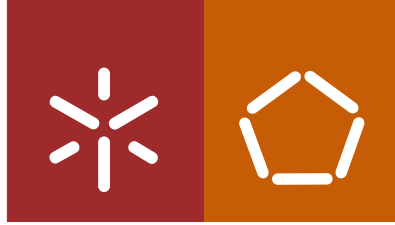




Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Bruno Emanuel Castro Pereira de Macedo

**Parâmetros térmicos D e z-value
para *Cadophora fastigiata* e discussão
de um caso prático**



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Bruno Emanuel Castro Pereira de Macedo

**Parâmetros térmicos D e z-value
para *Cadophora fastigiata* e discussão
de um caso prático**

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Biotecnologia

Trabalho efetuado sob a orientação do
Professor Doutor Armando Albino Dias Venâncio
e do
Professor Doutor Nelson Manuel Viana da Silva Lima

outubro de 2019

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.



Atribuição-NãoComercial-Compartilha Igual
CC BY-NC-SA

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Agradecimentos

Enquanto pretendo manter os meus agradecimentos sumários seria impossível evitar a menção de certas pessoas sem as quais não poderia aqui estar.

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus colegas que me auxiliaram durante a minha estadia no laboratório AMG, fizeram-me sentir em casa e potenciaram o meu crescimento. Na mesma linha de pensamento, gostaria de agradecer a ambos o Professor Doutor Armando Venâncio e ao Professor Doutor Nelson Lima, pela sua disponibilidade e por cultivarem novas aptidões em mim.

Noutra faceta mais pessoal, gostaria de agradecer à minha família, particularmente à minha progenitora, pelo suporte que me prestou ao longo dos anos. Tenho ainda a destacar a incrível pessoa que o meu avô, Alberto Lopes Pereira, é. Mesmo durante a sua luta corrente contra o cancro mostrou-se como um magnânimo pilar de força e auxílio.

A todos gostaria de expressar a minha mais sincera gratidão, muito obrigado pelo vosso interesse e dedicação.

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

Parâmetros térmicos D e z-value para *Cadophora fastigiata* e discussão de um caso prático

Resumo

No tempo corrente há um incremental desejo por parte da população global de obter o mais variadíssimo tipo de alimentos, sem que estes acarretem qualquer risco. Esta tarefa vê-se dificultada, uma vez que, ainda que haja uma exigência por alimentos seguros, há também uma pressão contra vários tipos de tratamentos e métodos de conservação.

Um dos métodos de conservação usados com enorme frequência hoje em dia é o tratamento térmico, que tem vindo a ser usado desde que Louis Pasteur o criou a meio do século XIX. Enquanto este tipo de tratamento é eficaz, é necessário otimizá-lo para os organismos e matriz alimentar em causa, permitindo a destruição microbiana sem comprometer as propriedades organolépticas dos alimentos.

Uma fonte externa descobriu, após tratamento térmico, uma contaminação por parte do fungo *Cadophora fastigiata* nos seus produtos. Devido à falta de informação sobre este fungo filamentososo, toma-se em causa este caso prático como ímpeto para levar a cabo um estudo térmico sobre este fungo, determinando os seus valores de D e z e apontando se estes parâmetros se mostram de tal forma insólitos que justifiquem a contaminação.

No final do estudo, obtiveram-se os valores de 0,69 minutos para a inativação de 90% dos esporos a 70 °C para uma amostra de água destilada a pH 6,5. Assim como, valores de D de 9,19 e 9,60 minutos, a 55 °C, respetivamente para amostras a pH 4 de solução de sacarose a 20% e de água acidificada. Adicionalmente os valores de z obtidos para todas as amostras variaram entre 7,8 °C e 10,6 °C, tornando desta forma improvável uma contaminação fúngica por parte deste fungo após o devido tratamento térmico.

Palavras-chave: *Cadophora fastigiata*; fator de resistência térmica (z); micologia alimentar; processamento térmico; tempo de redução decimal (D)

Thermal parameters of D and z-value for *Cadophora fastigiata* and a practical case discussion

Abstract

In current times there is a growing desire by the global population to obtain the most varied sorts of foods, without any associated risks. This task sees itself hardened by the fact that, although there is a demand for safe products, there is also a pressure of sorts against a lot of the treatments and methods used for food preservation.

One of the preservation methods used with vast frequency nowadays is the thermal processing, this method has been used since Louis Pasteur created it in the middle of the 19th century. While this type of treatment is very effective, it is necessary to optimize it depending on the organisms and food matrix at hand, in order to allow for microbial destruction without jeopardizing the products' organoleptic properties.

An external source has discovered, after thermal processing of their products a contamination by *Cadophora fastigiata*. Due to the lack of information regarding this filamentous fungus, this practical case is used as a throttle to start off a series of thermal studies on this fungus, in order to determine its D and z values and highlighting whether these parameters are so outlandish that they are able to justify the contaminations found.

