

336 AGR

10

**THE BRITISH LIBRARY**



This document has been supplied by or on behalf of, The British Library Document Supply Centre, Boston Spa, Wetherby, West Yorkshire LS23 7BQ United Kingdom

**WARNING:** Further copying of this document (including storage in any medium by electronic means), other than that allowed under the copyright law, is not permitted without the permission of the copyright owner or an authorised licensing body.

N<sup>o</sup> 665/02

Agno

خامسة البرية  
 المكتبة المركزية  
 البحت البعث الوطني

# OCORRÊNCIA DE FUNGOS FILAMENTOSOS TERMO-RESISTENTES EM POLPA DE TOMATE ENVASADA ASSEPTICAMENTE<sup>1</sup>

Flávio BAGLIONI<sup>2</sup>, Homero Ferracini GUMERATO<sup>2</sup>, Pilar Rodriguez MASSAGUER<sup>2,\*</sup>

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo principal determinar a ocorrência de fungos filamentosos termo-resistentes durante o processamento asséptico de polpa de tomate (8°BRIX). Durante o período de safra de tomate foram feitas amostragens em 9 lotes (3 no início, 3 no pico e 3 em fim de safra) e no período de entressafra em 5 lotes. Foi feita a enumeração de fungos termo-resistentes nas amostras coletadas durante as diferentes etapas do processo asséptico de cada lote. Foram obtidas contagens médias relativamente baixas, variando entre <1 e 8UFC/100mL de amostra. As maiores contagens foram obtidas na matéria prima e na água de pré lavagem e transporte. Cinquenta linhagens de fungos termo-resistentes detectadas no procedimento de enumeração foram isoladas, codificadas e estocadas. Os esporos de cada isolado com 1 mês de cultivo foram submetidos a diferentes choques térmicos para selecionar a linhagem de fungo mais termo-resistente. O isolado de fungo mais termo-resistente (sobrevivência ao choque à 100°C/25 minutos) foi identificado como *Neosartorya fischeri*.

**Palavras-chave:** tomate, processamento asséptico, fungo termo-resistente.

## SUMMARY

OCCURRENCE OF HEAT RESISTANT MOLDS IN TOMATO PULP PACKED ASEPTICALLY. This work aimed at determining the occurrence of heat resistant molds during the aseptic processing of tomato pulp (8°BRIX). During tomato harvest, 9 lots were sampled (3 at the beginning, 3 at the apex and 3 at the end of harvest) and other 5 lots were sampled between harvest. For each lot, the enumeration of heat resistant molds was carried out in samples collected during the aseptic process. The mean count of heat resistant molds was relatively low, ranging from <1 to 8CFU/100mL of sample. The higher counts were observed in the raw material and the pre-wash and transportation water. Fifty strains of heat resistant molds detected in the enumeration procedure were isolated, codified and stocked. One-month-old spores of each isolate were submitted to different heat shocks to select the most heat resistant mold. The most heat resistant isolated strain (survived 100°C/25 minutes) was identified as *Neosartorya fischeri*.

**Keywords:** tomato, aseptic processing, heat resistant mold.

## 1 – INTRODUÇÃO

Os fungos filamentosos, na sua maioria, são pouco resistentes ao calor, uma vez que este destrói facilmente conídios e hifas. As poucas espécies termo-resistentes produzem esclerócios ou ascósporos, sendo que a maior

parte das deteriorações em alimentos provocadas por elas são devidas à sobrevivência de ascósporos ao tratamento de pasteurização [22]. A pasteurização normalmente aplicada a produtos vegetais ácidos ativa ascósporos dormentes, com posterior germinação e crescimento dos fungos termo-resistentes, ocasionando deterioração no produto final [3, 6].

As espécies de fungos termo-resistentes mais comumente envolvidas na deterioração de alimentos são *Byssochlamys fulva*, *Byssochlamys nivea*, *Neosartorya fischeri* e *Talaromyces flavus* [13, 22, 24]. Entre as menos comumente relatadas podem ser citadas espécies pertencentes ao gênero *Eupenicillium* [10, 24].

O primeiro relato extensivo sobre deterioração por fungos termo-resistentes foi feito por OLLIVER & RENDLE [16] que reconheceram ser *B. fulva* o agente causador da deterioração em frutas processadas na Inglaterra. Hoje é reconhecida a distribuição mundial de fungos termo-resistentes e vem sendo feitos estudos sistemáticos sobre fontes de contaminação, ocorrência, resistência térmica, crescimento, avaliação da deterioração e produção de metabólitos destes microrganismos, principalmente no que se refere às espécies que ocorrem mais freqüentemente.

