ser envasado (Toledo, 1975).

4.10.7. Utilização do microscópio confocal para observação de esporos de *P. variotii* e *N. fischeri* tratados com H₂O₂

Os relatos sobre os efeitos do tratamento com peróxido de hidrogênio na estrutura do esporo fúngico são escassos. Mais freqüentes são os relatos da atuação do peróxido de hidrogênio na estrutura de esporos bacterianos, os quais são estruturalmente diferentes de esporos fúngicos.

Nenhuma alteração na morfologia dos esporos foi visível com o microscópio Confocal, sendo possível apenas observar alguns esporos com coloração alterada, o que poderia ser atribuída à permeabilização da capa do esporo ou presença de células mortas com conseqüente penetração do corante, porém, essa hipótese carece de maiores comprovações e precisa ser melhor estudada.

Nas figuras 43 e 44 (com utilização do recurso de zoom) são mostrados ascosporos de *N. fischeri* com 1 mês de idade que não foram

tratados com peróxido, onde observa-se muitos esporos com coloração verde na borda, que pode ser devido à presença de esporos viáveis. Nota-se também a presença de alguns esporos amarelo - alaranjados possivelmente relacionados a esporos mortos.

Esporos de bolores possuem uma parede grossa, assim como as células vegetativas dificultando sua coloração. Uma grande variedade de corantes são utilizados em Micologia, porém, muitos possuem uma baixa penetração da parede do esporo (Pitt & Hocking, 1985), o que pode ter ocorrido com o laranja de acridina, sendo assim outro corante deverá ser testado para melhor visualização dos esporos após testes com peróxido.

Na figura 45 são mostrados ascosporos de *N. fischeri* com 1 mês de idade tratados com 35% de H_2O_2 , onde os ascosporos com bordas verdes brilhantes e amarelas alaranjadas ainda predominam. A figura 46 mostra ascosporos de *N. fischeri* com 1 mês expostos a 40% de H_2O_2 , onde observa-se uma maior predominância da cor verde opaca e amarelo-alaranjada, sendo que alguns esporos estão totalmente preenchidos pelo corante. Com o microscópio Confocal não foi possível a observação de alterações morfológicas para os esporos tratados com o agente esterilizante. No entanto, no tratamento com 40% de peróxido observou-se uma maior permeação do corante quando o esporo está inativo, apresentando-se amarelo-alaranjado em toda a sua totalidade e não apenas nas bordas. Este fato pode ser um indicativo da alteração da permeabilidade da parede do esporo uma vez que houve uma significativa penetração do corante.

Os esporos de *Bacillus megaterium*, segundo Shin et al. (1994),

foram mortos sem lise ou perda de refratibilidade quando tratados com peróxido de hidrogênio em concentrações baixas, como 1% (p/p) a 50°C, mesmo após uma longa incubação, porém, quando a concentração do peróxido foi elevada para 15% a 60°C a morte foi precedida de lise. Neste trabalho, após duas horas de tratamento, observou-se a presença de grandes rupturas no complexo de membranas mais externas da capa do esporo.

Para uma melhor observação do efeito do peróxido na integridade da parede do esporo, o mais indicado seria a utilização da Microscopia Eletrônica de Transmissão que possui um alto poder de resolução permitindo a visualização da parede do esporo.

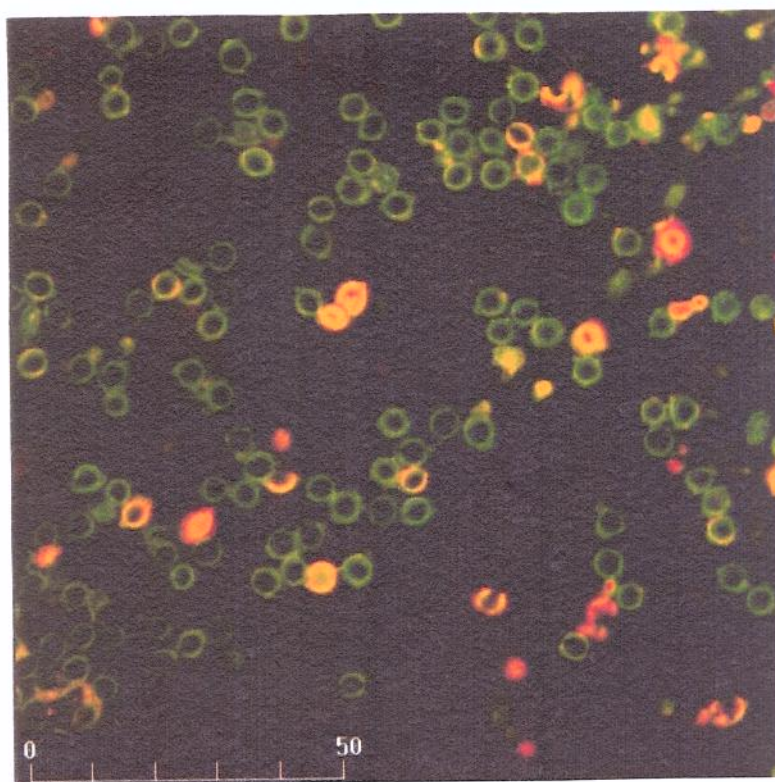


Figura 43. Ascosporos de *Neosartorya fischeri* (1 mês) sem exposição ao peróxido de hidrogênio (aumento de 1000 x)

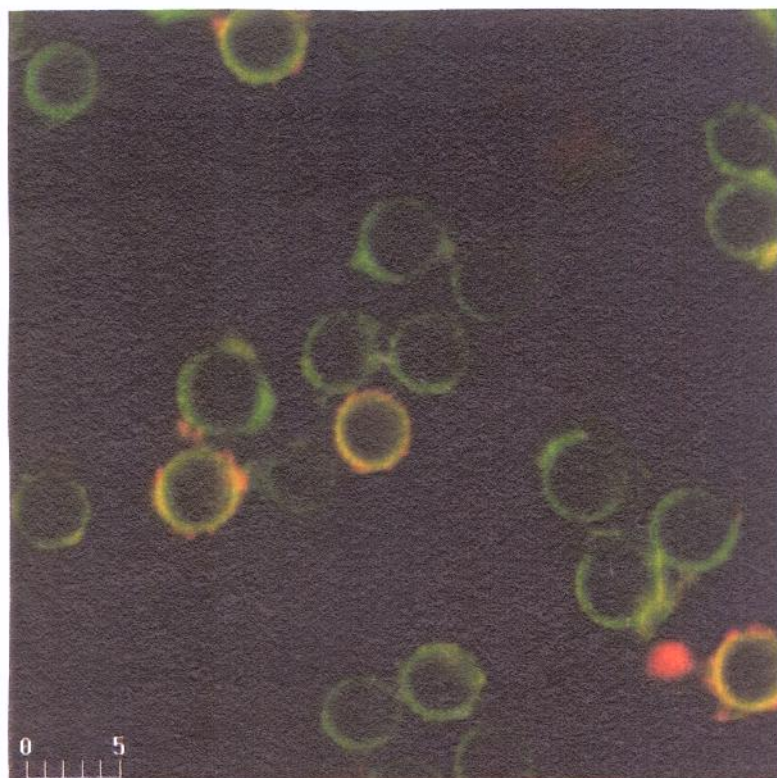


Figura 44. Ascosporos de *N. fischeri* (1 mês) sem tratamento com peróxido
(aumento + zoom = 3000x)

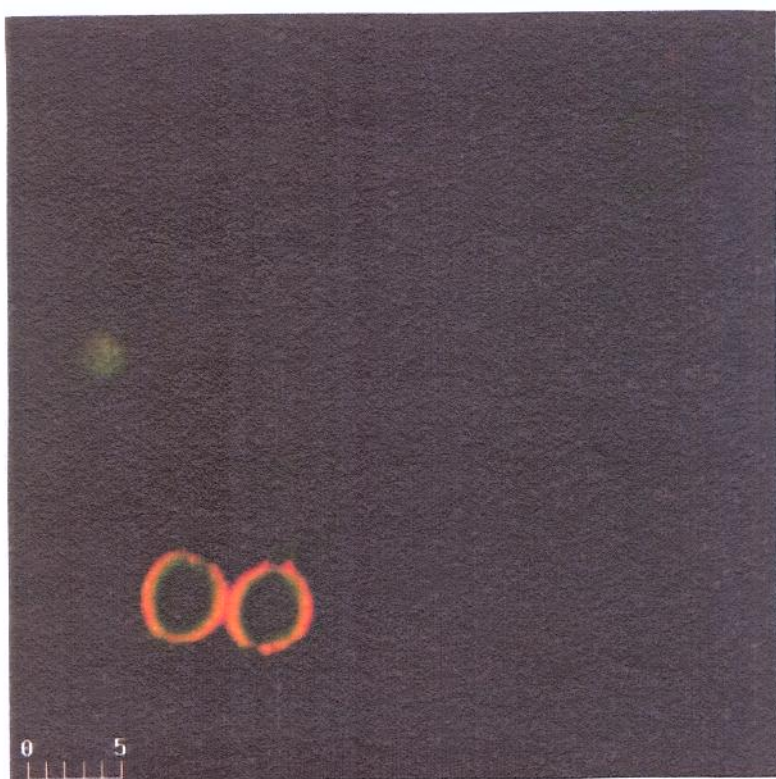


Figura 45. Ascosporos de *N. fischeri* (1 mês) expostos a 35% de peróxido a 70°C por 6 segundos (aumento + zoom = 3000x)

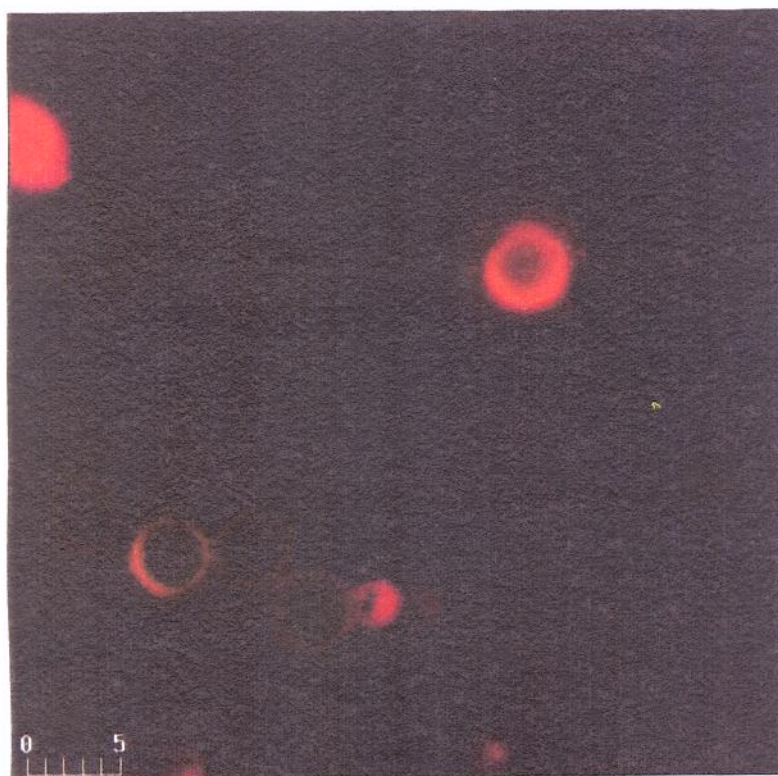


Figura 46. Ascosporos de *N. fischeri* (1 mês) expostos a 40% de peróxido a 70°C por 6 segundos (aumento + zoom = 3000x)