By the end of this study, we obtained the value of 0.69 minutes for the inactivation of 90% of the spores at 70 °C, for a distilled water sample at pH 6.5. Aside from these, we also found D values of 9.19 and 9.60 minutes, at 55 °C, respectively for the samples of 20% sucrose and acidified water both at a pH of 4. Additionally, the z values obtained for all samples varied between 7.8 °C and 10,6 °C, making it unlikely for a fungal contamination by this species to take place with the proper thermal treatments.

Keywords: *Cadophora fastigiata*; Decimal reduction time (D); Food mycology; Thermal processing; Thermal resistance factor (z)

Índice

1. Introdução	1
1.1 Introdução teórica.....	2
1.2 Objetivos	3
2. Revisão bibliográfica	4
2.1 Fungos	5
2.1.1 O que são fungos?	5
2.1.2 Taxonomia básica dos fungos	5
2.1.2.1 Fungos filamentosos.....	7
2.1.2.2 Genus <i>Cadophora</i> e <i>Phialophora</i>	7
2.1.2.3 <i>Cadophora fastigiata</i>	9
2.1.2.3.2 Descrição do crescimento em vários meios.....	10
2.1.2.3.2.1 Características da colônia a 20 – 22°C após 3 semanas de acordo com Lagerberg. 10	
2.1.2.3.2.2 Descrição de microscopia de espécime crescido em PDA a 20 – 22°C entre 1 a 3 semanas.....	10
2.1.3 Clamidósporos.....	11
2.1.4 Condições ambientais e crescimento fúngico	11
2.1.4.1 Necessidades específicas e vias alternativas.....	11
2.1.4.2 Atividade de água (a_w)	12
2.1.4.3 Concentração de íões de hidrogénio e pH	12
2.1.4.4 Temperatura.....	12
2.1.4.5 Tensão de gás	13
2.1.4.6 Matriz alimentar	13
2.2 Preservação de alimentos ao longo da história	13
2.2.1 Processamento térmico	15
3. Metodologia.....	18
3.1 Material biológico	19
3.1.1 Providência.....	19
3.1.2 Crescimento do fungo.....	19
3.1.3 Crescimento de clamidósporos	19
3.1.3.1 Meio NB.....	19
3.1.3.2 Meio PCA	20
3.1.4 Observações e colheita dos esporos.....	20
3.2 Tratamento térmico	21
3.3 Coloração vital com diacetato de fluoresceína (FDA).....	21
3.4 Contagem dos esporos totais e viáveis	22
3.5 Amostras utilizadas.....	22
3.5.1 Água destilada; pH 6,5	22
3.5.2 Solução de sacarose 20%; pH 4.....	23
3.5.3 Água acidificada; pH 4.....	23
3.6 Tratamento dos dados	23
3.6.1 Cálculo do tempo de redução decimal D e fator de resistência térmica z	24
4. Resultados e discussão.....	25
4.2 Coloração FDA.....	27
4.3 Contagens de esporos	28
4.3.1 Amostra água destilada; pH 6,5.....	29

4.3.2 Amostra solução de sacarose 20%; pH 4.....	29
4.3.3 Amostra água acidificada; pH 4.....	29
4.4 Proporção de esporos viáveis pelos binômios de temperatura/tempo	29
4.4.2 Amostra solução de sacarose 20%; pH 4.....	31
4.4.3 Amostra água acidificada; pH 4	32
4.5 Cálculo de D.....	33
4.5 Cálculo de z.....	37
4.7 Caso prático	39
5. Conclusão e considerações futuras	41
5.1 Conclusão	42
5.2 Considerações futuras	42
Referências bibliográficas	43
Anexo I.....	i