Embora as frutas e seus produtos processados sejam os mais incriminados em deteriorações por fungos termo-resistentes [19], existem relatos provando que hortaliças e suas conservas [12, 23, 26], leite e derivados [5] também podem ser deteriorados por estes.

A ocorrência de fungos termo-resistentes, inclusive em tomate, foi relatada por SPOTTI *et al.* [23] que detectaram níveis de contaminação de 12 esporos/Kg de tomate fresco não lavado e identificaram *B. nivea*, *B. fulva* e *T. flavus* neste produto. Em uma segunda amostra de tomate com pH 4.3, foi observado um baixo nível de contaminação (1 esporo/Kg de tomate), acusando a presença de *B. nivea*.

KOTZEKIDOU [12] isolou fungos termo-resistentes de latas de pasta de tomate deterioradas (29-30°BRIX): 9 linhagens foram isoladas, sendo 2 de *B. nivea*, 3 de *B. fulva*, 4 de *N. fischeri*. Suspensões de esporos destas linhagens, com 1 mês de idade sobreviveram a choques térmicos de 20 minutos à 85°C, partindo de uma população inicial de aproximadamente 10<sup>5</sup> esporos/mL.

O tomate é a hortaliça mais industrializada no Brasil e possivelmente no mundo, tendo grande valor tanto em termos de produção quanto econômico [2,14]. No Brasil, tem sido constatado nos últimos dez anos nos principais derivados de tomate envasados assepticamente em embalagens cartonadas a contaminação eventual por fungos, em circunstâncias e condições diversas que não

<sup>1</sup> Recebido para publicação em 04/12/98. Aceito para publicação em 28/06/99. Parte do trabalho de tese para obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos pela FEA/Unicamp.

<sup>2</sup> Universidade Estadual de Campinas/FEA/Laboratório de Termobacteriologia CEP 13081-970 – C.P 6121 – Campinas – SP. E-mail: esteril@touring.unicamp.br

\* A quem a correspondência deve ser enviada.

têm permitido uma clara identificação da origem do problema [7], não devendo ser confundido com o aparecimento de colônias de fungos durante a estocagem do produto em geladeira. Este tipo de contaminação se evidencia na abertura da embalagem e, apesar de não representativa em termos estatísticos, pelo fato de apresentar um aspecto extremamente desagradável e repulsivo aos olhos dos consumidores, pode vir a prejudicar a imagem de tais produtos junto ao mercado consumidor e também junto aos órgãos de fiscalização.

O mercado de produtos derivados de tomates no Brasil atinge um valor de R\$ 240.000/tonelada/ano e a participação no mercado brasileiro de derivados de tomate envasados assepticamente tem sido de 39% nos últimos quatro anos. Dada a importância do tomate e de seus produtos termoprocessados, o uso crescente de embalagens cartonadas para produtos de tomate e, levando em conta o número reduzido de estudos relacionando fungos termo-resistentes com estes alimentos, foram objetivos deste trabalho: 1) Determinar a ocorrência de fungos termo-resistentes durante o processamento asséptico da polpa de tomate envasada em embalagem cartonada; 2) Selecionar a cepa mais termo-resistente de fungo detectada.

## 2 – MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 – Amostragem

#### 2.1.1 - Número de amostragens e obtenção das amostras

Em 1996, no período de safra do tomate, foram feitas amostragens em 9 lotes (3 no início, 3 no pico e 3 ao fim de safra) e no período de entressafra em 5 lotes. As amostras foram obtidas em diferentes pontos da linha de processamento asséptico de polpa de tomate de uma indústria localizada no Estado de São Paulo. A quantidade coletada/amostra foi de  $3.5 \pm 0.5$  Kg, sendo mantidas sob refrigeração (com exceção do produto final) até o momento da análise, sendo geralmente analisada 24 horas após a coleta (Item 2.2).

#### 2.1.2 - Período de safra do tomate

Durante o período de safra do tomate (Julho a Novembro de 1996), foram coletadas amostras dos seguintes pontos de processo: 1) Matéria-Prima (tomate após chegada na indústria); 2) Água não clorada de transporte e pré-lavagem da matéria prima (coletadas nas canaletas de transporte da matéria prima com recipiente estéril no fluxo médio); 3) Produto imediatamente antes da esterilização (no tanque de equilíbrio); 4) Produto final em embalagem asséptica cartonada (520g) e 5) Produto final estocado durante 3 meses em temperatura ambiente.