5. CONCLUSÕES

- 1- A contagem de bolores na superfície interna do laminado destinado à confecção de embalagens foi baixa (0,7 a 1,0/ 100cm²).
- 2- Somente duas amostras de um total de 24 (8%) para a indústria A e 1 de 44 amostras (2,2%) para a indústria B apresentaram contaminação por bolores.
- 3- O tratamento com peróxido (35%) a temperatura ambiente não foi eficiente para destruição dos esporos dos bolores *N.fischeri* e *P.variotii*. No entanto, causa 4 ou mais reduções logarítmicas nos fungos comuns.
- 4- Os valores de D são influenciados pelo aumento na concentração de peróxido para ambos os bolores estudados.
- 5- O bolor utilizado como controle, *Neosartorya fischeri* é conhecido como o mais termorresistente e foi também o mais resistente ao tratamento com peróxido de hidrogênio, porém, não foi isolado das embalagens utilizadas no trabalho.
- 6- Para *N. fischeri*, com 95% de significância, o efeito da temperatura no valor de D foi muito mais marcante na concentração de 35% de peróxido de hidrogênio do que em 40 e 45% . Com o aumento da concentração de peróxido de hidrogênio a diferença de comportamento da resistência se reduz para ambas as idades devido à interação idade *versus* peróxido.

- 7- Para *N.fischeri*, apenas a 40°C e nas concentrações de 35 e 40% de H₂O₂, foi possível observar a diferença de comportamento entre as idades. Nas temperaturas de 60 e 70°C e a 45% de H₂O₂, o efeito do peróxido foi tão grande para esse bolor que não houve diferença de comportamento entre as idades.
- 8- Para o bolor *P. variotii* as interações idade *versus* peróxido, idade *versus* temperatura e peróxido *versus* temperatura foram significativas (95%) na diminuição do valor de D, sendo que isso não ocorreu para cada parâmetro isoladamente.
- 9- Para esporos de *N. fischeri* (4 meses) aumentando a concentração de H₂O₂ de 35% para 40% a 70°C – 10 segundos, ocorre um aumento de 2,5 para 4,0 reduções logarítmicas. A variável concentração de peróxido foi altamente significativa a 95% para a diminuição de resistência desse bolor (p= 0,000002)
- 10- Considerando todos esses fatos e a incidência de bolores detectada, foi possível concluir que um tratamento de 6 segundos, 35% de H₂O₂ e 70°C deverá eliminar os bolores comuns e as formas esporuladas menos resistentes dos bolores termorresistentes, sendo adequada para contaminações de até 1 esporo/100cm². Para o caso de populações maiores ou de suspeita de formas altamente resistentes de esporos de bolores, um tratamento com 40% de H₂O₂ por 10 segundos de contato deverá assegurar uma baixa probabilidade de sobrevivência (10⁻⁴UFC/ml). Este último tratamento é viável pois deixa um residual de peróxido de hidrogênio inferior a 0,5 ppm.

- 11- O valor da resistência térmica pode ser estimado dentro das condições estabelecidas no presente estudo por relações quadráticas.
- 12- Sugerimos ainda que as bobinas contendo o material de embalagem destinado ao envase asséptico sejam sempre estocadas em local limpo , livre, principalmente, do contato com a matéria prima e que as bobinas estejam sempre bem protegidas com a embalagem secundária que as envolvem e que estas sejam somente abertas na sala de envase cujo ambiente deve ser monitorado rotineiramente para bolores, utilizando-se o método de exposição de placas. Estas sugestões são normalmente recomendadas pelo fabricante das embalagens, no entanto, os processadores nem sempre as seguem rigorosamente.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AHERN, H. Cellular responses to oxidative stress. American Society for Microbiology News, v.57, n. 12, p. 627-629, 1991.
2. ALASRI, A; VALVERDE, M; ROQUES, C; MICHEL, G; CABASSUD, C; APTEL, P. Sporicidal properties of peracetic acid and hydrogen peroxide, alone and in combination, in comparasion with chlorine and formaldehyde for ultrafiltration membrane disinfection. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, v.39, p.52-60, 1993.
3. ALDERTON,G; SNELL,N. Chemical States of Bacterial Spores: Heat resistance and its kinetics at intermediate water activity. Applied microbiology, V.19, n.4, p.565-572, april, 1970
4. ARAGÃO, M.F.G. Identificação e determinação da resistência térmica de fungos termorresistentes isolados de polpa de morango. Campinas, 1989. Tese de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas.
5. BAGLIONI, F. Estudo da ocorrência de fungos filamentosos termorresistentes em polpa de tomate envasada assepticamente. Campinas, 1998. 94p.Tese de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas.
6. BANNER, J.M; MATTICK, R.L; SPLITTSTOESSER, F.D. Chemical composition of the ascospores of *Byssochlamys fulva*. Journal of Food Science, Chicago, V.44, n.2, p.545-548, 1979.
7. BAULDRY, M.G.C. The bactericidal, fungicidal and sporicidal properties

- of hydrogen peroxide and peracetic acid. Journal of Applied Bacteriology, Oxford, v.54, p.417-423, 1983.
8. BAYLISS, C.E.; WAITES, W.M. Effect of simultaneous high intensity ultraviolet irradiation and hydrogen on bacterial spores. Journal Food Technology, Chicago, v. 17, p.467-470, 1982.
 9. BAYLISS, C.E.; WAITES, W.M. The effect of hydrogen peroxide and ultraviolet irradiation on non-sporing bacteria. Journal of Applied Bacteriology, Oxford, v.48, p.417-422, 1980.
 10. BAYLISS, C.E.; WAITES, W.M. The combined effect of Hydrogen peroxide and ultraviolet irradiation on bacterial spores. Journal of Applied Bacteriology, Oxford, v.47, p.263-269, 1979.
 11. BAYNE, G.H.; MICHENER, D.H. Heat resistance of *Byssochlamys* ascospores. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.37, n.3, p.449-453, 1979.
 12. BEUCHAT, L.R. Extraordinary heat resistance of *Talaromyces flavus* and *Neosartorya fischeri* ascospores in fruit products. Journal of Food Science, V.56, n.6, p.1506-1510, 1986.
 13. BEUCHAT, L.R. ; PITT, J.I. Detection and Enumeration of heat resistant molds. In: VANDERZANT, C. ; SPLITTSTOESSER, D.F. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 3^a edição, Washington, American Public Health Association, 1992. p.241-263.
 14. BEUCHAT, R.L. Survival of *Neosartorya fischeri* and *Talaromyces flavus* ascospores in fruit powders. Letters in Applied Microbiology, Oxford, v.14, p.238-240, 1992.
 15. BUCHEN, S.Y.; MARTH, E.H. Sporicidal action of hydrogen peroxide

- on conidia from toxigenic strains of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Journal of Food Protection, v.40, n.9, p.617-621, 1977.
16. BUNDGAARD- NIELSEN, K; NIELSEN, PER. V. Fungicidal effect of 15 disinfectants against 25 fungal contaminants commonly found in bread and cheese manufacturing. Journal of food protection. V. 59, n. 3, p. 268-275, 1995.
 17. CASELLA, A.L.M; MATASCI, F; SCHIMIDT-LORENZ, W. Influence of age, growth medium and temperature on heat resistance of *Byssoschlamys nivea* ascospores. Lebensmittel – Wissenschaft & Technologie. V.23, n.5, p. 404-411, 1990.
 18. CERF,O; HERMIER,J. Diversité de la résistance des spores de *Bacillus* à l'eau oxygénée. Le lait. Revue Générale des questions laitières. N.511-512, janvier-février, p.1-20, 1972.
 19. CONNER, D.E.;BEACHAT, L.R. Age – related changes in ultrastructure and chemical composition associated with changes in heat resistance of *Neosartorya fischeri* ascospores. Trans. British Mycological Society, v.89, n.4, p.539-550, 1987.
 20. CONNER, D.E.;BEACHAT, L.R. Heat resistance of ascospores of *Neosartorya fischeri* as affected by sporulation and heating medium. International Journal of Food Microbiology, Amsterdam, v.4 , p.303 - 312, 1987a.
 21. CONNER, D.E.; BEAUCHAT, L.R. Efficacy of media for promoting ascospore formation by *Neosartorya fischeri*, and the influence of age and culture temperature on heat resistance of ascospores. Food Microbiology, v.4, p.229-238,1987 b.

22. DOYLE, M.P.; MARTH, E.H. Thermal inactivation of conidia from *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Effects of moist heat, age of conidia, and sporulation medium. Journal of Milk Food Technology, Ames, v.38, n.11, p.678-682, 1975 a.
23. DOYLE, M.P.; MARTH, E.H. Thermal inactivation of conidia from *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Effects of pH and buffers, glucose, sucrose and sodium chloride. Journal of Milk and Food Technology, Ames, v. 38, n.12, p.750 -758, 1975b.
24. GIRARDIN, H.; LATGÉ, J.P. Comparison of *Neosartorya fischeri* varieties based on protein profiles and immunoactivities. In: SAMSON, R.A.; HOCKING, A.D.; PITT, J.I.; KING, D.A. Modern methods in food mycology. Amsterdam :Elsevier, 1992. p. 177-187.
25. GUMERATO, F. H. Desenvolvimento de um programa de computador para identificação de alguns fungos comuns em alimentos e determinação da resistência térmica de *Neosartorya fischeri* isolado de maçãs. Campinas, 1995. 106p. Tese de mestrado apresentada à faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade estadual de Campinas-UNICAMP.
26. HAMMAD, A. A. I; RAGAB, M. M.; ZAHER, E.A; SHAHIN, A . A .M. Effects of fungal infection and irradiation on high moisture sesame seeds. ASEAN Food Journal, v.10, n.4, p.119-124, 1995.
27. HOCKING, A . D. Fungal spoilage of high fat foods. Food Australia, v.46, n.1, p.30-33, 1994.
28. HOCKING, A. D, PITT, J.I. Food spoilage fungi.II. Heat resistant fungi. CSIRO Food Research Quarterly, V.44, n.4, p.73-82, 1984.