Lista de abreviaturas

a_w – atividade de água

D – Tempo de redução decimal

FDA – *Fluorescein Diacetate hydrolysis* ou Diacetato de fluoresceína

HTLT – High Temperature Long Time

m – Declive da reta

|m| – Modulo do declive da reta

rDNA – *Ribosomal Deoxyribonucleic Acid*

STEC – *Shiga-Toxin producing Escherichia coli*

z – Resistência térmica

Lista de figuras

Figura 1 Filogenia e classificação dos Fungos. Fungos basais e Dikarya. Cumprimento dos ramos não proporcional a distâncias genéticas. Adaptado de (Hibbett, Binder et al. 2007).....	6
Figura 2 Uma das 8 árvores com maior parsimonia baseada em sequências de parte da grande subunidade de rDNA de espécies parecidas a <i>Phialophora</i> e outros ascomicetos. A raiz da árvore é o basidiomiceto <i>Bulleromyces albus</i> . Adaptado de (Harrington and McNew 2003).....	8
Figura 3 Câmara de Neubauer com as áreas de contagem destacadas, adaptado de (Giri)	22
Figura 4 Crescimento fúngico com presença de clamidósporos.	27
Figura 5 Esporos viáveis a apresentar fluorescência no campo de 470 – 490nm devido a FDA.....	27
Figura 6 Ilustração da proporção de esporos viáveis x 1000 por tempo (minutos) para a amostra em água destilada a pH 6,5.....	30
Figura 7 Ilustração da proporção de esporos viáveis x 1000 por tempo (minutos) para a amostra em solução de sacarose 20% a pH 4.	31
Figura 8 Ilustração da proporção de esporos viáveis x 1000 por tempo (minutos) para a amostra em água acidificada a pH 4.....	32
Figura 9 Log (proporção de esporos viáveis x 1000) por tempo (minutos) para a amostra de água destilada, pH 6,5.....	34
Figura 10 Log (proporção de esporos viáveis x 1000) por tempo (minutos) para a amostra de sacarose 20%, pH 4.	34
Figura 11 Log (proporção de esporos viáveis x 1000) por tempo (minutos) para a amostra de água acidificada, pH 4.	35
Figura 12 Gráfico de LOG (D) por temperatura (em Celsius), para a amostra de água destilada, pH 6,5	37
Figura 13 Gráfico de LOG (D) por temperatura (em Celsius), para a amostra de solução de sacarose, pH4.	38

Lista de tabelas

Tabela 1 Contagem dos esporos totais e viáveis de quatro amostras diferentes, somatório e proporção de viáveis encontram-se respetivamente no final da tabela. NT – Não submetidas a tratamento térmico; A – autoclavadas	28
Tabela 2 Tabela para cálculo de D a partir de m para as várias temperaturas utilizadas no tratamento térmico da amostra de água destilada, pH 6,5.	35
Tabela 3 Tabela para cálculo de D a partir de m para as várias temperaturas utilizadas no tratamento térmico da amostra de solução de sacarose 20%, pH 4.	36
Tabela 4 Tabela para cálculo de D a partir de m para as várias temperaturas utilizadas no tratamento térmico da amostra de água acidificada, pH 4.	36
Tabela 5 Tabela com valores de z para as diferentes amostras.	38
Tabela 6 Valores de D e z para as várias condições de <i>C. fastigiata</i> em comparação com outras espécies de contaminantes alimentares	40

1. Introdução

1.1 Introdução teórica

Os fungos filamentosos são frequentemente descritos como ubíquos na natureza, isto deve-se ao seu carácter quase omnipresente resultante dos mecanismos de dispersão e colonização que eles possuem. Assim, são capazes de ocupar uma variedade enorme de nichos ecológicos com apenas as condições mais básicas. Assim, uma vez que a maior parte dos alimentos que ingerimos no nosso quotidiano derivam de células animais ou vegetais cheias de compostos nutricionais, estes alimentos representam matrizes ideais para contaminações e proliferação fúngica, ao fornecerem todas as características que estes organismos necessitam para prosperar.

Lamentavelmente, apesar de a humanidade ter encontrado várias formas de utilidade nos fungos, as suas contaminações continuam a ser indesejadas. Pensa-se que a sua difusão resulte em contaminações entre 5 a 10% da produção mundial de alimentos (Santos, Venâncio et al. 1998), levando a prejuízos elevados. Contaminações alimentares por parte de propágulos fúngicos, ou por potenciais micotoxinas por estes produzidas, têm a capacidade de potenciar a deterioração dos alimentos, assim como, de afetar gravemente os consumidores, uma vez que podem causar sintomas que variam entre desagradáveis a fatais. Estima-se que cerca de 40000 pessoas morram diariamente devido a doenças de transmissão alimentar ou dietas impróprias, incluindo por falta de nutrição suficiente, e que até cerca de 2 mil milhões de pessoas (McElhatton and Marshall 2007), ou seja, cerca de um quarto da população mundial, não tenha acesso a alimentação adequada. Adicionalmente, é de ter em conta que a propagação de contaminações e doenças de transmissão alimentar, pode ter efeitos negativos noutras indústrias, como a do comércio e turismo, e até potencialmente comprometer outras fontes de alimentos.

As ciências que envolvem a área alimentar procuram encontrar a maneira melhor de conservar os alimentos, tanto frescos como processados, isto é, de descobrir e aplicar formas de manter a segurança dos alimentos, sem comprometer a sua qualidade. Estes processos giram à volta de abrandar as reações químicas e os microrganismos responsáveis pela decomposição dos alimentos ou pela inativação direta de bactérias, fungos ou enzimas. Procedimentos deste tipo são vitais para conseguirmos manter uma fonte contínua de alimentos durante todo o ano, assim como, para permitir o transporte de alguns alimentos pelo globo.