#### 2.1.3 - Período de entressafra do tomate

Durante o período de entressafra (Janeiro a Abril de 1997), foram coletados os seguintes tipos de amostras: 1) Concentrado de tomate com teor de sólidos solúveis de 29°BRIX utilizado como matéria prima na entressafra (este concentrado, embalado em "Bag in Drums" de 240-270Kg,

foi importado do Chile e dos Estados Unidos); 2) Produto imediatamente antes da esterilização; 3) Produto final em embalagem asséptica cartonada (520g) e 4) Produto final estocado durante 3 meses em temperatura ambiente.

### 2.2 – Detecção e Enumeração de fungos termo-resistentes

#### 2.2.1 - Preparo das amostras

A matéria-prima foi desintegrada e homogeneizada em triturador metálico estéril e as amostras de concentrado de tomate foram diluídas com água peptonada 0.1% (1:2)p/v e homogeneizadas em triturador estéril antes da aplicação do choque térmico. Nos outros tipos de amostras não houve a necessidade de um preparo prévio, ou seja, foram utilizadas diretamente na análise.

#### 2.2.2 - Determinação do tempo de subida da temperatura

Tubos com tampa rosqueável 25X200 mm foram preenchidos com a quantidade adequada de amostra (25 ou 50mL); inseriu-se um termopar cobre-constantan (tipo T, ECKLUND®) estando a sua junta de medida no centro do volume ocupado pela amostra. Este conjunto assim montado foi colocado em um banho termostático (HAAKE®, precisão de  $\pm 0.1^\circ\text{C}$ ) ajustado à  $80^\circ\text{C}$ , acionando-se no mesmo instante o cronômetro. Quando a amostra atingiu  $80^\circ\text{C}$  (monitoramento através do termopar) registrou-se o tempo marcado pelo cronômetro (tempo de subida).

#### 2.2.3 - Procedimento de enumeração dos fungos termo-resistentes

Cem mililitros de amostra foram transferidos assepticamente para dois tubos com tampa rosqueável 25X200mm (50ml em cada tubo) e submetidos a um choque térmico em banho termostático (HAAKE®, precisão de  $\pm 0,1^\circ\text{C}$ ) regulado à  $80^\circ\text{C}$ . Somente para o homogeneizado de matéria prima (Item 2.2.1) foram utilizados 4 tubos com tampa rosqueável 25X200mm (25mL em cada tubo), pois neste tipo de amostra ocorre uma separação de fases (polpa/soro) com dilatação de volume durante o choque térmico. Assim, neste caso, é mais segura a utilização de uma quantidade menor de amostra por tubo. Quando a amostra atingiu  $80^\circ\text{C}$  (tempo de subida previamente determinado conforme item 2.2.2), foi iniciada a contagem do tempo de choque térmico (20 minutos) (4). Terminado o tempo de choque térmico, os tubos foram resfriados até cerca de  $45-50^\circ\text{C}$  e o conteúdo destes tubos (100mL), transferidos para um erlenmeyer contendo 100mL de Ágar Batata Dextrose (PDA, DIFCO) em concentração dupla, adicionado de 50mg/l de rosa de bengala e 4g/L de cloranfenicol. O conteúdo resultante foi acidificado com solução de ácido tartárico 10% p/v (pH final = 3.5), homogeneizado e distribuído em 8 placas de Petri de 90mm de diâmetro. Todo este procedimento foi feito em câmara de fluxo laminar. Após solidificação da mistura nas placas, estas foram envolvidas por um saco plástico (para evitar ressecamento) e incubadas à  $30^\circ\text{C}$  por 30 dias. Para cada amostra, este procedimento foi feito em triplicata.

### 2.3 – Isolamento e estocagem dos fungos termo-resistentes

Cada colônia de fungo que se desenvolveu nas placas de enumeração (Item 2.2.3) foi isolada em placas contendo 25mL de PDA (pH 5.6, DIFCO) transferindo-se com o auxílio de uma alça em "L", um fragmento da colônia original para o centro das placas ( em duplicata).

Os fungos assim isolados foram estocados em sílica-gel de acordo com a metodologia descrita por MURO & LUCHI [15].

### 2.4 – Preparo da suspensão de esporos

O preparo do inóculo para cada fungo termo-resistente consistiu em transferir, com o auxílio de uma alça em "L" um fragmento de colônia para um tubo contendo 2mL de solução 0.05% de Tween 80, seguido de agitação. Uma alíquota (0.5mL) de cada inóculo preparado foi transferida para garrafas de Roux respectivas contendo 200mL de Ágar Extrato de Malte (MEA), formulado segundo PITT & HOCKING [17]. Este procedimento de inoculação foi feito em duplicata para cada isolado de fungo termo-resistente codificado, com incubação das garrafas à 30°C por 30 dias, para permitir a esporulação e desenvolvimento de resistência dos ascosporos.

