

Marcela Vicente Vieira Andrade Gonçalves

SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA DE POLPA DE CUPUAÇU PROCESSADA TERMICAMENTE

Marcela Vicente Vieira Andrade Gonçalves

SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA DE POLPA DE CUPUAÇU PROCESSADA TERMICAMENTE

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Tecnologia de Processos em Químicos e Bioquímicos Engenharia Química, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química

Orientadores: Verônica Maria de Araújo Calado e Amauri Rosenthal

SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA DE POLPA DE CUPUAÇU PROCESSADA TERMICAMENTE

Marcela Vicente Vieira Andrade Gonçalves

Tese submetida ao corpo docente de pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para o grau de Doutor em Ciências.

Aprovado por:	
Prof ^a . Verônica Calado, D.Sc – Orientadora	
Amauri Rosenthal, D.Sc – Orientador	
Prof. Marcelo Cristianini, D.Sc	
Janine Passos Lima da Silva, D.Sc	
Prof ^a . Lourdes Maria Pessoa Masson, D.Sc	
Prof ^a . Eliana Flávia Camporesi Sérvulo, D.Sc	
Prof ^a . Andréa Medeiros Salgado, D.Sc	

DEDICO Ao meu esposo, Paulo Maurício, que sempre esteve comigo, disposto a ajudar-me com paciência e compreensão nos momentos que encontrei dificuldades ...Te amo! Aos meus pais, Elidivar e Maria, e meus irmãos Rosângela, Larissa, Gabriel e Vanessa pessoas especiais que sempre incentivaram e apoiaram todas as minhas escolhas.

Agradecimento

Agradeço a DEUS, por estar em todos os momentos ao meu lado. Pela vida, pela saúde, pela família maravilhosa e por todas as oportunidades que sempre me deste. Sem Ele eu nada seria:

Ao meu esposo PAULINHO. Nem sei como expressar aqui tudo que ele representou para mim nesses anos difíceis de adaptação. Lembro-me de cada noite que ficamos no sofá estudando, traduzindo artigo, pelos finais de semana que não pudemos sair, pelos feriados não curtimos, ele esteve literalmente em todos os momentos do meu doutorado, sempre me incentivando com muito amor e carinho. Agradeço pelas muitas noites de choro e desespero e sempre com muita paciência, compreensão, amizade, companheirismo, respeito, sinceridade, força e seu imenso amor. Te amo!!!!!

Aos meus PAIS e IRMÃOS (ROSÂNGELA, LARISSA, GABRIEL e VANESSA) pelo imenso incentivo, respeito e amor sempre demonstrado. Agradeço por acreditarem em meu sonho. Agradeço em especial a minha irmã VANESSA, que tantas vezes veio ficar comigo aqui no Rio, para me incentivar e me motivar quando o desespero já estava muito grande, pelas muitas noites em claro estudando, sempre com muita paciência. Não tenho como te agradecer por esses momentos valiosos.

Aos meus SOGROS e CUNHADOS, por terem me recebido com tanto carinho aqui no Rio. Obrigada por me ajudarem no momento em que me vi sozinha sem meus familiares por perto e perdida pelas muitas ruas dessa cidade tão grande...

À minha orientadora, VERÔNICA, por ter aceitado me orientar, pelo exemplo de profissionalismo e dedicação, e, sobretudo por acreditar que eu era capaz;

Ao meu co-orientador, AMAURI, pela paciência e ajuda durante esses anos de aprendizado.

A JANINE, minha amiga e meu apoio de todas as horas, por aceitar fazer parte dessa banca de doutorado, pela paciência e atenção, pelo carinho e principalmente pelo companheirismo no período mais difícil, desde omeu início tumultuado e dos muitos choros, das muitas risadas, enfim da nossa amizade. Muito obrigada!!!!

Aos membros da banca ANDRÉA, ELIANA, MARCELO, LOURDES por terem aceitado fazer parte dessa banca de doutorado, obrigada, pelas considerações e ajuda.

Agradeço de forma especial as amigas ANDRÉIA e SILVANIA, mesmo longe se fizeram presentes nos momentos mais angustiantes e difíceis da minha vida acadêmica. Sinto muita falta das noites no laboratório, das muitas risadas...

Não posso esquecer de uma grande amiga SIMONE, não esperava conhecer uma pessoa tão especial durante as análises na Embrapa. Muito obrigada por todo carinho e paciência que teve comigo, mesmo quando você não estava mais na Embrapa, sempre te disse não tenho como te agradecer por toda ajuda...

À minha avó DIVA por todas as orações, continuei te dando muito trabalho mesmo no doutorado. Muito obrigada!!!

À amiga SILMARA, pelo apoio, companheirismo, pela maravilhosa convivência e muitos momentos de descontração;

Aos pesquisadores da Embrapa/RJ, Edna e Edmar, pela ajuda cedendo o laboratório para as minhas análises. Em especial à Edna e a Ivanilda que me ajudaram com as análises moleculares, muito obrigada!!

A Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) pela oportunidade de realização do curso;

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo;

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

GONÇALVES, Marcela Vicente Vieira Andrade. **Segurança Microbiológica de polpa de cupuaçu Processada Termicamente.** Rio de Janeiro, 2014. Tese (Doutorado em tecnologia de ProcessosQuímicos e Bioquímicos) - Escola de Química, UniversidadeFederal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014

Cupuaçu, também conhecido como cupu, cupuassu ou cupu-do-mato, é uma das principais e mais consumidas frutas da região amazônica brasileira. O cupuaçu é uma fruta ácida, de sabor exótico e agradável, rico em compostos voláteis e sais minerais, pertence à família Sterculiacea, cuja denominação binomial é Theobroma grandiflorum schum. industrialização de polpas de frutas tem crescido de forma acentuada no Brasil e, tanto para o mercado interno como para exportação, é usada no preparo direto de outros produtos pelo consumidor e, principalmente, como ingrediente de industrialização secundária. O padrão de qualidade e de segurança de polpas de frutas tem variado enormemente, não satisfazendo aos requisitos sanitários do mercado interno e implicando em rejeição pelo mercado externo. No caso especifico do cupuaçu, a polpa tem apresentado crescimento e potencial de ampliação de produção, sendo de grande relevância para a região amazônica e com perspectivas de expansão para outras regiões. A exemplo de outras polpas tropicais e amazônicas, o processo de conservação por pasteurização térmica é dimensionado sem levar em consideração as características e a microbiota específica do produto. Este estudo visou caracterizar a microbiota presente na polpa de cupuaçu ao longo de uma linha de produção por meio de análises microbiológica, físico-química, reológica, com intuito de identificar o microrganismo alvo para o estabelecimento do processo térmico e dimensionar o processo de pasteurização com base na sua termorresistência na polpa. Em todas as etapas de processamento nas quais foram coletadas amostras, não houve multiplicação de coliformes a 35°C ou coliformes a 45°C, ou presença de Salmonella spp. O pH médio foi de 3,68. Foram identificados dois fungos termorresistentes, Aspergillus niger e Aspergillus flavus, sendo este último o que apresentou potencial de produção de micotoxinas. Os esporos de cada isolado com um mês de idade foram submetidos a diferentes choques térmicos para selecionar a linhagem de fungo mais termorresistente, tendo o isolado fungico selecionado resistido a 100°C/2 min e sendo identificado como Aspergillus niger. Foram utilizados os modelos linear, de Weibull e de Alderton e Snell para inativação térmica do fungo e verificou-se que o melhor ajuste ocorreu pelo modelo de Weibull, sendo necessário um tratamento de 95°C/20,26 minutos ou a uma temperatura maior por menos tempo, 98°C/6,83 min ou 101°C/1,12 min para redução da população em 5 ciclos logarítmicos. O A. niger revelou-se muito resistente, evidenciando que o tratamento dado pela indústria não é suficiente para garantir a destruição do fungo.Os resultados demonstraram a necessidade de aprimorar as boas práticas agrícolas e de fabricação e implantação de sistemas de controle de qualidade, para minimização dos riscos associados à contaminação por microrganismos.

Palavras-chave: Fungo, polpa de cupuacu, termorresistência, inativação, reologia.

ABSTRACT

GONÇALVES, Marcela Vicente Vieira Andrade. Segurança Microbiológica de polpa de cupuaçu Processada Termicamente. Rio de Janeiro, 2014. Tese (Doutorado em tecnologia de ProcessosQuímicos e Bioquímicos) - Escola de Química, UniversidadeFederal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014

Cupuacu, also known as cupu, cupuassu or cupu-do-mato is one of the leading and most widely consumed fruit in the Brazilian Amazon region. The cupuaçu is an acid fruit, with exotic and niceflavor, rich in volatile compounds and mineral salts, and belongs to Sterculiacea family, whose binomial name is Theobroma grandiflorum Schum. The industrialization of fruit pulp has grown in an accentuated way in Brazil and both in the domestic market and for export. It is used in the direct preparation of other products by consumers and especially as an ingredient in secondary industrialization. The standards of quality and safety of Brazilian fruit pulps have greatly varied, not meeting the health requirements of the internal market and resulting in rejection by the foreign market. In the specific case of cupuaçu, the pulp has shown potential for growth and expansion of production, being of great relevance for the Amazon region and with prospects for expansion to other regions. By the example of other tropical and Amazonian pulps, the conservation process by thermal pasteurization has been carried out without taking into account the characteristics and the specific microbiota of the product. This study aimed to characterize the microbiota present in the cupuaçu pulp along a production line through microbiological, physic-chemical and rheological analyses, aiming at identifying the target microorganism to establish the thermal process and scale up the pasteurization process based in the microbial heat resistance in the pulp. At all stages of processing in which samples were collected, there was no multiplication of coliforms at 35 ° C or 45 ° C coliform or Salmonella spp. The average pH was 3.68. Two heat resistant molds were identified, Aspergillus niger and Aspergillus flavus, the latest presenting potential for mycotoxin production. The most heat resistant insulated fungus, at 1 month of age, survived at 100 °C/2 min and was identified as Aspergillus niger. The linear, Weibull, Alderton and Snell models were used for thermal inactivation of the fungus and it has been found that the best fit was the Weibull model, being necessary a treatment of 95°C/20,26 minutes or at a greater temperature for less time, 98°C/6,83 min or 101°C/1,12 min for 5 log cycles reduction. The A. niger proved to be very resistant, indicating that the treatment given by the industry is not sufficient to ensure the destruction of the fungus. The results demonstrated the need to enhance good agricultural and manufacturing practices and the implementation of quality control systems to minimize the risks associated with contamination by microorganisms.

Keywords: Aspergillus niger, cupuaçu pulp, heat resistance, inactivation, rheology

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Rendimento do fruto do cupuaçu (polpa, casca e semente) e	
suas respectivas porcentagens.	22
Tabela 2 - Composição físico-química das sementes de cupuaçu.	23
Tabela 3 - Composição físico-química aproximada da polpa de cupuaçu.	26
Tabela 4 - Características e composição da polpa de cupuaçu.	26
Tabela 5 - Composição química da polpa de cupuaçu (mg/100 g base úmida).	27
Tabela 6 - Principais características do Aspergillus niger	40
Tabela 7 - Amostras de frutos in natura e polpas congeladas de cupuaçu com	
suas respectivas codificações	53
Tabela 8 - Tratamentos Térmicos aplicados aos Fungos Isolados	58
Tabela 9 - Ensaio da termorresistência utilizando as temperaturas e tempos	
de aquecimento em polpa de cupuaçu	59
Tabela 10 - Genes-alvo das proteínas das vias de síntese de cada micotoxina	61
Tabela 11 - Oligonucleotídeos iniciadores (primers) usados na detecção dos	
genes que codificam as proteínas-chave das vias de síntese de cada micotoxina	62
Tabela 12 - Cálculos dos ajustes de pasteurização	63
Tabela 13 - Caracterização físico-química de polpa de cupuaçu congelada	64
Tabela 14 - Estimativas dos parâmetros do modelo Ostwald-de-Waelle	
(Lei da Potência) para polpa de cupuaçu	70
Tabela 15 - Resultados das análises microbiológicas realizadas na polpa de cupuaçu	74
Tabela 16 - Sobrevivência dos 2 fungos isolados submetidos a diferentes tratamentos	
térmicos nas condições do experimento	82
Tabela 17 - Limite de sobrevivência dos fungos filamentosos na polpa de cupuacu	83
Tabela 18 - Recuperação dos ascósporos (30 dias) e porcentagem de ativação do	
isolado mais termorresistente em pol pa de cupuaçu a $80^{\rm o}{\rm C}$	84
Tabela 19 - Contagem do número de sobreviventes com o tempo de aquecimento	
em polpa de cupuaçu	84
Tabela 20 - Coeficiente de determinação (R ²) e média quadrática dos erros	
(MQ _E) dos modelos de Weibull, de Alderton e Snell e Linear ajustados	
à curva de sobrevivência de ascósporos de <i>A. niger</i> em polpa de cupuacu	88

Tabela 21 - Parâmetros dos modelos de Weibull, de Alderton e Snell e	
Linear na inativação de ascósporos em polpa de cupuaçu a 95, 98 e 101°C	
Tabela 22 - Valores de t ₁ e t ₅ (Modelo de Weibull), D e 5D (Modelo linear)	
determinados para a inativação de ascósporos de A. niger	90
Tabela 23 - Comparação entre os valores de "D" teórico e corrigido	
Tabela 24 . Comparação entre D ₉₅ e F ₉₅ , considerando o tratamento térmico industrial	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Mercado mundial de cupuaçu	20
Figura 2 - Foto ilustrativa de cupuaçu (Theobroma Grandiflorum)	21
Figura 3 -Foto ilustrativa da fruta de cupuaçu (Theobroma Grandiflorum)	22
Figura 4 -Fluxograma do processo produtivo para obtenção da polpa de cupuaçu.	27
Figura 5 - Morfologia representativa de espécies do gênero Aspergillus niger	39
Figura 6 - Morfologia representativa de espécies do gênero Aspergillus flavus	41
Figura 7 - Curvas de escoamento de diferentes tipos de fluidos	51
Figura 8 - Efeito do cisalhamento sobre o comportamento de partículas e agregados	52
Figura 9 - Fluxograma do processamento do fruto cupuaçu para obtenção de polpa	54
Figura 10 - Pasteurizador Armfield FT25D SSHE com sistema acoplado, utilizado	
na planta piloto da Embrapa Agroindústria de Alimentos.	63
Figura 11 - Comportamento das curvas de viscosidade aparente (Pa.s) das amostras	
Provenientes das etapas de processamento da polpa de cupuaçu. Todas as amostras	
em uma temperatura fixa. ◆ Viscosidade PEMB Pa.s; ■ Viscosidade E Pa.s;	
▲Viscosidade H Pa.s; × Viscosidade P Pa.s; × Viscosidade A Pa.s.	69
Figura 12 - Curva de escoamento da amostra PEMB nas diferentes temperaturas	
em função da viscosidade e taxa de cisalhamento. (A) 25°C; (B) 45°C; (C) 60°C;	
(D) 80°C e (E) 95°C	73
Figura 13 - Crescimento de fungo termorresistente na polpa de cupuaçu proveniente	
das etapas de processamento: (a) homogeinização; (b) pasteurização e (c) envase	77
Figura 14 - Crescimento de fungo termorresistente na polpa de cupuaçu após três	
meses de validade comercial, proveniente das etapas de processamento:	
(a) homogeinização; (b) pasteurização e (c) envase	79
Figura 15 - Polpa do cupuaçu pasteurizada na Embrapa sem crescimento aparente	
de fungo	80
Figura 16 - (a). Aspergillus flavus (b). Aspergillus niger.	82
Figura 17 - Curva de ativação do isolado fúngico de maior termorresistência a 80°C	84
Figura 18 - Curva de sobrevivência térmica do Aspergillus niger	85
Figura 19 - Curvas de sobrevivência de ascósporos de <i>A. niger</i> estimadas pelos	

modelos de Weibull, linear e de Alderton e Snell em polpa de cupuaçu a 95, 98	
e 101°C	87
Figura 20 - Curva para o calculo do valor de "z" de Alderton e Snell (1970)	
do A. Níger	90
Figura 21 - Gráfico comparativo entre os tratamentos térmicos dados pela	
indústria e o baseado no fungo A. niger	92
Figura 22 - Eletroforese em gel de agarose de análise potencial aflatoxigênicos	
usando primers AFLR (1 e líder da banda 8-Low Mass; 2 - A. flavus, 3 - A. niger,	
4 - tensão 1, 5 - 1 6 tensão-deformação 2, 7-deformação 2)	93

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	18
2.1. OBJETIVO GERAL	18
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3. REVISAO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1. CUPUAÇU (Theobroma grandiflorum Schum)	19
3.2. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO CUPUAÇU	24
3.3. CARACTERÍSTICAS DA POLPA DE CUPUAÇU	25
3.4. FLUXOGRAMA DO PROCESSO PRODUTIVO DA POLPA	
DE CUPUAÇU	27
3.4.1. Cultivo	28
3.4.2. Colheita	28
3.4.3. Transporte	28
3.4.4. Recepção e Pesagem	29
3.4.5. Seleção	29
3.4.6. Lavagem	29
3.4.7. Quebra e descascamento	30
3.4.8. Despolpamento	30
3.4.9. Pasteurização	30
3.4.10. Envasamento da polpa	31
3.4.11. Congelamento rápido	31
3.4.12. Armazenamento	32
3.5. PRINCIPAIS GRUPOS DE FUNGOS DETERIORANTES EM FRUTAS	33
3.5.1 Fungos Filamentosos	35
3.5.2 Genero Aspergillus	38
3.5.2.1 Aspergillus niger	38
3.5.4.2 Aspergillus flavus	41
3.5.3 Micotoxinas	42
3.6 CINÉTICA DE INATIVAÇÃO TÉRMICA DE MICRORGANISMOS	45

3.7 COMPORTAMENTO REOLÓGICO DA POLPA DE FRUTA	49
4.0 MATERIAL E MÉTODOS	53
4.1 MATERIAL	54
4.2 METODOLOGIA	54
4.2.1 Caracterização Físico-Química da Polpa de Cupuaçu	54
4.2.2 Caracterização Reológica	54
4.2.3 Análises Microbiológicas	55
4.2.4 Ensaio para Determinação da Termorresistência	55
4.2.4.1 Determinação do tempo de subida de temperatura	55
4.2.4.2 Análise de Fungos Termorresistentes	56
4.2.4.3 Isolamento e identificação de fungos Termorresistentes	56
4.2.4.4 Preparo da suspensão de ascósporos	57
4.2.4.5 Seleção do isolado mais Termorresistente	57
4.2.5 Ensaio com a Cepa de Fungo mais Termorresistente	58
4.2.5.1 Produção e coleta de ascósporos	58
4.2.5.2 Determinação das condições ótimas de ativação dos ascósporos	58
4.2.5.3 Determinação da Termorresistência dos Ascósporos do Isolado	
Fúngico mais Termorresistente	59
4.2.6 Análise do Potencial de Produção de Micotoxinas	61
4.2.7Avaliação do Binômio Tempo-Temperatura da	
Pasteurização de Polpa de Cupuaçu	63
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	63
5.2 DETERMINAÇÃO DAS CURVAS DE ESCOAMENTO E DA	
VISCOSIDADE DA POLPA DE CUPUAÇU	66
5.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	73
5.4 ENSAIO PARA DETERMINAÇÃO DA TERMORRESISTÊNCIA	75
5.4.1 Análise de Fungos Termorresistentes	76
5.4.3 Ativação ótima dos ascósporos	83
5.4.4 Resistência térmica do isolado mais termorresistente	84
5.5 POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE <i>AFLATOXINA</i>	92
5.5.1 Potencial de produção das micotoxinas: Desoxinivalenol (DON),	
Fumonisina, Ocratoxina e Patulina	94

6.0 CONCLUSÃO	95
7.0 REFERÊNCIAS	98
ANEXO 1	

1- INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas, com mais de 44 milhões de toneladas anuais, sendo superado pela China (193 milhões de toneladas) e Índia (71 milhões de toneladas) (FAO, 2010) (Anuário Brasileiro de Fruticultura, 2013). O Brasil possui uma das maiores áreas cultiváveis do planeta, além de uma ampla variedade de solos e climas. Desse modo, detém potencial para exportar praticamente todas as espécies de cultura que agregam valor econômico (FAO, 2010), dentre as quais as frutas de clima tropical, que têm amplo mercado e elevado valor comercial. Muitas dessas espécies frutíferas são nativas e ainda não totalmente exploradas comercialmente. Em contraste à elevada produção anual brasileira, exporta-se apenas 1% do total produzido, evidenciando fraca inserção no mercado internacional (FERNANDES, 2006). Desses, 53% destinam-se ao consumo nacional *in natura* e 46% para a indústria processadora, sendo a exportação constituída basicamente por frutas frescas, (FAO, 2010; Secretaria de Estado de Agricultura e Abastecimento/PR — DERAL, 2012). Tal conjuntura demanda esforços de entidades públicas e privadas no aprimoramento da fruticultura brasileira, ao longo da cadeia de produção primária, processamento e comercialização, tanto para o mercado interno como para exportação.

Em nosso País, cultiva-se uma grande variedade de frutas. No entanto, o seu aproveitamento é parcial, sendo ora para consumo *in natura*, ora para processamento, restando uma grande parcela que se perde devido aos danos no manejo, deficiência no transporte e embalagem, preços baixos no mercado e reduzida capacidade técnica e operacional das indústrias processadoras. Transcorrida a época da safra, a fruta que esporadicamente se produz em outros períodos não tem a qualidade adequada à época da colheita e os preços se multiplicam pela demanda contínua.

O círculo vicioso dentro do qual se move a industrialização de frutas explica em boa parte os hábitos do mercado que demandam principalmente fruta fresca. A obtenção de polpas de fruta de boa qualidade, tanto para o mercado interno, quanto para o externo, isenta principalmente de contaminação microbiológica, permitirá não apenas prolongar o seu período potencial de consumo, como também atenuar o problema da grande perda póscolheita.

O agronegócio de fruticultura cresce na razão de 5% ao ano em todo mundo e representa uma excelente oportunidade para que o Brasil possa aumentar a sua participação nesse mercado. Para tanto, é necessário incorporar e internalizar padrões de produção e

distribuição para atender essas demandas por meio de ações, coordenadas e integradas em rede para tornar competitivo o mercado exportador.

A despeito do crescimento considerável nos últimos anos do mercado de polpas congeladas, abrangendo variedade de frutas de sabores exóticos, a inexistência ou a não conformidade a padrões, originando produtos sem qualidade e uniformidade (BUENO *et al.*, 2002), limita a expansão e sustentabilidade.

Dentre as frutas exóticas com potencial destacado, encontra-se o cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*shum), um dos mais importantes frutos tipicamente amazônicos. O cupuaçu é uma fruta originária do Sul e do Sudeste da Amazônia e é apreciado por sua polpa ácida de sabor e aroma intenso. A parte do fruto mais aproveitada em termos comerciais ainda é a polpa, usada *in natura* para elaboração de suco, ou como matéria-prima para fabricação de produtos derivados como cremes, tortas, sorvetes, néctar, balas, geléias, licores entre outros (YANGet al., 2003).

O processo térmico usualmente aplicado a polpas de frutas no Brasil, notadamente no caso das frutas tropicais e amazônicas, não leva em consideração as características específicas das frutas e dos produtos nem a microbiota específica deteriorante e patogênica, que pode comprometer a segurança e qualidade do produto.

A pesquisa de fungos termorresistentes em produtos à base de frutas torna-se nesse sentido relevante, considerando a deterioração dos produtos, mas igualmente o potencial de produção de micotoxinas, tais como aflatoxina, ocratoxina, fumitremorgina. Tais toxinas são metabólitos tóxicos com efeitos mutagênicos, teratogênicos e carcinogênicos sobre humanos e animais, sendo importante ressaltar que uma única espécie de fungo é capaz de produzir uma ou várias micotoxinas, sendo que estas podem ser produzidas por diferentes espécies de fungos.

A maior parte dos fungos deteriorantes é pouco termorresistente. As poucas espécies que possuem a termorresistência como característica, produzem esporos resistentes, denominados ascósporos, que possuem uma grande resistência à variação de pH, presença de açúcares, gorduras, ácidos, entre outros. Essa microbiota deteriorante é muito comum em alimentos devido à contaminação principalmente pelos gêneros *Aspergillus*, *Neosartorya*, *Byssochlamys*, *Talaromyces* e *Eupenicillium*. Grande parte da deterioração em alimentos termoprocessados, provocada por essas espécies, é devido à sobrevivência dos ascósporos ao tratamento de pasteurização.

As espécies *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus* estão dentre os fungos de maior incidência na deterioração de alimentos. São comumente encontrados em regiões de clima quente, com incidência principalmente no campo, mas também em alimentos estocados, estando também associados ao amolecimento de frutos frescos.

O presente trabalho teve por objetivo efetuar a caracterização físico-química, reológica e microbiológica da polpa de cupuaçu, verificando, em particular, a incidência de fungos termorresistentes com potencial de produção de micotoxina na polpa pasteurizada e congelada. Assim, pretende-se contribuir para definição do processo térmico, visando a garantia de sanidade e o estabelecimento de um padrão de identidade e qualidade do produto.

Este trabalho é parte integrante das iniciativas que vêm sendo realizadas abrangendo a Embrapa Agroindústria de Alimentos, a Universidade Estadual de Campinas e a Universidade de Santa Catarina, juntamente com o Instituto Brasileiro de Frutas (IBRAF), no sentido de se avaliar a segurança microbiológica de produtos à base de frutas, em particular sucos, néctares e polpas, bem como definir processos térmicos para garantia de sanidade e otimização de qualidade dos produtos industriais.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterização físico-química, microbiológica e reológica e determinação das condições (tempo/temperatura) da pasteurização para inativação de fungos termorresistentes em polpa de cupuaçu.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a polpa de cupuaçu proveniente de unidade processadora, concernente a sua composição química, comportamento reológico e microbiota contaminante;
- Isolar, identificar e avaliar o potencial de produção de micotoxinas de fungos termorresistentes contaminantes de linha processadora de polpa de cupuaçu;
- Definir a cinética de inativação térmica do fungo de maior termorresistência isolado de linha de processamento de polpa de cupuaçu, definido como microrganismo alvo do processo, e proposição de um modelo matemático para descrever essa cinética;
- Determinar o binômio tempo-temperatura para garantir a sanidade microbiológica da polpa de cupuaçu, com base na termorresistência do microrganismo alvo.

3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum* Schum)

O Brasil possui uma grande diversidade de frutas regionais, principalmente nas regiões Norte e Nordeste. A fruticultura brasileira corresponde, aproximadamente, a 25% do valor da produção agrícola nacional, sendo um dos segmentos mais importantes da agricultura do país (FAO, 2010). Dentre as frutas tropicais nativas da Amazônia, o cupuaçu é uma das plantas frutíferas de maior importância, particularmente, devido a sua participação na composição dos sistemas de produção, cultivo e extrativismo, além da grande aceitação e consumo de sua polpa, tornando-o o que reúne as melhores condições de aproveitamento industrial (LANES, 2003).

Também conhecido como cupu, cupuassu ou cupu-do-mato, o cupuaçu pertence à família Sterculiacea, cuja espécie é *Theobroma grandiflorum schum*. É uma fruta típica da Amazônia, sendo cultivada nos estados do Pará, Maranhão e Tocantins. Os agricultores do Pará foram os primeiros a cultivá-la de maneira planejada no início da década de 80. Entretanto, observa-se também o cultivo de espécies isoladas nos estados de São Paulo, Bahia e Rio de Janeiro (BASTOS *et al.*, 2002).

Estatísticas do governo do Pará, de cerca de uma década atrás, apontavam que a produção de cupuaçu estava em forte ascensão no estado, passando de 10 milhões em 1998 para 21,4 milhões de frutos colhidos em 2000, representando um aumento de mais de 55% ao ano. Em 2003, a produção atingiu 33.570 toneladas do fruto (IBGE/GCEA/LSPA, 2003). Nos primeiros quatro meses de 2002, o estado do Amazonas exportou 50 toneladas de semente de cupuaçu para o Japão, país que está investindo muito em pesquisa e produtos à base de cupuaçu (LIMITES ÉTICOS, 2009).

O cupuaçu vem conquistando o mercado de outras regiões do Brasil e despertando o interesse de países da Europa e da Ásia, sobretudo Inglaterra, Japão e Suécia, além dos Estados Unidos e países sul-americanos (Figura 1) (MEC, 2007). Como consequência da demanda, espera-se uma produção cada vez mais organizada, com maior regularidade na oferta do produto para o setor industrial (MAIA *et al.*, 2007).

Maiores compradores mundiais da polpa de cupuaçu brasileira

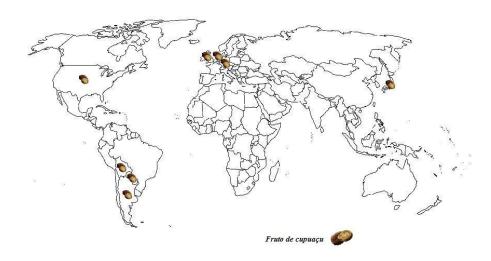


Figura 1: Mercado mundial de cupuaçu. Fonte: MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO, 2007.

O cupuaçu tem um grande potencial para a industrialização, sendo que o seu valor econômico está baseado na industrialização e comercialização da polpa. Apesar das sementes constituírem cerca de 20% da massa do fruto e apresentarem alto valor nutritivo, constituem-se, na maioria das vezes, em resíduo, sendo praticamente descartadas durante o beneficiamento do fruto. Estudos têm sido realizados para o aproveitamento de suas sementes para o desenvolvimento de produtos análogos ao chocolate e produtos achocolatados, pois o cupuaçu é do mesmo gênero do cacau (*Theobroma*). A partir de suas sementes fermentadas e secas, pode-se produzir o licor do cupuaçu, com características físicas, químicas, nutricionais e sensoriais semelhantes ao licor do cacau (LOPES e PEZOA-GARCÍA; VASCONCELOS, 2003). Tal aproveitamento já é uma realidade comercial, com empresas processando diferentes produtos à base da "manteiga" ou licor do cupuaçu das sementes do cupuaçu, denominado de cupulate.