Todos os métodos de conservação e procedimentos a executar no tratamento dos alimentos tem em vista que as pessoas possam exercer o seu direito de obter alimentos inócuos e aptos para consumo, de maneira segura e contínua, sem qualquer preocupação.

1.2 Objetivos

Esta dissertação tem como objetivo principal determinar os parâmetros térmicos de tempo de redução decimal (D) e fator de resistência térmica (z) para o fungo filamentoso *Cadophora fastigiata*. A determinação destes valores mostra-se relevante no que toca ao processamento térmico de alimentos potencialmente contaminados com este fungo. A pertinência destes valores salienta-se, ainda, na apreciação de um caso prático onde se verificou uma contaminação pós-processamento de produtos alimentares por parte de *C. fastigiata* num ambiente industrial e permitirão com maior facilidade apurar a validade desta contaminação.

2. Revisão bibliográfica

2.1 Fungos

2.1.1 O que são fungos?

Há cerca de 120000 espécies de fungos identificados neste momento (Hawksworth and Lücking 2017), contudo, ainda não começamos nem a arranhar a superfície no que toca à descoberta e descrição destes organismos. Classicamente estimava-se a existência de 1,5 milhões de espécies fúngicas no nosso planeta, com estimativas mais recentes inflacionando ainda mais esse número até aos 2,2 a 3,8 milhões de espécies (Hawksworth and Lücking 2017). Pondo isto em perspetiva, pensamos já ter descoberto cerca de 80% de espécies de plantas existentes (Chapman 2009), mas temos ainda mais de 90% de espécies de fungos existentes para descobrir!

O Reino dos fungos é notoriamente difícil de delimitar devido às grandes diferenças encontradas entre os seus elementos, todavia, possuem geralmente certas características em comum (Webster and Weber 2007).

- São organismos heterotróficos, não fazem fotossíntese e obtêm energia através de absorção;
- Possuem estado vegetativo no substrato, no estado de micélio não motor, no entanto, podem ocorrer estados reprodutivos móveis;
- Tipicamente têm parede celular, usualmente de glucanos e quitina;
- Eucarióticos, com um ou vários núcleos, com o talo a ser homo ou heterocariótico, haploide, dicariótico ou diploide;
- Ciclos de vida usualmente complexos, mas ocasionalmente simples;
- Reprodução sexuada, com fusão dos núcleos e meiose, parassexuada, envolvendo fusão dos núcleos e desdiploidização gradual, e finalmente assexuada, com unicamente divisão mitótica;
- Propágulos geralmente na forma de pequenos esporos produzidos em altos números;
- Esporocarpos macro ou microscópicos, com formas características;
- Geralmente cosmopolita, universalmente presentes em habitats terrestres e de água doce, regista-se presença diminuta em ambientes marinhos.

2.1.2 Taxonomia básica dos fungos

A taxonomia é uma ciência de classificação, tendo o propósito de classificar e ordenar organismos através do conjunto das suas características. Apesar de ser uma ciência, a taxonomia é por

vezes um tanto arbitrária, uma vez que os conceitos criados para ela são estabelecidos pelo ser humano (Webster and Weber 2007). Esta peculiaridade destaca-se ainda mais na taxonomia clássica, na qual se procura e decide entre uma série de caracteres macro e microscópicos; no entanto, mesmo com métodos mais modernos ainda é detetada. No caso dos fungos em particular, a taxonomia parece estar em constante mudança e mesmo existindo um acordo geral em relação às clades existentes, existe mesmo assim discordância a níveis de nomenclatura, sendo por exemplo, um grupo nomeado *Ascomycetes* em *Dictionary of the Fungi* e *Pezizomycotina* em *Myconet* (Hibbett, Binder et al. 2007). Exemplos deste tipo são frequentes, e levam a maior dificuldade e confusão no que toca a uma classificação na sua natureza volátil.

Não obstante, a utilidade da taxonomia não pode ser de modo algum negada, e as vantagens de conseguir agrupar os seres e saber quais os tipos de relação de proximidade entre eles é imprescindível. Assim, uma das correntes representações da taxonomia fúngica é a que segue na Figura 1.