29. HORIKOSHI, K.; IIDA, S. Studies of the spore coats of fungi. Isolation and composition of the spore coats of *Aspergillus oryzae*. Biochimica et Biophysica Acta, v. 83, p.197-203, 1964.
30. INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS – ICMSF. Microorganisms in Foods. Characteristics of microbial pathogens, 1996, p.397 – 413.
31. ITO, K.A; DENNY, C.D; BROWN, C.K; YAO, M; SEEGER, M.L. Resistance of bacterial spores to Hydrogen Peroxide. Food Technology, Chicago, p. 58, 60 - 66, 1973.
32. JESENSKÁ, Z.; PIECKOVÁ, E.; SEPITKOVÁ, J. Thermoresistant propagules of *Neosartorya fischeri* some ecologic considerations. Journal of Food Protection, Ames, v.54, n.8,p.582-584, 1991.
33. KING JUNIOR, D. A. ; BAYNE,H.G. ALDERTON, G. Nonlogarithmic death rate calculations for *Byssoclamys fulva* and other microorganisms. Applied and environmental microbiology, v.37, N.3, p.596-600, 1979.
34. KING JUNIOR, D.A.; HALBROOK,W.U. Ascospore heat resistance and control measures for *Talaromyces flavus* isolated from fruit juice concentrate. Journal of Food Science, Chicago, v.52, n.5, 1987.
35. KING JUNIOR, D.A; WHITEHAND, C.L. Alteration of *Talaromyces flavus* heat resistance by growth conditions and heating medium composition. Journal of Food Science. Chicago, v.55, n.3, p. 830 – 836, 1990.
36. KLAPES, N.A; VESLEY, D. Vapor -Phase Hydrogen Peroxide as a Surface Decontaminant and Sterilant. Applied and Environmental

- Microbiology, Washington, v.56,n.2, p. 503-506, 1990.
37. KOTZEKIDOU, P. Heat resistance of *Byssochlamys nivea*, *Byssochlamys fulva* and *Neosartorya fischeri* isolated from canned tomato paste. Journal of Food Science, Chicago, v.62, n.2, p.410-412,437, 1997.
 38. LLABRÉS, C.M; ROSE, B.E. Antibacterial properties of retail sponges. Journal of food protection, v.52, p 49-50,54, Jan, 1989.
 39. LÜCK,H. Catalase. In: BERGMAYER, H.U. Methods of Enzymatic Analysis. 4ª edição, p.885-894, 1971.
 40. LUND, F; FILTENBORG,O; WESTALL,S; FRISVAD,J.C. Associated mycoflora of rye bread. Letters in Applied Microbiology, v.23, p.213-217, 1996.
 41. MADIGAN,M.T; MARTINKO,J.M; PARKER,J. Biology of microorganisms. Prentice Hall, USA, 8ª edição, 1997.
 42. MAGGI, A.; GOLA, S.; SPOTI, E.; ROVERE, P.; MUTTI, P. Trattamenti ad alta pressione di ascospore di muffe termoresistenti e di patulina in nettare di albicocca e in acqua. Industria conserve, Parma, anno 69, n.1, p.26-29, 1994.
 43. MCNEILLIE. A; BIESER, J . Hydrogen Peroxide uses for the year 2000. Food Processing, Chicago, p.59-63, 1993.
 44. MICHENER, D.H.; KING.JUNIOR, D. Preparation of free heat-resistant ascospores from *Byssochlamys* asci. Applied Microbiology, Washington,v.27, n.4, p.671-673, 1974.
 45. NIELSEN, K.B, NIELSEN, P.V. Fungicidal effect of 15 disinfectants against 25 fungal contaminants commonly found in bread and cheese manufacturing. Journal of Food Protection, Ames, v.59, n.3, p.268-

46. NIELSEN, P.V.; BEUCHAT, L.R.; FRISVAD, J.C. Influence of atmospheric oxygen content on growth and fumitremorgin production by a heat resistant mold, *Neosartorya fischeri*. Journal of Food Science, Chicago, v.54, n.3, p. 679-682, 1989.
47. NIELSEN, P.V.; SAMSON, R.A. Differentiation of Food Borne Taxa of *Neosartorya*. In: SAMSON,R.A; HOCKING, A.D; PITT, J.I; KING, D.A. Modern methods in food mycology.Amsterdam: Elsevier,1992. p.159-168.
48. NIELSEN, P.V; BEACHAUT, L.R; FRISVAD, J.C. Influence of atmospheric Oxygen Content on Growth and Fumitremorgin Production by a Heat- resistant Mold, *Neosartorya fischeri*, Journal of Food Science , Chicago, v.54, n.3, p.679-682,1989.
49. NIELSEN-BUNDGAARD, K.; NIELSEN, V. Fungicidal effect of 15 disinfectants against 25 fungal contaminants commonly found in bread and cheese manufacturing. Journal of Food Protection, Ames, v.59,n.3, p.268-275, 1995.
50. OLIVEIRA, L.M; PADULA, M.. Novas Tecnologias de acondicionamento de alimentos: embalagens flexíveis e semi rígidas - INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS – ITAL - Centro de Tecnologia de Embalagem de alimentos - CETEA / SPCTA, Campinas, 1988.
51. OLIVEIRA, C.G.L.- TETRAPAK LTDA - Centro de Treinamento – Departamento de Engenharia . Cap. Peróxido de Hidrogênio, p.113-123, 1988 (Catálogo).

52. PAPA, F.; ZAMBONELLI, C.; GRAZIA, L. L'uso dei raggi ultravioletti per il controllo dell'ammuffimento dei salumi. Industrie alimentari, Pinerolo, v.34, 1995.
53. PARKER, B.J; VENESS, R.G; EVANS,C.S. A biochemical mechanism whereby *paecilomyces variotii* can overcome the toxicity of the wood protectant, borate. Enzyme and Microbial Technology, v.24, n.7,p.402-406, May, 1999
54. PECORELLI,S; ROSMINI,M.R; CABRERA,A; MOREYRA,E; OTERO,J. Comparacion de tres procedimientos de muestreos para el analisis microbiologico de superficies. Fleischwirtsch. Español, v. 1 p. 36-38, 1993.
55. PETERSON, S.W. *Neosartorya pseudofischeri* sp. nov. and its relationship to other species in *Aspergillus* section *fumigati*. Mycology Research , Great Britain, v. 96, n. 7, p. 547-557, 1992
56. PETTIPHER, G.L; MANSELL,R; Mc KUNRON,C.H; CONSURIS,C.M. Rapid membrane filtration epifluorescent microscopy technique for direct enumeration of bacteria in raw milk. Applied and environmental microbiology. V.39,n.2,p.423-429, 1980.
57. PITT, J.I; HOCKING, A . Fungi and food spoilage. Academic Press, Sydney, 413 p, 1985.
58. POPHAM, D.L; SENGUPTA, S; SETLOW, P. Heat, Hydrogen Peroxide, and UV resistance of *Bacillus subtilis* spores with increased core water content and with or without major DNA- binding Proteins. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.61,n. 10, p.3633- 3638, 1995.

59. PUT, H.M.C.; DE JONG, J. The resistance of ascospores of four *Saccharomyces* spp. Isolated from spoiled heat-processed soft drinks and fruit products. Journal of Applied Bacteriology, Oxford, v.52, p.235-243, 1982.
60. 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.
61. REED, G. Food Science and Technology. A series of monographs. 2^a ed. Academic Press, New York, 1975.
62. RICE, S.L. Patulin production by *Byssochlamys* spp. In canned grape juice. Journal of Food Science, v.45, p.485-488, 495, 1980.
63. ROITMAM, I; TRAVASSOS, L,R; AZEVEDO, J.L. Tratado de Microbiologia. Capítulo 5: Controle do desenvolvimento microbiano em alimentos. Editora Manole. V.1, p.58, 1988.
64. ROSE,^aH. Food Microbiology. Economic Microbiology, v.8, Academic Press, Oxford, Great Britain, p. 101, 1983
65. SAMSON, R.A; HOEKSTRA, R.S.E; HARTOG, B.J. Influence of pretreatment of raspberry pulp on the detection of heat resistant moulds.In: SAMSON,R.A; HOCKING, A.D; PITT, J.I; KING, D.A. Modern methods in food mycology, Amsterdam: Elsevier, p.155-158, 1992.
66. SAMSON, R.A; van REENEN HOEKSTRA, E.S. Introduction to food micology. 3 ed., p. 202-203, 1988
67. SCOTT,V.N; BERNARD, D.T. Heat resistance of *Talaromyces flavus* and

Neosartorya fischeri isolated from commercial fruit juices. Journal of food Protection, v.50, n.1, p.18-20, january, 1987

68. SENSIDONI,A; RONDININI,G; PERESSINI,D; MAIFRENI, M; BORTOLOMEAZZI,R. Presence of na off – flavor associated with the use of sorbates in cheese and margarine. Italian Journal of Food Science, v.6, n.2, p.237-242, 1994.
69. SETLOW, B; SETLOW, P. Binding of small, acid-soluble spore proteins to DNA plays a significant role in the resistance of *Bacillus subtilis* spores to Hydrogen Peroxide. Applied and Environmental microbiology, Washington, v.59,n.10, p.3418-3423, 1993.
70. SHIN, Y.S; CALVISI, E.G; BEAMAN, T.C; PANKRATZ, S.H; GERHARDT, P; MARQUIS, E.R. Microscopic and Thermal Characterization of Hydrogen Peroxide Killing and Lysis of Spores and Protection by Transition Metal Ions, Chelators, and Antioxidants. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.60, n.9, p.3192-3197, 1994.
71. SMILANICK, J.L.; MARGOSAN, D.A.; HENSON, D.J. Evaluation of Heated Solutions of sulfur dioxide, ethanol, and hydrogen peroxide to control postharvest green mold lemons. Plant disease, St. Paul, v.79,n.7,p.742-747, 1995.
72. SMITH, D.; ONIONS, A.H.S. The preservation and maintenance of living fungi. Commonwealth Mycological Institute, England, 51p, 1983.