O cupuaçu é uma fruta ácida, de sabor exótico e agradável, rica em compostos voláteis e sais minerais. Apresenta alto teor de pectina, comparável ao da maçã, revertendo em diferencial positivo da fruta, considerando que tal fibra dietética solúvel pode promover, conforme demonstrado em estudos, redução dos níveis séricos de colesterol e triglicerídeos em ratos e humanos (FIETZ e SALGADO, 1999).

O cupuaçuzeiro (Figura 2) é uma árvore que atinge cerca de 20 m de altura e 45 cm de diâmetro de tronco, no estado silvestre. Quando cultivada, a altura pode variar de 6 a 8 m. A

produção do cupuaçu tem início no terceiro ano de cultivo, sendo bastante irregular, com grande variação entre plantas e sendo ainda bastante sensível à variação das condições climáticas (LOCATELLI *et al.*, 2001; REISDORFF *et al.*, 2002). Tem período de frutificação ocorrendo entre novembro e junho, atingindo o pico, geralmente, em fevereiro e março. Tem um bom desenvolvimento em regiões onde a temperatura média oscila entre 21 e 27° C e a umidade relativa do ar varia de 77-88%. É uma planta de boa adaptação à sombra, o que faz com que seja apropriada para a formação de consórcios com outras plantas de porte florestal (VENTURIERE, 1993).



Figura 2. Foto ilustrativa de cupuaçu (*Theobroma Grandiflorum*)
Fontes: Fruta Vida Retail Store. Online. Disponível em:
<www.tryfrutavida.com/images/cupuacu12.jpg>.

O fruto (Figura 3) é do tipo drupáceo, de forma variada, extremidades arredondadas e peso situando entre 0,5 a 4,0kg, sendo em media 1,5kg. É constituído de casca (epicarpo mais mesocarpo), endocarpo (polpa que envolve as sementes) e sementes. O epicarpo é rígido e lenhoso e com epiderme de coloração verde, a qual é recoberta por camada pulverulenta ferruginea que se desprende facilmente com o manuseio. O endocarpo é carnoso, com aroma pronunciado e está fortemente aderida às sementes por fibras (CALZAVARA *et al.*, 1984).



Figura 3. Foto ilustrativa da fruta de cupuaçu (*Theobroma Grandiflorum*)

Fonte: Icoaraci. Online. Disponível em: <www.icoaraci.com.br/imagens/fotos/cupuacu.jpg>

Quando maduros, os frutos caem sem o pedúnculo, exalando um cheiro característico, o que indica sua perfeita maturação. Suas sementes possuem 48% de uma gordura branca aromática que pode ser utilizada na fabricação de chocolate (CAVALCANTE, 1991).O rendimento médio dos frutos (Tabela 1), assim como na maioria das outras frutas, é variável de acordo com o tamanho, a procedência, o período de safra e o método de extração. O aproveitamento do fruto inicia-se com a quebra manual da casca. Em seguida, faz-se o despolpamento que pode ser realizado manualmente, com o auxilio de tesouras, ou mecanicamente. O despolpamento mecânico deixa a polpa uniforme e menos viscosa e é usado por produtores, revendedores ou indústrias de maior porte (NAZARÉ *et al.*, 1990).

Tabela 1. Rendimento médio do fruto do cupuaçu (polpa, casca e semente) e suas respectivas porcentagens

Fruto do cupuaçu	Porcentagem
Polpa	35%
casca	45%
semente	20%

Fonte: NAZARÉ et al. (1990).

As frutas, de modo geral, por conterem uma variedade de vitaminas e minerais essenciais, sempre foram consideradas como alimentos reguladores do metabolismo. Do ponto de vista das propriedades funcionais fisiológicas, esses alimentos têm sido altamente recomendados pela sua riqueza em vitamina C, carotenóides, substâncias fenólicas, substâncias sulfuradas, glicosídeos indólicos, fruto-oligossacarídeos, dentre muitos outros (SGARBIERI e PACHECO, 1999). No caso do cupuaçu, conforme salientado, a presença de sais minerais e pectina determina as propriedades nutricionais e funcionais da fruta.

As sementes, cujo número médio é de aproximadamente 32 unidades (podendo variar de 9-62 unidades) por fruto, são superpostas em cinco fileiras verticais e envolvidas por uma polpa branco-amarelada, delicadamente fibrosa, de sabor acidulado e de cheiro agradável. Essas sementes têm dimensões variáveis, com médias de 2,6cm de comprimento, 2,3cm de largura e 0,9cm de espessura. Sua composição físico-química está apresentada na Tabela 2 (LOPES, 2000).

Tabela 2. Composição físico-química média das sementes de cupuaçu

Composição físico-química	Semente (%)
Umidade	5,87
Proteína	9,82
Lipídios	60,25
Fibras	4,12
Cinzas	2,35
Outros compostos	17,59
Energia (Kcal/100g)	651,89

Fonte: LOPES, (2000).

As sementes do cupuaçu são muito ricas em gordura (57% da massa seca), com uma digestibilidade de 91,1% em seres humanos. Determinações visando a fabricação de chocolate (ou cupulate) mostraram que de cada 100kg de sementes frescas de cupuaçu, podem-se obter 45,5kg de sementes secas, 42,8kg de sementes torradas e 31,2kg de amêndoas sem casca. A prensagem dessas amêndoas pode produzir 13,5kg de manteiga de cupuaçu. As cascas do fruto têm grande utilidade como adubo; possuem 0,72% de nitrogênio, 0,04% de fósforo e 1,5% de potássio em relação à massa seca (CRUZ, 2007).

De acordo com Calzavara (1994), as três principais variedades de cupuaçu são: cupuaçu redondo, o fruto possui extremidades arredondadas, sendo a mais comum na região Norte; cupuaçu mamorana, no qual os frutos apresentam-se com a extremidade comprida parecendo um bico ou ponta, produzindo frutos de maior tamanho e massa, o qual vegeta espontaneamente ao longo dos rios; e cupuaçu mamau, sendo a variedade encontrada na localidade de Pacajás, município de Cametá, no rio Tocantins-PA, cuja característica do fruto é não possuir sementes.

3.2 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO CUPUAÇU

O Brasil é um país de clima tropical, que se destaca pela sua grande biodiversidade onde se encontram inúmeras frutas com potencial de exportação no mercado internacional, devido ao seu exótico sabor e elevado valor nutricional. O Brasil é considerado um dos principais países produtores de frutas e um dos maiores exportadores, sendo sua produção vendida, especialmente, nos Estados Unidos e em países da Europa (EMBRAPA, 2009).

A importância econômica do cupuaçu está associada principalmente à sua polpa e sementes, usados para consumo natural e fins industriais. A polpa, de aroma e sabor muito apreciados, é utilizada para sucos, refrescos, sorvetes, doces, compotas, licores, iogurtes, concentrados, polpas desidratadas e aromatizantes (VELHO *et al.*, 1990). O cupuaçu, por apresentar alto teor de pectina e por ser naturalmente ácido, favorece a fabricação de néctar, doce e geléias (CAVALCANTE, 1991).

Embora tradicionalmente aproveitado pelas populações nativas da região Amazônica, o cupuaçu vem ultimamente sendo objeto de exploração comercial sistemática e em larga escala. O mercado do cupuaçu vai sendo conquistado à medida que o produto penetra em outras regiões que não a de sua origem. Como produto novo, praticamente desconhecido fora da Amazônia até há bem pouco tempo, tem condições de consolidar um amplo mercado a depender, dentre outros fatores, da sua confiabilidade, higiene e garantia de oferta (OYAMA, 1996).

As sementes de cupuaçu contêm um teor de proteína considerável, 9 a 12%, e apresentam possibilidade de uso não somente para a produção de um produto análogo ao chocolate, conforme anteriormente abordado, mas principalmente como um alimento alternativo com boas qualidades nutricionais, principalmente quando se considera que a farinha desengordurada obtida a partir dessas sementes, que possuem cerca de 60% de

lipídios, pode alcançar teores de proteína superiores a 26% (LOPES, 2000; MATTIETTO, 2001).

A partir das semelhanças entre essas frutas, vários pesquisadores fizeram experiências com o cupuaçu, usando um processo idêntico ao aplicado ao cacau para a produção de chocolate na fabricação do cupulate, tais como: fermentação, secagem e torração, para então elaborar produtos similares ao chocolate (ao leite, branco, em pó e amargo) (LOPES, 2000). O produto apresenta valores nutritivos superiores aos do chocolate de cacau, o que favorece a disputa do cupuaçu no amplo mercado dos produtos alimentícios destinados ao público infantil (NAZARÉ, 1997), bem como pelo apelo de saúde ao público consumidor em geral.

3.3 CARACTERÍSTICAS DA POLPA DE CUPUAÇU

De acordo com o Regulamento Técnico Geral para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade, a polpa de fruta é definida como produto não fermentado, não concentrado, não diluído, obtido por esmagamento das partes comestíveis de frutas carnosas por processos tecnológicos adequados, com um teor mínimo de sólidos totais. A polpa de fruta deverá ser obtida de frutas frescas, sãs e maduras, com características físicas, químicas e organolépticas do fruto (BRASIL, 2000).

As polpas de frutas podem ser consideradas uma dispersão de partículas sólidas insolúveis (polpa) em solução aquosa contendo sólidos solúveis (principalmente açúcares e ácidos orgânicos), sendo que sua estabilidade à sedimentação depende das condições de processamento. Os principais fatores que podem afetar a estabilidade das polpas de frutas são: distribuição do tamanho e forma das partículas e teor de sólidos e solúveis (NINDO *et al.*, 2007).

O mercado de polpas de frutas congeladas tem crescido e apresenta um grande potencial mercadológico (DANTAS *et al.*, 2012). Esse setor da agroindústria encontra-se disseminado em todos os estados do Brasil, sendo um importante segmento da cadeia produtiva. Essa atividade agroindustrial é um negócio com boa rentabilidade, pois é uma maneira prática de aproveitar e armazenar o excesso de frutas produzidas na safra, quando geralmente baixam de preço, passando a ser comercializado na entressafra. Além disso, a polpa possibilita o aproveitamento de frutas que não atendem ao padrão de comercialização da fruta *in natura*. O crescimento da indústria frutícola no país é resultado, em grande parte, da produção de polpas de frutas congeladas em fábricas de pequeno porte, muitas vezes

implantadas com o intuito de melhorar a renda familiar de pequenos produtores rurais ou aproveitar a matéria-prima não utilizada e frequentemente desperdiçada (TEIXEIRA, 2008). A Tabela 3 apresenta a composição físico-química aproximada da polpa de cupuaçu.

Tabela 3. Composição físico-química aproximada da polpa de cupuaçu

Composição Físico-química	Valores
рН	3,2 - 3,6
Acidez titulável (%)	2,0 - 2,15
Umidade (%)	84,9 - 89,0
Açúcares redutores (%)	2,8 - 3,0
Açúcares não-redutores (%)	4,0 - 5,8
Amido (%)	0,96
Gordura (%)	0,48 - 2,35
Proteína (%)	0,53 - 1,92

Fonte: OLIVEIRA (1997).

A polpa ou purê de cupuaçu deverá obedecer às características sensoriais (cor, sabor, aroma e acidez), ácido ascórbico e °Brix, como apresentado na Tabela 4 (BRASIL, 2000).

Tabela 4. Características e composição da polpa de cupuaçu

Características	Composição
Cor	Branco ou branco amarelado
Sabor	Levemente ácido
Aroma	Próprio, característico de cupuaçu
Sólidos solúveis em ^o Brix, a 20 ^o C	Mínimo de 9ºBrix
Ácido ascórbico	Mínimo de 0,18g/100g
Acidez ácido cítrico	Mínimo de 1,5g/100 g

Fonte: Brasil (2000)

Estudando a composição química da polpa de cupuaçu, Rogez*et et al.* (2004) constataram, conforme apresentado na Tabela 5, teores elevados de fósforo e de potássio, sendo esse último importante no controle do balanço de sais nos tecidos humanos.

Tabela 5. (Composição	química da	a polpa de ci	upuacu (mg/10	Og base úmida)
				- I	

Composição química	Polpa de cupuaçu
Mn	0,21 (+/- 0,048)
Cu	0,258 (+/- 0,059)
Zn	0,532 (+/- 0,024)
Fe	0,432 (+/- 0,042)
P	15,73 (+/- 0,48)
Mg	13,07 (+/- 1,94)
K	34,27 (+/- 4,27)
Ca	5,57 (+/- 0,85)
Na	2,56 (+/- 0,20)

Fonte: Rogezet et al. (2004)

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA (BRASIL, 2001) estabelece padrões microbiológicos para polpas de frutas dispostas para comercialização apenas para coliformes a 45°C e *Salmonella sp.* Contudo, a ocorrência desses grupos em polpa de cupuaçu é pouco provável em virtude de sua elevada acidez.

3.4 FLUXOGRAMA DO PROCESSO PRODUTIVO DA POLPA DE CUPUAÇU

O fluxograma com as etapas do processo produtivo para a obtenção de polpa de cupuaçu congelada é apresentado na Figura 4, tendo sido adaptado de ABREU *et al.* (1997),OLIVEIRA JÚNIOR e COSTA (2003):

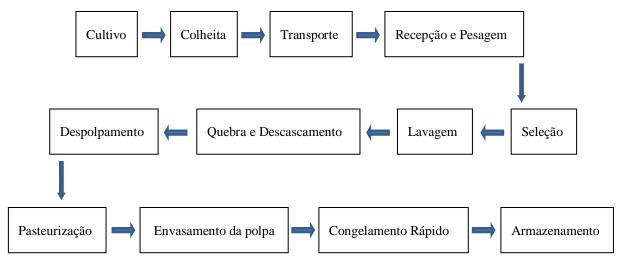


Figura 4. Fluxograma do processo produtivo para obtenção da polpa de cupuaçu.

As várias etapas apresentadas serão descritas a seguir.

3.4.1 Cultivo

Em cultivos racionais, o porte do cupuaçuzeiro varia de 4 a 8m de altura atingindo até 18m. Recomenda-se seu cultivo em regiões que vão de clima subúmido ao superúmido a 1800 mm, bem distribuídos e com temperatura média anual superior a 22 °C (CALZAVARA, 1987).

As principais pragas relacionadas com o cultivo do cupuaçu são: "vassoura de bruxa" e "broca-do-fruto" e o controle fitossanitário deve ser feito de forma adequada, realizando as práticas culturais adequadas, adotando recomendações técnicas nas fases pré e pós-colheita (ABREU *et al.*, 1997; OLIVEIRA JÚNIOR e COSTA, 2003).

3.4.2 Colheita

O fruto quando maduro desprende-se da planta, sendo colhido no chão e acondicionado em caixas resistentes ou sacos. A colheita deve ser feita sempre no início da manhã, evitando a permanência do fruto caído no campo por muito tempo, para não ocorrer a deterioração causada por ataque de fungos, ocasionando com isso, a perda da massa do fruto, e riscos de contaminação por fungos micotoxigênicos. O tempo decorrido entre a colheita e o processamento deve ser o menor possível. No caso da necessidade de armazenamento antes do processamento, os frutos devem ser mantidos em local preferencialmente refrigerado ou, pelo menos, sombreado e arejado, evitando-se amontoamento (ABREU *et al.*, 1997; OLIVEIRA JÚNIOR e COSTA, 2003).

3.4.3 Transporte

A forma como a fruta é levada para a indústria influencia muito na preservação da sua qualidade, além disso, fatores como tempo e temperatura devem ser controlados. O transporte deve ser feito no menor prazo possível (INTEC, 2005). Segundo Martins (2008), devido a sua perecibilidade, o transporte do cupuaçu *in natura* a longas distâncias não é usual. Sendo assim, o congelamento da polpa é uma opção viável para evitar perdas de produção. A polpa de cupuaçu, obtida por despolpamento manual ou mecânico, pode ser acondicionada em sacos plásticos de 1 a 2 kg e congelada até sua comercialização ou utilização (ARAGÃO, 1992).

Os fatores tempo e temperatura devem ser controlados, de forma adequada, de modo a evitar perdas e fermentação do fruto (ABREU *et al.* 1997; OLIVEIRA JÚNIOR e COSTA, 2003).

3.4.4 Recepção e pesagem

As frutas passam por uma pré-seleção, onde se separam as estragadas ou em estágio de maturação avançado, daquelas com maturação apropriada. Deve-se verificar a qualidade da matéria-prima e efetuar a pesagem do material (ABREU *et al.*, 1997; OLIVEIRA JÚNIOR e COSTA, 2003).Logo depois, devem ser pesadas para obter o volume real de frutas processadas (RAMOS *et al.*, 2006).

3.4.5 Seleção

Nesta fase, as frutas são expostas sobre mesas ou esteiras apropriadas onde são avaliadas quanto à maturação, firmeza, machucaduras, defeitos causados por fungos, roedores e insetos. São retiradas todas aquelas que venham a comprometer a qualidade do produto final (FAZIO, 2006).

3.4.6 Lavagem

Como a matéria-prima tende a chegar à indústria com uma carga de microrganismos, sujidades, e principalmente terra adquiridos durante a colheita e transporte, é necessário que se tenha um controle de eliminação dos mesmos. A lavagem tem como objetivo reduzir o número de microrganismos iniciais a um mínimo aceitável, e ainda permitir melhor visualização das frutas durante a seleção. Esta operação é considerada uma das mais importantes no processamento (INTEC, 2005). A água utilizada deve ser de boa qualidade, e clorada com cerca de 8ppm a 12ppm de cloro livre (ABREU *et al.*, 1997; OLIVEIRA JÚNIOR e COSTA, 2003).

3.4.7 Quebra e descascamento

O utensílio utilizado para a quebra do fruto e a superfície do local de quebra deve ser de aço-inoxidável e devidamente esterilizado. A polpa no interior do fruto sadio se apresenta sem contaminação, porém, ao ficar exposta ao ambiente poderá se contaminar se os cuidados nessa fase, tais como lavagem, quebra, retirada da polpa e higiene pessoal, ambiental e máquinas de trabalho, forem inadequados (ABREU *et al.*, 1997; OLIVEIRA JÚNIOR e COSTA, 2003).

3.4.8 Despolpamento

O despolpamento pode ser manual ou mecânico e consiste em separar a polpa das sementes. O manual é feito cortando-se a polpa com tesouras ou facas, separando-a das sementes e placenta. A forma manual não é recomendável no processamento com fim comercial, pois torna a polpa muito exposta à contaminação. O despolpamento mecânico é feito com máquinas denominadas despolpadeiras, fabricadas em aço inoxidável, constituídas de um cilindro, peneira móvel e um eixo giratório com paletas, acionado por motor elétrico, que movimenta a polpa com as sementes no cilindro (RAMOS *et al.*, 2006)

De acordo com Abreu *et al.* (1997) e Oliveira Júnior e Costa (2003), a polpa extraída é liberada na parte inferior do equipamento. As sementes são descartadas na extremidade do cilindro perfurado. Para realizar o despolpamento mecânico, deve-se retirar a placenta antes de colocar-se a massa de polpa na despolpadeira. Por ser fibrosa, a placenta ao ser misturada à polpa afeta a sua aparência, depreciando o seu valor. Além disso, sua presença no despolpamento mecânico traz prejuízos ao processo por causar obstrução na passagem da polpa através da peneira. Apesar de ser mais eficiente, esse procedimento acarreta a incorporação de ar na polpa, o que pode afetar sua qualidade sensorial e nutricional durante o armazenamento.

3.4.9 Pasteurização

Nesta etapa, a polpa passa por um processo de elevação da temperatura/tempo, o qual permite preservar as principais características (cor, sabor e aroma típicos) da fruta original, além de contribuir para a melhoria das características de conservação do produto (redução de

carga microbiológica) (INTEC, 2005). A polpa é pasteurizada e o resfriamento da mesma é feito no próprio equipamento de pasteurização. Em geral, a polpa é aquecida a 90°C (+ou-2°C) por um período de 60 segundos, ou o mínimo necessário para a destruição de microrganismos contaminantes. A pasteurização também auxilia na inativação das enzimas presentes na polpa (ABREU *et al.*, 1997; OLIVEIRA JÚNIOR e COSTA, 2003).

3.4.10 Envasamento da polpa

De acordo com Abreu *et al.* (1997); Oliveira Júnior e Costa (2003), o envasamento da polpa consiste no enchimento das embalagens com a polpa, por máquina dosadora. A quantidade de polpa por embalagem é variável; a dosadora deve ser previamente regulada para enchimento das embalagens na quantidade desejada. A polpa é normalmente acondicionada em sacos de polietileno. O envasamento pode ser feito em máquinas manuais, semiautomáticas ou automáticas. No processo semiautomático, o enchimento das embalagens é automático, ficando por conta do operador o reabastecimento do tanque de equilíbrio, fechamento e acomodação das embalagens. No processo manual, os procedimentos são comandados por um operador que aciona os dispositivos responsáveis por essa operação. No envasamento automático, a polpa é succionada e elevada desde o reservatório da despolpadeira até o tanque de equilíbrio da envasadora. A partir daí, o processo se dá por ação de ar comprimido, que injeta o produto na embalagem em dosagens precisas, concluindo-se o envasamento com fechamento termosoldável da embalagem tipo sacola.

3.4.11 Congelamento rápido

Os frutos são bastante perecíveis, sendo praticamente inviável o seu transporte *in natura* para longas distâncias. Com isso, o congelamento de polpa de fruta tornou-se uma opção viável para evitar perdas de produção, pois preserva as características originais da fruta fresca possibilitando, inclusive, sua comercialização nos períodos de entressafra (VENTURIERE, 1993).

A polpa recém-embalada deve ser imediatamente congelada em túneis ou câmaras de congelamento rápido. Quanto mais rápido o congelamento, melhor é a qualidade da polpa após ser descongelada, mantendo suas características originais. Quando o congelamento é lento, como acontece nos *freezers* domésticos, a polpa ao ser descongelada libera uma grande

quantidade de suco, devido à ruptura das células causada por cristais de gelo (ABREU *et al.*, 1997; OLIVEIRA JÚNIOR e COSTA, 2003).

3.4.12 Armazenamento

As polpas que sofreram o processo de congelamento devem ser armazenadas em câmeras frigoríficas à temperatura de, aproximadamente, -20°C (RAMOS *et al.*, 2006).

3.5 PROCESSAMENTO TÉRMICO DA POLPA DE CUPUAÇU

Um dos métodos mais utilizados na preservação dos alimentos embalados tem sido o processamento térmico. O conceito de processamento térmico é baseado no aquecimento de alimentos por um determinado período de tempo a uma certa temperatura, visando a obtenção de um produto seguro (AFAGHI *et al.*, 2001).

O tratamento térmico é um dos métodos mais importantes para a preservação de alimentos, mas um aquecimento excessivo pode produzir uma perda de valor nutricional e alteração das características sensoriais dos alimentos. Os métodos mais usuais de preservação de néctares, polpas e sucos de frutas que utilizam tratamento térmico são a pasteurização e a esterilização comercial, sendo nesse caso o pH o fator determinante da intensidade do tratamento a ser empregado para que se alcance à esterilidade comercial do produto embalado assepticamente (DOMINGUES, 2003).

Há a ocorrência de microrganismos denominados termófilos com temperatura mínima de crescimento ao redor de 45°C, ótima entre 50°C e 60°C e máxima de 70°C ou acima. Entre os microrganismos termófilos podem ser encontrados cianobactérias, tiobacilos, algas, bacilos, clostrídios e principalmente, fungos termorresistentes (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

Os processamentos térmicos mais comuns são: branqueamento, esterilização e pasteurização. O branqueamento é freqüentemente aplicado aos tecidos alimentícios antes do congelamento, secagem ou enlatamento. A Esterilização Comercial é o processo que visa a inativação de microrganismos ou de seus esporos que sob as condições de estocagem poderiam crescer e deteriorar o alimento, ou causar danos à saúde. A maioria dos alimentos estéreis comercialmente é embalado sob condições anaeróbicas (TOLEDO, 1991).

A pasteurização é um tratamento térmico que, quando aplicado às polpas de frutas, tem como principais objetivos a destruição de células vegetativas de microrganismos deteriorantes e a inativação enzimática. A microflora de produtos ácidos é relativamente restrita, apresentando microrganismos de menor resistência térmica, provocando alterações mínimas sobre o valor nutritivo e características sensoriais dos produtos (FELLOWS, 1994). Essa técnica é amplamente associada com outros métodos de preservação, tais como: refrigeração, congelamento, concentração, embalagens herméticas e conservantes químicos (DOMINGUES, 2003).

A relação tempo-temperatura utilizada na pasteurização depende da resistência térmica do microrganismo deteriorador que deve ser destruído, da sensibilidade do produto e da necessidade de inativação enzimática. Métodos envolvendo altas temperaturas e curto tempo (HTST) são preferidos por causarem menor dano ao produto (MARTINS, 2008). Geralmente, para inativar as enzimas são necessários tratamentos em que as temperaturas de processo variam por volta de 90°C. As principais enzimas que devem ser inativadas em polpas e sucos de frutas são a poligalacturonase (PG), pectinesterase (PE), polifenoloxidase e peroxidase (TOCCHINI *et al.*, 1995). Variesmann (2008) ressalta a importância de enzimas hidrolíticas na polpa do cupuaçu devido à sua ação sobre os polissacarídeos da parede celular.

Esta técnica é uma das etapas do processamento de frutas que mais se desenvolveu nos últimos anos em termos de tecnologia. A pasteurização de uma polpa ou purê de fruta é, geralmente, feita em trocadores de calor de dois tipos: superfície raspada e tubular. O trocador de superfície raspada é ideal para trabalhar com produtos mais espessos, viscosos, como é o caso das polpas, ou que tenham partículas em suspensão, já que o raspador impede que o produto fique aderido as paredes do equipamento, realizando uma troca de calor mais homogênea (TEIXEIRA, 2006). O efeito da temperatura contribui para a alteração da cor e para o escurecimento não enzimático (Reação de Maillard) (LESZKOWIAT *et al.*, 1990). De acordo com Silva (1999), a polpa de acerola sofre significativa mudança de cor, de vermelho para amarelo-alaranjado, quando submetida à pasteurização térmica (95°C/25 segundos).

3.6 PRINCIPAIS GRUPOS DE FUNGOS DETERIORANTES EM FRUTAS

Alguns microrganismos presentes podem ser causadores de alterações bioquímicas, o que pode ser prejudicial e resultar na "deterioração microbiana", com alterações de cor, odor, sabor, textura e aspecto do alimento. Essas alterações são consequências da atividade

metabólica natural dos microrganismos (TOURNAS, 1994). Os grupos mais relevantes de fungos deteriorantes atuantes em alimentos são os xerofílicos, os toxigênicos e os termorresistentes, sendo esses os principais responsáveis por perigos biológicos e químicos nos alimentos, devido à produção de micotoxinas por algumas espécies (SALAVESSA, 2009).

Segundo Pitt (1996), fungos xerofílicos desenvolvem-se em atividade de água (Aa) abaixo de 0,85, ainda que não em toda condição de pH, temperatura, potencial redox e outros fatores de crescimento, sendo definidos como xerofílicos moderados, não requerendo condições especiais para crescimento. Neste grupo, acham-se as espécies xerofílicas de *Eurotium* (espécie *Aspergillus glaucus*), *Penicillium*, *Aspergillus* (principalmente a série de *Aspergillus restrictus*) e, as linhagens de *Wallemia sebi*, entre outros. A contaminação dos alimentos pelos microrganismos xerofílicos deve ser evitada, ainda que as condições impeçam o crescimento, visto que podem sobreviver por longos períodos, contagiando outros alimentos (FRISVAD *et al.*, 2005).

Os fungos toxigênicos começaram a ser estudados a partir da descoberta da aflatoxina, em 1960, quando admitiu-se a capacidade de muitos fungos, de origem alimentar, em produzir micotoxinas. Essas representam um sério risco para a saúde humana e animal (PITT e HOCKING, 1997), dependendo das espécies envolvidas, têm-se casos de intoxinação variados. Os dados permitem constatar que a mesma toxina pode ser secretada por uma variedade de fungos distintos, como por exemplo, a patulina, produzida por *Aspergillus clavatus*, *A. terreus*, *Penicillium expansum* e *P. griseofulvum*(YOSHISAWA, 2001).Além disso, alguns fungos são capazes de sintetizar várias toxinas diferentes, como *Aspergillus flavus*, por exemplo, que produz ácido ciclopiazônico, aflatoxinas, ácido aspergílico.

Os alimentos mais sujeitos a decomposição por fungos termorresistentes são as frutas e seus derivados, já que a principal fonte de contaminação das frutas é o solo, onde esses fungos estão presentes. O crescimento visível do fungo, a produção de ácido e odor desagradável, a desintegração da fruta e dissolução do amido e pectina no meio são efeitos causados nas frutas e seus derivados, pelos fungos. As transformações causadas nesses produtos são averiguadas pelo desenvolvimento de fungos na parte superior das embalagens, onde são favorecidos pela presença de oxigênio residual, promovendo estufamento das embalagens de sucos e deterioração visível em recipientes transparentes (PIECKOVÁ e SAMSON, 2000). Para Keller *et al* (2005), a identificação e a determinação da micobiota contaminante e de suas características fisiológicas, nutricionais e toxígenas revestem-se de

grande importância para o estabelecimento e a análise do risco de exposição do homem e dos animais a estes fungos e suas potenciais micotoxinas, para prevenção dos vários problemas para a saúde inerentes ao consumo de alimentos e de ração contaminada (BAPTISTA, 2004).

3.6.1 Fungos filamentosos

Avalia-se que existam cerca de 1,5 milhões de espécies de fungos no mundo, mas somente 69 mil espécies foram descritas (SOUZA *et al.*, 2012). Dada a capacidade em utilizar substratos distintos, eles são capazes de contaminar e deteriorar incontáveis produtos utilizados pelo homem, tais como tecidos, couro, petróleo e seus derivados, dentre outros. Portanto, vários procedimentos como aquecimento, secagem, uso de irradiação ou de aditivos químicos, congelamento, enlatamento, são aplicados para proteger os alimentos dos fungos e também das bactérias (ALEXOPOULOUS, 1996).