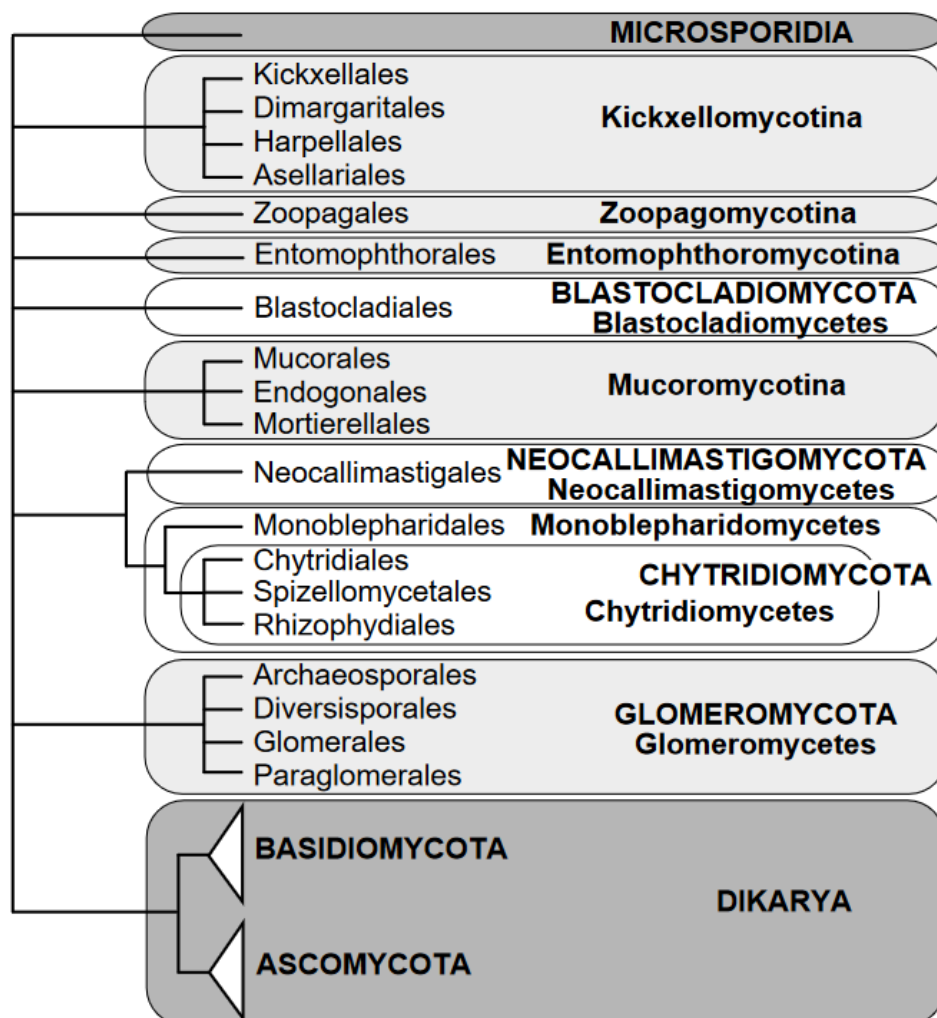


Figura 1 Filogenia e classificação dos Fungos. Fungos basais e Dikarya. Cumprimento dos ramos não proporcional a distâncias genéticas. Adaptado de Hibbett et al. (2007).

2.1.2.1 Fungos filamentosos

Fungos filamentosos são assim chamados pois a sua unidade de crescimento vegetativo consiste na hifa, a qual é composta por tubos com parede, que se estendem numa das pontas por incorporação de novo material de parede celular (Weber and Pitt 2001). Estas estruturas representam a principal ferramenta que permite aos fungos assumirem um papel chave na maioria dos ecossistemas. Esta e outras características, tais como, a capacidade de ter um ápex extensível capaz de produzir exoenzimas, a formação de “ramos” e a translocação de nutrientes entre segmentos de hifa maduros, tornam os fungos filamentosos em colonizadores do solo de tal forma superiores (Smith and Read 2002) que uma grande parte das plantas terrestres os tem como parceiros micorrizais, com forma a facilitar a colonização do solo e expansão da área que ocupam neste. Esta associação entre fungos micorrizais e plantas terrestres verifica-se desde há cerca de 400 milhões de anos (Simon, Bousquet et al. 1993, Remy, Taylor et al. 1994); no entanto, com o avanço da ciência a sua utilidade não termina aí. Como previamente mencionado, estes tem a capacidade de produzir vastas quantidades de enzimas extracelulares (Peberdy 1994), tornando-os em organismos de interesse para processos biotecnológicos.

2.1.2.2 Géneros *Cadophora* e *Phialophora*

O género *Cadophora* foi criado por Lagerberg e Melin em 1927, este género foi inicialmente criado em volta de uma única espécie (Lagerberg, Lundberg et al. 1927), tendo-a como a espécie tipo do género. A espécie em questão era *Cadophora fastigiata*. Os traços característicos a que Lagerberg e Melin deram ênfase e que especializavam este género eram a produção de conídios endógenos das fiálides, tendo uma abertura em forma de colarete (Lagerberg, Lundberg et al. 1927). Mais tarde, em 1934, Melin e Nannfeldt adicionaram quatro espécies novas ao género, todas provenientes de madeira com contaminações que davam origem a manchas (Melin and Nannfeldt 1934).