73. SMITH, Q.J; BROWN, K.L. The resistance of dry spores of *Bacillus subtilis* var. *globigii* (NCIB 8058) to solutions of hydrogen peroxide in relation to aseptic packaging. Journal Food Technology, Chicago, v.15, p.169-179, 1980.
74. SPLITTSTOESSER, D.F.; CADWELL, C.M.; MARTIN, M. Ascospore production by *Byssochlamys fulva*. Journal of Food Science, Chicago, v.34, p.248-250, 1969.
75. SPLITTSTOESSER, D.F. Heat resistant molds potential spoilers of apple products. New York Agriculture Experimental Station, v.7, n.7, 1978.
76. SPLITTSTOESSER, D.F.; NIELSEN, P.V.; CHUREY, J.J. Detection of viable ascospores of *Neosartorya*. Journal of Food Protection, v.56, n.7, p.599-603, 1993.
77. SPLITTSTOESSER, D.F.; WILKISON, M.; HARRISON, W. Heat activation of *Byssochlamys fulva* ascospores. Journal Milk Food Technology, Ames, v.35, n.7, p.399-401, 1972.
78. SPLITTSTOESSER, D.F.; CHUREY, J.J. Reduction of heat resistance of *Neosartorya fischeri* ascospores by sulfur dioxide..Journal of Food Science, Chicago, v.56, n.3, p.876 - 877, 1991.
79. SPLITTSTOESSER, F.D.; SPLITTSTOESSER, M.C. Ascospores of *Byssochlamys fulva* compared with those of a heat resistant *Aspergillus*. Journal of Food Science, Chicago, v.42, n.3, p.685 – 688, 1977.
80. SPOTTI, E.; CASOLARI, A . Indagine sul contenuto di catalasi di muffe gasogene e altri microrganismi.. Industria Conserve, v. 62, p.22-24, 1987.

81. STANNARD, J.C; ABBISS, S.J.; WOOD, M.J. Combined treatment with hydrogen peroxide and ultra-violet irradiation to reduce microbial contamination levels in pre-formed food packaging cartons. Journal of Food Protection, Ames, v.46, n.12,p.1060-1064, 1983.
82. STEVENSON, K.E; SHAFER, B.D. Bacterial spore resistance to hydrogen peroxide. Food Technology, Chicago, p.111-114, 1983.
83. STRICKER, R.,ROMAILLER,G.,TURIAN.,TZANOS, D. Production et applications alimentaires d'un pigment jaune hydrosoluble d'origine fongique (*Epicoccum nigrum* Link).Lebensm.Wiss.u. – Technol, v.14, p.18-20, 1981.
84. STUMBO, C.R. Thermobacteriology in Food Processing, 2^a ed.Academic Press, New York, 1973.
85. SU,W; BEUCHAT,L.R. Combined effect of growth medium age of cells and phase of sporulation on heat resistance and recovery of *Hansenula anomala*. Mycophatologia, v.87, p.129-134, 1984.
86. SURESH, E. R.; ETHIRAJ, S.; JAYARAM,H.L. Heat resistance of *Neosartorya fischeri* isolated from grapes. Journal of Food Science and Technology, v.33, n.1, p.76-78, 1996.
87. SUSSMAN, A .S; DOUTHIT,H.A. Dormancy in microbial spores. Annual review of plant physiology, v.24, p. 311-352, 1973
88. SVEUM, W.H.; MOBERG, L.J.; RUDE, R.A.; FRANK, J.F. Microbiological monitoring of the processing environment. In: VANDERZANT,C.; SPLITTSTOESSER,D.F.; Compendium of Methods for the microbiological examination of foods. 3^a ed., Washington, 1992. p. 51-61.

89. SVEUM, W.H.; MOBERG, L.J.; RUDE, R.A.; FRANK, J.F.
Microbiological monitoring of the processing environment. In:
VANDERZANT,C.; SPLITTSTOESSER,D.F.; Compendium of
Methods for the microbiological examination of foods. 3^a ed.,
Washington, 1992. p. 51-61.
90. SWARTLING,P; LINDGREN,B. The sterilizing effect against *Bacillus subtilis* spores of hydrogen peroxide at different temperatures and concentrations. Journal of Dairy Research, v.35, p.423-428, 1968.
91. TOLEDO, R.T. Chemical Sterilants for Aseptic Packaging. Food Technology, Chicago, p.102-112, 1975.
92. TOLEDO, R.T. Overview of Sterilization Methods for Aseptic Packaging Materials.In : HOTCHKISS,H.J. Food and Packaging interactions, Washington, DC: American Chemical Society, 1988. Cap.8, p.94-105.
93. TOLEDO, R.T.; ESCHER,F.E; AYRES,J.C. Sporicidal Properties of Hydrogen Peroxide against food spoilage organisms. Applied Microbiology, Washington, v.26, p.592-597, 1973.
94. TOURNAS, V. Heat resistant Fungi of Importance to the Food and Beverage Industry. Critical Reviews in Microbiology, Cleveland, v.20, n.4, p.243-263, 1994.
95. TOURNAS, V.; TRAXLER, R.W. Heat resistance of *Neosartorya fischeri* Strain Isolated from pineapple Juice Frozen concetrade. Journal of Food Protection, Ames, v.57, n.9, p.814-816,1994.
96. TSUCHIDA, Y; TSUCHIDO, T. Sensitivities to hydrogen peroxide vapor of intact and decoated spores of *Bacillus subtilis* as influenced by divalent cations supplemented in sporulation medium. Biocontrol

science, v.2, n.1, p.19-26, 1997.

97. WHITFIELD, F.B; HILL,J.L, SHAW,K.J. 2,4,6- tribromoanisole: a potential cause of mustiness in packaged food. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 45, n.3, p.889-893, 1997.
98. VÄRNAMO, T.F. Tetrapak International Sales Support Box 61. Aseptic Packaging Processing, Sweden, 1982
99. VICINI, E; BARBUTI, S; SPOTTI, E ; CAMPANINI, M; CASTELVETRI, F; GOLA,S; MANGANELLI,E; CASOLARI,A. Alterazione di succhi di frutta determinata da muffe gasogene. Industria conserve, Parma,V.58, p.238, 1983.
100. VON BOCKELMANN, B.- A collection of lectures from Tetra Pak Seminars - Aseptic Packaging Processing., Lund, Sweden, 1982.
101. VON BOCKELMANN, B. H; BOCKELMANN VON, I.L.I. Aseptic packaging of liquid food products. A literature review. Journal of Agriculture and food chemistry, v. 34, p. 384-392, 1986.

APÊNDICE 1

**Identificação pelo programa Fung-Hom dos fungos
isolados da embalagem**

F1A1

Fungo isolado de swab com 20 ml de diluente (água peptonada 0.1%) e esponja de celulose (3M). Coleta do dia 25/3/98 na Arisco. A sub cultura foi feita em meio MA.

Unknown fungus "F1A1" was identified like *Paecilomyces variotii* with probability = 95%

No.	Micro and macro morphological characteristics	Readings results
1	Colony on CYA 25C Absent (+/-)	[-] Expected
2	Colony on CYA 25C convex (+/-)	[-] Expected
3	Colony on CYA 25C dense (+/-)	[-] Expected
4	Colony on CYA 25C very dense (+/-)	[-] Expected
5	Colony on CYA 25C low (+/-)	[-] Expected
6	Colony on CYA 25C mucoid (+/-)	[-] Expected
7	Colony on CYA 25C radially sulcate (+/-)	[-] Expected
8	Colony on CYA 25C strictly velutinous or velutinous (+/-)	[-] Expected
9	Colony on CYA 25C surface appearing powdery (+/-)	[-] Expected
10	Asci on CYA 25C [N]ot found or long (µm)	[N] Expected
11	Asci on CYA 25C width (µm)	[-] Expected
12	Ascospores on CYA 25C [N]ot found or long (µm)	[N] Expected
13	Ascospores on CYA 25C width (µm)	[-] Expected
14	Cleistothecia on CYA 25C [N]ot found or if spherical diam um	[N] Expected
15	Cleistothecia on CYA 25C [N]ot found or if elongate long um	[-] Expected
16	Gymnothecia on CYA 25C [N]ot found or diam um	[-] Expected
17	Conidia on CYA 25C [N]ot found or long (µm)	[4.0] Expected
18	Conidia on CYA 25C width (µm)	[2.4] Expected
19	Conidia on CYA 25C with rough walls (+/-)	[-] Expected
20	Conidia on CYA 25C with smooth walls (+/-)	[+] Expected
21	Conidia on CYA 25C with spinose walls (+/-)	[-] Expected
22	Conidia on CYA 25C with thick walls (+/-)	[-] Expected
23	Conidia on CYA 25C with thin walls (+/-)	[-] Expected
24	Conidia on CYA 25C barrel-shaped (+/-)	[-] Expected
25	Conidia on CYA 25C spherical or spheroidal or subspheroidal (+/-)	[-] Expected
26	Conidiogenesis on CYA 25C ligh (+/-)	[-] Expected
27	Conidiogenesis on CYA 25C moderate (+/-)	[-] Expected
28	Phialides per metulae on CYA 25C [N]ot found or number (1 to 99)	[1] Unknown
29	Phialides on CYA 25C long (µm)	[14] Expected
30	Phialides on CYA 25C width (µm)	[1.8] Unexpected
31	Phialides on CYA 25C with smooth walls (+/-)	[+] Unexpected
32	Phialides on CYA 25C ampulliform (+/-)	[-] Expected
33	Metulae per verticil on CYA 25C [A]bsent or number (1 to 99)	[A] Unknown
34	Metulae on CYA 25C long (µm)	[-] Unknown
35	Metulae on CYA 25C width (µm)	[-] Unknown
36	Vesicles on CYA 25C [N]ot found or if spherical diam (µm)	[N] Expected
37	Vesicles on CYA 25C spherical or spheroidal or subspheroidal (+/-)	[-] Expected
38	Stipes on CYA 25C [N]ot found or width (µm)	[1.8] Expected
39	Stipes on CYA 25C with smooth walls (+/-)	[+] Unexpected
40	Stipes on CYA 25C with thin walls (+/-)	[-] Expected
41	Penicilli on CYA 25C irregularly verticillate (+/-)	[+] Expected
42	Sclerotia on CYA 25C [N]ot found or long (µm)	[N] Unknown
43	Sclerotia on CYA 25C width (µm)	[-] Unknown

**Unknown fungus "F1A1" was identified like *Paecilomyces variotii*
with probability = 95%**

No.	Micro and macro morphological characteristics	Readings results
44	Asci on CYA 30C [N]ot found or diam (µm)	[-] Expected
45	Ascospores on CYA 30C [N]ot found or long (µm)	[N] Expected
46	Ascospores on CYA 30C width (µm)	[-] Expected
47	Ascospores on CY20S 25C [N]ot found or long (µm)	[N] Expected
48	Ascospores on CY20S 25C width (µm)	[-] Expected
49	Cleistothecia on CY20S 25C [N]ot found or diam (µm)	[-] Expected
50	Conidia on CY20S 25C [N]ot found or long (µm)	[U] Missing datum
51	Conidia on CY20S 25C width (µm)	[U] Missing datum
52	Phialides on CY20S 25C [N]ot found or long (µm)	[U] Missing datum
53	Vesicles on CY20S 25C [N]ot found or diam (µm)	[-] Unknown
54	Colony on G25N 25C Absent (+/-)	[-] Expected
55	Colony on G25N 25C dense (+/-)	[-] Expected
56	Colony on G25N 25C low (+/-)	[+] Unexpected
57	Colony on G25N 25C plane (+/-)	[-] Unexpected
58	Ascospores on G25N 25C [N]ot found or long (µm)	[N] Expected
59	Ascospores on G25N 25C width (µm)	[-] Expected
60	Cleistothecia on G25N 25C [N]ot found or diam (µm)	[N] Expected
61	Conidia on G25N 25 C [N]ot found or diam (µm)	[U] Missing datum
62	Phialides on G25N 25 C [N]ot found or long (µm)	[U] Missing datum
63	Vesicles on G25N 25 C [N]ot found or diam (µm)	[U] Missing datum

F2A6

Fungo isolado de Swab no dia 27/5/98. Meio de sub cultura em PDA com desenvolvimento de uma colônia (DELGADO).