Os fungos possuem habitats relativamente diversos. Alguns são aquáticos (vivem principalmente em água doce, embora também sejam conhecidos alguns fungos marinhos). A maioria, no entanto, vive em habitats terrestres, no solo, mas principalmente onde há matéria orgânica em abundância, já que, diferentemente das plantas, precisam de uma fonte externa de alimento (MUELLER e SCHMIT, 2007). É relevante citar que um grande número de fungos é parasita de plantas terrestres, sendo responsáveis pela maioria das doenças de vegetais economicamente importantes. Nas florestas tropicais, uma simples folha está sujeita à invasão de milhares de esporos de fungos, e estes podem se desenvolver na superfície dos órgãos das plantas ou penetrar nos tecidos (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Com relação à nutrição, os fungos fazem absorção do alimento, acumulam glicogênio como material de reserva e têm forma de vida diversificada como saprobiontes, comensal, simbiontes e parasitas (SALEEMULLAH et al., 2006).

Os fungos filamentosos microscópicos são predominantemente pluricelulares; apresentam micélio aéreo, possuem reprodução sexuada e/ou assexuada. Sua estrutura morfológica fundamental é a hifa, que geralmente cresce em conjunto, ao longo de uma superfície, que pode ser uni ou multinucleada, septada ou cenocítica, sendo que o seu conjunto constitui o que denominamos de micélio, que pode ser facilmente visualizado sem o 2006). auxílio de um microscópio (WILLIAMS al.. Seus esporos (conídios e blastoconídios) e os esporos sexuais são oriundos da especialização de seu micélio em órgãos ou sistemas reprodutivos podendo ser endógeno ou exógeno (LACAZ et al., 2002).

Esporos produzidos no interior de um saco fechado (asco) são denominados ascósporos, enquanto aqueles produzidos na extremidade de uma estrutura claviforme (basídio) são denominados basidiósporos (VANDENBERGHE *et al.*, 2000). Quando amadurecem, os ascos sofrem uma ruptura por onde são liberados os ascósporos. Estes últimos possuem parede, e são geralmente ornamentados e refráteis. Os ascos de alguns destes fungos são recobertos por um grande corpo de frutificação que leva o nome geral de ascocarpo. As espécies termorresistentes, usualmente produzem dois tipos diferentes de ascocarpos: o cleistotécio (membrana rígida, esférica, de parede lisa e completamente fechada) ou o gimnotécio (parede formada por um emaranhado de hifas) (PITT e HOCKING, 1985).

Segundo Kang *et al* (2004), o crescimento de um microrganismo, assim como a formação de um produto, ocorre como resposta às condições ambientais, e deste modo é essencial a compreensão da relação que existe entre a regulação do metabolismo microbiano e seu ambiente físico e químico. Os fungos são capazes de crescer em todos os tipos de alimentos, resultando em vários tipos de alterações (deteriorações) nos mesmos, como por exemplo: *off-flavours*, toxinas, descoloração, apodrecimento e formação de propágulos alergênicos ou patogênicos. A deterioração de propriedades sensoriais é frequentemente devido à produção de exoenzimas durante o crescimento, que podem continuar sua atividade independente da destruição ou remoção do micélio, ocasionando completa desintegração da textura do alimento (TOURNAS, 1994).

Por possuírem baixa resistência térmica, os fungos genericamente podem ser eliminados pela pasteurização, destruindo conídios e hifas. Entretanto, uma pequena classe de fungos filamentosos apresentam uma elevada resistência térmica, decorrente da presença de esporos sexuados, tais como *Aspergillus*, *Byssoclamys*, *Neosartorya*, *Talaromyces*, entre outros. Estes esporos podem permanecer em estado de dormência em restos de frutas apodrecidas e no solo, necessitando de uma ativação térmica para germinarem, o que é propiciado pelos processamentos térmicos comerciais (TOURNAS e TRAXLER, 1994). Mislivec *et al.* (2001) relataram que o crescimento de fungos e leveduras pode ser manifestado por pontos de podridão, bem como pela presença de esporos. O fato de não se observar crescimento visual não significa que o produto não esteja contaminado por esses microrganismos.

Nas indústrias, a causa da contaminação por fungos termorresistentes pode ser devido à contaminação inicial, manuseio e estocagem imprópria dos produtos. Também pode ser decorrência de tratamento térmico inadequado, como por exemplo, a pasteurização de frutas e derivados comumente efetuada por 3 minutos a 90°C, enquanto que poucos sucos de frutas

sofrem tratamento em intervalo de tempo menor, a temperaturas variando entre 80°C e 90°C(TOURNAS, 1994; HOCKING e PITT, 1984). Segundo Baglioni (1998), a variação entre linhagens de fungos termorresistentes, a influência da natureza do meio de aquecimento e a adição de conservantes são os principais fatores que afetam a resistência térmica de fungos filamentosos termorresistentes. Embora as frutas e seus produtos processados sejam os mais relacionados a deteriorações por esses fungos, existem relatos provando que hortaliças e suas conservas, leite e derivados também podem ser deteriorados por eles (MARCOS FILHO, 2005).

Os esporos das linhagens de *Aspergillus* são geralmente reportados como possuidores de pequena resistência térmica, como por exemplo, de 5 minutos a 60°C. Todavia, já se têm estudos de linhagens de *Aspergillus niger*, produtora de conidiósporos, com um valor D de 85°C por 60 minutos, sendo essas consideradas como microrganismos emergentes e como tais, deficientes de estudos (SPLITTSTOESSER e SPLITTSTOESSER, 1977).

Os fungos do gênero *Byssochlamys* sp são caracterizados pela ausência de cleistotécio ou qualquer outro corpo que envolva os ascos durante o seu desenvolvimento. O *B. nivea* tem em seu ciclo de vida duas formas de reprodução: assexuada ou estágio imperfeito (anamorfo), denominando-se *Paecilomyces niveus*, produzindo conídios, e sexuada ou estágio perfeito (teleomórfico), que produzirá os ascósporos (esporos) (EICHER e LUDWIG, 2002).

Os ascos em fungos do gênero *Neosartorya sp*são produzidos em ascocarpos (cleistotécio), dando à colônia uma aparência granular. Dentro do gênero *Neosartorya*, a única espécie significante e reconhecida como deterioradora de alimentos é *Neosartorya fischeri*, que se caracteriza por apresentar colônias de cor branca creme em Ágar Extrato de Malte (MEA) (SPLITTSTOESSER *et al.*, 1993).

Talaromyces é um gênero de fungos filamentosos deteriorante de frutas e produtos derivados comumente encontrado em suco de polpas comerciais congeladas de morango (SALOMÃO, 2002). A espécie mais comumente isolada de alimentos ácidos termoprocessados é o *Talaromyces macrosporus*. No meio CYA (Cyzapeck yeast extract Agar) a 25°C, observa-se um micélio amarelo brilhante, com formação ocasional de exsudados avermelhados (BEUCHAT e PITT, 2001).

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

outros autores. Suas características de crescimento em CYA são de crescimento rápido e denso, com micélio amarelo e pouco formação de exsudado sem cor, sendo seu reverso usualmente âmbar (PITT e HOCKING 1985).

3.6.2 Genero Aspergillus

A denominação *Aspergillus*, oriundo do latim é devido a aparência do conidióforo (cabeça aspergilar, que é um globo perfurado contendo uma esponja) semelhante ao instrumento usado para aspergir água benta (KLICH e PITT, 1988; BUCKINGAHAM e LEE, 2004). Trata-se do gênero mais comum de fungos filamentosos, além de ser um dos mais bem estudados, foi descrito há quase 300 anos e é considerado um dos fungos filamentosos mais conhecidos, uma vez que compreende fungos utilizados para produção de compostos bioquímicos (p. ex. ácido cítrico por *Aspergillus niger*), alimentos fermentados (p. ex. molho de soja por *Aspergillus oryzae*), e enzimas (p. ex. amilases por *A. niger*). Por outro lado, as espécies de *Aspergillus* são também conhecidas por estarem entre os mais tóxicos deteriorantes de alimentos e rações (p. ex. *A. flavus*) (PERRONE *et al.*, 2007).

Compreende mais de 200 espécies, entretanto somente 30 destas são bem definidas e facilmente distinguíveis. Possuem ampla distribuição mundial estando presente na superfície, no ar e na água, tanto em organismos vegetais quanto em animais e também estão associadas com a deterioração de materiais vegetais e alimentos, em especial nas regiões de clima tropical e subtropical. Há espécies patogênicas para o homem, para os animais e há aquelas que durante seu metabolismo produzem toxinas (ROSA *et al.*, 2002; PARK e MEHRAD, 2009).

3.6.2.1 Aspergillus Níger

A espécie Aspergillus niger é reportada, dentre os fungos filamentosos, como a de maior incidência em deterioração de alimentos. Essa espécie é facilmente encontrada em regiões de clima quente, tanto no campo, como em alimentos estocados. Frutas como morango e maracujá, que são de plantas rasteiras, e as que são colhidas no solo, como o cupuaçu, são as mais susceptíveis à deterioração de seus produtos após o processamento (SANTOS, 2007). Segundo Mclellan e Padilla-Zakour (2005) é preciso realizar o controle da matéria prima, de forma que ela seja a menos contaminada possível, pois a contaminação

inicial de sucos e produtos de frutas por fungos filamentosos termorresistentes será baixa, quando for realizada uma lavagem eficiente da casca do produto, onde se concentra a maioria dos bolores oriundos do contato do produto com o solo, além disso, assegurar-se que o tratamento aplicado ao alimento será suficiente para redução da contaminação para níveis seguros.

Esta espécie produz tipicamente o "aspergillum" ou "cabeça aspergillar", que consiste de uma haste (estipede) asseptada que termina em uma vesícula, sobre a qual nascem as células conidiogênicas (fiálides e métulas). A estrutura inteira, incluindo a cabeça aspergilar, a haste (ou estipede) e a célula pé, é chamada de conidióforo (SANTOS, 2007). Seus conidiósporos são longos (400-3000μm), lisos, hialinos, tornam-se escuros no ápice e terminam em uma vesícula globosa. A métula e as filíades cobrem a vesícula inteira e seus conídios são marrons ou pretos, globosos, ásperos, com 4-5μm (BENNETT, 2010). A anatomia da cabeça aspergilar, forma da estrutura anamórfica que caracteriza o gênero esta apresentada na Figura 5.

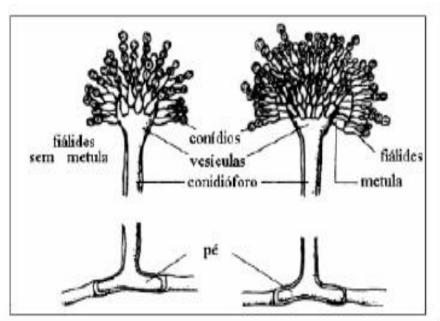


Figura 5. Morfologia representativa de espécies do gênero *Aspergillus niger* (ROSA *et al.*, 2002)

As colônias de *Aspergillus niger*, em meio de cultura para identificação CYA, cobrem toda a superfície da placa de Petri. Macroscopicamente, se caracteriza no início do crescimento por uma colônia branca que se torna marrom escura ou preta após o desenvolvimento dos conídios e o reverso da colônia se caracteriza por uma cor pálida, creme ou amarelada (SAMSOM, 2007). Em razão da coloração preta de seus esporos estes

apresentam, aparentemente, resistência à luz solar e a luz UV, o que torna sua eliminação em alguns ambientes dificultada, requerem uma temperatura mínima para crescimento de 6-8°C, máxima de 45-47°C e ótima de 35-37°C (PITT e HOCKING,1985).

É um fungo comumente encontrado no ar, no solo e em vegetais, sendo um deteriorador que, algumas vezes pode incorrer em danos à saúde humana e animal, devido à produção de micotoxinas, essa habilidade somada à capacidade do mesmo em crescer em condições desfavoráveis e deteriorar produtos, torna este bolor um importante microrganismo a ser eliminado em alimentos processados. Neste caso, é preciso ressaltar que, apesar de inesperada, algumas linhagens podem apresentar resistências térmicas extremamente altas tais como:

- Aspergillus niger, isolado por Silva (2006) como o fungo filamentoso mais termorresistente em 50 amostras de 1L de néctar de manga processado termicamente, foi capaz de sobreviver a choque térmico de 100°C/15 minutos;
- A. tamarii e A. flavus, isolados por Obeta e Ugwuanyi (1995) a partir de sucos de manga, laranja e tomate processados termicamente, foram capazes de sobreviver ao choque térmico de 75°C por 30 minutos.
- A linhagem *Aspergillus sp. WR1*, isolada por Splittstoesser e Splittstoesser (1977), foi capaz de sobreviver a choques térmicos de 85°C/60 minutos em sucos de uva, maçã e tomate.

A classificação e principais características do *Aspergillus niger*, organizados por Couri, 1993 são apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6. Principais características do Aspergillus niger

Classificação	Principais características		
Reino Fungi			
Divisão Eumycota	Tipicamente micelial, algumas vezes unicelular.		
Subdivisão Deuteromycotina	Talo micelial e septado ou unicelular; reprodução sexual ausente, mas a parasexual pode ocorrer.		
Classe Hyphomycetes	Formas miceliais estéreis ou produzindo conídios em hifas separadas ou agregadas na ausênciade conidiomata.		
Ordem Moniliales	Micélio hialino, contendo conidióforos livres, que se projetam do micélio de forma irregular.		
Família Moniliaceae	Os conidióforos são solitários livres, que se		

	projetam do micélio de forma irregular.		
Gênero Aspergillus	Micélio septado. Conidióforo ereto com terminai		
	globosos dos quais emergem fiálides com conídios		
	arredondados unicelular e de coloração negra,		
	esverdeada ou amarela.		
Espécie A. niger	Conídios globulosos de aspecto rugoso, com		
	equinulações verdadeiras, coloração negra,		
	medindo em torno de 4 a 5 μm de diâmetro.		

Fonte: COURI, (1993)

3.6.2.2 Aspergillus flavus

Este fungo pertence ao Reino Fungi, Divisão Ascomycota, à classe Ascomycetes, à ordem Eurotiales e à família Trichomaceae (KIRK *et al.*, 2008). As hifas vegetativas septadas dão origem aos conidióforos de *A. flavus* e *A. parasiticus*. As fiálides surgem ou diretamente de uma vesícula globosa (condição unisseriada) ou da métula que envolve a superfície da vesícula (condição bisseriada). A cabeça conidial, compreendida por vesícula, métula, fiálides e cadeias de conídios, a seriação é mais variável (BENNETT, 2010). Este gênero é amplamente distribuído pelo mundo, sendo conhecido por produzir conídios em cabeça do tipo escovão (Figura 6) (PITT e HOCKING, 1997).

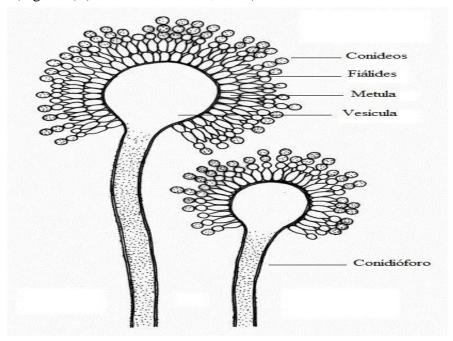


Figura 6. Morfologia representativa de espécies do gênero *Aspergillus flavus* Fonte: KOZAKIEWICZ, (1989)

Macroscopicamente, o gênero *Aspergillus* caracteriza-se pelo desenvolvimento de colônias coloridas e brilhantes. As colônias de *A. flavus* são caracteristicamente verdes a amarelo-oliva, embora eventualmente possam apresentar coloração amarelo puro, tornando-se acinzentadas com a idade (GEISEN, 2000).

O desenvolvimento do *A. flavus* é beneficiado quando este se encontra em temperatura acima de 25°C (temperatura ótima 35°C) e umidade relativa entre 80 e 90%, definindo-o como fungo de armazenamento, sendo essas condições abióticas, inapropriadas para regiões tropicais, como Brasil, além disso, a insuficiência de CO₂ e O₂ facilita o crescimento de bolores favorecendo a contaminação dos grãos (LEE, 2004).Em substratos ricos em amido, como o milho, não são tão frequentes, mas ainda assim, produzem micotoxina, no entanto, desenvolvem-se bem em substratos oleaginosos aumentando o nível de produção da mesma (CASTRO *et al.*, 1995).

3.6.3 Micotoxinas

Há algumas décadas, o reconhecimento de um determinado gênero ou espécie de fungo era considerado desnecessário. Contudo, o que modificou a atitude do homem frente à contaminação fúngica dos alimentos e deu uma nova dimensão à micologia alimentar foi a descoberta de que muitos fungos contaminantes de alimentos são capazes de produzir uma grande variedade de substâncias tóxicas (GEORGINNA e PAYNE, 2009).

A contaminação por fungos é importante não apenas sob o ponto de vista sensorial, mas também pelo risco que representa para o consumidor. Os fungos que são produtores de toxinas são tidos como toxigênicos; cerca de 400 micotoxinas já foram isoladas (ZINEDINE et al., 2009). A palavra micotoxina deriva do termo grego mikes (fungo) e do latim toxicum (veneno), ou seja, toxina produzida por fungos em condições específicas. Não são todos os fungos que a produzem, de forma que a simples presença de fungos em um alimento não quer dizer necessariamente que as toxinas tenham sido ou venham a ser produzidas (YOSHISAWA, 2001). Por outro lado, a inexistência de sinais visíveis de emboloramento também não deve ser interpretada como ausência de toxinas, pois estas podem permanecer em um alimento mesmo depois que o fungo que a produziu tenha desaparecido do produto processado (OLIVER et al., 2008). As toxinas de maior risco e ocorrência em alimentos são

as aflatoxinas, ocratoxinas, zearalenona, tricotocenos, fumonisinas, patulina, ácido ciclopiazônico e micotoxinas tremorgênicas (RODRÍGUEZ-AMAYA e SABINO, 2002).

O gênero *Aspergillus* estão entre os mais importantes fungos produtores de micotoxinas (PITT e HOCKING, 2009). Algumas delas permanecem restritas ao micélio fúngico, enquanto que a maior parte é secretada no substrato. Sabe-se que a maioria é bastante resistente aos tratamentos químicos e físicos e, uma vez presentes nos alimentos, sofrem pouca alteração durante o processamento e estocagem (YOSHISAWA, 2001). Devido a importância relacionada a pesquisa desta tese, será dada maior ênfase a ocratoxina A (OTA), fumonisina, patulina, DON e aflatoxinas (AFs).

- A ocratoxina A (OTA) foi descrita pela primeira vez em 1965 como metabólito do Aspergillus ochraceus. Logo após, foi confirmada como metabólito de diferentes espécies de Aspergillus (A. niger, A. sulphureus, A. alliaceus, entre outros) e Penicillium (P. verrucosum) conhecidas por colonizar um grande número de produtos e é considerada uma preocupação para saúde humana (BRERA et al., 2011). Em países da América do Sul, a presença de cepas de Aspergillus da seção Nigri (aspergillus negros) produtora de OTA tem sido constantemente relatada (ASTORECA et al., 2009). A OTA possui um átomo de cloro como grupo substituinte em sua estrutura química, contribuindo para a característica tóxica (SCUSSEL, 2000). As espécies ocratoxigênicas têm sido observadas em regiões de clima temperado e tropical, sendo encontradas no solo e em matérias orgânicas (NUNES, 2008). Por apresentar uma molécula bastante estável, essa micotoxina não é degradada durante o processamento, podendo permanecer em uma grande quantidade de alimentos (MURILLO-ARBIZU et al., 2010). A Ocratoxina A é a mais tóxica e é produzida em grandes quantidades e frequentemente encontrada como um contaminante natural de alimentos e rações. Tem recebido considerável atenção desde 1993, quando a International Agency for Research on Cancer (IARC) a classificou como possível carcinógeno para o homem (MATEO et al., 2007).
- •As fumonisinas, descobertas em 1988, constituem um grupo de micotoxinas estruturalmente relacionadas, produzidas por espécies do gênero *Aspergillus*, *Fusarium*, principalmente *Fusarium verticillioides* (= *F. moniliforme*) e *F. proliferatum*, fungos amplamente distribuídos na natureza, principalmente em regiões de clima tropical e subtropical (DIAZ e BOERMANS, 1994).Os membros pertencentes a este gênero são economicamente importantes uma vez que são patogênicos para plantas, causando, todos os anos, vastos prejuízos, nomeadamente em culturas de milho e de

sorgo, sendo um importante patógeno de cerais em todas as suas fases de desenvolvimento, incluindo o período após a colheita quando os grãos são armazenadas (JURGENSON *et al.*, 2002). São compostos fortemente polares, solúveis em água, e insolúveis em solventes orgânicos, o que tem dificultado seu estudo. Não absorvem luz visível ou ultravioleta, portanto não são fluorescente, requerendo derivação química para sua detecção (MURPHY, 1996). O conhecimento científico sobre as fumonisinas é relativamente menor, quando comparado às aflatoxinas, embora sua ocorrência seja também bastante frequente (LI *et al.*, 2000).

- A patulina é um metabólito secundário produzida por algumas espécies de fungos dos gêneros Aspergillus, Penicillium e Byssochlamysem frutas como maçãs e produtos derivados de maçãs, mas também pode estar presente em outros vegetais, produtos alimentícios e em outras frutas tais como, laranja, damasco, pêssego, tomate e seus respectivos produtos derivados (MAHFOUD et al., 2002). Há uma preocupação muito grande com os níveis de patulina em alimentos ácidos, como sucos de frutas, sendo fundamental sua diminuição frente ao riscos que podem levar ao consumidor. O fungo desenvolve-se em partes da fruta danificadas mecanicamente ou por pragas, onde se observa o apodrecimento; todavia, pode ser detectada em frutas visivelmente sadias (JACKSON et al., 2003). É solúvel em água, possui forte atividade antibiótica contra várias bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, inclusive Mycobacterium tuberculosis, além de possuir atividade antifúngica (SORENSON et al., 1985). Entretanto, não pode ser usada para tratamento devido aos seus efeitos tóxicos. Ensaios em animais, demonstraram propriedades mutagênicas, carcinogênicas e teratogênicas (LAI et al., 2000).
- Desoxinivalenol (DON) é uma micotoxina, pertencente ao grupo dos tricotecenos. É produzida principalmente pelos fungos do gênero *Fusarium*, que são comumente encontrados nas áreas temperadas da Europa. Ocorre predominantemente em grãos, como trigo, cevada, aveia, centeio e milho, e menos frequentemente no arroz, sorgo. Cereais de grão podem tornar-se contaminado tanto no campo quanto durante o armazenamento. DON é quimicamente estável e resistentes ao processamento térmico (SIROT *et al*, 2013; STREIT *et al*, 2012).
- Aflatoxina: a designação do nome aflatoxina vem de seu principal agente produtor (*Aspergillus flavus*toxina) (MALLMANN, 2007). São metabólitos secundários produzidos por *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e eventualmente *A. nomius* (KARAMI-OSBOO *et al.*, 2012). Apenas 50% das cepas da espécie *A. flavus* produzem aflatoxinas, sendo que produzem

somente as do tipo B1 e B2, dentre os isolados aflatoxigênicos alguns chegam a produzir até 106 μg/kg (KLICH e PITT, 1988; COTTY *et al.*, 1994; YU *et al*, 2004). Após serem extraídas as aflatoxinas são fotossensíveis, sofrendo deteriorização quando expostas ao ar, à luz visível e ultravioleta (KLISCH, 2007). A destruição parcial acontece à medida que temperaturas elevadas são mantidas por um prolongado período de tempo, na presença de umidade, como por exemplo, durante a autoclavagem ou cozimento em forno (MARASAS e NELSON, 1987). São o grupo de micotoxinas mais relatadas em alimentos, sendo hepatotóxicas, apresentando caráter mutagênico, carcinogênico e teratogênico (LIU e WU, 2010; IARC, 2002; BINDER, 2007). No Brasil, dentre as várias micotoxinas, as aflatoxinas são as únicas cujos níveis máximos em alimentos estão preditos na legislação, definidos na Portaria nº 183de 1996, do Ministério da Agricultura e Pecuária, em 4μg/kg para o somatório das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 em amendoim, milho e produtos derivados (BRASIL, 1996). Este limite assemelha-se aos estabelecidos por outros países e recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Organização para Alimentação e Agricultura (FAO) (JECFA, 1998).

3.7. CINÉTICA DE INATIVAÇÃO TÉRMICA DE MICRORGANISMOS

Muitos estudos têm sido realizados para minimizar a perda ou destruição da qualidade sensorial do alimento, relativos a sabor, cor e/ou textura, durante o processamento ou estocagem. Modelos cinéticos que descrevem a taxa de destruição e suas dependências em relação a fatores, como a temperatura, devem ser determinados (LENZ e LUND, 1980; SALOMÃO, 2003). As razões para a determinação de tais modelos cinéticos podem ser classificados em três categorias: i) teste de validade comercial, para prever a vida de prateleira durante a estocagem (LEE *et al.*, 1977); ii) melhoria de produtos e processos, para minimizar a perda de um fator de qualidade existente em um produto associado a um processo (LUND, 1973) e iii) desenvolvimento de novos processos para elaboração e otimização de novos produtos por meio do planejamento de novos processos e/ou de métodos para embalagem.Nos alimentos, a inativação térmica de esporos termorresistentes normalmente segue uma cinética de reação de primeira ordem, isto é, a taxa de destruição em temperatura constante é diretamente proporcional ao número de esporos sobreviventes presentes (SILVA *et al.*,1999).

A maioria dos microrganismos apresenta uma taxa de inativação térmica logarítmica, ou seja, quando se plota o logaritmo do número de sobreviventes versus tempo de

aquecimento, a uma dada temperatura, obtém-se uma linha reta (KING Jr. *et al.*, 1979). Os fungos termorresistentes, quando analisados por meio deste tipo de gráfico, mostram uma curva de inativação térmica não logarítmica, onde é possível a visualização de um "ombro" inicial, representando uma maior lentidão de morte por parte dos esporos, seguido de uma taxa de morte acelerada, que dá à curva um aspecto logarítmico e por fim apresentando uma "cauda" (tail) onde os ascósporos mais resistentes passam a demorar mais tempo para apresentar completa inativação. Esse comportamento, segundo teorias, pode se dar por substâncias protetoras (açúcares, ácidos), ou por conformação de proteínas, com presença ou não de certos peptídeos capazes de fornecer termorresistência (KING Jr. *et al.*, 1979; BAYNE e MICHENER, 1979; ARAGÃO, 1985; KING e HALBROOK, 1987; KING Jr. e WHITEHAND 1990; KOTZEKIDOU 1997; BAGLIONI 1998).

Plotando-se o gráfico em escala monologarítmica da concentração de esporos em função do tempo de tratamento térmico, será obtida uma reta, cuja tangente da inclinação representa o valor D (tempo de redução decimal do microrganismo a uma determinada temperatura em minutos). É importante ressaltar que o tratamento térmico adequado a um determinado produto está relacionado e é comumente expresso em função do valor "D"; desse modo, para tratamentos de pasteurização, é utilizado o tratamento 5D que corresponde a uma diminuição da carga microbiana do microrganismo alvo em 5 ciclos logarítmicos. Já para tratamentos de esterilização, esse valor se modifica para 12D (CAMARGO *et al.*, 1984).

O parâmetro z significa uma constante de resistência térmica em graus centígrados para a curva de TDT (tempo de redução da população microbiana para meios desejados em uma temperatura definida) atravessar um ciclo logarítmico, ou também o número de graus centígrados que se deve aumentar a temperatura para que o tempo de morte pelo calor (F ou TDT) seja reduzido em dez vezes (TOLEDO, 1991). A maioria dos alimentos não é aquecida a uma temperatura constante, estando submetido a uma variação de temperatura, quando a temperatura aumenta, também aumenta a taxa de inativação, reduzindo o tempo de redução decimal. Para a maioria das células vegetativas e esporos há uma relação razoavelmente linear entre o logaritmo do valor D e a temperatura; com isso, a inclinação da curva de valores F ou a curva TDT x Temperatura é representado pelo parâmetro z.

Em estudo de Katan (1985), enfocando o fungo *T. flavus*, observou-se rápida destruição de 9 linhagens, com inativação de 10⁶ ascósporos em 20 minutos de aquecimento a 80°C. Já Scott e Bernard (1987), trabalhando com suco de maçã, observaram que as resistências térmicas de *T. flavus* e *N. fischeri* eram comparáveis à de *B. fulva*, obtendo para *T.*

flavus um D igual a 200 minutos a 80°C, enquanto para N. fischeri o valor D foi de aproximadamente 4,6 minutos a 85°C. Os autores King e Halbrook (1987) verificaram que o tempo para redução de 3 ciclos logarítmicos na população inicial de T. flavus, em meio sintético pH 5,0, variava entre 97 e 236 minutos a 80°C; 32 a 36 minutos a 85°C e 5 a 12 minutos a 90°C.

Nos alimentos, ao contrário do que é observado nos processos fermentativos, o tipo e a concentração de nutrientes não são constantes e previamente conhecidos e, em geral, não são limitantes. Portanto, faz-se necessário o uso de modelos matemáticos definidos para avaliar a segurança e a qualidade dos alimentos (WHITING; BUCHANAN, 1997).

ALDERTON e SNELL (1970) propuseram um dos modelos cinéticos de primeira ordem para linearização da curva não logarítmica de sobrevivência. A linearização da curva de sobreviventes é procedida a partir da equação 1:

$$(\log N_0 - \log N)^a = kt + C$$
 (1)

em que No = Concentração inicial de ascósporos/mL; N = Concentração de sobreviventes/mL (após um tratamento térmico de t minutos); a = parâmetro para linearização (expoente); K = Constante de taxa de morte (coeficiente angular da curva linearizada) (min); C = Coeficiente linear da curva linearizada; t = (min).