Após 30 dias de incubação, 25mL de água destilada estéril foram transferidos para cada garrafa sendo a superfície do crescimento raspada levemente com o auxílio de uma bagueta estéril. A suspensão recém preparada foi filtrada em várias camadas de gaze estéril, recolhida em um tubo estéril e estocada sob refrigeração (4°C) até uso.

### 2.5 – Seleção do isolado mais termo-resistente

A suspensão de esporos preparada (Item 2.4) de cada isolado codificado foi submetida a diferentes choques térmicos, variando entre 80°C/20 minutos e 100°C/25 minutos, se necessário, para definir o isolado mais termo-resistente dentro de cada lote e entre todos os lotes. A *Tabela 1* mostra os diferentes choques térmicos aplicados, conforme necessidade.

TABELA 1. Choques térmicos aplicados (Temperatura/tempo) aos esporos dos fungos isolados

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

<sup>(\*)</sup> Choques utilizados na definição do fungo mais termo-resistente

Para cada fungo, foram utilizados tubos com tampa rosqueável (16X150mm) com 9mL de polpa de tomate 8°BRIX estéril, sendo cada tubo inoculado com 1mL da suspensão filtrada de esporos com concentração em torno de 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> esporos/mL (estimativa de concentração feita através de contagem em Câmara de Neubauer), seguido da homogeneização da mistura resultante.

Utilizando um banho termostático (Polystat ®, precisão ± 0,1°C), foi aplicado o choque térmico aos tubos preparados, de acordo com o binômio tempo/temperatura especificado, sendo o tempo de choque contado após o tempo de subida para cada temperatura definida (determinado de maneira semelhante ao descrito no item 2.2.2). Após o choque térmico, os tubos foram resfriados imediatamente.

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

### 2.6 – Identificação dos isolados mais importantes

A identificação do isolado fúngico mais termo-resistente e do isolado proveniente do produto final foi feita utilizando um programa de computador (FUNG.HOM) com base em 63 características macro e micromorfológicas dos fungos [9], sendo identificados a nível de espécie.

## 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 – Enumeração de fungos filamentosos termo-resistentes em polpa de tomate de 8°BRIX

Foi utilizado o método de plaqueamento [4, 20] para a detecção de fungos termo-resistentes nas amostras, uma vez que testes preliminares mostraram que este método recupera maior quantidade de esporos quando comparado com o método de incubação direta [4,10,17]. Ensaio preliminares mostraram também que, no método de plaqueamento utilizando a concentração de cloranfenicol recomendada no meio de cultura (100mg/L), houve grande interferência de actinomicetos na contagem de bolores termo-resistentes. Para diminuir esta interferência foi feita a acidificação do meio de crescimento com solução de ácido tartárico 10% p/v (para pH final = 3.5) e adição de cloranfenicol na concentração final de 4g/L.

As *Tabelas 2 e 3* mostram os valores da contagem média (em UFC/100mL) de fungos termoresistentes em amostras procedentes de diferentes pontos do processo e dentro de cada lote no processamento asséptico da polpa de tomate, nos períodos de safra e entressafra do tomate, respectivamente.

**TABELA 2.** Média da enumeração de fungos termo-resistentes (UFC/100mL de amostra) durante o período de safra do tomate (Julho a Novembro de 1996)

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

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

**TABELA 3.** Média da enumeração de fungos termo-resistentes (UFC/100mL de amostra) durante o período de entressafra do tomate (Janeiro a Abril de 1997)

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

Observando-se a *Tabela 2*, nota-se uma contagem relativamente baixa de fungos termo-resistentes e que matéria prima e água de pré-lavagem e transporte hídrico apresentaram as maiores contagens. Este fato já era esperado, já que matéria prima (tomate *in natura*) e água de pré-lavagem e transporte hídrico estão no início da linha de processamento, não recebendo nenhum tratamento térmico, além do que a água de transporte hídrico não é clorada e recebe as sujidades da matéria prima recém chegada. Estas constatações também foram feitas por GRAJALES [8] que realizou a contagem de fungos termo-resistentes em amostras durante a elaboração do concentrado de tomate. Esta autora verificou que só houve contagem na matéria prima (tomate na recepção e tomate na seleção) e que esta contagem era baixa (contagem entre <1 e 15 UFC/100mL de amostra). Entretanto, deve-se ressaltar que GRAJALES [8] empregou um método diferente aplicando um choque térmico de 70°C/1 hora previamente à contagem e acidificação até 3,5 sem o uso de antibióticos como o cloranfenicol.