CYA, 25°C, 7 d: Colônia com 68 mm de diâmetro verde azul, com centro diferenciado, plana e lanosa, com bordo branco e fino. Com exudado hialino e sem pigmento solúvel. Reverso incolor.

CY20S, 25°C, 7 d: Colônia com 64 mm de diâmetro semelhante àquela formada em meio CYA, porém sem exudado e reverso mais amarelo e sem pigmento solúvel.

G25N, 25°C, 7 d: Colônia com 12 mm de diâmetro, baixa, plana, esparsa, lisa e não densa. Conidiogênese fraca. Sem exudado e sem pigmento solúvel. Reverso incolor.

Não apresentou estado teleomórfico.

Saída do programa **FUNG-HOM**:

Unknown fungus "F2A6" was identified like *Aspergillus parasiticus* with probability = 98.94%

No.	Micro and macro morphological characteristics	Readings results
1	Colony on CYA 25C Absent (+/-)	[-] Expected
2	Colony on CYA 25C convex (+/-)	[-] Expected
3	Colony on CYA 25C dense (+/-)	[+] Expected
4	Colony on CYA 25C very dense (+/-)	[-] Expected
5	Colony on CYA 25C low (+/-)	[-] Unexpected
6	Colony on CYA 25C mucoid (+/-)	[-] Expected
7	Colony on CYA 25C radially sulcate (+/-)	[-] Expected
8	Colony on CYA 25C strictly velutinous or velutinous (+/-)	[-] Unexpected
9	Colony on CYA 25C surface appearing powdery (+/-)	[-] Expected
10	Asci on CYA 25C [N]ot found or long (µm)	[N] Expected
11	Asci on CYA 25C width (µm)	[-] Expected
12	Ascospores on CYA 25C [N]ot found or long (µm)	[N] Expected
13	Ascospores on CYA 25C width (µm)	[-] Expected
14	Cleistothecia on CYA 25C [N]ot found or if spherical diam um	[N] Expected
15	Cleistothecia on CYA 25C [N]ot found or if elongate long um	[-] Expected
16	Gymnothecia on CYA 25C [N]ot found or diam um	[-] Expected
17	Conidia on CYA 25C [N]ot found or long (µm)	[2.4] Unexpected
18	Conidia on CYA 25C width (µm)	[2.4] Unexpected
19	Conidia on CYA 25C with rough walls (+/-)	[+] Expected
20	Conidia on CYA 25C with smooth walls (+/-)	[-] Expected
21	Conidia on CYA 25C with spinose walls (+/-)	[-] Expected
22	Conidia on CYA 25C with thick walls (+/-)	[-] Expected
23	Conidia on CYA 25C with thin walls (+/-)	[-] Expected
24	Conidia on CYA 25C barrel-shaped (+/-)	[-] Expected
25	Conidia on CYA 25C spherical or spheroidal or subspheroidal (+/-)	[+] Expected
26	Conidiogenesis on CYA 25C ligh (+/-)	[-] Expected
27	Conidiogenesis on CYA 25C moderate (+/-)	[+] Unexpected
28	Phialides per metulae on CYA 25C [N]ot found or number (1 to 99)	[99] Unknown
29	Phialides on CYA 25C long (µm)	[4.8] Unexpected

**Unknown fungus "F2A6" was identified like *Aspergillus parasiticus*
with probability = 98.94%**

No.	Micro and macro morphological characteristics	Readings results
30	Phialides on CYA 25C width (μm)	[1.6] Unexpected
31	Phialides on CYA 25C with smooth walls (+/-)	[+] Unexpected
32	Phialides on CYA 25C ampulliform (+/-)	[+] Unexpected
33	Metulae per verticil on CYA 25C [A]bsent or number (1 to 99)	[A] Expected
34	Metulae on CYA 25C long (μm)	[-] Unknown
35	Metulae on CYA 25C width (μm)	[-] Unknown
36	Vesicles on CYA 25C [N]ot found or if spherical diam (μm)	[20] Expected
37	Vesicles on CYA 25C spherical or spheroidal or subspheroidal (+/-)	[+] Expected
38	Stipes on CYA 25C [N]ot found or width (μm)	[8] Unknown
39	Stipes on CYA 25C with smooth walls (+/-)	[+] Expected
40	Stipes on CYA 25C with thin walls (+/-)	[+] Unexpected
41	Penicilli on CYA 25C irregularly verticillate (+/-)	[-] Expected
42	Sclerotia on CYA 25C [N]ot found or long (μm)	[N] Unknown
43	Sclerotia on CYA 25C width (μm)	[-] Unknown
44	Asci on CYA 30C [N]ot found or diam (μm)	[-] Expected
45	Ascospores on CYA 30C [N]ot found or long (μm)	[N] Expected
46	Ascospores on CYA 30C width (μm)	[-] Expected
47	Ascospores on CY20S 25C [N]ot found or long (μm)	[N] Expected
48	Ascospores on CY20S 25C width (μm)	[-] Expected
49	Cleistothecia on CY20S 25C [N]ot found or diam (μm)	[-] Expected
50	Conidia on CY20S 25C [N]ot found or long (μm)	[U] Missing datum
51	Conidia on CY20S 25C width (μm)	[U] Missing datum
52	Phialides on CY20S 25C [N]ot found or long (μm)	[U] Missing datum
53	Vesicles on CY20S 25C [N]ot found or diam (μm)	[U] Missing datum
54	Colony on G25N 25C Absent (+/-)	[-] Expected
55	Colony on G25N 25C dense (+/-)	[-] Expected
56	Colony on G25N 25C low (+/-)	[+] Expected
57	Colony on G25N 25C plane (+/-)	[+] Expected
58	Ascospores on G25N 25C [N]ot found or long (μm)	[N] Expected
59	Ascospores on G25N 25C width (μm)	[-] Expected
60	Cleistothecia on G25N 25C [N]ot found or diam (μm)	[N] Expected
61	Conidia on G25N 25 C [N]ot found or diam (μm)	[U] Missing datum
62	Phialides on G25N 25 C [N]ot found or long (μm)	[U] Missing datum
63	Vesicles on G25N 25 C [N]ot found or diam (μm)	[U] Missing datum

Matched expected pairs= 40 Matched unexpected pairs= 10
Matched unknown pairs= 6 Missing characteristics = 7

Unknown fungus "F4E2" was identified as closely as *Penicillium decumbens* with probability > 90%

No.	Micro and macro morphological characteristics	Readings results
1	Colony on CYA 25C Absent (+/-)	[-] Expected
2	Colony on CYA 25C convex (+/-)	[-] Expected
3	Colony on CYA 25C dense (+/-)	[+] Expected
4	Colony on CYA 25C very dense (+/-)	[-] Expected
5	Colony on CYA 25C low (+/-)	[+] Expected
6	Colony on CYA 25C mucoid (+/-)	[-] Expected
7	Colony on CYA 25C radially sulcate (+/-)	[-] Expected
8	Colony on CYA 25C strictly velutinous or velutinous (+/-)	[-] Expected
9	Colony on CYA 25C surface appearing powdery (+/-)	[-] Expected
10	Asci on CYA 25C [N]ot found or long (um)	[N] Expected
11	Asci on CYA 25C width (um)	[-] Expected
12	Ascospores on CYA 25C [N]ot found or long (um)	[N] Expected
13	Ascospores on CYA 25C width (um)	[-] Expected
14	Cleistothecia on CYA 25C [N]ot found or if spherical diam um	[N] Expected
15	Cleistothecia on CYA 25C [N]ot found or if elongate long um	[-] Expected
16	Gymnothecia on CYA 25C [N]ot found or diam um	[-] Expected
17	Conidia on CYA 25C [N]ot found or long (um)	[2.0] Unexpected
18	Conidia on CYA 25C width (um)	[2.0] Expected
19	Conidia on CYA 25C with rough walls (+/-)	[-] Expected
20	Conidia on CYA 25C with smooth walls (+/-)	[+] Expected
21	Conidia on CYA 25C with spinose walls (+/-)	[-] Expected
22	Conidia on CYA 25C with thick walls (+/-)	[-] Expected
23	Conidia on CYA 25C with thin walls (+/-)	[-] Expected
24	Conidia on CYA 25C barrel-shaped (+/-)	[-] Expected
25	Conidia on CYA 25C spherical or spheroidal or subspheroidal (+/-)	[+] Unexpected
26	Conidiogenesis on CYA 25C ligth (+/-)	[-] Expected
27	Conidiogenesis on CYA 25C moderate (+/-)	[-] Expected
28	Phialides per metulae on CYA 25C [N]ot found or number (1 to 99)	[5] Expected
29	Phialides on CYA 25C long (um)	[5.6] Unexpected
30	Phialides on CYA 25C width (um)	[1.5] Unexpected
31	Phialides on CYA 25C with smooth walls (+/-)	[-] Expected
32	Phialides on CYA 25C ampulliform (+/-)	[-] Unexpected
33	Metulae per verticil on CYA 25C [A]bsent or number (1 to 99)	[A] Expected
34	Metulae on CYA 25C long (um)	[-] Unknown
35	Metulae on CYA 25C width (um)	[-] Unknown
36	Vesicles on CYA 25C [N]ot found or if spherical diam (um)	[N] Expected
37	Vesicles on CYA 25C spherical or spheroidal or subspheroidal (+/-)	[-] Expected
38	Stipes on CYA 25C [N]ot found or width (um)	[2.4] Expected
39	Stipes on CYA 25C with smooth walls (+/-)	[+] Expected
40	Stipes on CYA 25C with thin walls (+/-)	[+] Expected
41	Penicilli on CYA 25C irregularly verticillate (+/-)	[-] Expected
42	Sclerotia on CYA 25C [N]ot found or long (um)	[N] Unknown
43	Sclerotia on CYA 25C width (um)	[-] Unknown
44	Asci on CYA 30C [N]ot found or diam (um)	[-] Expected
45	Ascospores on CYA 30C [N]ot found or long (um)	[N] Expected
46	Ascospores on CYA 30C width (um)	[-] Expected
47	Ascospores on CY20S 25C [N]ot found or long (um)	[N] Expected
48	Ascospores on CY20S 25C width (um)	[-] Expected
49	Cleistothecia on CY20S 25C [N]ot found or diam (um)	[-] Expected