O valor de "a" é o inverso do coeficiente angular da curva log (logNo – logN) 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 "l/k" é derivado da equação 2:

$$1/k = t/\left(\log N_0 - \log N\right)^a \tag{2}$$

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

$$D = t/(\log N_0 - \log N)(3)$$

Segundo Baglioni (1998), por analogia das equações 2 e 3, "l/k" é um parâmetro equivalente a "D".

Para a aplicação do Modelo Linear assume-se que a inativação de muitos microrganismos a uma temperatura constante segue uma cinética de 1ª ordem, que se baseia na seguinte equação:

$$\log S(t) = -t/D \quad (t \ge 0) (4)$$

 $S(t) = N/N_0 t = \text{tempo (min)}; D = \text{tempo de redução decimal (min)}.$

De acordo com este modelo, todas as células da população têm igual probabilidade de morte (BUZRUL *et al*, 2005; BUZRUL e ALPAS, 2007). Um gráfico entre log S(t) *versus* tempo (min) será linear e a partir dele pode-se determinar o valor D.

O modelo de Weibull, entre tantos, assume que a população de células ou esporos temorresistências diferentes e a curva de sobrevivência é uma forma cumulativa da distribuição letal. Em termos de curva de sobrevivência, uma forma cumulativa da distribuição de Weibull pode ser descrito pela Equação 5.

$$S(t) = \exp\left(-(t/\alpha)^{\beta}\right) \tag{5}$$

$$LogS(t) = -1/2,303(t/\alpha)^{\beta}$$
 (6)

em que:

S(t)= N/N₀; t = tempo (min); α e β são parâmetros da distribuição. α é denominado parâmetro de escala, cuja unidade é minuto ou segundo, e β parâmetro de forma,utilizado como índice de comportamento.Porém, vários autores (BUZRUL e ALPAS, 2007; BUZRUL e ALPAS, 2004;BUZRUL *et al.*, 2005; PELEG, 1999) preferem escrever a Equação 6 da seguinte forma (Equação 7):

$$LogS(t) = -b.t^{n} \tag{7}$$

em que:

$$n = \beta e b = 1/2,303\alpha^{-n} (min^{-1} ou s^{-1})$$

O modelo representado na Eq. 7 apresenta como principal vantagem a simplicidade e é suficientemente robusto para descrever curvas de sobrevivência que apresentem ombro (côncavo), em que n > 1, e curvas com cauda (convexas), onde n < 1. A curva côncava (n > 1) indica que o acúmulo dos danos às células levam ao aumento de sua sensibilidade e a curva convexa (n < 1) mostra maior resistência ou habilidade do microrganismo de se adaptar a um tratamento estressante. Quando n= 1, o modelo é linear (BUZRUL e ALPAS, 2007; ALBERT e MAFART, 2005; CHEN e HOOVER, 2004; MARTINUS e BOEKEL, 2002). E em muitos outros casos ainda, as curvas de inativação de certos microrganismos apresentam tanto a fase lag inicial, quanto a "cauda" final, formando uma sigmoide (TOLEDO, 1991).

No modelo de Weibull, t_d é o tempo necessário para reduzir 1 ciclo log da população microbiana. O valor t_1 , referente à equação 5, é análogo ao valor Dno modelo linear; t_d pode ser determinado pela Equação 8.

$$t_d = (d/b)^{1/n}$$
 (8)

Em que: d = nº de reduções na população inicial. Valores de d maiores que 2 determinam o tempo cumulativo do processo.

3.8 COMPORTAMENTO REOLÓGICO DA POLPA DE FRUTA

Reologia é a ciência que estuda a deformação e o escoamento de materiais, ou seja, o modo como os materiais respondem à aplicação de uma tensão ou deformação. O conhecimento das propriedades reológicas de alimentos é muito importante para o projeto de tubulações e equipamentos, no controle de qualidade, no desenvolvimento de novos produtos, na aceitabilidade por parte do consumidor, bem como em um melhor entendimento do comportamento estrutural dos produtos (STEFFE, 1996).

As propriedades reológicas dos alimentos são estudadas por várias razões: controle de qualidade, avaliação sensorial, estudo da estrutura e aplicações a engenharia de processos (RAO, 1999; BEZERRA, 2000). O aumento da concorrência e a pressão dos custos forçam as indústrias a buscarem métodos rápidos para controlar a qualidade e identificar as propriedades de novos produtos durante o seu desenvolvimento. As informações sobre o comportamento reológico dos fluidos permitem o cálculo prático para situações importantes como: bombeamento, troca de calor, estocagem, filtração e separação de sólidos (VIDAL *et al.*, 2006).

Para que cada etapa do processo seja economicamente viável, é fundamental o conhecimento das propriedades físicas e químicas da polpa de fruta submetida aos processos de industrialização. Dentre essas propriedades, o comportamento reológico ocupa posição de grande destaque (VRIESMANN e PETKOWICZ, 2009).

Os fluidos podem ser classificados em newtonianos ou não-newtonianos. Fluidos newtonianos são aqueles em que a tensão cisalhante é diretamente proporcional à taxa de cisalhamento. Todo o fluido cuja relação entre a tensão cisalhante e a taxa de cisalhamento não é constante é denominado não-newtoniano, considerando-se a temperatura e a pressão constantes e o escoamento laminar. Esses fluidos são classificados conforme o aspecto da curva de escoamento e a correlação com alguma equação ou modelo matemático (CABRAL et al., 2007). A maioria dos alimentos fluidos não segue o simples modelo reológico newtoniano. Geralmente, apresentam propriedades reológicas dependentes da tensão aplicada, podendo depender também da duração do cisalhamento (GONÇALVES e LANNES, 2010).

Numerosas equações empíricas têm sido propostas para elaborar modelos matemáticos das relações observadas entre a tensão cisalhante e a taxa de cisalhamento para fluidos

(GONÇALVES e LANNES, 2010). Dentre eles, têm-se os modelos de Newton da viscosidade, de Ostwald de Waele e o de Herschel-Bulkley.

Ostwald de Waele (Lei da potência) propôs a equação 9 para ajustar dados experimentais de tensão e taxa de cisalhamento.

$$\tau = \kappa \gamma^{n} \tag{9}$$

em que τ é a tensão de cisalhamento (Pa), k é o índice de consistência do fluido (Pa.sⁿ), γ ⁿ é a taxa de cisalhamento (s⁻¹) e n é o índice de comportamento do fluido (admensional).

No caso dos fluidos newtonianos, o índice de comportamento do fluido tem valor unitário, portanto, a equação 9 pode ser simplificada, sendo k o valor da própria viscosidade do fluido (η), conforme apresentado na equação 10.

$$\tau = \eta \gamma^{n} \tag{10}$$

A dependência da viscosidade de soluções newtonianas com a temperatura é, geralmente, expressa conforme a relação de Arrhenius (GRANJEIRO *et al.*, 2007), mostrada na equação 11. A mesma pode ser utilizada para representar os dados experimentais de viscosidade, possibilitando a determinação dos parâmetros E_a e η_0 .

$$\eta = \eta_0 \exp(E_a/RT)(11)$$

em que η_0 é um parâmetro da equação; E_a é a energia de ativação do escoamento (kJ.mol⁻¹); R a constante dos gases ideais (8,314.10⁻³ kJ.mol⁻¹.K⁻¹) e T é a temperatura absoluta (K).

Muitas pesquisas evidenciam a influência de fatores como concentração e temperatura nos parâmetros reológicos de diversos produtos, sendo a relação de Arrhenius geralmente utilizada para descrever o efeito da temperatura na viscosidade dos alimentos líquidos (RAO, 1999).

Todo material apresenta uma resposta a uma força externa entre as duas extremidades do comportamento ideal: um sólido elástico e um líquido viscoso. O primeiro é descrito pela lei de Hooke, enquanto que um líquido viscoso ideal obedece à lei de Newton. No entanto, a maior parte dos alimentos comporta-se como um material viscoelástico; ou seja, dependendo da tensão aplicada e da escala de tempo, um corpo sólido pode apresentar propriedades da fase líquida e um material líquido pode mostrar propriedades de um corpo sólido (AHMED e RAMASWAMY, 2004).

Segundo Egawa (2007), os fluidosnão-newtonianos podem ser classificados em dois grupos: dependentes (tixotrópicos e reopéticos) e independentes do tempo (pseudoplásticos, plásticos e plásticos de Bingham (Figura 7). Para um fluido de Bingham, certa tensão deve ser

aplicada antes que o escoamento seja induzido (tensão crítica). Alguns exemplos de fluidos alimentícios que representam esse comportamento são: molhos de tomate, maionese, clara de ovo batida e margarina (SCHRAMN, 2006). A maioria dos alimentos se enquadra nessa classificação.

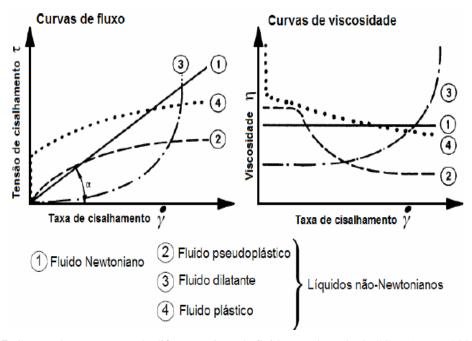


Figura 7. Curvas de escoamento de diferentes tipos de fluidos - Adaptado de SCHRAMM (2006),citado por VRIESMANN (2008).

O comportamento viscoelástico de alimentos vem sendo largamente estudado em reômetros que cisalham a amostra (força tangencial), enquanto que parâmetros reológicos em tração ou compressão (força normal) vêm sendo cada vez mais utilizados na caracterização da textura de produtos alimentícios. Além disso, é possível a caracterização do produto a baixas ou altas deformações independentemente do tipo de força aplicada (PELEGRINE *et al.*, 2002).

A viscosidade aparente de polpas de frutas pode ser influenciada por inúmeros fatores, tais como distribuição de tamanho de partículas, formato das partículas, quantidade de sólidos insolúveis e solúveis e variáveis de processo. Polpas de frutas, como tomate, manga, acerola, cajá, graviola, melão e morango, foram caracterizadas na literatura como sendo fluidos pseudoplásticos com tensão residual (BHATTACHARYA,1999; FREITAS, 2002). A viscosidade aparente diminui à medida que a taxa de deformação e o tempo de cisalhamento aumentam, devido à orientação das moléculas na direção do escoamento e à quebra de agregados, que tornam a resistência ao movimento cada vez menor (Figura 8) (BARNES *et al.*, 1989).

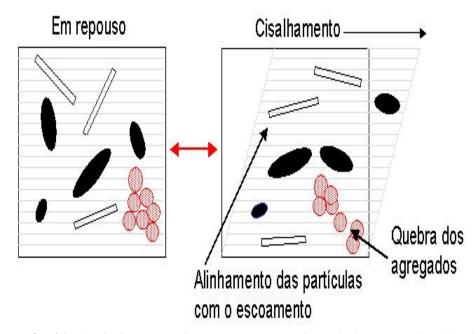


Figura 8. Efeito do cisalhamento sobre o comportamento de partículas e agregados (SATO, 2002).

Em estudos realizados relacionando o caráter pseudoplástico das amostras com o teor de polpa em suspensão, Freitas (2002) observou que amostras com maior teor de polpa em suspensão apresentaram baixo índice de comportamento de escoamento e tensão de cisalhamento inicial.

Pelos estudos realizados para determinar as propriedades de escoamento da polpa de cupuaçu, Ferreira *et al.* (2008) observaram que a viscosidade aparente decresce com o aumento da taxa de deformação indicando um comportamento pseudoplástico para a polpa, devido ao maior alinhamento das partículas na direção da tensão aplicada.

4.0 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

O fruto *in natura* e as polpas de cupuaçu foram adquiridos da empresa processadora de fruto de cupuaçu no estado do Pará. Foram utilizados frutos e polpas da safra de 2010 que, após serem processadas na própria empresa, foram enviadas para a Embrapa Agroindústria de Alimentos, no Rio de Janeiro-RJ.

As etapas do processamento são mostradas na Figura 9. Duas amostras foram retiradas ao final das etapas de Recepção, de Homogeneização da Polpa, da Pasteurização, do Envase e do Armazenamento e colocadas em sacos estéreis (Whirl-Pak®). Em seguida, foram imediatamente levadas ao processo de congelamento em câmaras frias da própria empresa (-40°C), sendo somente removidas 24 horas após e acondicionadas em caixas térmicas para o transporte em direção à Embrapa Agroindústria de Alimentos, no Rio de Janeiro-RJ.

Na Tabela 7, estão representados os códigos das amostras.

Tabela 7- Amostras de frutos *in natura* e polpas congeladas de cupuaçu com suas respectivas codificações

Etapas do processamento	Codificação
Frutos in natura	F
Polpa homogeneizada	Н
Polpa pasteurizada	P
Polpa envasada	Е
Polpa congelada armazenada (meia-vida de seis	A
meses)	
Polpa pasteurizada na Embrapa	PEMB

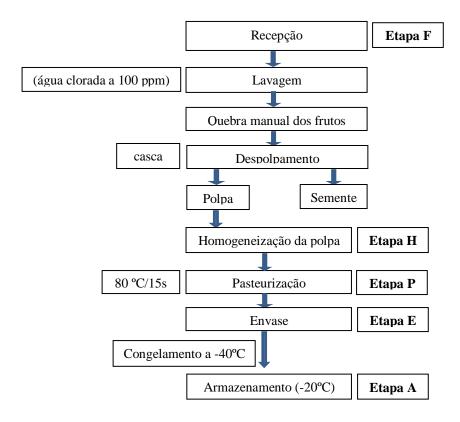


Figura 9. Fluxograma do processamento do fruto cupuaçu para obtenção de polpa.

As amostras das polpas e do fruto chegaram à Embrapa Agroindústria de Alimentos e foram utilizadas à medida que as variadas análises foram realizadas.

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Caracterização Físico-Química

Para as análises de caracterização físico-química da polpa pasteurizada. (umidade, cinzas, nitrogênio total, extrato etéreo, acidez, sólidos solúveis e pH) foi utilizada a metodologia preconizada pela AOAC (2010).

4.2.2 Caracterização Reológica

O comportamento da viscosidade e da tensão de cisalhamento (estado estacionário) de todas as amostras e controles das polpas de cupuaçu, foi medido em um reômetro com tensão controlada (AR-G2, existente no Laboratório de Propriedades Físicas da Escola de Química

da UFRJ), sendo os dados obtidos analisados pelo software *TA Orquestrator* acoplado ao reômetro.

4.2.2.1 Avaliação do comportamento de viscosidade e tensão de cisalhamento das polpas de cupuaçu mediante testes em condições estacionárias

Foram realizados testes em estado estacionário, para avaliar o comportamento de escoamento das amostras (H, P, E, A e PEMB), mediante a obtenção dos parâmetros de tensão de cisalhamento e de viscosidade aparente. Todas as amostras foram homogeneizadas manualmente na própria embalagem durante 30s. A geometria utilizada para essas medições foram cilindros concêntricos com raios interno e externo de 14 e 15 mm, respectivamente. A altura imersa do cilindro foi 42 mm, com *gap* de5920 μm. A programação utilizada do equipamento foi: temperaturas de25, 40, 60, 80 e 95 °C e taxa de cisalhamento de 0 a 200 s⁻¹.

4.2.3 Análises Microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas de acordo com a RDC n°.12 (BRASIL, 2001), seguindo-se a metodologia do APHA (2010).

Para as cinco etapas de processamento (F, H, P, E e A), foram realizadas análises em triplicata de coliformes a 35°C e 45°C, pela técnica do número mais provável (KORNACKI e JOHNSON, 2001), detecção de *Salmonella* sp (Compendium de Métodos Microbiológicos, 2006), contagem de fungos filamentosos e leveduras (BEUCHAT e COUSIN, 2001) e contagem padrão de bactérias aeróbicas mesófilas (MORTON, 2001).

4.2.4 Ensaio para Determinação da Termorresistência

4.2.4.1 Determinação do tempo de subida de temperatura

Como descrito por Baglioni (1998) e Rocha (2002), inseriu-se um termopar em tubo com tampa rosqueável (16 x 150 mm) preenchido com amostra (9 mL de polpa de cupuaçu + 1 mL de água estéril) e, então, este foi submetido ao banho termostático, acionando-se ao mesmo tempo um cronômetro. Quando a amostra atingiu a temperatura determinada, iniciouse o registro do tempo de subida da temperatura para iniciar o tratamento térmico.

4.2.4.2 Análise de Fungos Termorresistentes

Para enumeração dos fungos termorresistentes, utilizou-se o método de plaqueamento (PITT *et al.*, 1992), já que ele recupera maior quantidade de esporos quando comparado ao método de incubação direta (BEUCHAT; PITT, 1992). Foram utilizadas para essa análise as etapas do processamento F, H, P, E e A.

Foram transferidos assepticamente 100g das polpas, provenientes das várias etapas de processamento, para saco estéril (Whirl-Pak®). O pH do sistema foi aferido e ajustado quando necessário, para que fosse alcançado um valor final de 3,5. A amostra foi colocada em banho-maria a 80°C por 30 minutos e em seguida em banho de gelo por 15 minutos. Após o choque térmico, foram adicionados à amostra, 100 mL de meio Ágar Batata Dextrose (BDA), adicionado de cloranfenicol a 2 g/L e ácido tartárico 10% m/v. O volume total da amostra, acrescido do meio BDA, foi vertido em 8 placas de 90x15 mm ou 4 placas de 120x20 mm. Após a solidificação do meio, as placas foram vedadas com Parafilm® M, armazenadas em sacos plásticos, para evitar ressecamento, e incubadas por 30 dias a 30°C. Após esse período, foi realizada a leitura das placas.

Após 3 meses de armazenamento na Embrapa Agroindústria de Alimentos, foi realizada uma análise complementar de isolamento de fungos termorresistentes presentes na polpa de cupuaçu, para cada uma das etapas F (fruto), H (homogeneização), P (pasteurização) e E (envase).

4.2.4.3 Isolamento e identificação de fungos termorresistentes

Para enumeração dos fungos, utilizou-se o método de detecção e enumeração de esporos de fungos termorresistentes, de acordo com HOCKING; PITT, (1984). Foram transferidos assepticamente 100g da polpa, provenientes das várias etapas de processamento, para saco plástico estéril (Whirl-Pak®). Após a etapa de isolamento, conforme item 4.2.4.2 foi realizado a purificação e identificação dos fungos, as colônias foram inoculadas em placas contendo 25 mL de BDA e incubadas a 30°C por 7 dias.

Os fungos isolados foram identificados baseando-se na taxonomia clássica, por meio do estudo morfológico (macroscópico e microscópico) em três meios diferentes: CYA (Ágar Czapeck Extrato de Levedura), MEA (Ágar Extrato de Malte) e G25N (Ágar Glicerol Nitrato 25%) (PITT e HOCKING, 1985).

Para o estudo macroscópico, foram observados a superfície e o reverso da colônia, quanto ao diâmetro, cor dos conídios e micélio, textura, presença de exsudados e pigmentos solúveis. As estruturas microscópicas (conidióforos, células conidiogênicas e conídios) foram comparadas às apresentadas com critérios adotados por RAPER e FENNELL (1965), KLICH e PITT (1988), PITT (2000), KLICH (2002), ABARCA *et al.* (2004); SAMSON e VARGA (2007).

4.2.4.4 Preparo da suspensão de ascósporos

Garrafas de Roux contendo 200mL de BDA (PITT, 1979) foram inoculadas com 0,5mL de suspensão previamente preparada de cada cepa de fungo termorresistente proveniente das etapas F, H, P, E e A. Para a preparação dessa suspensão, transferiu-se, com uma alça de platina estéril, um fragmento de fungo para um tubo de tampa rosqueável 13 x 100mm contendo 2mL de solução 0,05 % de Tween 80 (solução dispersante), seguido de agitação.

Após 30 dias de incubação a 30°C, foram transferidos para cada garrafa, 30 ml de água destilada estéril e, com auxílio de uma bagueta estéril, fez-se a raspagem da superfície de crescimento do fungo. A suspensão foi filtrada em um sistema estéril de funil e camadas de gaze, colocada em garrafas com tampa rosqueável e armazenada sob refrigeração a -4°C.

4.2.4.5 Seleção do isolado mais termorresistente

Os esporos de cada isolado foram submetidos a diferentes tratamentos térmicos variando entre 80°C/20 min e 100°C/3 min, em que, para cada isolado, foi utilizado tubo com tampa de rosca com 9 ml de polpa de cupuaçu das etapas de processamento F, H, P, E e A, previamente esterilizada, sendo cada tubo inoculado com 1mL da suspensão de ascósporos e então colocados em banho-maria.

Os tratamentos térmicos foram aplicados em banhos termoestáticos de acordo com a relação tempo/temperatura especificada na Tabela 8, sendo o tempo de tratamento iniciado após o tempo de subida de cada temperatura. Após esse tratamento, cada tubo foi misturado a 30 ml de meio BDA, distribuído em placas de Petri. Após solidificação da mistura, as placas foram incubadas a 30° C, de 7 a 21 dias, pois o crescimento de fungo após esse período seria indicativo de resistência ao tratamento térmico.

Tabela 8. Tratamentos Térmicos aplicados aos Fungos Isolados

Temperatura (°C)	Tempo (min)
80	20
85	15
90	10
95	5
95	10
98	5
98	10
99	5
100	2
100	3
101	-

Fonte: FERREIRA et al., 2011

4.2.5 Ensaio com a Cepa de Fungo mais termorresistente

4.2.5.1 Produção e coleta de ascósporos

A cepa do fungo selecionada foi inoculada em 5 garrafas de Roux contendo 200 ml de MEA e incubadas a 30°C por 30 dias. Após o período de incubação, os ascósporos de cada garrafa foram coletados utilizando-se 30 ml de água estéril. A suspensão resultante foi filtrada em sistema estéril de funil revestido com gaze para remover os fragmentos de hifas. Esses fragmentos foram submetidos a ultrasom entre temperatura de 0 a –4°C, com incrementos de 1 min até a obtenção de ascósporos livres, de forma que a concentração final, contada em Câmara de Neubauer, fosse aproximadamente 10⁷ UFC/mL.

4.2.5.2 Determinação das condições ótimas de ativação dos ascósporos

Para a determinação das condições ótimas de ativação dos ascósporos foi usada a temperatura de 85°C (BEUCHAT, 1989 apud BAGLIONI, 1998) e os tempos 0 (controle), 5, 10, 15, 20 e 25 minutos. A relação tempo/temperatura que obteve a maior recuperação dos ascósporos foi considerada a condição ótima para ativação dos mesmos. Tubos TDT (Thermal Death Treatment) estéreis (em duplicata) foram preenchidos com 1,8 mL de polpa de cupuaçu

estéril e inoculados com 0,2 ml da suspensão de ascósporos preparadas, em seguida foi feita uma homogeneização. Os tubos TDT foram selados em maçarico O₂/acetileno e colocados em banho termostático ajustado a 85° C para receber os tratamentos térmicos. O tempo de subida até a temperatura desejada foi determinado previamente. Em cada tempo de aquecimento definido, os tubos foram retirados do banho e resfriados em banho de gelo imediatamente. Seguidamente, os tubos foram abertos assepticamente e, após diluição serial, fez-se o plaqueamento em profundidade em Ágar Extrato de Malte (duplicata).

As placas foram incubadas a 30° C e as leituras feitas a partir do terceiro até o sétimo dia de incubação. A contagem foi expressa em UFC/ml.

4.2.5.3 Determinação da termorresistência dos ascósporos do isolado fúngico mais termorresistente

Para o ensaio da termorresistência, foram utilizadas as temperaturas de 95°C, 98°C, 101°C com diferentes tempos de aquecimento (Tabela 9), usando-se o método do TDT selado (PITT, 1979). Os tubos foram preparados conforme item 4.2.5.1 e colocados em banho termostático, ajustados nas temperaturas definidas, considerando-se o tempo de subida da temperatura pré definido até a temperatura avaliada. As variações de temperatura foram baseadas no valor z estimado (z=5°C) (KOTZEKIDOU, 1997; SPLITTSTOESSER et al., 1989) e no limite de sobrevivência dos fungos. O tempo de permanência em cada temperatura foi calculado e baseou-se na "curva fantasma" (Equação 11).

$$Log D_2 - Log D_1 = -1/z (T_2 - T_1)$$
 (11)

Tabela 9: Ensaio da termorresistência utilizando as temperaturas e tempos de aquecimento em polpa de cupuaçu

Temperatura (°C)	Tratamento térmico	Tempo de aquecimento (min)
95°C	1D	3,98
	2D	7,96
	3D	11,94
	4D	15,92
	5D	19,90
98°C	1D	1,51
	2D	3,02

	3D	4,52
	4D	6,04
	5D	7,55
101°C	1D	0,38
	2D	0,76
	3D	1,14
	4D	1,52
	5D	1,90

Após tratamento térmico, os tubos foram resfriados e abertos assepticamente, sofrendo 5 diluições decimais sucessivas e posterior plaqueamento em profundidade em MEA (triplicata). Depois do meio homogeneizado e solidificado, as placas foram incubadas a 30°C. A leitura do número de colônias formadas foi feita do terceiro até o sétimo dia de incubação e expressa em UFC/mL.

Com o número de sobreviventes e o tempo de aquecimento foram construídas as curvas de sobrevivência térmica para cada temperatura. Geralmente estas curvas não seguem um comportamento linear. Em consequência, diferentes modelos matemáticos foram propostos para descrever as curvas não-lineares, tais como modelo logístico (COLE *et al.*, 1993; ANDERSON *et al.*, 1996), equação de Gompertz modificada (LINTON *et al.*, 1995); modelo de Weibull (FERNANDES *et al.*, 1999; PELEG, 1999). Outra alternativa seria a linearização das curvas de sobrevivência utilizando a equação de Alderton e Snell (1970), conforme utilizado por King Junior; Whitehand (1990), Kotzekidou (1997), Rajashekhara *et al.* (1996), Rajashekhara *et al.* (2007); Slongo e Aragão (2007); Ferreira *et al.* (2011).

Neste trabalho, optou-se por utilizar os Modelos linear, de Aldertone Snell e de Weibull. O modelo de Weibull tem descrito bem as curvas de inativação não-lineares de diversos microrganismos em várias condições experimentais (MAFART *et al.*, 2002; MARTINUS e VAN BOEKEL, 2002; BUZRUL e ALPAS, 2004; BUZRUL *et al.*, 2005; ALBERT e MAFART, 2004; PERIAGO *et al.*, 2004; BUZRUL e ALPAS, 2007; CHEN, 2007; ARAGÃO *et al.*, 2007; HUANG, 2009; SANT'ANA *et al.*, 2009) e o linear tem sido utilizado em alguns trabalhos como modelo comparativo (HUANG, 2009; CHEN,2007; BUZRUL e ALPAS, 2007; CHEN e HOOVER, 2004) nas curvas de sobrevivência de fungos

termorresistentes. Os parâmetros cinéticos dos modelos foram ajustados pelo método estatístico dos mínimos quadrados.

O tempo de tratamento térmico foi determinado pelo modelo que melhor se ajustar à curva de sobrevivência do microrganismo alvo, no caso deste estudo, aos ascósporos de *Aspergillus niger*.

4.2.6 Análise do Potencial de Produção de Micotoxinas

Os fungos termorresistentes isolados foram analisados quanto ao potencial de produção de micotoxinas. Para tanto, o DNA genômico dos fungos foi isolado usando o kit comercial DNeasy (Qiagen, Alemanha). A concentração do DNA isolado foi determinada pela leitura em espectrofotômetro a 260nm. Em seguida, o DNA isolado foi usado como molde para a reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) usando os oligonucleotídeos iniciadores (primers) para a amplificação de sequências específicas das proteínas da via de biossíntese de aflatoxina (Tabela 10) (SHAPIRA et al., 1996; KUSUMOTO YU al., al., 1998; 2000; **SWEENEY** et al., 2000; O'BRIAN et al., 2003; YU et al., 2004). Na Tabela 11, estão apresentados os oligonucleotideos iniciadores para a detecção de outras micotoxinas importantes para a avaliação da segurança dos fungos termorresistentes isolados.

Tabela 10. Genes-alvo das proteínas das vias de síntese de cada micotoxina.

Micotoxina	Gene-alvo	Referências
Aflatoxina	afLR; ord-1	Yu et al., 2000; Sweeney et al., 2000; O'Brian et al., 2003; Yu et al., 2004.
Desoxinivalenol (DON)	Cluster TRI	Ward et al., 2002
Fumonisina	Cluster FUM	Proctor et al., 2003; Lorenzzetti et al., 2006.
Ocratoxina A	PKS	Khoury e Atoui, 2010.
Patulina	idh	Dombrink-Kurtzman, 2007.

Tabela 11. Oligonucleotídeos iniciadores (primers) usados na detecção dos genes que codificam as proteínas-chave das vias de síntese de cada micotoxina.

Micotoxina	Sensi	Anti-sensi	Amplicom
DON 1	TCGCAGACCCCGGTATCTC	CGGGTTCCGGGAAGA	67 bp
		TTT	
DON 2	GAACCCATTCCTCTCTCT	CTTCGAACGGAATTG	74 bp
	TACA	GTTTTCT	
DON 3	AGAGGCTCCCAGACTTGC	AGCCATACACCCCGT	68 bp
	AA	GACA	
PATULINA1	TCATCGCGGCCACACAT	CAGCGGTCGAATTTA	66 bp
		TGGAGAT	
PATULINA2	CACATGGAAGGCGAGACT	TGACTAGCTCAACGA	73 bp
	GA	AGCCCATA	
PATULINA3	GGTCCCTGGGAACTCTATT	CCGCTTCAGAGGAAC	75 bp
	CAAA	CTTCA	
OCHRA1	CCATGGTGCTTACGTGCCT	TTGGTGTAAGCCGAT	65 bp
	AT	CTGGAA	
OCHRA2	CCTGTCGGCGCCAATC	GGAAATTGGCCCCAT	73 bp
		TGAT	
OCHRA3	CGAGATGGTTTTGTATAGG	TTTGTGTGGTATTCCT	84 bp
	CATGA	CGAGATCA	
FUM1	CGACTGCAAAGCCCCTTTC	GTCTAATCGGTCAAA	77 bp
		AGGAACAATTC	
FUM2	CACAAATACACAGTCTGAT	GAGCTCCGGGTCCAA	85 bp
	CATAAGAAAAG	GACA	
FUM3	AAGATACGGATCCAGGAG	CTCCATAGCGTTTTCT	122 bp
	ACGTAA	GCTATCTG	
	I	l	

A PCR foi conduzida de acordo com a seguinte programação (termociclagem): 95°C – 5min; 40 ciclos: 95°C – 1min, 60°C – 30s, 72°C – 30s; 72°C – 1min. Após o término das amplificações, o produto da PCR (*amplicom*) de cada par de *primers* foi analisado através de eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% a 100mV e 100mA. Em seguida, as bandas

(*amplicons*) foram visualizados no fotodocumentador-UV (Vilbert, Biosystems, Estados Unidos), localizado na Embrapa Agroindústria de Alimentos.