Anteriormente a isto, Medlar, a 1915, tinha proposto o nome genérico *Phialophora* para a única espécie que havia sido encontrada do género, esta foi isolada de uma infeção de pele crónica num ser humano e mais tarde foi nomeada *Phialophora verrucosa* (Medlar 1915). O nome *Phialophora* foi registado devido à célula que dá origem aos conídeos ser segundo Medlar um “pequeno e superficial copeiro” – ou seja – esta estrutura reprodutiva era um fiálides com um colarete bem desenvolvido (Medlar 1915).

Mais tarde, em 1937, Conant teve uma peculiar consideração. Perguntou-se se as espécies de fungos patogênicas no Homem teriam que ocorrer como saprófitas ou parasitas noutro habitat (Conant 1937). Aí começou a sua pesquisa e comparou oito espécies de *Cadophora* com *Phialophora verrucosa* e considerou-as congêneres, adicionando sete das espécies de *Cadophora* para o gênero *Phialophora* (Conant 1937). Esta denotação de Conant, tal como a de que existe a possibilidade de polimorfismo entre a espécie atirou ambos os gêneros *Cadophora* e *Phialophora* para uma discussão confusa durante anos (Cole and Kendrick 1973). Autores sugeriam classificações diferentes dando ênfase a características diferentes, o que incorria que não houvesse concordância final quanto a ambos os gêneros.

Recentemente usando tecnologias mais inovadoras, através da análise de sequências ITS e 28S de rRNA, foi determinado que o gênero *Cadophora* é anamorfo dos Helotiales (Discomycetes) e distinto do gênero morfologicamente semelhante *Phialophora* (Figura 2) (Harrington and McNew 2003).

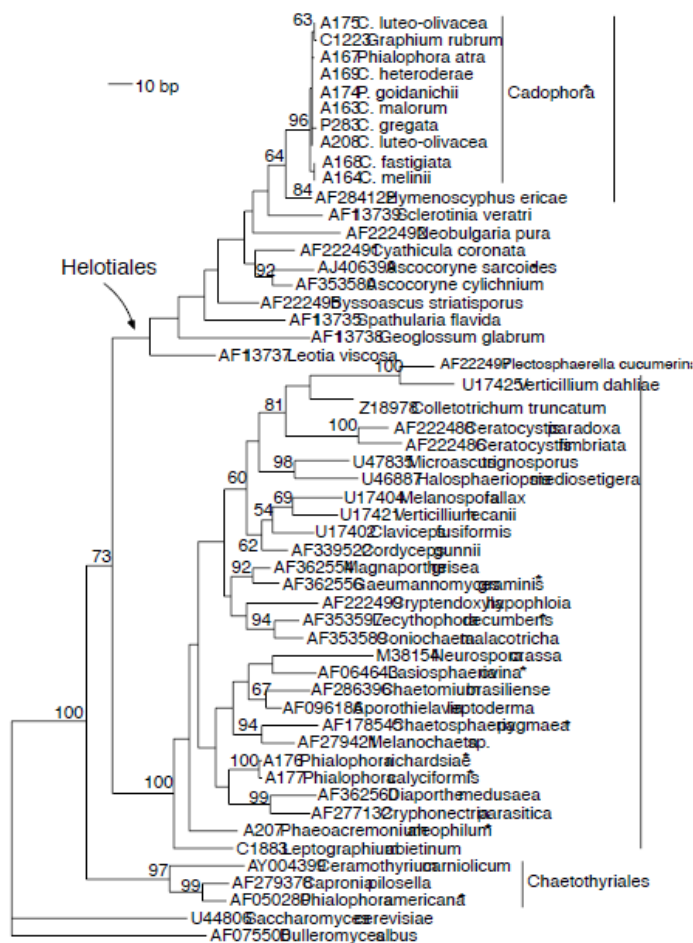


Figura 2 Uma das 8 árvores com maior parsimonia baseada em sequências de parte da grande subunidade de rDNA de espécies parecidas a *Phialophora* e outros ascomicetos. A raiz da árvore é o basidiomiceto *Bulleromyces albus*. Adaptado de Harrington e McNew (2003).

2.1.2.3 *Cadophora fastigiata*

Cadophora fastigiata é a espécie tipo do género *Cadophora*. Enquanto durante algum tempo, devido à desordem que existia nas classificações entre *Cadophora* e *Phialophora*, esta deteve ambos os nomes de *Cadophora fastigiata* e *Phialophora fastigiata* (Harrington and McNew 2003), verificando-se o último obsoleto no tempo corrente.