Unknown fungus "F4E2" was identified as closely as *Penicillium decumbens* with probability > 90%

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

Matched expected pairs= 47 Matched unexpected pairs= 5
 Matched unknown pairs= 4 Missing characteristics = 7

F5E2

Saída do programa FUNG-HOM:

Unknown fungus "F5E2" was identified like *Talaromyces flavus* with probability = 99 %

No.	Micro and macro morphological characteristics	Readings results
1	Colony on CYA 25C Absent (+/-)	[-] Expected
2	Colony on CYA 25C convex (+/-)	[-] Expected
3	Colony on CYA 25C dense (+/-)	[+] Expected
4	Colony on CYA 25C very dense (+/-)	[-] Expected
5	Colony on CYA 25C low (+/-)	[+] Expected
6	Colony on CYA 25C mucoid (+/-)	[-] Expected
7	Colony on CYA 25C radially sulcate (+/-)	[-] Expected
8	Colony on CYA 25C strictly velutinous or velutinous (+/-)	[-] Expected
9	Colony on CYA 25C surface appearing powdery (+/-)	[-] Expected
10	Asci on CYA 25C [N]ot found or long (um)	[8.0] Expected
11	Asci on CYA 25C width (um)	[8.0] Expected
12	Ascospores on CYA 25C [N]ot found or long (um)	[4.8] Expected
13	Ascospores on CYA 25C width (um)	[3.2] Expected
14	Cleistothecia on CYA 25C [N]ot found or if spherical diam um	[N] Unknown
15	Cleistothecia on CYA 25C [N]ot found or if elongate long um	[-] Unknown
16	Gymnothecia on CYA 25C [N]ot found or diam um	[200] Expected
17	Conidia on CYA 25C [N]ot found or long (um)	[4.0] Expected
18	Conidia on CYA 25C width (um)	[1.8] Expected
19	Conidia on CYA 25C with rough walls (+/-)	[-] Expected
20	Conidia on CYA 25C with smooth walls (+/-)	[-] Expected
21	Conidia on CYA 25C with spinose walls (+/-)	[-] Expected
22	Conidia on CYA 25C with thick walls (+/-)	[-] Expected
23	Conidia on CYA 25C with thin walls (+/-)	[-] Expected
24	Conidia on CYA 25C barrel-shaped (+/-)	[-] Expected
25	Conidia on CYA 25C spherical or spheroidal or subspheroidal (+/-)	[-] Expected
26	Conidiogenesis on CYA 25C ligh (+/-)	[-] Expected
27	Conidiogenesis on CYA 25C moderate (+/-)	[-] Expected
28	Phialides per metulae on CYA 25C [N]ot found or number (1 to 99)	[5] Expected
29	Phialides on CYA 25C long (um)	[10] Expected
30	Phialides on CYA 25C width (um)	[1.8] Unexpected
31	Phialides on CYA 25C with smooth walls (+/-)	[-] Expected
32	Phialides on CYA 25C ampulliform (+/-)	[-] Expected
33	Metulae per verticil on CYA 25C [A]bsent or number (1 to 99)	[3] Expected
34	Metulae on CYA 25C long (um)	[9.5] Unexpected
35	Metulae on CYA 25C width (um)	[2.5] Unexpected
36	Vesicles on CYA 25C [N]ot found or if spherical diam (um)	[N] Expected
37	Vesicles on CYA 25C spherical or spheroidal or subspheroidal (+/-)	[-] Expected
38	Stipes on CYA 25C [N]ot found or width (um)	[2.3] Unexpected
39	Stipes on CYA 25C with smooth walls (+/-)	[+] Expected
40	Stipes on CYA 25C with thin walls (+/-)	[+] Unexpected
41	Penicilli on CYA 25C irregularly verticillate (+/-)	[-] Expected
42	Sclerotia on CYA 25C [N]ot found or long (um)	[N] Unknown
43	Sclerotia on CYA 25C width (um)	[-] Unknown
44	Asci on CYA 30C [N]ot found or diam (um)	[U] Missing datum

Unknown fungus "F5E2" was identified like *Talaromyces flavus* with probability = 99 %

No.	Micro and macro morphological characteristics	Readings results
45	Ascospores on CYA 30C [N]ot found or long (um)	[U] Missing datum
46	Ascospores on CYA 30C width (um)	[U] Missing datum
47	Ascospores on CY20S 25C [N]ot found or long (um)	[U] Missing datum
48	Ascospores on CY20S 25C width (um)	[U] Missing datum
49	Cleistothecia on CY20S 25C [N]ot found or diam (um)	[U] Missing datum
50	Conidia on CY20S 25C [N]ot found or long (um)	[U] Missing datum
51	Conidia on CY20S 25C width (um)	[U] Missing datum
52	Phialides on CY20S 25C [N]ot found or long (um)	[U] Missing datum
53	Vesicles on CY20S 25C [N]ot found or diam (um)	[U] Missing datum
54	Colony on G25N 25C Absent (+/-)	[-] Expected
55	Colony on G25N 25C dense (+/-)	[+] Unexpected
56	Colony on G25N 25C low (+/-)	[-] Unexpected
57	Colony on G25N 25C plane (+/-)	[-] Expected
58	Ascospores on G25N 25C [N]ot found or long (um)	[U] Missing datum
59	Ascospores on G25N 25C width (um)	[U] Missing datum
60	Cleistothecia on G25N 25C [N]ot found or diam (um)	[U] Missing datum
61	Conidia on G25N 25 C [N]ot found or diam (um)	[U] Missing datum
62	Phialides on G25N 25 C [N]ot found or long (um)	[U] Missing datum
63	Vesicles on G25N 25 C [N]ot found or diam (um)	[U] Missing datum

Matched expected pairs= 36 Matched unexpected pairs= 7
Matched unknown pairs= 4 Missing characteristics = 16

Melhor esporulação do estado teleomórfico em meio PDA, 30°C e melhor esporulação do estado anamórfico em CY20S e CYA, 25°C

Talaromyces flavus

**Unknown fungus "F6E2" was identified like *Aspergillus sydowii* with
probability = 98.12%**

No.	Micro and macro morphological characteristics	Readings results
1	Colony on CYA 25C Absent (+/-)	[-] Expected
2	Colony on CYA 25C convex (+/-)	[-] Expected
3	Colony on CYA 25C dense (+/-)	[+] Expected
4	Colony on CYA 25C very dense (+/-)	[-] Expected
5	Colony on CYA 25C low (+/-)	[-] Expected
6	Colony on CYA 25C mucoid (+/-)	[-] Expected
7	Colony on CYA 25C radially sulcate (+/-)	[-] Expected
8	Colony on CYA 25C strictly velutinous or velutinous (+/-)	[-] Expected
9	Colony on CYA 25C surface appearing powdery (+/-)	[-] Expected
10	Asci on CYA 25C [N]ot found or long (um)	[N] Expected
11	Asci on CYA 25C width (um)	[-] Expected
12	Ascospores on CYA 25C [N]ot found or long (um)	[N] Expected
13	Ascospores on CYA 25C width (um)	[-] Expected
14	Cleistothecia on CYA 25C [N]ot found or if spherical diam um	[N] Expected
15	Cleistothecia on CYA 25C [N]ot found or if elongate long um	[-] Expected
16	Gymnothecia on CYA 25C [N]ot found or diam um	[-] Expected
17	Conidia on CYA 25C [N]ot found or long (um)	[3.2] Expected
18	Conidia on CYA 25C width (um)	[3.2] Expected
19	Conidia on CYA 25C with rough walls (+/-)	[-] Expected
20	Conidia on CYA 25C with smooth walls (+/-)	[-] Expected
21	Conidia on CYA 25C with spinose walls (+/-)	[+] Expected
22	Conidia on CYA 25C with thick walls (+/-)	[-] Expected
23	Conidia on CYA 25C with thin walls (+/-)	[-] Expected
24	Conidia on CYA 25C barrel-shaped (+/-)	[-] Expected
25	Conidia on CYA 25C spherical or spheroidal or subspheroidal (+/-)	[+] Expected
26	Conidiogenesis on CYA 25C lighth (+/-)	[-] Expected
27	Conidiogenesis on CYA 25C moderate (+/-)	[-] Expected
28	Phialides per metulae on CYA 25C [N]ot found or number (1 to 99)	[1] Expected
29	Phialides on CYA 25C long (um)	[5.6] Unexpected
30	Phialides on CYA 25C width (um)	[2.5] Expected
31	Phialides on CYA 25C with smooth walls (+/-)	[+] Unexpected
32	Phialides on CYA 25C ampulliform (+/-)	[-] Expected
33	Metulae per verticil on CYA 25C [A]bsent or number (1 to 99)	[99] Expected
34	Metulae on CYA 25C long (um)	[4.8] Unexpected
35	Metulae on CYA 25C width (um)	[2.5] Expected
36	Vesicles on CYA 25C [N]ot found or if spherical diam (um)	[16] Expected
37	Vesicles on CYA 25C spherical or spheroidal or subspheroidal (+/-)	[+] Unexpected
38	Stipes on CYA 25C [N]ot found or width (um)	[8] Expected
39	Stipes on CYA 25C with smooth walls (+/-)	[+] Expected
40	Stipes on CYA 25C with thin walls (+/-)	[-] Expected
41	Penicilli on CYA 25C irregularly verticillate (+/-)	[-] Expected
42	Sclerotia on CYA 25C [N]ot found or long (um)	[N] Unknown
43	Sclerotia on CYA 25C width (um)	[-] Unknown
44	Asci on CYA 30C [N]ot found or diam (um)	[-] Expected
45	Ascospores on CYA 30C [N]ot found or long (um)	[N] Expected
46	Ascospores on CYA 30C width (um)	[-] Expected
47	Ascospores on CY20S 25C [N]ot found or long (um)	[N] Expected

Unknown fungus "F6E2" was identified like *Aspergillus sydowii* with probability = 98.12%

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

Matched expected pairs= 49 Matched unexpected pairs= 5
 Matched unknown pairs= 2 Missing characteristics = 7