4.2.7 Avaliação do Binômio Tempo-Temperatura da Pasteurização de Polpa de Cupuaçu

A amostra de polpa de cupuaçu da safra de 2010, da etapa do processamento (H), foi pasteurizada em trocador de superfície raspada (com dois sistemas de aquecimento e um de resfriamento) (Figura 10) a 80°C por 15s (Tabela 12). Então, a amostra foi armazenada em vidros e congelada para posterior avaliação da presença ou não de fungos termorresistentes.



Figura 10. Pasteurizador Armfield FT25D SSHE com sistema acoplado, utilizado na planta piloto da Embrapa Agroindústria de Alimentos.

Tabela 12. Cálculos dos ajustes de pasteurização

Comprimento	da Seção (cm)	Diâmetro da Tubulação (cm)	Volume da Seção (L)	
210.	00	1.00	0.16	
Volume medido	Tempo medido	Vazão (L/h)	Tempo de retenção (s)	
em Proveta (mL)	(s)	v azao (L/II)	Tempo de Tetenção (8)	
500.00	45.47	39.58	15.00	

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Os resultados da caracterização físico-química podem ser observados na Tabela 13. Como o padrão de identidade e de qualidade estabelecido pela legislação para polpa de frutas (BRASIL, 2000) define apenas resultados de pH, acidez e sólidos solúveis, só foi possível comparar os resultados obtidos com as referências da legislação nessas três análises.

Tabela 13. Caracterização físico-química de polpa de cupuaçu congelada

Caracterização Físico- Química	Polpa de Cupuaçu Avaliada (média±desvio-padrão) *	Padrão de Identidade e Qualidade de Polpa de Cupuaçu**
Umidade g/100g	84,47 ±0,19	-
pH	3,68 ±0,01	2,60
Cinzas g/100g	0,83 ±0,01	-
Acidez em ácido cítrico g/100g	1,81 ±0,01	1,50
Sólidos solúveis ° Brix	13 ±0,00	9,00
Extrato etério g/100g	1,2 ±0,25	-
Nitrogênio total/ proteína g/100g	1,2 ±0,01	-
Atividade de água (aw)	0,97 ±0,01	-

^{*}Resultado das médias e DP das análises em triplicata

De acordo com os resultados expressos na Tabela 12, observou-se que a polpa de cupuaçu apresentou teor de sólidos solúveis de 13 °Brix, encontrando-se dentro dos padrões estabelecidos pelo regulamento técnico para fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade (mínimo de 9 °Brix, para valores de sólidos solúveis totais). Este resultado foi significativamente semelhante ao encontrado por Matos *et al.* (2008), de 13,44 a 13,79 °Brix. Os sólidos solúveis são utilizados como uma medida indireta de açúcares em frutos, indicando

^{**}Valores mínimos

o seu grau de maturidade e a quantidade de sólidos ou compostos solúveis em água que se encontram dissolvidos no suco ou na polpa. A sua medição não representa o exato teor de açúcares, devido às outras substâncias dissolvidas, recebendo influência da quantidade de chuvas durante a safra e de outros fatores climáticos, além da variedade da planta, do tipo de solo e do estádio de maturação (CHITARRA e CHITARRA, 2005).

Quando comparado com os dados do presente estudo, Hernandez e Garcia (2000) obtiveram valores maiores de 14,4 °Brix. Já Canuto *et al.* (2010) e Nazaré (1997) encontraram valores menores de 12 e 10,80 °Brix, respectivamente. Elevados teores de sólidos solúveis na matéria-prima implicam em menor necessidade de adição de açúcares na preparação de néctares, menor tempo de evaporação da água, menor gasto de energia e maior rendimento do produto, resultando em maior economia no processamento (MATOS, 2007).

O valor de pH (3,68) encontrado neste trabalho foi semelhante ao obtido por Schwanet al. (2000), Bueno et al. (2002), Costa et al. (2003) e Canuto et al. (2010), os quais, ao estudarem polpa de cupuaçu, encontraram valor de pH de 3,3. Matos et al., 2008, encontraram valores próximos, variando na faixa de 2,98 a 3,08. Todas as polpas avaliadas estavam de acordo com a legislação em vigor, cujo valor mínimo de pH estipulado é de 2,6 (BRASIL, 2000). Desse modo, a polpa de cupuaçu pode ser classificada como muito ácida, segundo classificação que se baseia no pH mínimo para a multiplicação da grande maioria das bactérias (4,00) (JAY, 2005), contribuindo, assim, para uma baixa contagem microbiana quando associado à boa qualidade da matéria prima empregada (FREIRE et al.,2009).

De acordo com a legislação nacional (BRASIL, 2000), a polpa de cupuaçu deve apresentar valor mínimo de 1,50% de ácido cítrico. Dessa forma, o resultado encontrado no presente estudo, 1,81 %, encontra-se de acordo com os padrões propostos pela legislação, assim como no resultado obtido por Bueno et al (2002), correspondente a um valor de acidez de 1,90%. Diferindo do encontrado por Matos *et al.* (2008) com valores de 2,92 a 3,23 %. A acidez titulável é um importante parâmetro na apreciação do estado de conservação de um produto alimentício, durante o amadurecimento, geralmente ocorre uma diminuição da acidez e modificação da proporção entre os diversos ácidos encontrados nos frutos (MACEDO, 2001).

O valor de atividade de água na polpa de cupuaçu (0,97) foi similar ao descrito por Costa *et al.* (2003). Algumas bactérias não se desenvolvem em Aw < 0,91 e muitos fungos filamentosos não se multiplicam em Aw inferiores a 0,80 (UBOLDI-EIROA, 1996).

Entretanto, essa atividade de água depende da concentração de sólidos solúveis (°Brix) do produto (SOUZA FILHO *et al.*, 1999). As frutas com atividade de água superior a 0,98 são mais susceptíveis à deterioração por bactérias, fungos filamentosos e leveduras (ABREU *et al.* 2003). Todos os alimentos, independente de sua origem, apresentam uma microbiota natural extremamente variável, concentrada principalmente na região superficial. Por influenciar na multiplicação, resistência, sobrevivência e na atividade metabólica dos microrganismos, a menor atividade de água provoca um aumento na estabilidade e na segurança dos alimentos.

Em trabalhos anteriores. Taco (2006),Nazare (1997)Ribeiro et al. (1992) relataram valores entre 0,6 a 1,0% para cinzas. Esses resultados estão em conformidade ao encontrado neste trabalho (0,83). Entretanto, para outras polpas de frutas típicas desta região do Brasil, cacau e açaí, a FAO (2010) encontrou valores mais elevados de 1,2% e 1,5%, respectivamente. Esse parâmetro permite avaliar a quantidade de minerais, provenientes do solo e que estejam presentes no fruto; essas não dependem da época do ano, mas dos cuidados com a matéria-prima durante as operações de colheita, transporte e recepção na indústria. O quantitativo de compostos minerais existentes nos alimentos que derivam da completa incineração de seus constituintes orgânicos, resultando apenas nos constituintes inorgânicos, corresponde a cinzas. Nesse contexto, as substâncias inorgânicas em seu teor, originadas de vegetais submetidos à análise química, indicam a riqueza da amostra no tocante a elementos minerais como: cálcio magnésio, potássio entre outros (NOGUEIRA et al., 1996).

5.2 DETERMINAÇÃO DAS CURVAS DE ESCOAMENTO E DA VISCOSIDADE DA POLPA DE CUPUAÇU

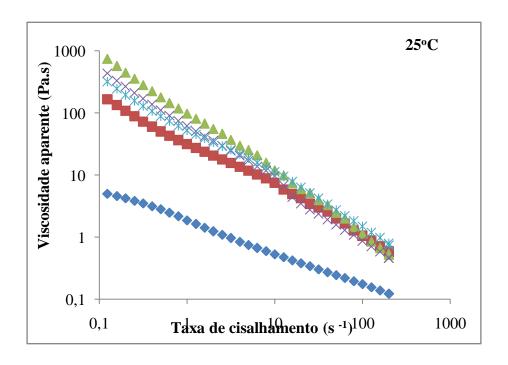
Na Figura 11, são apresentadas as curvas de viscosidade aparente da polpa de cupuaçu provenientes das etapas do processamento industrial (H, P, E e A) e da pasteurização realizada na Embrapa Agroindústria de Alimentos (PEMB). As análises reológicas foram realizadas a temperaturas de 25, 45, 60, 80 e 95° C. Tais condições foram selecionadas pois representam temperaturas comuns de descongelamento de polpas de fruta (HAMINIUK et al., 2006) e temperaturas mínimas de pasteurização (PELAIS; ROGEZ; PENA, 2008).

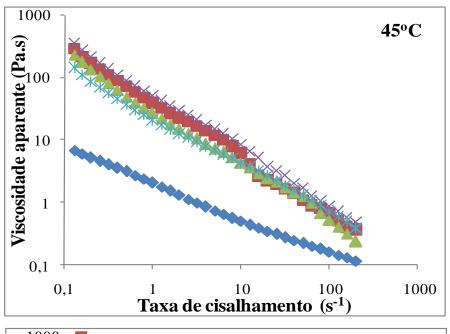
Observa-se neste trabalho uma diminuição da viscosidade aparente com o aumento da taxa de cisalhamento nas polpas provenientes de todas as etapas estudadas. Entretanto, a

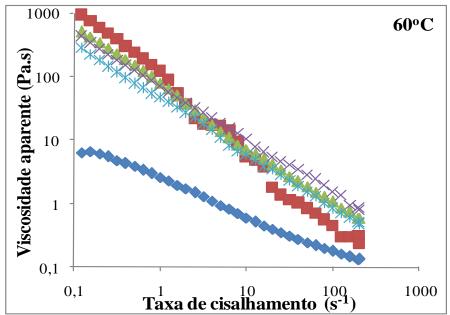
amostra PEMB apresentou uma diminuição mais acentuada da viscosidade aparente quando comparada com as outras amostras. Isso se deve ao fato da mesma ter sido peneirada antes de passar pelo processo de pasteurização, diminuindo a área superficial das partículas pequenas, facilitando o escoamento. Resultados semelhantes foram observados por Tanglertpaibul e Rao (1987), que analisaram amostras obtidas com menores aberturas da peneira (e teoricamente com menor distribuição do tamanho de partículas) levando a menores valores de viscosidade. Ou autores concluíram que a viscosidade de concentrados de tomate pode ser afetada de maneiras distintas, tais como aumento da viscosidade devido à elevada área superficial das partículas pequenas e diminuição, da viscosidade pela exclusão das partículas grandes, que também são responsáveis pelo aumento da viscosidade.

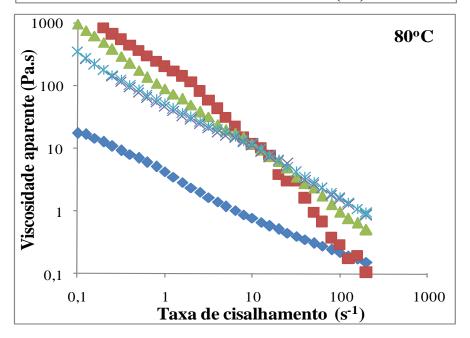
Foi observado que as curvas de viscosidade aparente, em relação à temperatura nas amostras de cupuaçu estudadas, descreveram um comportamento pseudoplástico. Esse tipo de fluido não-Newtoniano diminui a viscosidade aparente com o aumento da temperatura. De fato, o comportamento reológico comumente verificado em fluidos alimentícios, como polpas e sucos de frutas, é aquele de fluidos pseudoplásticos (VRIESMANN, 2008).

Ferreira *et al.* (2008) avaliaram o comportamento reológico de polpa de cupuaçu, em que o comportamento pseudoplástico foi observado, sendo o modelo de Ostwald-de Waele (Lei da Potência) o que melhor se ajustou aos dados experimentais. O mesmo efeito de pseudoplasticidade em polpa de cupuaçu foi observado por Cabral *et al.*, (2002) e por Guimarães e Mascigrande (2011), ao estudarem a reologia de polpa de açaí.









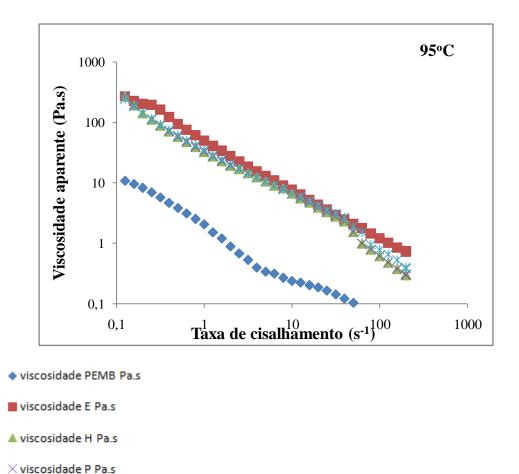


Figura 11. Comportamento das curvas de viscosidade aparente (Pa.s) das amostras provenientes das etapas de processamento da polpa de cupuaçu. Todas as amostras em uma temperatura fixa. Viscosidade PEMB Pa.s; Viscosidade E Pa.s. Viscosidade H Pa.s; Viscosidade P Pa.s.

X viscosidade A Pa.s

De acordo com Queiroz (1998) e Silva (2000), a temperatura afeta a viscosidade de polpa de frutas, pois esse comportamento pode ser explicado pelo maior alinhamento das partículas na direção da tensão aplicada. Rao e Palomino (1974) e Garcia *et al.* (1974), analisando o comportamento de polpas de frutas tropicais (goiaba, manga, banana e mamão), observaram que todas as amostras apresentaram esse padrão de comportamento. E ainda, Lopes (2005), analisando o comportamento reológico da polpa de pitanga, observou um decréscimo da viscosidade aparente com o aumento da temperatura e da taxa de cisalhamento.

A temperatura é um dos fatores que mais afeta a viscosidade das polpas de frutas, já que a maioria destas apresenta-se na forma de sólidos dispersos em meios líquidos. Um aumento na temperatura, neste caso, faz com que a viscosidade na fase líquida diminua, aumentando amobilidade das partículas em suspensão, diminuindo conseqüentemente a viscosidade da polpa. De maneira geral, a viscosidade aparente de purês de frutas diminui

moderadamente com o aumento da temperatura, enquanto que a de sucos clarificados apresenta um declínio mais intenso (SANCHEZ et al., 2002).

Observa-se pela Figura 11 que na etapa de Envase (E), às temperaturas de 60 e 80°C, o conjunto de pontos apresentou uma distribuição um pouco dispersa, sendo o mesmo comportamento observado por Ferreira *et al.* (2002) ao estudar a polpa de caju, nas temperaturas de 10 e 60°C. Os autores atribuíram esse comportamento atípico a fibras longas presentes na polpa, as quais não teriam sido fragmentadas durante o despolpamento e que se entrelaçariam durante a deformação, dificultando o escoamento do material.

Na Tabela 14 e Figura 12, são mostrados os pontos experimentais e as curvas de ajuste ao modelo de Ostwald-de-Waelle (Lei da Potência) para todos os tratamentos em todas as temperaturas testadas.

Tabela 14. Estimativas dos parâmetros do modelo Ostwald-de-Waelle (Lei da Potência) para

polpa de cupuaçu

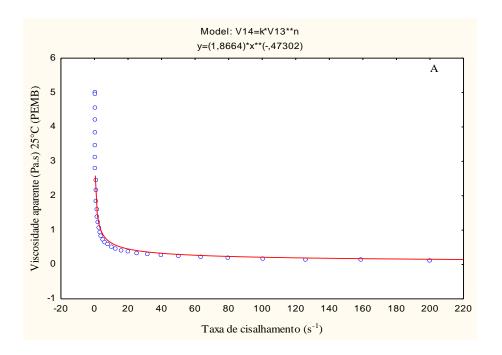
	A	P	E	H	PEMB
	•	•	25°C	•	
K	45,27	54,54	28,05	86,51	1,87
n	-0,95	-1,00	-0,87	-1,04	-0,47
\mathbb{R}^2	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
	1	1	45°C	1	
K	17,05	42,24	32,94	21,91	2,03
n	-1,04	-1,04	-1,05	-1,15	-0,59
\mathbb{R}^2	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
			60°C		
K	42,76	62,88	117,95	78,78	2,57
n	-0,92	-0,95	-1,02	-0,93	-0,47
\mathbb{R}^2	0,99	0,99	0,99	0,99	0,97
			80°C		
K	48,52	42,85	211,73	92,54	4,34
n	-0,84	-0,89	-0,84	-1,04	-0,64
\mathbb{R}^2	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
			95°C		
K	28,26	21,10	56,55	21,46	2,26
n	-1,05	-1,08	-0,78	-1,24	-0,75
\mathbb{R}^2	0,99	0,99	0,99	0,99	0,98

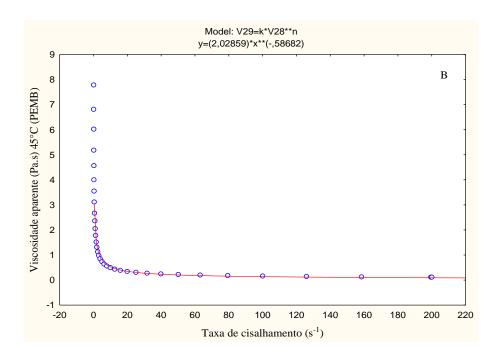
K= índice de consistência do fluido; n= índice de comportamento do fluido

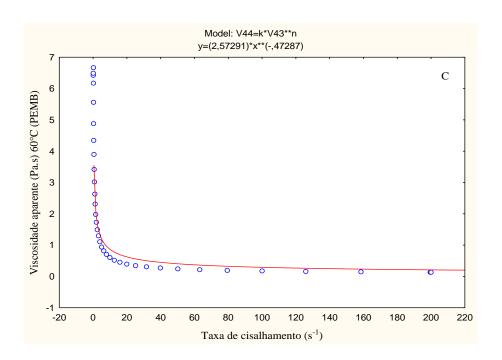
Os valores de "n" estão abaixo da unidade, comprovando o caráter pseudoplástico, segundo Steffe (1996). Esse comportamento foi encontrado também por Ferreira *et al.* (2002) em polpa de goiaba e por Cabral *et al.* (2002) em polpa de cupuaçu. Os valores de R² encontrados mostram o bom ajuste do modelo estudado. Os parâmetros foram estatisticamente significativos, considerando um nível de significância de 5%. A amostra

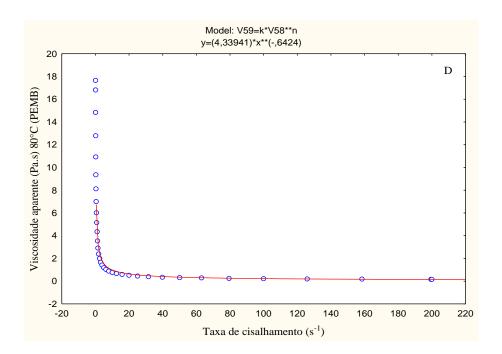
PEMB forneceu os menores valores de viscosidade, esse fato pode ser justificado pela pequena presença de fibras apresentando também, menores valores de "n" e "k".

Na Figura 12, são mostradas as curvas de ajuste ao modelo de Ostwald-de-Waelle (Lei da Potência) para a amostra PEMB em todas as temperaturas testadas.









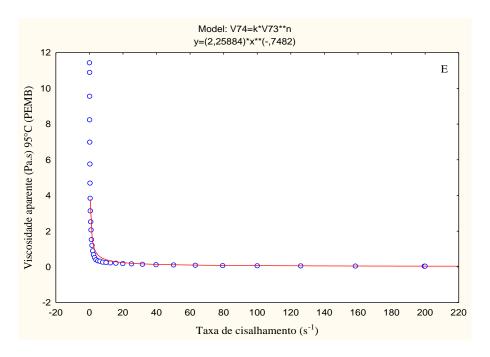


Figura 12.Curva de escoamento da amostra PEMB nas diferentes temperaturas em função da viscosidade e taxa de cisalhamento. (A) 25°C; (B) 45°C; (C) 60°C; (D) 80°C e (E) 95°C.

5.3. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

As análises microbiológicas realizadas nas amostras dos frutos e polpas de cupuaçu estão de acordo com o padrão da legislação brasileira vigente, descritos na Tabela 15, para polpas de frutas, no tocante a fungos filamentosos e leveduras, coliformes 35°C e 45°C e *Salmonella* spp, isso era esperado, uma vez que a casca preserva a integridade do fruto, formando uma barreira e impedindo a entrada de microrganismos, por ser uma estrutura rígida e espessa.

A IN nº 1 do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2000) estabelece para a polpa de fruta *in natura* o limite máximo de 5×10³UFC.g⁻¹ para contagem de fungos filamentosos e leveduras e de 2×10³ UFC.g⁻¹ para polpa tratada quimicamente e/ou que tenha sofrido tratamento térmico. A contagem de coliformes a35 e 45°C (de origem fecal) não deve exceder a 1,0 NMP.g⁻¹ e *Salmonella sp* deve estar ausente em 25g da polpa.Por meio da avaliação microbiológica do produto, assim como pela pesquisa de microrganismos patogênicos e de indicadores de contaminação fecal, será possível estimar sua vida de prateleira, constatar ou não a existência de riscos à saúde pública advindos do seu consumo (JAY, 2005).

Tabela 15.	Resultados	das análises	microbiológicas	s realizadas na	polpa de cupuaçu

Etapas de Processamento							
Análises	F	Н	P	E	A	Limites	
Microbiológicas						Estabelecidos	
Fungos	< 10	3,3x10	8,3x10	8,5x10	9,8x10	5x10 ³ (in natura)	
Filamentosos e						2x10 ³ (processada	
Leveduras)	
(UFC/g)*							
Coliformes a 35	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	1,0	
°C (NMP/g)							
Coliformes a 45	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	1,0	
°C (NMP/g)							
Salmonellasp.	-	-	-	-	-	-	

^{*}Estimado contagem < 25 colônias e>250 colônias. (-) ausência em 25 g.

Em todas as etapas de processamento nas quais foram coletadas amostras, não houve multiplicação de coliformes a 35°C ou a 45°C, ou presença de Salmonella spp. Bueno et al. (2002) realizaram uma análise da qualidade microbiológica de 15 marcas de polpas de frutas congeladas, incluindo cupuaçu, concluindo que todas as amostras atenderam à legislação vigente. A baixa contagem microbiana em polpa de frutas pode ser atribuída à boa qualidade da matéria-prima empregada na fabricação do produto e da destruição de microrganismos promovida pela pasteurização, resfriamento e congelamento subsequentes (FAZIO et al., 2006). Rabelo et al. (1998) analisando 35 amostras de polpas de frutas congeladas no estado do Ceará, observaram que 94% apresentavam níveis inferiores a 3 NMP de coliformes totais à 45°C/100mL e quanto aos 6% das amostras restantes, o NMP de coliformes totais à 45°C variou de 75 a 2400 e de 3 a 93. As polpas de frutas têm como características gerais, alta atividade de água (>0,95), potencial de óxido redução elevado e pH baixo, sendo a acidez um fator de inibição da microbiota deteriorante, o cupuaçu obedece tais características de frutas ácidas, apresentando acidez elevada e baixo pH (faixa de pH situa-se entre 2,0 e 4,0) na polpa), o que restringe a flora microbiana capaz de se desenvolver com maior facilidade no meio (FREIRE et al., 2009).

À parte das características intrínsecas, os resultados obtidos, mostraram também boas condições higiênico-sanitárias no processamento da polpa de cupuaçu indicando a adequada

aplicação das boas práticas de fabricação (BPF). Resultados semelhantes foram reportados por Santos *et al.* (2004) e Freire *et al.* (2009) em polpas congeladas de cupuaçu.

Em relação ao tempo de armazenamento, todas as etapas permaneceram estáveis microbiologicamente, apresentando ausência de coliformes fecais (< 3NMP/ mL) e de *Salmonella* durante os 3 meses de armazenamento, de acordo com os padrões microbiológicos estabelecidos para a polpa de fruta: coliformes fecais, máximo de 10²/g e *Salmonella*, ausente em 25g. Em seus estudos, Alexandre *et al.*(2004), obtiveram resultados semelhantes, porém para o tempo de armazenamento de 5 meses.

Os valores obtidos neste trabalho para fungos filamentosos e leveduras mostraram que as polpas homogeneizadas, pasteurizadas e envasadas estão de acordo com o padrão máximo estabelecido. Segundo Franco e Landgraf (2003), baixas contagens de fungos filamentosos e leveduras são consideradas normais (não significativas) em alimentos frescos e congelados. Quando em índices elevados nos alimentos, podem ser causados por condições higiênicas insatisfatórias de equipamentos, falhas no processamento e/ou na estocagem, contaminação excessiva na matéria-prima, entre outros fatores, além do aspecto deteriorante, que pode levar inclusive à rejeição do produto, e risco à saúde pública devido à possível produção de micotoxinas por algumas espécies de fungos filamentosos (SIQUEIRA, 1995).

Os resultados obtidos por Santos *et al.* (2004) igualmente atenderam aos padrões legais estabelecidos pelo Ministério da Agricultura e do Abastecimento, tendo obtido contagens de bolores e leveduras inferiores a 10 UFC.g⁻¹para polpa de cupuaçu congelada. Já Costa *et al.* (2003) encontraram contagens equivalentes a 1,1×10² UFC.g⁻¹, em níveis de fungos filamentosos e leveduras próximos àqueles verificados por Freire *et al.* (2009). Por outro lado, Nascimento *et al.* (1999), ao analisarem o perfil microbiológico de polpas produzidas e comercializadas na cidade de São Luís – MA, constataram que 100% das amostras apresentaram contaminação elevada por fungos filamentosos e leveduras, apresentando contagens entre 1,0 x 10⁵e 1,1 x 10⁸UFC.g⁻¹.

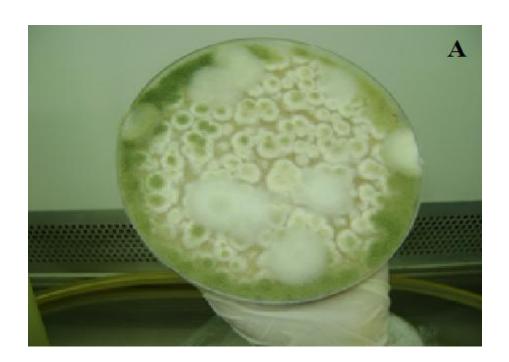
Santos *et al.* (2008), relataram que 89,8% de diferentes polpas de frutas, incluindo cupuaçu, apresentaram contaminação por fungos filamentosos e leveduras, sendo que as contagens variaram de <10 até 6,2 x 10 UFC.g. Dados semelhantes foram obtidos por Hoffmann *et al.* (1997), Feitosa *et al.* (1999), Leite *et al.* (2000) e Lima *et al.* (2001), quando analisaram a qualidade microbiológica de polpas comercializadas nos Estados de São Paulo, Paraíba, Pernambuco, Bahia e Ceará, e observaram contagens de fungos filamentosos e leveduras entre <10 e 7,8 x 10 UFC.g. Tal fato pode ser parcialmente atribuído ao elevado

teor de carboidratos normalmente presentes nas polpas de frutas, além do seu caráter ácido das polpas. Embora o baixo pH favoreça o desenvolvimento desses microrganismos, não houve uma relação direta entre o pH e uma maior ou menor contagem de fungos filamentosos e leveduras nas polpas de diferentes frutas.

5.4 ENSAIO PARA DETERMINAÇÃO DA TERMORRESISTÊNCIA

5.4.1 Análise de Fungos Termorresistentes

As análises de fungos termorresistentes, realizadas para as polpas de cupuaçu, mostraram que os fungos estudados cresceram, nas placas obtendo-se um número incontável de colônias, indicativo de que a pasteurização aplicada pela indústria não foi eficiente. Essas placas foram provenientes das etapas de processamento referentes à homogeinização (H); à pasteurização (P) e envase (E). A Figura 14 apresenta o crescimento para as polpas de cupuaçu em Ágar.





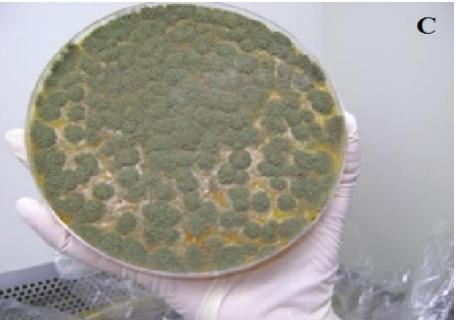


Figura 13. Crescimento de fungo termorresistente na polpa de cupuaçu proveniente das etapas de processamento: (a) homogeinização; (b) pasteurização e (c) envase

A origem da contaminação da polpa de cupuaçu com fungos termorresistentes pode estar associada à contaminação inicial das frutas destinadas à produção, principalmente, com fungos originários do solo, facilmente introduzidos na manipulação para o processamento da polpa, uma vez que o cupuaçu é normalmente recolhido do chão e levado para o processamento na indústria. Quadro semelhante foi constatado por Pitt e Hocking (1985), em seus estudos sobre o maracujá, que também apresenta grande suscetibilidade de contaminação

por ser diretamente recolhido e destinado ao processamento após cair no solo. Outros trabalhos estudam esse tipo de contaminação, tais como, *Neosarthorya fischeri*, isolado de morangos enlatados (McEVOY e STUART, 1970), de suco concentrado de abacaxi e de maracujá congelados (TOURNAS e TRAXLER, 1994).