Como mencionado previamente, as espécies do género *Cadophora* são geralmente encontradas no solo e em plantas, onde causam a sua decomposição, deixando manchas de várias colorações. O mesmo se aplica a *Cadophora fastigiata* (Melin and Nannfeldt 1934), apesar dos seus muito escassos relatos, a última vez que foi encontrada foi no início do século, em cabanas de madeira que tinham sido construídas entre 1901 e 1911 no Ártico (Blanchette, Held et al. 2004).

2.1.2.3.1 Descrição

Colónia com crescimento tardio, parte central de cor ocrácea forte, com margens laterais difusas imersas numa cor acastanhada. Vista de trás tem um aspeto fuliginoso. Hifas vegetativas ramificadas, septadas, subhialinas, com cor castanha 0,7 – 3 micrómetros de grossura. Conidióforo tem origem perpendicular a hifa vegetativa por um ramo simples estreito, obláveo, cilíndrico, de cor ligeiramente castanha. Ápice com fascículo com fiálides ou esterigmas da mesma forma. Fiálides com forma de lança, 5–12 x 2,5–3,5 µm, castanho claro, ligeiramente escuro. Conídeos elipsoidais ou obovóides 3–5 x 2–3 µm, castanho claros (Conant 1937).

Este fungo é microscopicamente reconhecido pela presença de colaretes, que circundam as pontas dos fiálides, onde se encontram conídios viscosos. A sua associação à decomposição de madeiras deve-se à sua capacidade de degradar lenhina, celulose e pectinas, causando por vezes uma coloração azul nas madeiras contaminadas (Melin and Nannfeldt 1934).

2.1.2.3.2 Descrição do crescimento em vários meios

2.1.2.3.2.1 Características da colônia a 20 – 22 °C após 3 semanas

Crescimento em *potato dextrose agar* (PDA) 1,5 mm por dia, plano, flocoso no centro, aveludado, castanho acinzentado; margem suave e branco maculado. Exsudato sem cor, abundante no centro que diminui para a margem; margem inteira, Reverso concolor (Lagerberg, Lundberg et al. 1927).

Crescimento em *plate count agar* (PCA) 1,7 mm por dia, plano, suave a ligeiramente flocoso, laranja acinzentado, vai ficando cinzento acastanhado junto até junto à margem, onde fica quase transparente. Sem exsudado; Margem inteira; Reverso concolor (Lagerberg, Lundberg et al. 1927).

Crescimento em *oatmeal agar* (OA) 1,4 mm por dia, plano, pulverulento com algumas hifas aéreas no centro, suave em direção à margem, cinzento acastanhado com zona marginal castanho acinzentado. Sem exsudado; Margem inteira; Reverso concolor (Lagerberg, Lundberg et al. 1927).

Crescimento em *malt extract agar* (MEA) 1,3 mm por dia, pequeno convexo, fofo com hifas levantadas no centro, branco maculado. Zona marginal suave, cor branco alaranjado a transparente na borda. Sem exsudado; margem inteira. Reverso amarelo dourado no centro, nos outros locais amarelo alaranjado (Lagerberg, Lundberg et al. 1927).

2.1.2.3.2.2 Descrição de microscopia de espécime crescido em PDA a 20 – 22 °C entre 1 a 3 semanas

Hifas aéreas regulares, suaves e de paredes finas, 2,5 µm de largura, com pigmentos oliváceos pálidos, com septos finos, hifas laterais hialinas, maioritariamente a crescer a quase angulos retos. Material extracelular acastanhado junto ao centro. Fiálides sesséis ou em células de suporte cilíndricas com até 13 µm de comprimento e 3 µm de largura, todos inseridos a ângulos quase retos em hifas indiferenciadas. Fiálides sesséis frequentemente não apresentam septo basal. Células de suporte laterais, caso presentes, apresentam 1 a 4 fiálides em arranjos menos densos, com ocasionalmente fiálides a abrir no dorso de outros fiálides. Fiálides com até 15 x 2 µm, amplamente pontiagudo, com parte basal arredondada com até 3 µm em comprimento e pescoço cilíndrico com cerca de 1,5 µm de largura e 3 µm de comprimento. Conídios produzidos em aglomerados viscosos, hialinos, suaves e de paredes finas, ovoides a elipsoidais com 3,0-5,5 por 1,5-2,5 µm. Sem clamidósporos. Temperatura mínima 4 °C; Temperatura máxima 30 – 33 °C; Temperatura ótima 21 a 24 °C, isolado de madeira de

Picea abies na Bélgica (Lagerberg, Lundberg et al. 1927).

2.1.3 Clamidósporos

Clamidósporos são formados por várias espécies fúngicas e apresentam-se como células vegetativas de tamanho superior e paredes mais grossas, com formas variadas e citoplasma condensado, eles formam-se no interior ou nas pontas das hifas (Lin and Heitman 2005).