**Unknown fungus "F7E2 " was identified like *Penicillium citrinum*
with probability = 99.96 %**

No.	Micro and macro morphological characteristics	Readings results
1	Colony on CYA 25C Absent (+/-)	[-] Expected
2	Colony on CYA 25C convex (+/-)	[-] Expected
3	Colony on CYA 25C dense (+/-)	[-] Expected
4	Colony on CYA 25C very dense (+/-)	[-] Expected
5	Colony on CYA 25C low (+/-)	[-] Expected
6	Colony on CYA 25C mucoid (+/-)	[-] Expected
7	Colony on CYA 25C radially sulcate (+/-)	[+] Expected
8	Colony on CYA 25C strictly velutinous or velutinous (+/-)	[-] Expected
9	Colony on CYA 25C surface appearing powdery (+/-)	[-] Expected
10	Asci on CYA 25C [N]ot found or long (um)	[N] Expected
11	Asci on CYA 25C width (um)	[-] Expected
12	Ascospores on CYA 25C [N]ot found or long (um)	[N] Expected
13	Ascospores on CYA 25C width (um)	[-] Expected
14	Cleistothecia on CYA 25C [N]ot found or if spherical diam um	[N] Expected
15	Cleistothecia on CYA 25C [N]ot found or if elongate long um	[-] Expected
16	Gymnothecia on CYA 25C [N]ot found or diam um	[-] Expected
17	Conidia on CYA 25C [N]ot found or long (um)	[2.4] Expected
18	Conidia on CYA 25C width (um)	[2.4] Expected
19	Conidia on CYA 25C with rough walls (+/-)	[-] Expected
20	Conidia on CYA 25C with smooth walls (+/-)	[+] Expected
21	Conidia on CYA 25C with spinose walls (+/-)	[-] Expected
22	Conidia on CYA 25C with thick walls (+/-)	[-] Expected
23	Conidia on CYA 25C with thin walls (+/-)	[+] Unexpected
24	Conidia on CYA 25C barrel-shaped (+/-)	[-] Expected
25	Conidia on CYA 25C spherical or spheroidal or subspheroidal (+/-)	[+] Expected
26	Conidiogenesis on CYA 25C ligh (+/-)	[-] Expected
27	Conidiogenesis on CYA 25C moderate (+/-)	[+] Expected
28	Phialides per metulae on CYA 25C [N]ot found or number (1 to 99)	[6] Unexpected
29	Phialides on CYA 25C long (um)	[7.0] Expected
30	Phialides on CYA 25C width (um)	[2.3] Expected
31	Phialides on CYA 25C with smooth walls (+/-)	[+] Unexpected
32	Phialides on CYA 25C ampulliform (+/-)	[-] Unexpected
33	Metulae per verticil on CYA 25C [A]bsent or number (1 to 99)	[4] Expected
34	Metulae on CYA 25C long (um)	[15] Expected
35	Metulae on CYA 25C width (um)	[3.0] Expected
36	Vesicles on CYA 25C [N]ot found or if spherical diam (um)	[N] Unexpected
37	Vesicles on CYA 25C spherical or spheroidal or subspheroidal (+/-)	[-] Expected
38	Stipes on CYA 25C [N]ot found or width (um)	[2.5] Expected
39	Stipes on CYA 25C with smooth walls (+/-)	[+] Expected
40	Stipes on CYA 25C with thin walls (+/-)	[-] Expected
41	Penicilli on CYA 25C irregularly verticillate (+/-)	[-] Expected
42	Sclerotia on CYA 25C [N]ot found or long (um)	[N] Unknown
43	Sclerotia on CYA 25C width (um)	[-] Unknown
44	Asci on CYA 30C [N]ot found or diam (um)	[-] Expected
45	Ascospores on CYA 30C [N]ot found or long (um)	[N] Expected
46	Ascospores on CYA 30C width (um)	[-] Expected
47	Ascospores on CY20S 25C [N]ot found or long (um)	[N] Expected
48	Ascospores on CY20S 25C width (um)	[-] Expected
49	Cleistothecia on CY20S 25C [N]ot found or diam (um)	[-] Expected

**Unknown fungus "F7E2 " was identified like *Penicillium citrinum*
with probability = 99.96 %**

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

Matched expected pairs= 48 Matched unexpected pairs= 6
Matched unknown pairs= 3 Missing characteristics = 6

APÊNDICE 2

Análises estatísticas dos tratamentos termoquímicos (Segunda fase do trabalho)

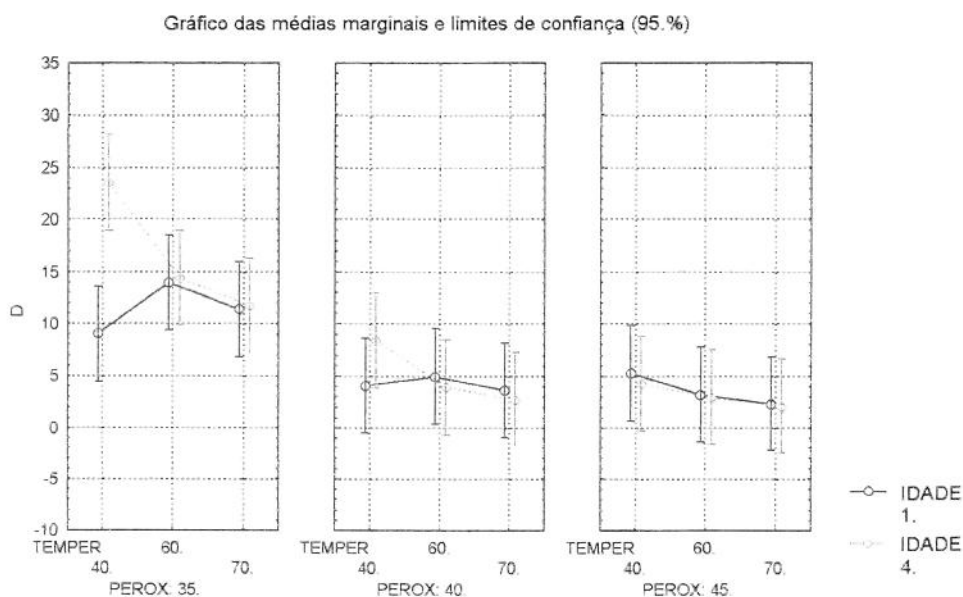


Figura 1. Médias marginais e limites de confiança (95%) para *N. fischeri* com 1 e 4 meses de idade exposto a 35, 40 e 45% de peróxido de hidrogênio nas temperaturas de 40, 60 e 70°C

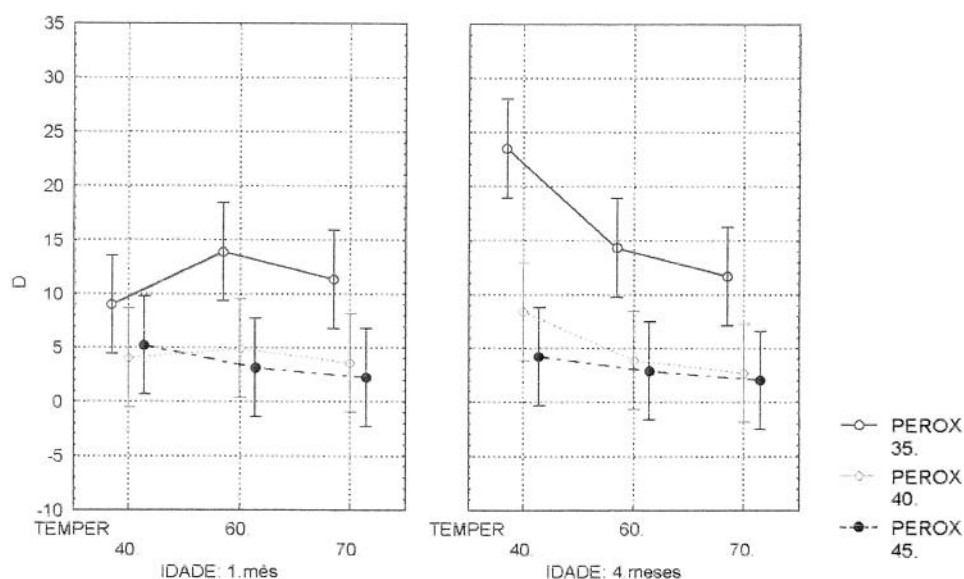


Figura 2. Médias marginais do efeito do peróxido de hidrogênio sobre *N. fischeri* (1 e 4 meses) nas temperaturas de 40, 60 e 70°C com limite de confiança de 95%.

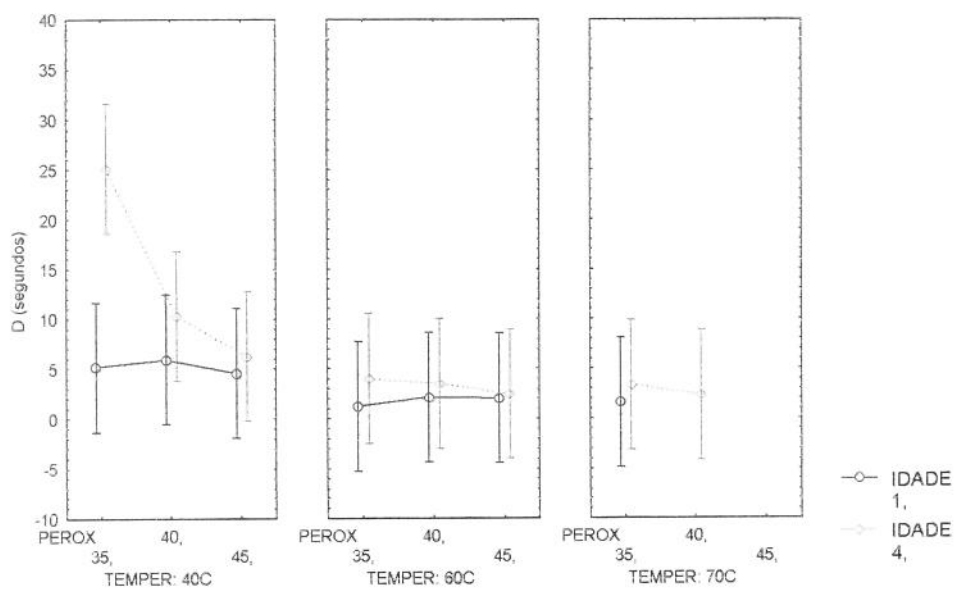


Figura 3. Médias marginais para *P. variotii* exposto a 35, 40 e 45% de peróxido de hidrogênio nas temperaturas de 40,60 e 70°C para 1 e 4 meses de idade, com limite de confiança de 95%