A maior contagem obtida entre todos os lotes ocorreu na matéria prima do lote 4 (8 UFC/100mL), provavelmente devido à utilização de um tomate de baixa qualidade para processamento, seguido da água de pré-lavagem e transporte hídrico no mesmo lote (4UFC/100mL). A contagem em pico de safra foi

mais alta, sendo significativamente diferente ao nível de 5% em relação a início e fim de safra .

No produto antes da esterilização e no produto final (no período de coleta e 3 meses após processo) geralmente não houve contagem de fungos termo-resistentes, com exceção da enumeração no produto antes da esterilização no lote 3 (1UFC/100mL), lote 5 (1UFC/100mL) e produto final no lote 4 (1UFC/100mL). No período de entressafra não foi possível a recuperação de fungos termo-resistentes. Uma explicação seria o fato de que a matéria prima utilizada durante a entressafra era procedente dos EUA e Chile (qualidade superior em relação ao produto brasileiro) em contraste com o processamento durante a safra. Porém, não se deve excluir a possibilidade da existência de ascósporos de fungos termo-resistentes no concentrado de tomate, visto que algumas linhagens destes podem sobreviver ao tratamento empregado para pasteurização da polpa concentrada (92°C, com posterior enchimento à quente dos tambores metálicos).

### 3.2 – Número de cepas de fungos isolados e seleção da mais termo-resistente

Durante o levantamento da contaminação da safra e entressafra de 1996, foi obtido um total de 50 isolados de fungos termo-resistentes, cujos esporos com 1 mês de idade foram submetidos a diferentes choques térmicos que variaram entre 80°C/20 minutos e 100°C/25 minutos para selecionar o mais termo-resistente. As *Tabelas 4 e 5* mostram dados e resultados sobre os isolados de fungos e limites de sobrevivência aos choques térmicos .

**TABELA 4.** Número de cepas de fungos isolados por lote amostrado

LOTE	Número de cepas diferentes de fungos termo-resistentes	Número de cepas diferentes confirmadas como termo-resistentes ( <i>in vitro</i> ) <sup>(*)</sup>
#1	9	9
#2	3	2
#3	2	2
#4	12	9
#5	8	7
#6	2	1
#7	5	4
#8	7	6
#9	2	1
#10	-	-
#11	-	-
#12	-	-
#13	-	-
#14	-	-

(\*) Confirmação da termorresistência : Sobrevivência ao choque térmico de 80°C/20 minutos

A segunda coluna da *Tabela 4* mostra o número de cepas de fungos termo-resistentes diferentes isolados por lote. Todavia, após isolamento, cultivo em meio sintético (MEA) por 1 mês com posterior coleta dos esporos e aplicação de diferentes choques térmicos, pôde-se observar (terceira coluna da mesma tabela) que nem

todos os isolados obtidos sobreviveram *in vitro* ao mesmo choque aplicado no procedimento de enumeração (80°C/20 minutos), ou seja, nem sempre houve confirmação de sobrevivência destes ao choque inicial. Este fato leva às seguintes hipóteses: o isolado produz um esporo menos termo-resistente no meio sintético ou o isolado não produz a forma termo-resistente no meio sintético dentro do tempo de incubação estipulado. Esta última hipótese foi relatada por SAMSON *et al.* [20], que em estudo com linhagens de *Eupenicillium spp.*, constataram que algumas destas não produziram ascósporos, mesmo dentro de um tempo de incubação de 6 semanas. Cabe indicar que o número de isolados termo-resistentes indicados na *tabela 4* supera os valores médios reportados nas *tabelas 2 e 3*, pois a enumeração foi feita em cada lote em duas amostras em triplicata e as cepas foram isoladas individualmente.

A verificação de que ascósporos de fungos termo-resistentes presentes originalmente nas amostras podem apresentar resistência térmica diferente (maior ou menor) em relação aos ascósporos das mesmas linhagens de fungos obtidos *in vitro*, foi feita por JESSENKA *et al.* [11] que, examinando amostras de solo, compararam a resistência térmica de ascósporos de fungos termo-resistentes procedentes destas amostras através de dois experimentos: (a) Choques térmicos sucessivos (60 - 90°C, a cada 10 minutos) diretamente nas amostras (verificação da resistência térmica dos ascósporos originários do solo); (b) Choques térmicos sucessivos (70 - 90°C/10-60 minutos) em ascósporos dos fungos isolados em (a) obtidos *in vitro* (a partir de culturas puras cultivadas em meio sintético / ascósporos com 1-2 meses de idade). Observaram que os ascósporos se mostraram mais termo-resistentes no experimento (a) ou (b), dependendo da espécie testada. Como exemplos, o fungo *Neosartorya fischeri* sobreviveu até 90°C/40 minutos pelo experimento (a) e pelo experimento (b) até 80°C/60 minutos; indicando maior termorresistência dos ascósporos presentes no solo. Em contrapartida, para *Talaromyces flavus* aconteceu a situação inversa: sobrevivência até 70°C/60 minutos pelo experimento (a) e pelo experimento (b) até 90°C/10 minutos, indicando maior termorresistência dos ascósporos obtidos *in vitro*.