Baglioni (1998) relatou que os fungos termorresistentes são importantes, pois, além de sobreviverem ao tratamento térmico por pasteurização, possuem grande relevância quando se considera a pré-contaminação da matéria prima, visto que podem aparecer na planta de processo por falta de procedimentos adequados de higienização. Além disso, constitui-se em uma das causas principais de deterioração a recontaminação do produto por fungos pósprocesso, especialmente no que diz respeito à contaminação durante o envase. Estes contaminantes podem causar mudanças organolépticas e favorecer o desenvolvimento de outros microrganismos por aumentarem o pH do produto e produzirem ácidos.

Análises subsequentes foram realizadas após três meses de validade comercial, os resultados encontrados estão apresentados na Figura 15. Foi observado que não houve diminuição da contaminação após esse período de congelamento da polpa (-18°C).







Figura 14. Crescimento de fungo termorresistente da polpa de cupuaçu após três meses de validade comercial, provenientes das etapas de processamento: (a) homogeinização; (b) pasteurização e (c) envase.

Olliver e Rendle (1934) verificaram o crescimento de *Byssochlamys* em alimentos estocados em uma faixa entre -12 a -7°C e observaram que o mesmo era inibido, não significando, no entanto a morte do microrganismo. Beuchat e Toledo (1977) mostraram que não houve crescimento de *B. nivea* em sucos e néctares de frutas estocados a 7°C e que a

estocagem de ascósporos a 7 e - 30°C teve um efeito letal. Eckardt e Arhens (1978) estudaram a sobrevivência de fungos termorresistentes em água destilada a -18°C, por um período de 34 semanas, e observaram a permanência, relativamente constante, do número de ascósporos. Esses resultados indicam que, embora a inativação dos ascósporos não possa ser assegurada, o crescimento de *Byssochlamys* spp e *Neosartorya* spp pode ser controlado estocando-os em temperaturas reduzidas (TOURNAS, 1994).

Na análise realizada com a polpa de cupuaçu proveniente da etapa de processamento (PEMB) devidamente pasteurizada em planta piloto II da Embrapa Agroindústria de Alimentos, não houve crescimento do fungo termorresistente (Figura 15). Essa observação mostra que o mesmo procedimento utilizado (80°C/15s) pela indústria fornecedora da polpa de cupuaçu não foi eficiente, provavelmente devido à limpeza e à sanitização ineficiente dos equipamentos e utensílios.

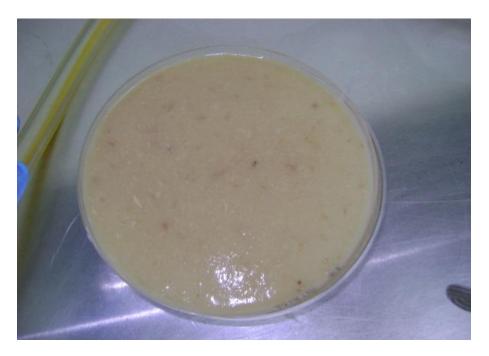


Figura 15. Polpa do cupuaçu pasteurizada na Embrapa sem crescimento aparente de fungo

Gumerato (1995) isolou o fungo *Neosartotya fischeri* presente em polpa de maçã, sendo que o mesmo microrganismo foi isolado na matéria prima, e no concentrado de maçã, mesmo depois deste último produto ter passado por processos térmicos da pasteurização e concentração, demonstrando potencial de resistência térmica do isolado. Segundo Mislivec*et al.* (2001), o crescimento de fungos filamentosos e leveduras pode ser manifestado por pontos de podridão, bem como, presença de esporos. Os autores afirmam, ainda, que o fato de não se

observar crescimento visual, não significa que o produto não esteja contaminado por estes microrganismos.

Os estudos sobre incidência de fungos termorresistentes evidenciam que o solo é a principal fonte de contaminação. Assim sendo, frutas e vegetais que têm contato direto com o solo, como o cupuaçu, são particularmente mais susceptíveis à contaminação por esses microrganismos. Portanto, constata-se que deve ser utilizada a matéria-prima não apodrecida ou lesionada e deve-se controlar o tempo de exposição das frutas à temperatura ambiente, além de ser recomendável uma rigorosa seleção e sanitização dos frutos (MORALES *et al.*, 2007).

5.4.2 Isolamento e identificação de fungos termorresistentes

Foram isoladas, de amostras de polpa de cupuaçu (de todas as etapas de processamento), oito cepas de fungos filamentosos. Dentre essas cepas, duas foram identificadas como sendo *Aspergillus* e seis não identificadas (consideradas não termorresistentes por não resistirem aos tratamentos térmicos superiores a 80°C/20 minutos). Esses fungos foram analisados macro e microscopicamente e identificados como *Aspergillus niger e Aspergillus flavus* (Figura 16).



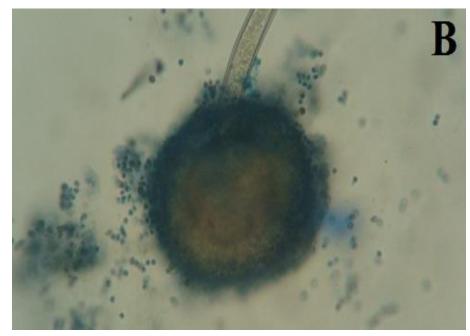


Figura 16.(a). Aspergillus flavus(b). Aspergillus niger

Considerando a importância da etapa de tratamento térmico na possível destruição dos fungos durante o processamento da polpa de cupuaçu, tornou-se relevante a busca por um isolado de maior termorresistência, para que a partir dele, parâmetros cinéticos fossem obtidos e usados para assegurar a inocuidade do produto final. A linhagem de *Aspergillus niger*, isolada da polpa de cupuaçu, apresentou capacidade de resistência térmica de 100°C/2min durante os choques seletivos(Tabelas 16 e 17), sendo considerada a mais termorresistente quando comparada com a linhagem de *Aspergillus flavus*(95°C/5min) isolada da mesma polpa.

Tabela 16. Sobrevivência dos 2 fungos isolados submetidos a diferentes tratamentos térmicos nas condições do experimento

	Sobrevivência (%)		
Tratamento Térmico	A. niger	A. flavus	
80°C /20min	100	100	
85°C /15min	98,3	57,4	
90°C /10min	80,1	11,7	
95°C /05min	62,8	2,1	
95°C /10min	35,7	-	
98°C /05min	20,1	-	
98°C /10min	9,7	-	

99°C /05min	5,3
100°C /02min	2,1
100°C /03min	

Tabela 17. Limite de sobrevivência dos fungos filamentosos na polpa de cupuacu

Fungos Termorresistentes	Condições Limites
Aspergillus niger	100°C/2min
Aspergillus flavus	95°C/05min

Não é muito comum encontrar espécies de *Aspergillus* que sejam termorresitentes. No entanto, em pesquisa realizada por Ugwuanyi e Obeta (1999), constatou-se a incidência de fungos termorresistentes em aproximadamente 17% das amostras de manga *in natura*, dentre os quais, *Aspergillus flavus*. SILVA (2006) também isolou *Aspergillus flavus* de néctar de manga processado termicamente, que foi capaz de sobreviver a uma temperatura de 100°C por 15 minutos. Resultados semelhantes foram obtidos por Splittstoesser e Splittstoesser (1977), na qual estudaram a resistência térmica de linhagens de *Aspergillus sp*, constataram a sobrevivência em suco de uva da linhagem *Aspergillus* 400 WR1, a 85°C por até 60 minutos.

5.4.3 Ativação ótima dos ascósporos

Os resultados dos ensaios de ativação ótima dos ascósporos do isolado mais termorresistente a 80°C, estão demonstrados nas Tabelas 18 e na Figura 17 (curva de ativação). A Tabela 17 exibe o número de ascósporos recuperados por cada choque e a percentagem de ascósporos ativados (em polpa de cupuaçu), tomando-se como referência a contagem direta original de ascósporos (1,9. 10⁷UFC/mL), efetuada em Câmara de Neubauer com 30 dias de incubação. A condição de temperatura de 80°C por 15 minutos resultou no melhor tratamento para ativação (maior % de recuperação de ascósporos), conforme pode ser observado na Tabela 17. Os ascósporos produzidos por fungos termorresistentes desenvolvem, com o tempo, uma dormência que só pode ser quebrada com um tratamento térmico subletal que irá permitir a germinação e o crescimento, em condições favoráveis. Esse tratamento é chamado de ativação (SPLITTSTOESSER *et al.*, 1993).

Tabela 18. Recuperação dos ascósporos (30 dias) e porcentagem de ativação do isolado mais termorresistente em polpa de cupuaçu a 80° C

Tratamento Térmico	UFC/mL	% de ascósporos ativados
80°C/05 min	$0.35 \cdot 10^7$	19,0
80°C/10 min	$0.74 \cdot 10^7$	36,8
80°C/15 min	1,10 . 10 ⁷	57,8
80°C/20 min	$0,20 \cdot 10^7$	11,5
80°C/25 min	$0.07 \cdot 10^7$	3,6

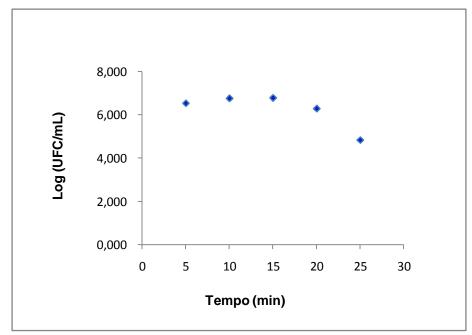


Figura 17. Curva de ativação do isolado fúngico de maior termorresistência a 80°C

5.4.4 Resistência térmica do isolado mais termorresistente

Os dados experimentais apresentados na Tabela 19 foram levados em consideração para obtenção da curva experimental de sobrevivência térmica para cada temperatura (Figura 18). As análises foram feitas em triplicata.

Tabela 19. Contagem do número de sobreviventes com o tempo de aquecimento em polpa de cupuaçu

Tempera	tura	Tratamento térmico	Tempo de	Média do	Desvio- padrão
(°C)			aquecimento	número de	
			(min)	sobreviventes	
				(UFC/mL)	

95°C	1D	3,98	5,40E+05	4,04E+04
	2D	7,96	2,90E+05	2,00E+04
	3D	11,94	7,27E+04	6,03E+03
	4D	15,92	3,13E+03	4,04E+02
	5D	19,9	7,83E+01	2,52E+00
98°C	1D	1,51	4,01E+05	2,00E+04
	2D	3,02	2,17E+04	2,08E+03
	3D	4,52	8,03E+03	4,51E+02
	4D	6,04	2,50E+02	3,00E+01
	5D	7,55	7,97E+01	2,52E+00
101°C	1D	0,38	2,07E+04	4,04E+03
	2D	0,76	1,43E+03	2,52E+02
	3D	1,14	1,40E+02	3,61E+01
	4D	1,52	2,00E+01	1,73E+00
	5D	1,9	1,23E+01	2,52E+00

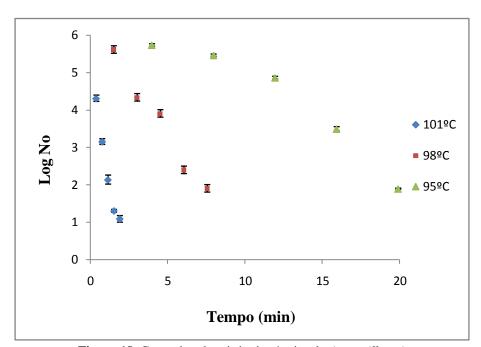
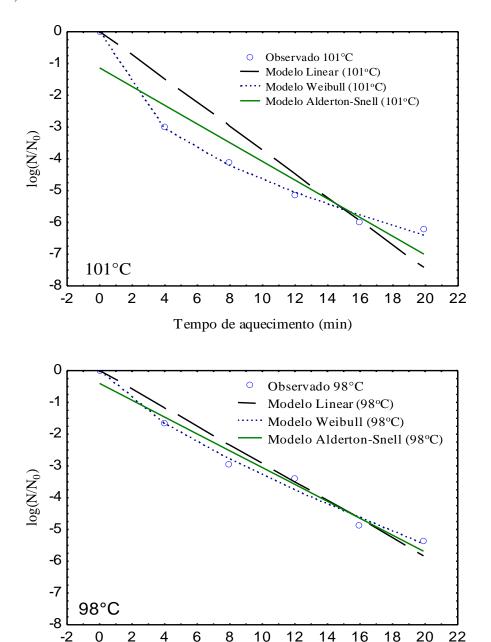


Figura 18. Curva de sobrevivência térmica do Aspergillus niger

Na Figura 18, observa-se uma não linearidade nas curvas com temperaturas mais brandas (95 e 98°C). Com o aumento da temperatura (101°C), a curva torna-se mais linear. Vários autores observaram esse fenômeno e constataram que as altas temperaturas

mascaram a não linearidade das curvas, sendo necessária a utilização de temperaturas mais baixas para evidenciar este fenômeno (BAGLIONI, 1998; SALOMÃO, 2002; SALOMÃO, 2004). Aragão (1989) relata que uma explicação para a não linearidade das curvas de sobreviventes de ascos de *Byssochlamys nivea* seria o fato de que os ascósporos encontram-se dentro de ascos íntegros, e que a destruição destes ascósporos não seria uniforme, indicando que a forma mais correta para o cálculo dos parâmetros de esterilização seria a aplicação do método de linearização de Alderton e Snell (1970).A Figura 20 mostra as curvas de sobrevivência de ascósporos de *A. niger* em polpa de cupuaçu ajustada para os modelos linear, de Weibull e de Alderton e Snell.



Tempo de aquecimento (min)

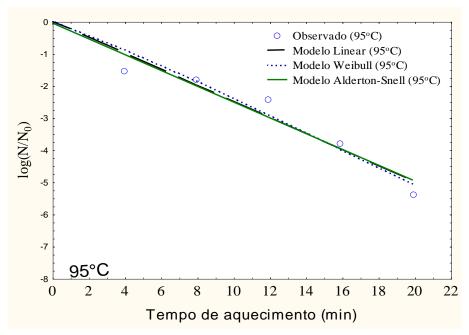


Figura 19. Curvas de sobrevivência de ascósporos de *A. niger* estimadas pelos modelos de Weibull, linear e de Alderton e Snell em polpa de cupuaçu a 95, 98 e 101°C.

Os coeficientes de determinação (R²) e a média quadrática dos erros (MQ_E) são apresentados na Tabela 20. Os modelos apresentaram resíduos com distribuição normal. Os resultados descritos na Tabela 19 evidenciam que o modelo que melhor se ajustou às curvas de sobrevivência de ascósporos de *A. niger* em polpa de cupuaçu foi o modelo de Weibull, pois apresentou maiores coeficientes de determinação e menores MQE. O mesmo foi encontrado por outros autores ao estudarem a inativação de microrganismos (FERREIRA, 2009; HUANG, 2009; CHEN, 2007 e HOOVER, 2004). A curva de sobrevivência de *A. niger* em polpa de cupuaçu a 95°C mostrou o mesmo ajuste nos três modelos. Resultados semelhantes foram observados por Ferreira (2009), que verificou o mesmo ajuste para o modelo linear e de Weibull em relação à temperatura de 98°C em néctar de abacaxi.

Tabela 20. Coeficiente de determinação (R²) e média quadrática dos erros (MQ_E) dos modelos de Weibull, de Alderton e Snell e Linear ajustados à curva de sobrevivência de ascósporos de *A. niger* em polpa de cupuaçu

Ascosporos de A. niger em polpa de cupuaçu						
	Modelo de V	Modelo de Weibull		Modelo de Alderton		Linear
			e Snell			
	R^2 MQ_1	Е	R^2MQ	Е	\mathbb{R}^2	MQ_E
Temperaturas	•					
95°C	0,95	0,15	0,95	0,16	0,95	0,15
98°C	0,98	0,04	0,97	0,11	0,95	0,15
101°C	0,99	0,02	0,88	0,57	0,79	0,98

Os parâmetros (b) e (n) do modelo de Weibull, o parâmetro (D) do modelo linear e o parâmetro (a) do modelo de Alderton e Snell encontram-se na Tabela 19. Esses parâmetros foram estatisticamente significativos (p< 5%) para todos os modelos estudados, apresentando baixo desvio-padrão, mostrando assim repetitividade dos experimentos. A Tabela 21 mostra que o parâmetro de forma (n) foi maior que 1 para a temperatura de 95°C e inferior a 1 para as temperaturas de 98 e 101°C. Para a primeira temperatura, observou-se um modelo côncavo, com formação de ombros (Figura 21), caracterizado pela lenta diminuição do número de sobreviventes, seguido de uma taxa de morte acelerada à medida que a temperatura de inativação aumenta. A fase "lag" ou "ombro" diminui, ficando a curva semelhante a uma reta. Para as outras temperaturas estudadas, obtivemos curvas convexas com formação de cauda, indicando maior resistência ou habilidade do microrganismo de se adaptar a um tratamento estressante (Figuras 22 e 23) (BUZRUL e ALPAS, 2007).Os valores do parâmetro de forma (n) do modelo de Weibull seguiram um mesmo comportamento: diminuíram com a elevação da temperatura. Essas análises foram feitas em triplicata.

Tabela 21. Parâmetros dos modelos de Weibull, de Alderton e Snell e Linear na inativação de ascósporos em polpa de cupuaçu a 95, 98 e 101°C

Ascosporos de A. niger em polpa de cupuaçu						
	Modelo d	le Weibull	Modelo de Alderton e	Modelo Linear		
			Snell			
	n±DP	b±DP	a± DP	D± DP		
Temperatura	Temperatura					
95°C	1,09±0,1	$0,19\pm0,05$	$0,25 \pm 0,01$	$4,01\pm0,12$		
p-level	0,000	0,002	0,000	0,000		
98°C	$0,73 \pm 0,03$	$1,23 \pm 0,07$	$0,69 \pm 0,03$	$1,29 \pm 0,03$		
p-level	0,000	0,000	0,000	0,000		
101°C	$0,46\pm0,01$	$4,75 \pm 0,04$	$3,08 \pm 0,27$	$0,26\pm0,01$		
p-level	0,000	0,000	0,000	0,000		

Com base nos valores de b e n (Tabela 21), foram determinados os valores de t₁ e t₅, segundo a equação (8). Na Tabela 22, encontram-se os valores de t₁ e t₅ referentes ao modelo de Weibull, bem como o valor de D e 5D, referentes ao modelo linear. Obtivemos um D_{95°C} de 0,38 e um t₁ de 4,60. Gumerato (1995), ao tratar dos parâmetros cinéticos para *N. fischeri*, selecionado como bolor mais termorresistente em polpa de maçã, encontrou na temperatura de 93°C valor D=0,4 minuto, Masson (2004), para suco de abacaxi, um D a 98°C de 5,51 minutos e Ferreira (2009), também estudando suco de abacaxi, um D a 98°C de 2,69 minutos.

O modelo que melhor se ajustou às curvas de sobrevivência de ascósporos de *A. niger* foi o modelo de Weibull. Segundo o Food and Drug Administration (FDA, 2001), para garantia do processo de pasteurização faz-se necessário um tratamento térmico que garanta uma redução de 5 ciclos logarítmicos na população do microrganismo alvo, sendo desse modo, necessários para inativação do fungo *A. niger* em polpa de cupuaçu: 95°C/20,26 min ou 98°C/6,83 min ou 101°C/1,12 min.

Tabela 22 . Valores de t ₁ e t ₅ (Modelo de Weibull), D e 5D (Modelo linear) determinados para
a inativação de ascósporos de <i>A. niger</i>

Ascosporos de A. niger em polpa de cupuaçu						
	Modelo de Weibull	Modelo Linear				
	$t_1 \text{ (min)} \qquad t_5 \text{(min)}$	D (min) 5D(min)				
Temperaturas						
95°C	4,60 20,26	0,38 1,9				
98°C	0,75 6,83	1,51 7,55				
101°C	0,03 1,12	3,98 19,9				

O modelo de ALDERTON e SNELL (1970) também apresenta particulares na sua interpretação. A partir dele pode-se também obter o coeficiente térmico "z" para o fungo mais termorresistente. Contudo, torna-se necessária a construção de uma curva Log K versus Temperatura, conforme mostrado na Figura 20.

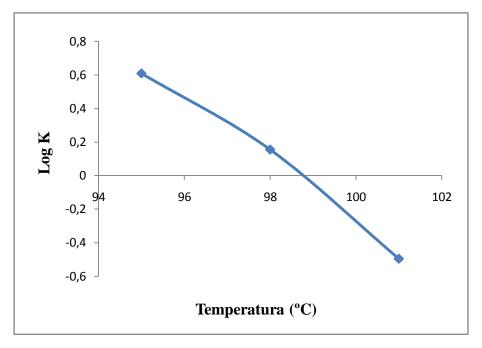


Figura 20. Curva para o calculo do valor de "z" de Alderton e Snell (1970) do A. Níger

Neste trabalho, foram utilizados os valores corrigidos do modelo citado presentes na Tabela 23. De acordo com os dados experimentais, os parâmetros cinéticos obtidos foram $z = 5,46^{\circ}\text{C}$ e $D_{95^{\circ}\text{C}} = 3,98\text{min}$. O valor de "z" encontrado se insere na faixa compreendida entre 4,0 e 6,0 para fungos termorresistentes (KOTZEKIDOU, 1997).

ROCHA (2002), avaliando suco de manga, obteve um valor $D_{90^{\circ}\text{C}} = 12,5$ s e um valor de $z = 4,79^{\circ}\text{C}$ para fungo do gênero *Penicililium*. Estudo realizado por Gressoni Jr (2002) avaliou a resistência térmica de *Byssochlamys nívea* em suco de laranja integral pasteurizado, encontrando valores $D_{90^{\circ}\text{C}} = 2,03\text{min}$ e $z = 19,56^{\circ}\text{C}$.

As Tabelas 23 e 24 e a Figura 24 mostram as diferenças nos tempos de tratamento térmico encontrados neste estudo e no aplicado pela indústria. Nota-se, então, que o tempo de tratamento térmico efetivamente empregado pela indústria é cerca de 15 vezes menor, considerando o valor teórico, e 16 vezes menor, quando comparado com o corrigido, ao requerido para inativação do fungo termorresistente encontrado em polpa de cupuaçu envasado assepticamente. O fungo isolado das amostras de polpa de cupuaçu revelou-se extremamente resistente, com base na grande diferença quando comparado o tratamento térmico necessário para sua destruição com o que é empregado na indústria, significando que o tratamento térmico atualmente realizado pela indústria não é suficiente para garantir a destruição do fungo.

Tabela 23. Comparação entre os valores de "D" teórico e corrigido

	D		F	
Temperatura	Teórico "Curva Fantasma"	Corrigido Alderton e Snell (1970)	Teórico "Curva Fantasma"	Corrigido Alderton e Snell (1970)
95°C	3,98	4,07	19,90	20,35
98°C	1,51	1,43	7,55	7,15
101°C	0,38	0,32	1,90	1,60

Parâmetros Cinéticos	Tratamento térmico dado pela indústria	
D _{95°C}	15s	

75s

Tabela 24. Comparação entre D₉₅ e F₉₅, considerando o tratamento térmico industrial

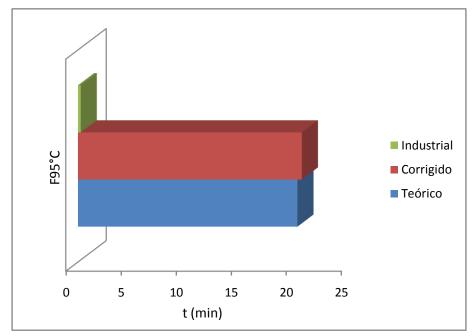


Figura 23. Gráfico comparativo entre os tratamentos térmicos dados pela indústria e o baseado no fungo *A. niger*

5.5 POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE AFLATOXINA

F_{95°C}

O potencial micotoxigênico depende da cepa, bem como da composição física e química da matriz colonizada pelo fungo e de fatores ambientais, podendo causar alterações biológicas bastante prejudiciais ao homem (PAPP *et al.*, 2002). Mais de 20 espécies de *Aspergillus* produzem micotoxinas, sendo as mais comuns as da divisão *flavi*, que incluem três espécies: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* (SALEEMULLAH *et al.*, 2006). Os resultados obtidos nesse trabalho mostraram para ambas as linhas que não houve amplificação dos genes da via de biossíntese de aflatoxinas quando foram conduzidas as reações usando os primers *aflR* e *ord-1*. Os fungos identificados como *Aspergillus flavus* apresentaram as bandas

características, confirmando o potencial para a produção de aflatoxina e, como esperado, o mesmo não foi verificado por parte do *Aspergillus niger*.

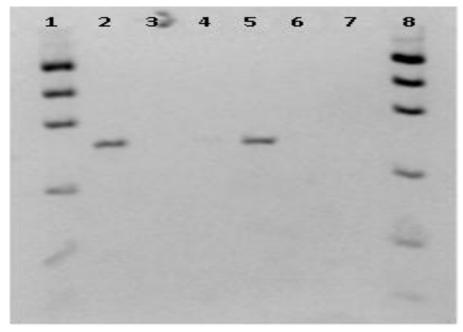


Figura 24. Eletroforese em gel de agarose de análise potencial aflatoxigênicos usando primers AFLR (1 e líder da banda 8-Low Mass; 2 - *A. flavus*, 3 - *A. niger*, 4 - tensão 1, 5 - 1 6 tensão-deformação 2, 7-deformação 2).

A exposição humana às micotoxinas por alimentos contaminados é questão de saúde pública no mundo todo. Essa contaminação pode acontecer no campo, antes ou após a colheita, durante o transporte e o armazenamento do produto (CALDAS *et al.*, 2002). No entanto, nem todos os fungos produzem toxinas, além disso, nem todas as espécies de fungos toxigênicos produzem toxinas, de forma que a simples presença de fungos em um alimento não implica que essas tenham sido ou venham a ser produzidas, mas sim a possibilidade de contaminação (PITT, 2006). Por outro lado, a ausência destes fungos não garante que o alimento esteja livre de toxinas, pois esses compostos persistem por um longo tempo, mesmo após o fungo ter perdido sua viabilidade. Algumas micotoxinas são relativamente termorresistentes e podem se apresentar ativas, mesmo após o processamento térmico, sendo mais sensíveis ao tratamento químico (YOSHISAWA, 2001).

5.5.1 Potencial de produção das micotoxinas: Desoxinivalenol (DON), Fumonisina, Ocratoxina e Patulina

Após as reações de amplificação (PCR), não foram detectadas as bandas características para as sequências específicas dos genes das vias de biossíntese de desoxinivalenol, fumonisina, ocratoxina e patulina, indicando que os fungos termorresistentes isolados não apresentam potencial de produção para tais micotoxinas.

6.0 CONCLUSÃO

Ao efetuar uma análise em relação aos padrões de identidade e qualidade fixados pela legislação, pôde-se concluir que as amostras apresentaram conformidade no tocante às suas características físico-químicas. A efetiva implantação das Boas Práticas de Fabricação, aliada às características inerentes da polpa de cupuaçu e ao processo de pasteurização, foi suficiente para garantir a ausência de bactérias do grupo coliformes e *Salmonella* spp. da polpa nas várias etapas de processamento e durante o período de armazenamento.

Para a polpa de cupuaçu, a viscosidade diminui com o aumento da temperatura até 95°C, quando se verificou que o índice de comportamento do fluido é menor que1(um), indicando o comportamento pseudoplástico da polpa. Com o aumento da temperatura, observou-se um aumento no índice de comportamento (n) e uma diminuição no parâmetro coeficiente de consistência (K), indicando que a polpa perde pseudoplasticidade e fica menos viscosa à medida que a temperatura aumenta, facilitando o escoamento e a troca de calor durante o processamento.

Neste trabalho, foram isoladas duas cepas de fungos, confirmadas como termorresistentes: *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus*, comumente reportados como deteriorantes. Apesar de não existirem relatos na literatura de linhagens de *Aspergillus niger* com elevado grau de termorresistência, a partir de polpa de cupuaçu, foi isolada uma cepa com resistência térmica ao tratamento a 100°C/02 minutos, sendo essa uma linhagem diferenciada. A incidência das espécies termorresistentes no processo de fabricação de polpa de cupuaçu foi evidenciada em todas as etapas de processamento.

Os fungos identificados como *Aspergillus flavus* apresentaram as bandas características, confirmando o potencial para a produção de aflatoxina e, como esperado, o mesmo não foi verificado por parte do *Aspergillus niger*. A presença da aflatoxina reflete não somente em perdas econômicas, principalmente às indústrias que exportam seus produtos a países que controlamos níveis dessa micotoxina, mas, sobretudo, um risco à saúde pública.

Ao se utilizar os modelos linear, de Weibull e de Alderton e Snell para inativação térmica de ascósporos do fungo mais termorresistente isolado da linha de processamento da polpa de cupuaçu, verificou-se que o melhor ajuste ocorreu pelo modelo de Weibull. O *A. niger* revelou-se muito resistente, evidenciando que o tratamento dado pela indústria não é suficiente para garantir a destruição do fungo, sendo necessário, de acordo com a

caracterização cinética, um tratamento de 95°C/20,26 minutos ou a uma temperatura maior por menos tempo, 98°C/6,83 min ou 101°C/1,12 min.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com a finalização dos experimentos e análise dos dados, a formação científica mostra que ainda existem muitas perguntas a serem respondidas em trabalhos futuros.

Como principais sugestões, temos:

- Avaliação de parâmetros reológicos em condições oscilatórias a fim de conhecer sua influência sobre o comportamento da polpa de cupuaçu;
- Estimar os parâmetros microbiológicos de crescimento utilizando outros modelos matemáticos e testar a eficiência destes modelos na estimativa de cada parâmetro separadamente;
- Estudo sobre a estabilidade da aflatoxina durante o processamento industrial da polpa de cupuaçu;
- Avaliação da situação micológica e micotoxicológica das polpas de cupuaçu produzidas na região Norte;
- Validar o processo térmico em linha piloto, com base nos parâmetros cinéticos de termorresistência do microrganismo alvo e nas propriedades termofísicas da polpa de cupuaçu.