Tabela 1. Efeitos estimados para *N. fischeri*

Efeitos estimados; Var. :D; R quadrado = 0,9127 R ajustado 0,86906										
12 – Níveis de fatores, 2 3 – Níveis de fatores, 18 corridas										
DV: D: QM residual = 4,312096										
	Efeito	Erro padrão	t(11)	p	Limite de confiança -95%	Limite de confiança +95%	Coefficient e	Erro padrão -coefficiente	Coefficient e limite -95%	Coefficient e limite +95%
Média	7,4930	0,49380	15,17422	0,000000*	6,4062	8,57988	7,49304	0,493800	6,40619	8,57988
IDADE (L)	2,1704	0,987601	2,197601	0,050296	-0,0033	4,34405	1,08518	0,493800	-0,00167	2,17203
PERÓXIDO (L)	-10,631 7	1,1987601	-8,86784	0,000002*	-13,2704	-7,99290	-5,31583	0,599451	-6,63522	-3,99645
PERÓXIDO (Q)	-4,0542	1,038279	-3,90470	0,002457*	-6,3394	-1,76893	-2,02708	0,519140	-3,16970	-0,88446
TEMPERAT URA (L)	-3,3646	1,177298	-2,85794	0,015574*	-5,9559	-0,77343	-1,68232	0,588649	-2,97793	-0,38671
IDADE x PERÓXIDO	-2,7917	1,198902	-2,32852	0,039973*	-5,4304	-0,15290	-1,39583	0,599451	-2,71522	-0,07645
IDADE x TEMPERAT URA	-3,3232	1,177298	-2,82275	0,016586*	-5,9144	-0,73200	-1,66161	0,588649	-2,95722	-0,36600

Tabela 2. Coeficientes de regressão para *N.fischeri*

Coeficientes de regressão; Var.:D; Rquadrado= 0,91527 ajustado0,86906						
12 – Fatores de níveis, 2 3 – fatores de níveis, 18 corridas						
DV:D, QM residual = 4,312096						
	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(11)	p	Limite de confiança -95%	Limite de confiança + 95%
Média	282,3781	66,56232	4,24231	0,001383*	135,8754	428,8808
IDADE(L)	12,2296	3,53915	3,45552	0,005375*	4,4400	20,0192
PERÓXIDO(L)	-13,5712	3,33066	-4,07464	0,001837*	-20,9019	-6,2405
PERÓXIDO (Q)	0,1622	0,04153	3,90470	0,002457*	0,0708	0,2536
TEMPERATURA(L)	0,0725	0,07628	0,95009	0,362475	-0,0954	0,2403
IDADE x PERÓXIDO	-0,1861	0,07993	-2,32852	0,039973*	-0,3620	-0,0102
IDADE x TEMPERATURA	-0,0738	0,02616	-2,82275	0,016586*	-0,1314	-0,0163

Tabela 3. Análise de variância (ANOVA) para *N. fischeri*

ANOVA; Var.: D; R quadrado 0,91527; R ajustado 0,86906					
1 2 fatores de níveis, 2 3 fatores de níveis, 18 corridas DV; D, QM residual = 4,312096					
Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade (GL)	Quadrado médio (QM)	F	p
IDADE(L)	20,8251	1	20,8251	4,82747	0,050296
PERÓXIDO (L)	339,0970	1	339,0970	78,63855	0,000002*
PERÓXIDO (Q)	65,7451	1	65,7451	15,24666	0,002457*
TEMPERATURA (L)	35,2203	1	35,2203	8,16780	0,015574*
IDADE (L) x PERÓXIDO (L)	23,3802	1	23,3802	5,42201	0,039973*
IDADE(L) x TEMPERATURA (L)	34,3583	1	34,3583	7,96790	0,016586*
ERRO	47,4331	11	4,3121		
SQ TOTAL	559,8320	17			

Tabela 4. Efeitos estimados para o bolor *P. variotii*

Efeitos estimados; Var.: D; R quadrado = 0,89325 R ajustado 0,78649										
12 – Níveis de fatores, 2 3 – Níveis de fatores, 15 corridas										
DV: D: QM residual = 7,514167										
	Efeito	Erro padrão	t(11)	p	Limite de confiança -95%	Limite de confiança +95%	Coefficiente	Erro padrão -coeficiente	Coefficiente limite -95%	Coefficiente limite +95%
Média	5,71470*	0,819666*	6,97199*	0,000217*	3,7765*	7,65290	5,71470*	0,818666	3,77650*	7,652902*
IDADE (L)	3,01195	1,484196	2,02935	0,081991	-0,4976	6,52152	1,50598	0,742098	-0,24881	3,2607559
PERÓXIDO(L)	-2,89212	1,976206	-1,46347	0,186744	-7,5651	1,78087	-1,44606	0,988103	-3,78255	0,890433
TEMPERATURA (L)	-5,32508	2,387790	-2,23013	0,060959	-10,9713	0,32115	-2,66254	1,193895	-5,48565	0,160573
TEMPERATURA (Q)	-3,39828	1,835463	-1,85146	0,106539	-7,7385	0,94190	-1,69914	0,917732	-3,86923	0,470950
IDADE x PERÓXIDO	-5,02127*	1,809584*	-2,77482*	0,027502*	-9,3003*	-0,74229	-2,51064*	0,904792	-4,65013*	-0,371144*
IDADE x TEMPERATURA	-5,80832*	1,883475*	-3,08383*	0,017720*	-10,2620*	-1,35461	-2,90416*	0,941737	-5,13102*	-0,677305*
PERÓXIDO x TEMPERATURA	6,71870*	2,583363*	2,60076*	0,035386*	0,6100*	12,82738	3,35935*	1,291682	0,30501*	6,413691*

Tabela 5. Coeficientes de regressão para o bolor *P. variotii*

Coeficientes de regressão; Var.: D; Rquadrado= 0,89325 R ajustado:0,78649						
12 – Fatores de níveis, 2 3 – fatores de níveis, 15 corridas						
DV:D, QM residual = 7,514167						
	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(11)	p	Limite de confiança -95%	Limite de confiança + 95%
Média	120,5626*	50,10979*	2,40597*	0,047052*	2,07180*	239,0535*
IDADE(L)	21,4931*	5,72159*	3,75649*	0,007107*	7,96370*	35,0225*
PERÓXIDO(L)	-1,9159	0,94016	-2,03779	0,080976	-4,13898	0,3073
TEMPERATURA(L)	-3,5155*	1,37265*	-2,56111*	0,037491*	-6,76134*	-0,2697*
TEMPERATURA(Q)	0,0170	0,00918	1,85146	0,106539	-0,00471	0,0387
IDADE x PERÓXIDO	-0,3348*	0,12064*	-2,77482*	0,027502*	-0,62002*	-0,0495*
IDADE x TEMPERATURA	-0,1291*	0,04185*	-3,08383*	0,017720*	-0,22805*	-0,0301*
PERÓXIDO x TEMPERATURA	0,0448*	0,01722*	2,60076*	0,035386*	0,00407*	0,0855*

Tabela 6. Análise de variância (ANOVA) para *P. variotii*

ANOVA; Var.: D; R quadrado 0,89325; R ajustado 0,78649					
1 2 fatores de níveis, 2 3 fatores de níveis, 15 corridas					
DV; D, QM residual = 7,514167					
Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade (GL)	Quadrado médio (QM)	F	p
IDADE(L)	30,9453	1	30,94530	4,118261	0,0811991
PERÓXIDO (L)	16,0934	1	16,09343	2,141745	0,186744
TEMPERATURA (L)	37,3715	1	37,37153	4,973476	0,060959
TEMPERATURA (Q)	25,7578	1	25,75776	3,427892	0,106539
IDADE (L) x PERÓXIDO (L)	57,8564*	1*	57,85635	7,699636	0,027502*
IDADE(L) x TEMPERATURA (L)	71,4599*	1*	71,45990	9,510023	0,017720*
PERÓXIDO x TEMPERATURA	50,8253*	1*	50,82530	6,763931	0,035386*
ERRO	52,5992	7	7,51417		
SQ TOTAL	492,7157	14			

APÊNDICE 3

Meios de cultura e soluções utilizadas

Meio Extrato de Malte Ágar (MEA)

Extrato de malte	20,0 g
Peptona	1,0 g
Glicose	20,0g
Ágar	20,0g
Água destilada	1000ml

PH final 5,5

Esterilizado em autoclave por 121° C/ 15 minutos

Ágar Batata Dextrose (PDA - Difco)

Infusão de batatas	200g
Dextrose	20g
Ágar	15g
Água	1000ml

PH final 5,6

Esterilizado em autoclave por 121°C/15 minutos

Acidificado com ácido tartárico 10% para obtenção de um pH final de 3,6

Solução de ácido tartárico 10%

Ácido tartárico	10g
Água destilada	100ml

Esterilizado a 121°C/ 15 minutos. Estocar sob refrigeração (4°C)

Ágar Aveia (AO) – Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS)

Flocos de aveia	30g
Ágar	15g
Água	1000ml

Adicionar a aveia à água e aquecer por 2 horas, agitando delicadamente. Filtrar através de gaze e completar para 1000 ml com água destilada. Adicionar 15 g de ágar e esterilizar em autoclave a 121°C/ 15 minutos.

Água peptonada 0,1%

Peptona bacteriológica	0,1g
Água destilada	100ml

Esterilizar em autoclave a 121°C/15 minutos

Corante Lactofucsina (coloração de esporos)

0,1% de ácido fucsínico dissolvido em ácido láctico de 85% ou maior pureza

Suspensão Semi Sólida (Utilizada para repicagem de fungos filamentosos)

Ágar	0,2 g
Detergente (Tween 80)	0,05 g
Água destilada	100ml

Solução de leite em pó desnatado 5 %

Leite em pó desnatado	5 g
Água	100 ml

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

ERRATA

- Na quinta linha do segundo parágrafo da página 69 onde se lê “o tempo de contato em minutos....” deve ser substituído por “ o tempo de contato em segundos....”
- Na segunda linha do segundo parágrafo da página 85 onde se lê “ 1 amostra para a planta B” deve ser substituído por “ 4 amostras para a planta B”
- Na quarta linha do segundo parágrafo da página 85 onde se lê “ ... e 2,27 das amostras para a planta B” deve ser substituído por “ ... e 9,09 das amostras para a planta B”
- Na chamada da Tabela 7 da página 94, em asterisco, onde se lê “ * = Contagem em câmara de Neubauer” deve ser substituído por “ * = Contagem em MEA (sem choque)”
- Na chamada da Tabela 8 da página 95, em asterisco, onde se lê “ * = Contagem em câmara de Neubauer” deve ser substituído por “ Contagem em MEA (sem choque)”
- Na primeira linha do primeiro parágrafo da página 95 onde se lê “a contagem em câmara de Neubauer....” deve ser substituído por “ a contagem em MEA sem choque ...”
- No segundo parágrafo da página 100 onde se lê “ em 2,2 das amostras” deve ser substituído por “ em 9,09 das amostras...”