O único fungo isolado de produto final não sobreviveu ao choque inicial (80°C/20 minutos). Este fungo foi identificado como *Penicillium implicatum*. Na literatura não consta que esta espécie seja termo-resistente [17], sugerindo uma contaminação pós processo que permitiria a entrada deste fungo. Entretanto, existe a possibilidade de que esta linhagem de *P. implicatum* em particular produza forma termo-resistente na natureza, mas perca esta capacidade quando cultivada *in vitro*.

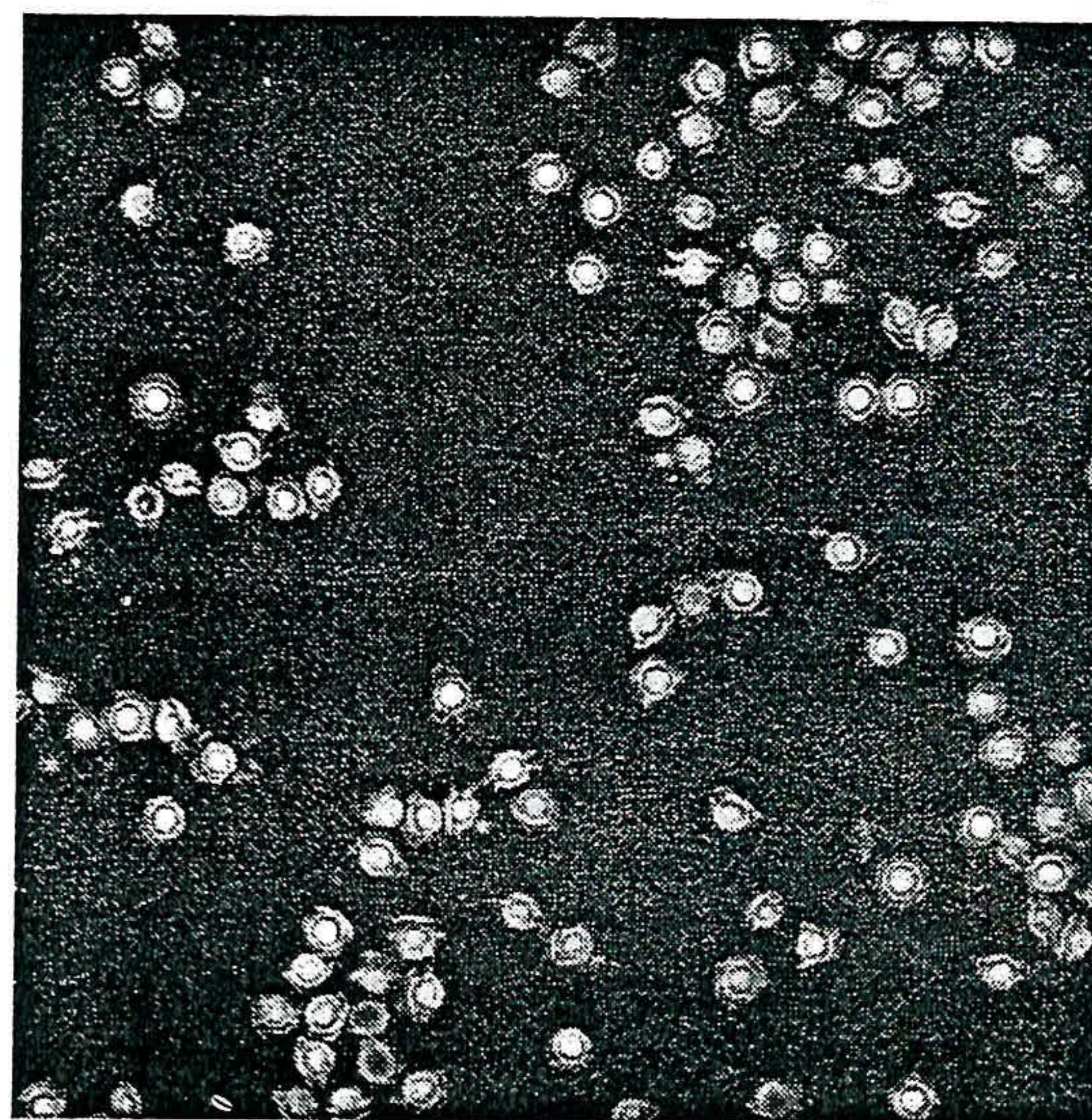
A *Tabela 5* mostra a distribuição (%) de sobrevivência dos isolados aos choques térmicos. A relevância dos dados reportados nesta tabela é que, mediante a seleção por choques térmicos sucessivos, foi possível chegar a estabelecer a porcentagem dos isolados mais resistentes.