6.0 REFERÊNCIAS

ABARCA, M.L.; ACCENSI, F.; CANO J.; CABANES F.J. Taxonomy and significance of black aspergilli. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.86, p. 33-49, 2004.

ABREU, F. A. P.; BASTOS, M. S. R.; OLIVEIRA, M. E. B.; SOUZA FILHO, M. S. M.; NASSU, R. T.; MACHADO, T. F. **Aspectos gerais de fabricação de polpas congeladas de frutas tropicais.** Fortaleza:Centro Nacional de Pesquisa de Agroindústria Tropical/EMBRAPA, 1997.

ABREU, M.C.; NUNES, I.F.S.; OLIVEIRA, M.M.A. Perfil microbiologico de polpas de frutas comercializadas em Teresina, PI. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.17, n. 112, p. 78-81, 2003.

ABRUNHOSA, L.; PATERSON, R. R. M.; KOZAKIEWICZ, Z.; LIMA, N.; VENÂNCIO, A. Mycotoxin production from fungi isolated from grapes. **Letters in Applied Microbiology**, v. 32, p. 240-242, 2001.

AFAGHI, M.; RAMASWAMY, H.S.; PRASHER, S.O. Thermal process calculations using artificial neural network models. **Food Research International**, v. 34, p. 55-65, 2001.

AGUIAR, H.F.; YAMASHITA, A.S.; GUT, J.A.W. Development of enzymic time-temperature integrators with rapid detection for evaluation of continuous HTST pasteurization processes. **Food Science Technology**, 47(1), 110-116, 2012.

AHMED, J.; RAMASWAMY, H.S. Response surface methodology in rheological characterization of papaya puree. **International Journal of Food Properties**, v.7, p.45-58, 2004.

ALBERT, I.; MAFART, P. A modified Weibull model for bacterial inactivation, **International Journal of Food Microbiology**, v.100, p,197-211, 2005.

ALDERTON, J.; SNELL, N. Chemical states of bacterial spores: heat resistance and its kinetics at intermediate water activity. **Applied Microbiology**, v.19, p.572-656, 1970.

ALEXANDRE, D. Conservação da polpa de açaí através da tecnologia de obstáculos e caracterização reológica, 2002. 161 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2002.

ALEXANDRE, D., CUNHA, R.L., HUBINGER, M.D. Conservação do açaí pela tecnologia de obstáculos. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n.1, p. 114-119, 2004.

ALEXOPOULOUS, C. J. Introductory Micology. 4 thed. New York: John Willey, 1996.

- ALMEIDA C.R.; SCHUCH, D.M.T.; GELLI, D.S.; CUÉLLAR, J.A.; DIEZ, A.V.; ESCAMILLA, J.A. Contaminacion microbiana de los alimentos vendidos em la via pública em ciudades de América Latina y características sócio-economicas de sus vendedores y consumidores. Washington: OPAS/OMS, 1996. 176p.
- ANDERSON, W. A.; McCLURE, P. J.; BAIRD-PAKER, A. C.; COLE, M.B. The application of alog-logistic model to describe the thermal inactivation of *Clostridium botulinum* 213B attemperatures below 121,1°C.**Journal of Applied Bacteriology**, v,80, p,283-290, 1996.
- APPLEBAUM, R.S.; BRACKET, R.E.; WISEMAN, D.W.; MARTH, E.H. Aflotoxin: toxicity to dairy cattle and occurrence in milk and mil products a review. **J. Food Prot**. Ames, v. 45, n. 8, p. 752-777, 1982.
- ARAGÃO G.M.F. Identificação e determinação de resistência térmica de fungos filamentosos termo-resistentes isolados de polpa de morango, 1989. 139 f.Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1989.
- ARAGÃO, C. G. Mudanças físicas e químicas da semente do cupuaçu (Theobroma grandiflorum Schum) durante o processo fermentativo, 1992. 115 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas, 1992.
- ASTORECA, A.; Barberis, C.; Magnoli, C.; Combina, M.; Dalcero, A. Ecophysiological fator effect on growth rate, lag phase and ochratoxin A production by Aspergillus niger aggregate strains on irradiated peanut seeds. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 129, p. 131-135, 2009.
- BAGLIONI, F. Estudo da ocorrência de fungos filamentosos termoresistentes em polpa de tomate envasada assepticamente, 1998. 94 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1998.
- BAPTISTA, A. S.; HORRI, J.; BAPTISTA, A. S. Fatores físico-químicos e biológicos ligados à produção de micotoxinas. **B. CEPPA**, Curitiba, v. 22, n.1, p.1-14, 2004.
- BARNES, H. A.; HUTTON, J. F.; WALTERS, K.An introduction to Rheology. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1989. 199p.
- BASTOS, M.S.R.; GURGEL, T.E.P.; SOUSA, M.S.M.F.; LIMA, I.F.B.; SOUZA, A.C.R.; SILVA, J.B. efeito da aplicação de enzimas pectinoliticas no rendimento da extração de polpa de cupuaçu. **Revista Brasileira de Fruticultura**, jaboticabal, v.24, n.1, p. 240-242, 2002.
- BAYNE, G. H.; MICHENER, D. H. Heat resistance of *Byssochlamys* Ascospores. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.37, n.3, p. 449-453, 1979.

BENNETT, J. W. An overview of the genus Aspergillus. In: MACHIDA, M.; GOMI, K. (editors). **Aspergillus Molecular Biology and Genomics**. Linton, UK: Caister Academic Press, 2010. p. 1-16.

BEUCHAT L.R.; PITT J.I. Detection and enumeration of heat-resistante molds.In:Compendium of Methods for the microbiological examination of foods. 4th ed. Washington: APHA, 2001. p. 217-222.

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

BEUCHAT, L. R.; TOLEDO, R. T. Behaviour of *Byssochlamys nivea* ascospores in fruits syrups. **Transactions of British Mycological Society**, v. 68, n. 1, p. 65-71, 1977.

BEUCHAT, L.R. Thermal inactivation of yeasts in fruit juices supplemented with food preservatives and sucrose. **Journal of Food Science.**v.47, p.1679-1682, 1989.

BEUCHAT, L. R.; COUSIN, M. A. Yeasts and molds. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (eds.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 ed. Washington: APHA, 2001. p. 209-215

BEZERRA, J.R.M.V. Comportamento reológico da polpa de manga (*Mangífera indica* L-**Keitt**), 2000.159 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) — Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2000.

BHATTACHARYA, S. Yield stress and time-dependent rheological properties of mango pulp. **Journal of Food Science**, Chicago, v.64, p.1029-1033, 1999.

BINDER, E. M. et al. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. **Anim. Feed Sci. and Technology**, v.137, p.265-282, 2007.

BNDES/FINAME/BNDESPAR. **Agroindústria: Exportações de Sucos e Polpas**. Informe Setorial nº 18, Dez. 2000. Disponível em: http://www.bndes.gov.br/conhecimento/setorial/is18-gs1.pdf> Acesso em: 04 jun. 2009.

BRASIL. Resolução nº183 de 21 de março de 1996. Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA). **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, seção I, página 4929.

BRASIL, Leis, Decretos, etc. Instrução normativa Nº 1 de 7 de janeiro de 2000, *Diário Oficial da União*, Nº 6, Brasília, 10 de janeiro de 2000. Seção I., p. 54-58. **Regulamento técnico geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de fruta.** BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC - 12, 2 de Janeiro de 2001. **Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos**.

Diário Oficial da União de 10/01/2001, Brasília – DF. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/e-legis/. Acesso em: 10 Jun. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitaria - ANVISA. Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. **Dispõe sobre limites máximos tolerados** (**LMT**) **para micotoxinas em alimentos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 22 fev. 2011. Seção 1. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/ Acesso em: 05 dez. 2011

BRERA, C.; DEBEGNACH, F.; DE SANTIS, B.; IAFRATE, E.; PANNUNZI, E.; BERDINI, C.; PRANTERA, E.; MIRAGLIA, M. Ochratoxin A in cocoa and chocolate products from the Italian market: Occurrence and exposure assessment. **Food Control**, Guildford, v. 22, p. 1663-1667, 2011.

BUCKINGHAM S.J., HANSELL D.M. *Aspergillus* in the lung: diverse and coincident forms. **Eur Radiol**. v.13, p.1786-1800, 2003.

BUENO, S.M.; LOPES, M.R.V.; GRACIANO, R.A.S.; FERNANDES, E.C.B.; GARCIA-CRUZ, C.H. Avaliação da polpa de frutas congeladas. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 62, n.2, p. 121-126, 2002.

BUZRUL, S.; ALPAS, H. Modeling the synergistic effect of high pressure and heat on inactivation kinetics of *Listeria innocua*: a preliminary study, **FEMS Microbiology Letters**, v.238, p.29-36, 2004.

BUZRUL, S.; ALPAS, H.; BOZOGLU, F. Use of Weibull frequency distribution model to describe the inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* by high pressure at different temperatures. **Food Research International**, v.38, p,151-157, 2005.

BUZRUL, S-; ALPAS, H. Modeling inactivation kinetics of food born pathogens at a constant temperature.**LWT – Food Science and Tecnology**, v.40, p.632-637, 2007.

CABRAL, M.F.P.; QUEIROZ, A.J.M.;FIGUEIRÊDO, R.M.F. Comportamento reológico da polpa de cupuaçu (*theobroma grandiflorum* schum.) peneirada. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.4, n.1, p.37-40, 2002.

CABRAL, R. A. F.; ORREGO-ALZATE, C. E.; GABAS, A. L.; TELIS-ROMERO, J. Rheologycal and termophysical properties of blackberry juice. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 3, p. 589-596, 2007.

CALDAS, E.D.; SILVA, S.C.; OLIVEIRA, J.N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e risco para saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 36, n.3, p. 319-323, 2002.

CALZAVARA, B.B. G.; MILLER C.H.; KAHNAGE, O.N.C. Fruticultura tropical: O cupuacuzeiro. Belém: EMBRAPA CPATU, 1984. 99p.

- CANUTO, G. A. B.; XAVIER, A. A. O.; NEVES, L. C.; BENASSI, M. T. Caracterização físico-química de polpas de frutos da Amazônia e sua correlação com a atividade anti-radical livre. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, n.4, p. 1196-1205, 2010.
- CARY J.W.; KLICH M. A.; BELTZ S.B. Characterization of aflatoxin-producing fungi outside of Aspergillus section Flavi. **Mycologia**, v.97, n.2, p.425-432, 2005.
- CASTRO, M.F.P.M.; SOARES, L.M.V.; FURLANI, R.R.Z. Mycoflora, aflatoxigenic species and mycotoxins in freshly harvest corn (Zea mays L.): a preliminary study. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 26, n.4, p. 289-295, 1995.
- CAVALCANTE, P. B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. 5. Ed. Museu Paraense Emílio Goeldi. Belém: ed. CEJUP, 1991, 279 p.
- CENTER FOR INTEGRATED FUNGAL RESEARCH. Disponível em: www.aspergillusflavus.org. Acesso em: 27 set. 2008.
- CHAAR, J. M. Composição do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum Schum*) e conservação de seu néctar por meios físicos e químicos, 1980. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Instituto de tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1980.
- CHEN, H.; HOOVER, D.G. Use of Weibull model to describe and predict pressure inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A in whole milk.**Innovative Food Science andEmerging Technologies**, v.5, n.269-276, 2004.
- CHEN, H. Use of linear, Weibull, and log-logistic functions to model pressureinactivation of seven foodborn pathogens in milk.**Food Microbiology**, v.24, p.197-204, 2007.
- CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. **Pós colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2 ed. Lavras: UFLA, 2005. 785 p.
- CLARK, A. H. Direct analysis of experimental tie line data (two polymer one solvent systems) using Flory-Huggins theory. **Carbohydrate Polymer**, n.42, n. 4, p. 337-351, 2000.
- COLE, M. B.; DAVIES, K.W.; MUNRO, G.; HOLYOAK, C. D.; KILBY, D.C. A. vitalistic model to describe the thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*. **Journal of IndustryMicrobiology**, v.12, p.232-239, 1993.
- CONNER, D. E.; BEUCHAT, L.R. Heat resistance of ascospores of *Neosartorya fischeri* as affected by sporulation and heating medium.**International Journal of Food Microbiology**, v.4, p.303-312, 1987.

- COSTA, C.L.; PERDONCINI, M.R.F. G.; ARROTÉIA, C. C.; KEMMELMEIER, C. Inibição da produção de aflatoxina B1 por óleo de nim (*Azadirachtaindica*) em culturas de *Aspergillus flavus*. **Revista Ciência e Vida**, Seropédica, v. 28, p. 135-137, 2008.
- COSTA, M. C.; MAIA, G. A.; SOUZA, M. S. M. F.; FIGUEIREDO, R. W.; NASSU, R. T.; MONTEIRO, J. C. S. Conservação de polpa de cupuaçu [*Theobroma grandiflorum* (*Willd. Ex Spreng.*) *Schum*] por métodos combinados. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 213-215, 2003.
- COTTY,P.J.; BAYMAN, P.; EGEL, D.S.; ELIAS, K.S.Agriculture, aflatoxins and Aspergillus, In K.A. Powell, A. Renwick, and J.F. Peberdy (ed.), **The genus Aspergillus**. New York: Plenum Press, 1994. p.1–27.
- COURI, S. Efeito de cátions na morfologia do agregado e na produção de poligalacturonase por Aspergillus niger mutante 3T5BS, 1993. 198f. Tese (Doutorado em Ciências) Pós-graduação em Tecnologia de processos químicos e Bioquímicos. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1993.
- CRUZ, D.E. Drying and germination of cupuassu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K. Schum.) seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 29, n. 3, p. 197-201, 2007
- DANTAS, R.L.; ROCHA, A.P.T.; ARAÚJO, A.S. et al. Qualidade microbiológica de polpas de frutas comercializadas na cidade de Campina Grande PB. Rev Bras Prod Agroind, Campina Grande, v.14, n.2, p.125-130, 2012.
- DELGADO, D. A. **Ação esporicida do peróxido de hidrogênio sobre bolores isolados em laminado para embalagens assépticas**, 2001. 232 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2001.
- DIAZ, G.J.; BOERMANS, H.J. (1994) Fumonisin toxicosis in domestic animals: a review. Veterinary and Human Toxicology, 36: 548—555.
- DILKIN, P.; MALLMANN, C. A. **Sinais clínicos e lesões causadas por micotoxinas.** In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 11, 2004. **Anais...** Piracicaba SP: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. Disponível em: http://www.lamic.ufsm.br>. Acesso em: 20 set. 2006.
- DOMBRINK-KURTZMAN, M.A.; ENGBERG, A.E. <u>Byssochlamys nivea with patulin-producing capability has an isoepoxydon dehydrogenase gene (idh) with sequence homology to Penicillium expansum and P. griseofulvum.</u> Mycological Research, v.110, p.1110-1118, sept. 2006.

- DOMINGUES, A. M. Avaliação do processo de pasteurização de suco de abacaxi (Ananas comosus L. Merr.) na inativação de enzimas oxidativas deteriorantes, 2003. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Instituto de tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2003.
- EGAWA, E. Y. Caracterização térmica e reológica de blendas de glicerol: colágeno tipo I de diferentes tecidos, 2007. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Química Analítica) Instituto de Química de São Paulo, Universidade de São Paulo, 2007.
- EICHER, R.; LUDWIG, H. Influence of activation and germination on high pressure inactivation of ascospores of the mould *Eurotium repens*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.131, p.595-604, 2002.
- EMBRAPA. **Fruticultura_OLD**. Disponível em: http://www21.sede.embrapa.br/linhas_de_acao/alimentos/fruticultura/fruticultura_OLD/mostra_documento-acesso-em: 07 mai. 2009.
- ENGEL, G. & TEUBER, M. Heat resistance of Byssochlamys nivea in milk and cream. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.12, p.225-234, 1991.
- **FAO** (FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION). Disponível em http://www.fao.org. Acesso em: 20 jun. 2010.
- FAZIO, M.L.S. Qualidade Microbiológica e Ocorrência de Leveduras em Polpas Congeladas De Frutas, 2006. 132 f.Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exata, Universidade EstadualPaulista, 2006.
- FÁZIO, M.L.S.; GONÇALVES, T.M.V.; REPISSO, C.S.; MARTINS, M.; HOFFMAN, F.L. Qualidade microbiológica de polpas congeladas de frutas, comercializadas na região de São José do Rio Preto, SP. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.20, n. 138, p.92-97, 2006.
- FEITOSA, T.; BASTOS, M. S. R.; OLIVEIRA, M. E. E. B.; MUNIZ, C. R.; BRINGEL, H. F.; ABREU, S. C. Qualidade microbiológica de polpas de frutas produzidas comercialmente nos Estados da Paraíba e Pernambuco. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 12, n. 66/67, p. 111-115, 1999.
- FELLOWS, P. Tecnologia del procesado de los alimentos: principios y prácticas. Zaragoza: Acribia, 1994. 549p.
- FERNANDES, A,; SALMERON, C,; MARTINEZ, A, Application of a frequency distribution model to describe the thermal inactivation of two strains of *Bacillus cereus*, **Trends in FoodScience and Technology**, v,10, p,158-162, 1999.

- FERNANDES, M. de S.; TOFANELLI, M.B.D.; CARRIJO, N.S.;MARTINS FILHO, O.B. Resultados do levantamento do volumecomercializado e perdas de produtos hortifrutigranjeiros nomercado varejista de Mineiros-GO. Mineiros: Fimes/Indep, 2006.81p. (Relatório de Pesquisa).
- FERREIRA, G.M.; GUIMARÃES,M.J.O.C.; MAIA, M.C.A. Efeito da temperatura e taxa de cisalhamento nas Propriedades de escoamento da polpa de cupuaçu (t. Grandiflorum schum) integral. **RevistaBrasileira de Fruticultura**, Jaboticabal , v. 30, n. 2, p.385-389, 2008.
- FIETZ, V. R.; Salgado, M. S. Efeito da pectina e da celulose nos níveis séricos de colesterol e triglicerídeos em ratos hiperlipidêmicos. **Ciênc. Ciência e Tecnolnologia de Alimentos**, v. 19, n. 3, p. 318-321, 1999.
- FRANCO, B. D. G.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. 2 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2003. 192 p.
- FREIRE, M.T.A; PETRUS, R.R.; FREIRE, C.M.A; OLIVEIRA, C.A.F; FELIPE, A.M.P.F.; GATTI, J.B. Caracterização físico-química, microbiológica e sensorial de polpa de cupuaçu congelada (*Theobroma grandiflorum Schum*) **Brazilian Journal of Food and Technology**, v. 12, n. 1, p. 09-16. 2009.
- FREITAS, I. C. Estudo das interações entre biopolímeros e polpas de frutas tropicais em cisalhamento estacionário e oscilatório, 2002. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2002.
- FRISVAD, J.C., Samson, R.A. & Smedsgaard, J. Emericella astellata, a new producer of aflatoxin B1, B2 and sterigmatocystin. **Letters in Applied Microbiology**, n.38, p. 440–445, 2004.
- FRISVAD, J.C., SKOUBOE, P. & SAMSON, RA. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B1, sterigmatocystin, and 3-O-methylsterygmatocystin, Aspergillus rambellysp. **Systematic and Applied Microbiology**, n.28, p.442-453, 2005.
- GARBEVA, P.; VAN VEEN, J.A.; VAN ELSAS, J.D. Microbial diversity in soil: Selection of Microbial Populations by Plant and Soil type and Implications for Disease Suppressiveness. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.42, p. 243-270, 2004.
- GARCIA, R.; RIVERA, J.; ROLZ, C. Rheological properties of some tropical fruit products and their enzymic clarification. In: Int. Cong. **Food Science & Technology**.v.2, p. 18-26. 1974.

GEISEN, R. PCR Methods for detection of Mycotoxin – producing Fungi. In: BRIDGED, P.D; ARORA, D.K.; REDDY, C.A.; ELANDER, R.P. (Eds). **Aplications of PCR in mycology**. 2nd ed. UK, Cambrige: University Press, 2000. p.242-263.

GEORGINNA, D.R.; PAYNE, G.A. Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: from gene to genome. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, p. 113-125, 2009.

GONÇALVES E.V., LANNES S.C.S. Chocolate rheology. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v.30, n.4, p.845-851, 2010.

GUIMARÃES, D. H. P.; MASCIGRANDE, D. D. Polpas de Juçara e Açaí: diferenças reológicas em função da temperatura e teor de sólidos suspensos. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, Guarapuava, v. 4, n.1, p.169-175, jan./abr. 2011.

GRANJEIRO, A. A.; QUEIROZ, A. J. M.; FIGUEIRÊDO, F. M. F.; MATA, M. E. R. M. C. Viscosidades de polpas concentradas de figo da índia. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 13, n. 2, p. 219-224, 2007.

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**, 1995. 106 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1995.

HASAN, H. A. Patulin and aflatoxin in brown rot lesion of apple fruits and their regulation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology,** Oxford, v. 16, n. 7, p. 607-612, 2000.

HASSAN, B.H.; HOBANI, A.I. Flow Properties of Roselle (*Hibiscus sabdariffa L.*) Extract. **Journal of Food Engineering**, v.35, p.459-470, 1998.

HEDAYATI, M.T. et al. Aspergillus flavus: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. **Microbiology**, New York, v. 153, p. 1677-1692, 2007.

HERNANDEZ, M.S., GARCIA, J.A.B., Manejo poscosecha e tranformacion de frutales nativos promisorio en la Amazonia colombiana. Bogotá: Instituto amazônico de investigaciones científicas, 2000. 63 p.

HOCKING, A. D & PITT, J. I. Food spoilage fungi. II. Heat Resistant Fungi. CSIRO **Division of Food Reaserch Quaterly**, v. 44, n.4, p. 73-82, 1984.

HOFFMANN, F. L. et al. Microrganismos contaminantes de polpas de frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 17, n. 1, p. 33-37, 1997.

HUANG, L, Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in ground beef under isothermal and dynamic temperature conditions, **Journal of Food Engineering**, v,90, p,380-387, 2009.

HUSSEIN S.H., BRASEL J.M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v.167, p.101-134, 2001.

IARC.International Agency for Research on Cancer. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene an stryrene. In: **IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**. Lyon, France, 2002. p.171–300.

INTEC, Assessoria e Consultoria em Gestão Estratégica. Estudo de Viabilidade Técnica e Econômica para Abertura de uma Agroindústria Processadora de Polpa de Frutas no Município Aimorés - MG. Viçosa, 2005. Disponível em: http://www.institutoterra.org/doc/06EVTE_IND_STRIA_DE_POLPAS_AI.PDF. Acesso em: 07 ago.2011.

JACKSON, L. S.; BEACHAM-BOWDEN, T.; KELLER, S. E.; ADHIKARI, C.; TAYLOR, K. T.; CHIRTEL, S. J.; MERKER, R. I. Apple quality, storage, and washing treatments affect patulin levels in apple cider. **Journal ofFood Protection**, Des Moines, v.66, n.4, p.618-624, 2003.

JAY, J.M. Microbiologia de Alimentos. 6ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p.

JECFA: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. **Safety evaluation of certain food additives and contaminants** – **Aflatoxins**. Geneva: World Health Organization. 1998. 96 p.

JESENKÁ, Z.; PIECKOVÁ, E.; BERNÁT, D. Heat resistance of fungi from soil. **International Journal of Food Microbiology**, Oxford, v. 19, n. 3, p. 187-192, 1993.

JURGENSON, J.E.; ZELLER, K.A.; LESLIE, J.F. Expanded genetic map of Giberella moniliformis (Fusarium verticillioides). Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.68, p. 1972-1979, 2002.

KABAK B., DOBSON A.D.W., VAR I. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed. **Critical reviews in food science and nutrition**, v.46, p.593-619, 2006.

KANG, S. W.; PARK, Y. S.; LEE, J. S.; HONG, S. I.; KIM, S. W. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulose biomass. **Bioresource Technology**, v.91, p.153-156, 2004.

KARAMI-OSBOO, R., MIRABOLFATHY, M., KAMRAN, R., SHETAB-BOUSHEHRI, M., & SARKARI, S. Aflatoxin B1 in maize harvested over 3 years in Iran. **Food Control**, v.23, n.1, p.271-274, 2012.

KAYA, A.; BELIBAGLI, K.B. Rheology of solid Gaziantep Pekmez.**Journal of Food Engineering**, Oxford, v.54, p.221-226, 2002.

KEDA, S.; NISHINARI, K.On solid-like rheological behaviors of globular proteins solution. **Food Hydrocolloids**. v. 15, p. 401-406, 2001.

KELLER, K. M. et al. Isolamento e identificação de fungos toxígenos isolados de amostras de 2 rações destinadas à alimentação de eqüinos no estado do Rio de Janeiro. **Revista Ciência e Vida**, Seropédica, v. 25, n. 1, Jan.-Jun, p.93-96, 2005.

KHOURY, A.; ATOUI, A. <u>Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status.</u> Toxins, Líbano, v.2, p.461-493, 2010.

KIKOKU, Y.Heat activation characteristics of *Taloramyces ascospore*.**Journal of Food Science**, Chicago, v.68, n.7, p.2331-2335, 2003.

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

KING JUNIOR, A, D,; WHITEHAND, L, C, Alterations of *Talaromyces flavus* heat resistance by growth conditions and heat medium composition, **Journal of FoodScience**, v.55, n.3, p.830-836, 1990.

KING, A.D.; HALBOOK, W.U. Ascospore heat resistance and control measures for *Taloramyces flavus* isolated from fruit juice concentrate. **Journal of Food Science**, v.52, p.1252-1254, 1987.

KIRK,P.M.; CANNON, P.F.; MINTER, D.W.; STALPES, J.A. **Dictionary of Fungi.** 10 ed.. United Kingdom: Cabi Europe, 2008. 771 p.

KLICH, M.A., & PITT, J.I. Differentiation of Aspergillus flavus from Aspergillus parasiticus and other closely related species. **Transactions of the British Mycologycal Society**, v.91, p. 99–108, 1988.

KLICH, M. A. Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus. **Mycoscience**, v. 48, p. 71-80, 2007.

KLICH, M.A. **Identification of common Aspergillus species** (1st ed). Utrecht, Netherlands: CBS, 2002. 116 p.

KLICH, M.A.; PITT, J.L.A laboratory guide to common Aspergillus pecies and their teleomorphs. Australia: North Ryde, 1988.

KOTZEKIDOU, P. Heat resistance of *Byssochlamys nivea*, *Byssochlamys fulva* and *Neosartorya fischeri* isolated from canned tomato paste. **Journal of Food Science**, v.62, n.2, p. 410-412, 1997.

KOZAKIEWICZ, Z. Aspergillus species on stored products. **Mycological papers**, Netherlands, v. 161, p. 1-188, 1989.

KRISTO, E.; BILIADERIS, C.G.; TZANETAKIS,N. Modelling of rheological, microbiological and acidification properties of a fermented milk product containing a probiotic strain of *Lactobacillus paracasei*. **International dairy Journal**, v.13,p. 517-528, 2003.

KURTZMAN, C. P.; HORN, B. W.; HESSELTINE, C. W. Aspergillus nomius, a new aflatoxin-producing species related to Aspergillus flavus and Aspergillus tamarii. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 53, p. 147-158, 1987.

KUSUMOTO, K.-I., YABE, K., NOGATA, Y., OTHA, H. Transcript of a homolog of *aflR*, a regulatory gene for aflatoxin synthesis in *Aspergillus parasiticus*, was not detected in *Aspergillus oryzae* strains. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam,v 169, p.303-307, 1998.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. et al. **Tratado de Micologia Médica Lacaz**.9.ed. São Paulo: Savier, 2002. 1120 p.

LAI, C.; FUH, Y.; SHIH, D.Y. Detection of mycotoxin patulin in apple juice. **Journal of Food and Drug Analysis**, Taiwan, v.8, n.2, p.85-96, 2000.

LANNES, S.C.S. et al. Cupuassu - A new confectionery fat from Amazonia, **American Oil Chemists Society**, v.14, n.1, p.40-41, 2003.

LEE, C.Z.; LIOU, G.Y.; YUAN, G.F. Comparison of Aspergillus flavus and Aspergillus oryzae by amplified fragment length polymorphism. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v.45, p. 61-68, 2004.

LEE, Y.C. Browning reaction enzymatic. In: **the Encyclopedia of Food Science and Technology** Hui, Y.; Ed.; Wiley, New york, 1991. p. 223-230.

LEITE, C. C. et al. Avaliação Microbiológica de polpas congeladas de frutas produzidas no Estado da Bahia. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 11, n. 78-79, p. 69-73, 2000.