O choque de 100°C/25 minutos é um valor elevado e, em consequência, muitos dos processamentos de pasteurização que são menos rigorosos podem permitir a sobrevivência destes bolores. Seis por cento, isto é 3 cepas de 50 apresentam esta sobrevivência. Deve ser observado na *tabela 5* que 82,0% dos isolados sobreviveram ao choque inicial; que 46,8% podem sobreviver à 95°C/5 minutos (possível sobrevivência ao tratamento de pasteurização da polpa concentrada) e que isolados altamente resistentes ao calor (sobrevivência à 100°C/5 minutos) representam 36,0% do total de isolados.

**TABELA 5.** % de sobrevivência de 50 isolados de fungos submetidos a diferentes choques térmicos em polpa de tomate

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

O fungo selecionado como o mais termo-resistente que sobreviveu à 100°C/25 minutos foi encontrado nos lotes 4, 5 e 8. As três cepas foram identificadas como *Neosartorya fischeri* [9], sendo originário da água de pré-lavagem e transporte. De acordo com estudos anteriores, ascósporos de *Neosartorya fischeri* podem sobreviver em água em ebulição por 1 hora [10], confirmando que esta espécie de fungo é altamente resistente ao calor. Os ascósporos deste fungo são mostrados na *Figura 1*.



**FIGURA 1.** Imagens de ascósporos livres de *Neosartorya fischeri* observados com microscópio confocal MR1024, objetiva 100X, ocular 10X e coloração com laranja de acridina (0.025p/v)

A ocorrência do fungo *N. fischeri* em frutas e seus produtos vem sendo relatada constantemente nos últimos dez anos [1, 6, 9, 19, 20, 21, 25]. Entretanto, só recentemente foi reportada a presença de *N. fischeri* em produto de tomate [12].

#### 4 – CONCLUSÕES

A incidência de fungos termo-resistentes nas amostras analisadas foi baixa. A contaminação mais alta ocorreu na matéria prima e água de transporte e pré lavagem. A ausência de fungos termo-resistentes nas amostras durante o período de entressafra não implica necessariamente na inexistência destes microrganismos nestas amostras.

O *N. fischeri* foi selecionado como o mais resistente dos isolados. Sua presença foi detectada na água da pré-lavagem e transporte dos tomates.

O uso de matéria prima de boa qualidade, a lavagem e seleção adequada desta matéria prima, a sanitificação e condições higiênicas adequadas das áreas de processamento/envase e a hermeticidade da embalagem são medidas de controle tanto de fungos termo-resistentes quanto de fungos comuns na planta de processamento de tomate.

#### 5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ARAGÃO, G. M. F. Identificação e determinação da resistência térmica de fungos filamentosos termo-resistentes isolados da polpa de morango. Campinas, 1989, 139p. (Tese de Mestrado), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
- [2] BERNHARDT, L. W. Enlatamento de hortaliças naturalmente ácidas. In: PASCHOALINO, J. E. (Ed.) **Processamento de Hortaliças**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1994, p. 18-32. (Manual Técnico, 4).
- [3] BEUCHAT, L. R. Extraordinary heat resistance of *Talaromyces flavus* and *Neosartorya fischeri* ascospores in fruit products. **Journal of Food Science**, v. 51, n. 6, p. 1506-1510, 1986.
- [4] BEUCHAT, L. R. & PITT, J. I. Detection and enumeration of heat resistant molds. In: VANDERZANT, C. & SPLITTSTOESSER, D. F. (Eds.) **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 3ª ed., Washington: A.P.H.A., 1992. Cap. 17, p. 251-253.
- [5] ENGEL, G. & TEUBER, M. Heat resistance of *Byssoschlamys nivea* in milk and cream. **International Journal of Food Microbiology**, v. 12, p. 225-234, 1991.
- [6] ENIGL, D. C.; KING Jr., A.D. & TOROK, T. *Talaromyces trachyspermus*, a heat resistant mold isolated from fruit juice. **Journal of Food Protection**, v. 56, n. 12, p. 1039-1042, 1993.
- [7] FERNANDES, M. S. Contaminação fúngica e a legislação vigente no Brasil e outros países. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DA ATUALIZAÇÃO DA TECNOLOGIA DO PROCESSAMENTO E ENVASE ASSÉPTICO DE PRODUTOS DERIVADOS DE TOMATE. Anais. São Paulo, 1995.
- [8] GRAJALES, G. M. A. Avaliação microbiológica do concentrado de tomate em diferentes pontos da linha de processamento. Campinas, 1996, 137p. (Tese de Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
- [9] GUMERATO, H. F. Desenvolvimento de um programa de computador para identificação de alguns fungos comuns em alimentos e determinação da resistência térmica de *Neosartorya fischeri* isolado de maçãs. Campinas, 1995, 98 p. (Tese de Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
- [10] 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.
- [11] JESENKA, Z.; PIECKOVA, E. & BERNAT, D. Heat resistance of fungi from soil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 19, p. 187-192, 1993.
- [12] KOTZEKIDOU, P. Heat resistance of *Byssoschlamys nivea*, *Byssoschlamys fulva* and *Neosartorya fischeri* isolated from canned tomato paste. **Journal of Food Science**, v. 62, n. 2, p. 410-412/437, 1997.
- [13] MAGGI, A.; GOLA, S.; SPOTTI, E.; ROVERE, P. & MUTTI, P. Trattamenti ad alta pressione di ascospore di muffe termoresistenti e di patulina in nettare di albicocca e in acqua. **Industria Conserve**, v. 69, p. 26-29, 1994.
- [14] MINAMI, K. Tecnologia de Produção - Parte A. In: MINAMI, K. & FONSECA, H. (Eds.) **Tomate - Produção, Pré-Processamento e Transformação Agroindustrial**. Série Extensão Agroindustrial, nº 8, 1982.
- [15] MURO, M. A. & LUCHI, M. R. Métodos de preservação. In: MURO, M. A. & LUCHI, M. R. (Eds.) **Preservação de microorganismos**. Campinas: Publicação FTPT, 1989, Cap.1, p. 8-12.
- [16] OLLIVER, M. & RENDLE, T. A new problem in fruit preservation. Studies on *Byssoschlamys fulva* and its effect on the tissues of processed fruit. **Journal of Society Chem. Ind.**, v. 53, p. 166T, 1934. Apud 24.
- [17] PITT, J. I. & HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. Sydney: Academic Press, 1985, 413p.
- [18] ; PITT, J. I. & HOCKING, A. D. SAMSON, R. A. & KING, A. D. Recommendations from the closing session of SMMEF II. In: PITT, J. I. & HOCKING, A. D. SAMSON, R. A. & KING, A. D. (Eds.) **Modern methods in food mycology**. Amsterdam: Elsevier, 1992, p. 359-368.
- [19] 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.
- [20] SAMSON, R. A.; VAN REENEN HOEKSTRA, E. S. & HARTOG, B. J. Influence of pretreatment of raspberry pulp on the detection of heat resistant moulds. In: SAMSON, R. A.; HOCKING, A. D.; PITT, J. I. & KING, A. D. (Eds.) **Modern methods in food mycology**. Amsterdam: Elsevier, 1992, p. 155-158.
- [21] SCOTT, V. N. & BERNARD, D. T. Heat resistance of *Talaromyces flavus* and *Neosartorya fischeri* isolates from comercial fruit juices. **Journal of Food Protection**, v. 50, n. 1, p. 18-20, 1987.
- [22] SPLITTSTOESSER, D. F. Fungi of importance in processed fruits. In: ARORA, D. K.; MUKERJI, K. G. & MARTH, E. H. (Eds.) **Handbook of Applied Mycology - Foods and Feeds**. New York: Marcel Dekker Inc., 1991. v. 3, Cap. 7, p. 201-219.
- [23] SPOTTI, E.; QUINTARALLA, S. & MUTTI, P. Contaminazione da spore fungine termoresistenti di frutta, pomodoro e loro derivati. **Industria Conserve**, v. 67, p. 421-425, 1992.
- [24] TOURNAS, V. Heat resistant fungi of importance to the food and beverage industry. **Critical Review Microbiology**, v. 20, n. 4, p. 243-263, 1994.
- [25] TOURNAS, V. & TRAXLER, R. W. Heat resistance of a *Neosartorya fischeri* strain isolated from pineapple juice frozen concentrate. **Journal of Food Protection**, v. 57, n. 9, p. 814-816, 1994.
- [26] YATES, A. R. & FERGUSON, W. E. Observation on *Byssoschlamys nivea* isolated from cucumber brine. **Canadian Journal of Botany**, v. 41, p. 1599-1601, 1963.

#### 6 – AGRADECIMENTOS

À CAPES, FAPESP e às empresas participantes pelo suporte técnico e financeiro.