- LENZ, M. K.; LUND, D. B. Experimental procedures for determining destruction kinetics of food components. **Food Technology**, v. 34, n. 2, p. 51-55, 1980.
- LESZKOWIAT, M. J.; BARICHELLO, V.; YADA, R. Y.; COFFIN, R. H.; LOUGHEED, E.C.; STANLEY, D. W. Contribution of sucrose to nonenzymatic browning in potato-chips. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 55, n. 1, p. 281- 285, 1990.
- LIMA, J. R.; MARTINS, S. C. S.; SILVA, J. L. A. Avaliação de popas de frutas congeladas comercializadas no estado do Ceará através de indicadores microbiológicos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.15, n.88, p. 62-66, 2001.
- LIMITES Éticos. **O caso do cupuaçu**. Disponivel em:< http://www.amazolink.org/biopirataria/cupuacu.htm>. Acesso em: 4 abr. 2009.
- LINTON, R,H,; CARTER, W,H,; PIERSON, M,D,; HACKNEY, C,R, Use of a modified Gompertz equation to model nonlinear survival curves for *Listeria monocytogenes* Scott A, **Journal of Food Protection**, v,58, n,9, p,946-954, 1995.
- LI, Y.C.; LEDOUX, D.R.; BERMUDEZ, A.J.; FRITSCHE, K.L.; ROTTINGHAUS, G.E.The individual and combined effects of fumonisin B1 and moniliformin on performance and selected immune parameters in turkey poults.Poult.SCi., v. 79, p. 871-878, 2000.
- LIU, Y., & WU, F. Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment. **Environmental Health Perspectives**, v.118, n.6, p.818-824, 2010.
- LOCATELLI, M.; SOUZA, V.F.; VIEIRA, A.H.; QUISEN, R.C. Nutrientes e biomassa em sistemas agroflorestais com ênfase no cupuacuzeiro, em solo de baixa fertilidade. Porto velho: EMBRAPA Rondônia, 2001. 17p.
- LOPES A.S. Estudo químico e nutricional de amêndoas de cacau (Theobroma cação L.) e cupuacu (Theobroma grandiflorum Schum) em funcao do processamento, 2000. 112 f. Dissertação (mestrado em Tecnologia de alimentos) Faculdade de engenharia de alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2000.
- LOPES, A. S.; PEZOA-GARCÍA, N. H.; VASCONCELOS, M. A. M. Avaliação das condições de torração após a fermentação de amêndoas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum Schum*) e cacau (*Theobroma cacao* L.). **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 6, n. 2, p. 309-316, 2003.
- LOPES, A.S. **Pitanga e acerola: estudo de processamento, estabilidade e formulação de néctar misto**, 2005. 137 f. Tese (Doutorado em Engenharia de alimentos)) Faculdade de engenharia de alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2005.

LORENZZETTI, R.S.; VILAS-BOAS, L.A.; GARCIA, J.E. <u>Aspectos Genéticos da</u> <u>Biossíntese de Fumonisinas.</u> UNOPAR Científica: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina, v.8, n.1, p. 63-70, out.2006.

LUND, D. B. Effects of heat processing. **Food Technology**, v.27, n.1, p. 16-18, 1973.

MAFART, P.; COUVERT, O.; GAILLARD, S.; LEGUERINEL, I, On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequebcy distribution model, **International Journal of Food Microbiology**, v.72, p.107-113, 2002.

MAHFOUD, R.; MARESCA, M.; GARMY, N.; FANTINI. J. The mycotoxin patulin alters the barrier function of the intestinal epithelium: mechanism of action of the toxin and protective effects of glutathione. **Toxicology and AppliedPharmacology**, San Diego, v.181, n.3, p.209-218, 2002.

MAIA, G. A.; SOUSA, P. H. M.; LIMA, A. S. L. **Processamento de Frutas Tropicais**. Fortaleza: Edições UFC, 2007. 320 p.

MALLMANN, C.A.; DILKIN, P. **Micotoxinas e Micotoxicoses em Suínos**. Santa Maria: Sociedade Vicente Pallotti, 2007. 238p.

MARASAS, W.F.O.; Nelson, P.E. **Mycotoxicology**. State College, EUA: The Pennsylvania State University Press, 1987. 102 p.

MARCOLINO, V.A., **Quantificação de leveduras, bolores comuns e termorresistentes em linha de processamento asséptico de bebida de uva**, 2003. 173 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de engenharia de alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2005.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495 p.

MARTINS, V. B. **Perfil sensorial de suco tropical de cupuaçu** (*Theobroma grandiflorum Schum*) **com valor calórico reduzido**, 2008. 141 f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) — Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2008.

MARTINUS, A,J,S,; VAN BOEKEL, On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells, **International Journal of Food Microbiology**, v.74, p.139-159, 2002.

MASSON, L.M.P. Avaliação do processo de pasteurização de suco de abacaxi (Ananas comosus L. Merr.) na inativação de fungos termorresistentes, 2004, 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2004.

MATAN, N. et al. Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.107, p.180-185, 2006.

MATEO, R.; MEDINA, Á.; MATEO, E. M.; MATEO, F.; JIMÉNEZ, M. An overview of ochratoxin A in beer and wine. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, n. 1-2, p. 79-83, 2007.

MATOS, C.B. Caracterização física, química, físico-química de cupuaçus (Theobroma grandiflorum (Wild. Ex. Spreng) Schum.) com diferentes formatos, 2007. 53 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) — Universidade Estadual Santa Cruz, 2007.

MATOS, C. B et al. Características físicas e físico-químicas de cupuaçus de diferentes formatos. **Rev. ciênc. agrár.,**n.50, p.35-45, 2008.

MATTIETTO, R.A. Estudo comparativo das transformações estruturais e físico-químicas durante o processo fermentativo de amêndoas de cacau (Theobroma cação L.) e cupuaçu (Theobroma grandiflorum Schum), 2001. 164 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de alimentos) – Faculdade de engenharia de alimentos. Universidade Estadual de Campinas, 2001.

McEVOY, I. J. & STUART, M. R. Temperature tolerance of Aspergillus fischeri var glaber in canned strawberries. **Irish Journal of Agricultural Research**, Dublin, v. 9, p. 59-67, 1970.

McLELLAN, M.R.; PADILLA-ZAKOUR, O.I. Juice Processing. In: BARRETT, D.M.; SOMOGYI, L.; RAMASWAMY, H. **Processing Fruits – Science and Technology**. 2a. Edição. Florida: Boca Raton, CRC Press LLC, 2005. Capítulo 4. Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa. Disponível em: http://hdl.handle.net/ 10400.5/2843>. Acesso em: 25 ago. 2011.

MISLIVEC, P.B.; BEUCHAT, L.R.; COUSIN, M.A. Detection and enumeration of heat resistant molds. In: Vanderzant, C.; Splistoesser, D.F. (Eds.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3rd ed. Washington: APHA, 2001. p. 251-253.

MORALES, H. et al. Cold and ambient deck storage prior to processing as a critical control point for patulin accumulation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 116, n. 2, p. 260-265, 2007.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquimica do solo**. 2. Ed Lavras: UFLA, 2006. 729p.

MORORÓ, R.C. Como montar uma pequena fabrica de polpas de frutas. 2.ed., Viçosa: Centro de produções técnicas, 2000. 84p.

MOSS, M.O. Risk assessment for aflatoxins in foodstuffs. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.50, p.137-142, 2002.

MUELLER, G.M.; SCHMIT, J.P. Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? **Biodiversity and Conservation**, London, v. 16, n.1-5, 2007.

MURILLO-ARBIZU, M. T.; AMÉZQUETA, S.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E.; CERAIN, A. L. Occurrence of Ochratoxin A in Southern Spanish Generous Wines under the Denomination of Origin "Jerez-Xérès-Sherry and 'Manzanilla' Sanlúcar de Barrameda". **Toxins**, Basel, v. 2, n. 5, p. 1054-1064, 2010.

MURPHY, P. A.; HENDRICH, S.; HOPMANS, E. C.; HAUCK, C. C.; LU, Z.; BUSEMAN, G.; MUNKVOLD, G. Effect of processing onfumonisin content of corn. In *Fumonisins in Food*; Jackson, L. S., DeVries, J. W., Bullerman, L. B., Eds.; Plenum Publishing:New York, 1996; pp 223-234

NASCIMENTO, A. R. et al. Perfil microbiológico de polpas de acerola (Malpighia glabal) e abacaxi (Ananas comosus), produzidas e comercializadas na ilha de São Luís, MA. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 62, p. 44-47, 1999.

NAZARÉ, R.F.R. de, Processos agroindustriais para o desenvolvimento de produtos de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). In: **Seminário Internacional Sobre Pimentado- Reino e Cupuaçu**, Belém. *Anais.*.. Belém: Embrapa - Amazônia Oriental/ JICA, 1997. p. 185-192.

NAZARÉ, R.F.R.; BARBOSA, W.C.; VIÉGAS, R.M.F. **Processamento das sementes de cupuaçu para a obtenção de cupulate**. Belem: EMBRAPA-CPATU.1990. 38 p.

NEMATI, M., MEHRAN, M. A., HAMED, P. K., & MASOUD, A. A survey on the occurrence of aflatoxin M1 in milk samples in Ardabil, Iran. **Food Control**, v.21, n.7, p. 1022-1024, 2010.

NINDO, C.I.; TANG, J.; POWERS, J.R.; TAKHAR, P.S. Rheological properties of blueberry puree for processing applications. **Lebensmittel Wissenschaft und-Technologie**, Oxford, v.40, p.292-299, 2007.

NOGUEIRA, C.M.D.; MORAIS, N.M.T.; LOPES, M.F.G.; SÁ, M.J.H.C. Análises químicas em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v.77, n. 1, p. 5-6, 1996.

NUNES, E. O. População de Fungos Filamentosos e sua Relação com Micotoxinas Presentes na Uva e no Vinho de Santa Catarina, 2008. 200 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

OBETA, J.N.; UGWUANYI, J.O. Heat-resistant fungi in nigéria heat-processed fruit juices. **Intertional Journal of Food Science and Technology**, v. 30,p. 587-590, 1995.

- O'BRIAN, G.R., FAKHOURY, A. M., PAYNE, G.A. Identification of genes differentially expressed during aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Fungal Genetics and Biology,** Orlando, v.39, p. 118-127, 2003.
- OLIVEIRA JÚNIOR, A. R.; COSTA, A. M. **Projeto potencialidades regionais estudo de viabilidade econômica cupuaçu** Coordenação: Valdeneide de Melo Parente Instituto Superior de Administração e Economia ISAE/Fundação Getúlio Vargas (FGV). 2003. Disponível em: http://www.suframa.gov.br/publicacoes/proj pot regionais/cupuacu.pdf> Acesso em: 22 set. 2010.
- OLIVEIRA, L.M.S. Contribuição ao aproveitamento industrial do cupuaçu (Theobroma grandiflorum Schum), 1997. 72 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) Faculdade de engenharia de alimentos, Universidade Federal do Ceara, 1997.
- OLIVEIRA, M.E.B; BASTOS, M.S.R.; FEITOSA, T.; BRANCO, M.A.A.C.; SILVA. M.G.G. Avaliação de parâmetros de qualidade físico-químicos de polpas congeladasde acerola, cajá e caju. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, vol.19, n.3, 1999.
- OLIVER, C.; TORTA, L.; CATARA, V. A polyphasic approach to the identification of ochatoxin Aproducing black Aspergillus isolates from vineyards in Sicily. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 127, p. 147-154, 2008.
- OLLIVER, M & RENDLE, T.A new problem in fruit preservation. Studies on Byssochlamys fulva and its effect on the tissues of processed fruit. **Journal of the Society of Chemical Industry**, London, v. 53, p. 166-172, 1934.
- OYAMA, A. K. Cupuaçu: Potencialidades e mercado, algumas especulações.In: **Workshop sobre culturas de cupuaçu e pupunha na Amazônia**. Anais... Manaus: Embrapa-CPAA, 1996. p. 85-95.
- PAPP, E.; H-OTTA, K; ZA'RAY, G. MINCSOVICS, E. Liquid chromatographic determination of aflatoxins. **Microchemical Journal**, New York, v.73, p. 39-46, 2002.
- PARK SJ, MEHRAD B. Innate immunity to *Aspergillus* species. **Clinical Microbiology Review** v. 22, n.4, p. 535-551, 2009.
- PARKER, W.A.; MELNICK, D. Absence of aflatoxin from refined vegetable oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society,** Champaign, v.43, p. 635-638, 1966.
- PELEG, M, On calculating sterility in thermal and non-thermal preservation methods, **Food Research International**, v.32, p.271-278, 1999.

PELEGRINE, D.H.; SILVA, F.C.; GASPARETTO, C.A. Rheological behavior of pineapple and mango pulps. **Lebensmittel Wissenschaft und-Technologie**, Oxford, v.35, n.8, p.645-648, 2002.

PERRONE, G. et al. Biodiversity of Aspergillus species in some important agricultural products. **Studies in Mycology**.Utrecht, v. 59, p. 53-66, 2007.

PETERSON, S. W.; ITO, Y.; HORN, B. W.; GOTO, T. Aspergillus bombycis, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, A. nomius. **Mycologia**, v. 93, p. 689-703, 2001.

PIECKOVÁ ES, SAMSON RA. Heat resistance of Paecilomyces variotii in sauce and juice. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, England, v. 24, p.227–230, 2000.

PITT J.I. & HOCKING A.D. Fungi and food spoilage. Sydney: Academic Press, 1985, 413p.

PITT, J. I.; HOCKING, A.D. **Fungi and food spoilage**. 2 ed. Gaithersburg: Aspen Pub., Inc., 1997.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. Fungi and food spoilage. 3ed. Dordrecht: Springer, 2009.

PITT, J.L. The genus *Penicillium* and its Teleomorphic States *Eupenicillium* and *Talaromyces*. 1st ed. London: Academic Press, 1979.

PITTET, A. Natural occurrence of mycotoxins in fonds and feeds – an updated review.**Revue de Médecine Vétérinaire**, Toulouse, v. 149, n.6, p. 479-482, 1998.

PROCTOR, R.H. *et al.* Co-expression of 15 contiguous genes delineates a fumonisin biosynthetic gene cluster in Gibberella moniliformis. Fungal Genetics and Biology, USA, v.38, p.237-249, 2003

QUEIROZ, A. J. **Análise do comportamento reológico dos sucos de abacaxi e manga**, 1998. 109 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1998.

RABELO, J.L. et al. Avaliação de polpa de frutas congeladas e comercializadas no estado do Ceará através de indicadores microbiológicos. In: **Congresso Latino-Americano De Microbiologia e Higiene De Alimentos**. Livro de Resumos...Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1998. 154p.

RAJASHEKLARA, 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.

RAJASHEKHARA, E.; SURESH, E,R.; ETHIRAJ, S, Modulation of thermal resistance of ascospores of *Neosartorya fischery* by acidulants and preservatives in mango and grape juice, **Food Microbiology**, v.17, n.3, p,269-275, 2000.

RAMOS, A.M.; BENEVIDES, S.D.; PEREZ, R. Manual de Boas Práticas de Fabricação para Indústrias Processadoras de Polpas de Frutas. Viçosa: UFV, 2006.

RAO, M. A.; PALOMINO, N. O. Flow properties of tropical fruit purees. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 39, n. 1, p. 160-161. 1974.

RAO, M.A. Rheological Behavior of Aqueous Dispersions of Cashew Gum and Gum Arabic: Effect of Concentration and Blending. **Food Hydrocolloids**. V. 13. P. 501-506. 1999.

RAPER K.B. & FENNELL D.I..**The genus** *Aspergillus*1st ed..Baltimore: Williams & Wilkins, 1965. 686 p.

REINHARDT, D. H. Avanços tecnológicos na fruticultura tropical. **Informativo da Sociedade Brasileira de Fruticultura**, Brasília, v. 15, n. 4, p. 18-21, 1996.

REISDORFF, C.; GASPAROTTO, L.; LIEBEREI, R. Development and prodution of cupuacu plants (Theobroma grandiflorum) on degraded areas: implications of water relations. In Lieberei, R.; Bianchi, H.K.; Boehm, V.; Reisdorff, C. (Ed) **Neotropical ecosystems**.Geesthacht: GKSS. 2002. p. 661-668.

RIBEIRO, N. C.; SACRAMENTO, C.K.; BARRETTO, W.S.; SANTOS FILHO, L.P..Características físicas e químicas de frutos de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) do sudeste da Bahia. **Agrotrópica**, Ilhéus, v. 4, n.2, p. 33-37, 1992.

RINGOT, D.; CHANGO, A.; SCHINEIDER, Y.J.; LARONDELLE, Y. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. **Chemico-Biological Interaction**, v.159, p. 18-46, 2006.

ROCHA, A.C. Avaliação da Microbiota de linha de processamento de suco de manga envasado assepticamente. 2002. 60p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2002.

ROCHA NETO, O. G.; FIGUERÊDO, F. J. C.; SOUZA, N. G. Comportamento estomático e fotossintético de plantas jovens de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum. In: **Seminário Internacional sobre Pimenta-do-Reino e Cupuaçu**. Anais...Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 1997. 440 p.

RODRÍGUEZ-AMAYA, D.B.; SABINO, M. Mycotoxin research in Brazil: the last decade in review. **Brazilian Journal Microbiology**, São Paulo, v. 33, p. 1-11, 2002.

ROGEZ, H.; BUXANT, R.; MIGNOLET, E.; SOUZA, J. N. S.; SILVA, E. M.; LARONDELLE, Y. Chemical composition of the pulp of three typical Amazonian fruits: araça-boi (*Eugenia stipitata*), bacuri (*Platonia insignis*) and cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). **European Food Research and Technology**, v.218, n.4, p. 380-384, 2004.

ROSA, C. A. R.; CAMPOS, S. G.; BARONI, F. A.; **Práticas de micologia veterinária**.UFRRJ. Instituto de Veterinária. Departamento de Micologia e Imunologia Veterinária. Micologia Veterinária. Prática & Seropédica, 2002.

SALAVESSA, J.J.S.M. Salsicharia tradicional da zona do Pinhal: caracterização e melhoramento da tecnologia de fabrico dos Maranhos. 2009. 321f. Tese(Doutorado em Ciência e Tecnologia Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, 2009.

SALEEMULLAH, A. I. et al. Aflatoxin contents of stored and artificially inoculated cereals and nuts. **Food Chemistry**, v. 98, n. 4, p. 699-703, 2006.

SALOMÃO, B.C.M. Isolamento, identificação e estudo de resistência térmica de fungos filamentosos termorresistentes em produtos de frutas. Florianópolis, 2002. 120 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) — Pós-graduação em engenharia de alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.

SALOMÃO, B,C,M,; SLONGO, A,P,; ARAGÃO, G,M,F, Heat resistance of *Neosartorua fischeri* in various juices, **LWT – Food science and Technology**, v.40, n.4, p. 676-680, 2007.

SAMSON, R.A.; REENEN-HOEKSTRA, E.S. Identification of the common food-borne fungi. In:SAMSON, R.A.; REENEN-HOEKSTRA, E.S. **Introduction to food-borne fungi**, Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1988. p. 3-221.

SAMSON R.A. & Varga J. *Aspergillus* systematic in the genomic era. Utrecht, Netherlands: CBS, 2007. 207 p.

SÁNCHEZ, M. C.; VALENCIA, C.; GALLEGOS, C.; CIRUELOS, A.; LATORRE, A. Influence of processing on rheological properties of tomato paste. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Sussex, v.82, p.990-997, 2002.

SANT'ANA, A,S,; ROSENTHAL, A,; MASSAGUER, P,R, Heat resistance and the effects of continuous pasteurization on the inactivation of *B.fulva* ascospores in clarified apple juice, **Journal of Applied Microbiology**, v.107, p.197-209, 2009.

- SANTOS, C.A.A., COELHO, A.F.S., CARREIRO, S.C. Avaliação microbiológica de polpas de frutas congeladas. Ciências. **Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n.4, p. 913-915, 2008.
- SANTOS, F. A.; SALLES, J. R. J.; CHAGAS FILHO, E.; RABELO, R. N. Análise qualitativa das polpas congeladas de frutas produzidas pela SUFRUTS, MA. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 18, n. 119, p. 14-22, 2004.
- SANTOS, S.F.M. Estudo da Produção de Pectinases por Fermentação em Estado Sólido Utilizando Pedúnculo de Caju como Substrato, 2007. 132 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) Faculdade de engenharia química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2007.
- SARAVACOS, G.D. Effect of temperature on viscosity of fruits juice and purees. **Journal of Food Science**, Chicago, v.35, p.122-125, 1970.
- SARTORI, D. Marcadores moleculares para detecção de espécies de Aspergillus produtores de ocratoxina A em grãos de café, 2005. 97 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) Universidade Estadual de Londrina, 2005.
- SATO, A. C. K. **Influência do tamanho de partículas no comportamento reológico da polpa de jabuticaba**, 2005. 73 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de alimentos) Faculdade de engenharia de alimentos. Universidade Estadual de Campinas, 2005.
- SCHRAMM, G. **Reologia e reometria: fundamentos teóricos e práticos**, 2. ed. Karlsruhe: Artliber, 2006. 232 p.
- SCHWAN, R.F.; SOUZA, S.M.M.; MENDONÇA, M.A.S. Cupuaçu [*Theobroma grandiflorum* (Wild ex Spreng: Schum)]. In: ALVES, R.E. et al. (Coord.) **Caracterização de frutas nativas da América Latina**. Jaboticabal: FUNPEP, 2000. p.31-34.
- SCOTT, P.M. Methods of analysis for mycotoxins an overview. In: **Analysis of oilseeds, fast anda fatty foods**. London: Elsevier, 1991. p. 141-183.
- SCUSSEL, V. M. Atualidades em micotoxinas e armazenagem de grãos. Florianópolis: Insular, 2000. 382 p.
- SGARBIERI, V. C; PACHECO, M. T. B. Revisão: Alimentos Funcionais Fisiológicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 2, n. 1,2, p. 7-19, 1999.
- SHAPIRA, R., PASTER, N., EYAL, O., MENASHEROV, M., METT, A., SALOMON, R. Detection of Aflatoxin Molds in Grains by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC., v.62, n.9, p. 3270-3273, 1996.

- SILVA, A.R. Modelagem do crescimento de *Aspergillus niger* em néctar de manga, frente à pH e temperatura, 2006. 255 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2006.
- SILVA, F. C. da. Reologia do suco de acerola: efeito da concentração e da temperatura, 2000. 110p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2000.
- SILVA, F.M.; GIBBS, P.; VIEIRA, M.C.; SILVA, C.L.M. Thermal inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores under different temperature, soluble solids and pH conditions for the design of fruit processes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 51, p.95–103, 1999.
- SILVA, M. F.V. Efeito dos diferentes tratamentos e embalagens nas características da polpa de acerola e na determinação dos teores de ácido ascórbico e das antocianinas durante o armazenamento, 1999. 224 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1999.
- SIQUEIRA, R.S. **Manual de microbiologia de alimentos**. Brasilia: Embrapa –SPI; Rio de Janeiro: Embrapa CTAA, 1995. 159p.
- SIROT V, FREMY JM, LEBLANC JC. Dietary exposure to mycotoxins and health risk assessment in the second French total diet study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 52, p. 1-11, 2013.
- SLONGO, A,P,; ARAGÃO, G,M,F, Avaliação da resistência térmica de *B.nívea* e de *Neosartorya fischeri* em suco de abacaxi, **Boletim CEPPA**, v.25, n.2, p,217-224, 2007.
- SLONGO, A,P,; MIORELLI, S,; ARAGÃO, G,M,F, Influência de diferentes fatores na termorresistência de *Neosartorya fischeri* em suco de mamão, **Alimentos e Nutrição**, v,16, n,4, p,377-387, 2005.
- SORENSON, W. G.; SIMPSON, J.; CASTRANOVA, V. Toxicity of the mycotoxin patulin for rat alveolar macrophages. **Environmental Research**, San Diego, v.38, n.2, p.407-416, 1985.
- SOUZA, A. de A.; NASCIMENTO, C. R. do; SILVA, A. da C. D. da; BARBOSA, R. N. T.; ANDRADE, J. K. C. de; NASCIMENTO, J. F.do. Incidência de fungos associados a sementes de ipê-rosa (Tabebuia impetiginosa) e ipê-amarelo (Tabebuia ochracea) em Roraima. Revista Agro@mbiente On-line, Roraima, v. 6, n. 1, p. 34-39, 2012.
- SOUZA FILHO, M.S.M. et al. Efeito do branqueamento, processo osmótico, tratamento térmico e armazenamento na estabilidade da vitamina C de pedúnculos de caju processados por métodos combinados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos,** Campinas, v.19, n.2, p.211-213, 1999.

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

SPLITTSTOESSER, D.F.; KUSS, F.R.; HARRISON, W.; PREST, D.B.Incidence of heat resistant molds in Eastern Orchards and Vineyards. **Applied Environmental Microbiology**, v.21, n.2, p.335-337, 1971.

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

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

SPLITTSTOESSER, D.F.; LAMMERS, J.M.; DOWNING, D.L.; CHUREY, J.J. Heat resistance of *Eurotium herbariorum*, a xerophilic mold.**Journal of Food Science.**v.54, n.3, p.683—685, 1989.

STEFFE, J. F. Rheological methods in food process engineering, 2ed.Michigan: Freeman Press, 1996. 418p.

STOLOFF, L. Afltoxin M in perspective. **Journal of Food Protection**, Ames, v.43, n.3, p. 226-230, 1980.

STREIT E, SCHATZMAYR G, TASSIS P, TZIKA E, MARIN D, TARANU I, TABUC C, NICOLAU A, APRODU I, PUEL O and OSWALD I, 2012. Current situation of mycotoxin contamination and co-occurrence in animal feed – focus on Europe. **Toxins,** v.4, p.788 – 809, 2012.

SWEENEY, M.J., PÀMIES, P., DOBSON, A.D.W. The use of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for monitoring aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* 439.**International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam v.56, p.97-103, 2000.

TACO. **Tabela brasileira de composição de alimentos** / Taco-Nepa-Unicamp. T 113 Versão II. Campinas: NEPA-UNICAMP, 2006. 113p.

TEIXEIRA, C.K.B. et al. Estudo da pasteurização da polpa de graviola. **Revista de Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.17, n.3, p.263-269, 2006.

TEIXEIRA, C.G. A fruticultura no Brasil. **Jornal da Cidade,** Poços de Caldas, 2008.Disponívelem:http://www.jorcidade.com.br/index.php?option=com_content&view=article&id=38:qa-fruticultura-no-brasilq-por-cyro-oncalves-teixei ra&catid=13:todos&Itemid=19>. Acesso em: 17 mar. 2012.

TOCCHINI, R. P.; NISIDA, A. L. A. C.; De MARTIN, Z. J. **Industrialização de polpas, sucos e néctares de frutas**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1995. 85p.

TOLEDO, R.T. **Fudamentals of food process engineering**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991.582 p.

TOURNAS V. Heat-resistant fungi of importance to the food and beverage industry. **Critical Reviews in Microbiology,** v. 20, n.4, p. 243-263, 1994.

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.

UBOLDI EIROA, M. N. Microbiologia de frutas e hortaliças desidratadas. In: Aguirre, J. M., Gasparino Filho, J. (coord.). **Desidratação de frutas e hortaliças**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1996. p. 1-6.

UGWUANYI, J. O.; OBETA, J. A. N. Pectinolytic and cellulolytic activities of heat resistant fungi and their macerating effects on mango and African mango. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Sussex, v. 79, n. 7, p. 1054-1059, 1999.

VALIK, L.; PIECKOVA, E. Growth modeling of heat resistant fungi: the effect of water activity. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 63, n. 1, p. 11-17, 2001.

VAN EGMOND, H.P. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. **FAO Food and Nutrition Papers**, v. 81, p. 180, 2004.

VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A; LEBEAULT, J. M. Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, **v.**74, p.175-178, 2000.

VELHO, C. C.; WHIPKEY, A.; JANICK, J. Cupuassu: a new beverage crop for Brazil. In: J. Janick and J. E. Simons (eds), **Advances in New Crops**. Portland: Timber Press, 1990. p.372-375.

VENTURIERI, G.A. Cupuacu: a espécie, sua cultura, usos e processamentos. Belem: Clube do Cupu, 1993. 108p.

VIDAL, J. R. M.; SIERAKOWSKI, M. R.; HAMINIUK, C. W. I., MASSON, M. L. Propriedades reológicas da polpa de manga (*Mangifera indica L. Cv. Keitt*) centrifugada. **Ciência agrotécnica**, Lavras, v. 30, n. 5, p. 955-960, 2006.

VRIESMANN, L. C., E PETKOWICZ, C. L. O. Polysaccharides from the pulp of cupuassu (Theobroma grandiflorum): Structural characterization of a pectic fraction. **Carbohydrate Polymers**, v.77, p.72–79, 2009.

WARD, T.J. *et al.* Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic Fusarium. PNAS, Washington, v.99, n.14, jul.2002.

WILLIAMS, A.P., WILLIAMS & NEAVES. Other type of spoilage moulds. In: C. W. Blackburn. **Food Spoilage Microorganisms**. Woodhead, UK: CRC Press, 2006. p.488-503.

WHITING, R.C.; BUCHANAN, R.L. Predictive modeling In: Doyle, M.P.Beuchat, L.R.; Montville, T.J. Food microbiology fundamentals and frontiers, Washington, ASM, 1997, P.728-739.

YANG, H. et al.New bioactive polyphenols from *Theobroma grandiflorum* ("Cupuaçu").**Journal of Natural Products**, v.66, n.11, p.1501-1504, 2003.

YEMENICIOĞLU, A.; ÖZKAN, M.; CEMEROĞLU, B. Heat inactivation o apple polyphenoloxidase and activation of its latent form. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 62, n. 3, p. 508-510, 1997.

YOSHISAWA, T. Mycotoxins analyses for federative republic of Brazil. Japão: Trainig Course, 2001. 283 p.

YOUSEF, A.E.; MARTH, E.H. Degradation of aflatoxin M1 in milk by ultraviolet energy.**Journal of Food Protection**, v.48, n.8, p.697-698, 1985.

YU, J. et al. Aspergillus flavus expressed sequence tags for identification of genes with putative roles in aflatoxin contamination of crops. FEMS Microbiology Letters, Amsterdam, v. 15, n. 237, p. 333-340, 2004.

YU, J. *et al.* Cloning and characterization of avfA and omtB genes involved in aflatoxin biosynthesis in three Aspergillus species. Gene, New Orleans, n.248, p. 157-167, 2000.

YU, J. et al. Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. **Appl. and Environ. Microbiology**, v. 70, p.1253-1262, 2004.

ZINEDINE, A.; MAÑES, J. Occurrence and legislation of mycotoxins in food and feed from Morocco. **Food Control**, v. 20, p. 334-344, 2009.

ZHU, Z.; LI, T.; LU, J.; WANG, D.; YAO,C. Characterization of kaolin flocs formed by polyacrylamide as flocculation aids. Int. J. Miner. Process., v.91, p.94-99, 2009.

ANEXO 1

Curvas de ajuste ao modelo de Ostwald-de-Waelle (Lei da Potência) para os tratamentos (H, P, E e A) em todas as temperaturas testadas em função da viscosidade e taxa de cisalhamento.