A produção e a utilidade dos clamidósporos parece variar entre as espécies a que pertencem (Lin and Heitman 2005), no entanto, parecem ocorrer em condições ambientais muito específicas e ter na maioria das vezes uma função mais ligada à sobrevivência que à disseminação (Paraud, Hoste et al. 2005); (Grønvold, Nansen et al. 2009), ao contrário dos esporos habituais.

2.1.4 Condições ambientais e crescimento fúngico

Enquanto geralmente não olhamos para os alimentos como um ecossistema, para um vasto leque de espécies fúngicas é exatamente isso que eles representam. Os alimentos, sendo por sua natureza nutritivos, apresentam-se como um habitat rico para a proliferação fúngica.

No entanto, há muitos outros fatores nos alimentos para além do quão nutritivos são, que os apontam como um alvo ideal para a propagação de espécies fúngicas.

2.1.4.1 Necessidades específicas e vias alternativas

Apesar de os alimentos serem uma rica fonte de nutrientes, não são adequados para o crescimento de qualquer tipo de fungos. Verifica-se a existência de algumas espécies fúngicas com necessidades nutricionais específicas, assim como, algumas com capacidade de usar outros solutos devido a vias específicas e por vezes mais eficiente. Não obstante, o metabolismo fúngico parece preferir substratos ricos em hidratos de carbono.

2.1.4.2 Atividade de água (a_w)

A atividade de água dispõe-se como o valor de água não ligada existente, isto é, a quantidade de água livre que se encontra disponível no alimento, cujo microrganismo pode usar para o seu crescimento. Este valor pode ser definido pela equação:

$$a_w = p/p_0, \quad (1)$$

onde, p é a pressão parcial de vapor de água no material e p_0 é a pressão do vapor de saturação de água pura nas mesmas condições, indicando assim que os valores possíveis de a_w podem teoricamente variar entre 0 e 1; no entanto, para a vida como a conhecemos encontram-se confinados ao intervalo entre 0,6 e 0,99(9).

Na maioria das situações reais, a atividade de água desempenha o papel mais importante para determinar a segurança ou deterioração do alimento face às ameaças fúngicas. Dito isto, apesar da maior parte dos organismos necessitar de valores muito altos de a_w para o seu crescimento (os animais são virtualmente apenas capazes de crescimento entre valores de 0,99 a 1,0 a_w), os fungos pertencentes ao filo Ascomycota são capazes de crescer a a_w abaixo de 0,9, com alguns fungos xerófilos capazes ainda de crescer em a_w abaixo de 0,85 em algumas condições.

2.1.4.3 Concentração de iões de hidrogénio e pH

Quando a valores altos de a_w os fungos encontram nas bactérias um competidor para acomodar o nicho que ocupam na degradação dos alimentos.

Em pH neutro, as bactérias prosperam e os fungos não conseguem competir com elas. No entanto, quando o pH chega a valores abaixo de 5, este manifesta-se como um condicionante que torna o desenvolvimento bacteriano cada vez mais improvável, enquanto ao mesmo tempo afeta apenas ligeiramente os fungos, os quais, geralmente são pouco perturbados por valores de pH entre 3 a 8.

2.1.4.4 Temperatura

A temperatura mostra-se distintivamente relevante em duas etapas diferentes, isto é, na etapa de processamento e na de conservação.

Durante o processamento fungos resistentes a altas temperaturas podem sobreviver a processos de pasteurização em condições ácidas. Porém, pouco se sabe da sua resistência a altas temperaturas,

exceto no que convém a algumas espécies em particular. Todavia, parece verificar-se geralmente, que altos níveis de açúcar parecem exercer ações protetivas sobre os esporos, sendo necessária uma maior temperatura ou mais longa exposição para a sua inativação. Ao passo que, níveis de pH baixos e uso de elementos preservadores parecem além de aumentar o efeito do calor na inativação de propágulos fúngicos, dificultar a regeneração de estruturas danificadas.

No que toca à conservação dos alimentos, é necessário que estes se encontrem preservados a temperaturas de -10 °C ou inferiores, uma vez que estas parecem inibir a atividade microbiológica. Quanto à refrigeração que encontramos em arcas refrigeradoras ou frigoríficos domésticos, esta ronda os cerca de 5 °C, o que se verifica como suficiente para estender o tempo de vida de alguns alimentos, mas incapaz de impedir o crescimento de espécies de *Fusarium*, *Cladosporium* e *Penicillium*.

2.1.4.5 Tensão de gás

Fungos responsáveis pela deterioração dos alimentos, tal como quase todos os outros fungos filamentosos, tem uma necessidade por oxigénio. Para muitos destes fungos a concentração de oxigénio dissolvida no substrato tem muito maior influência que a pressão de oxigénio atmosférico. Muitas espécies encontram-se suscetíveis a altos níveis de dióxido de carbono e baixos níveis de oxigénio, no entanto, isto não se aplica ao conjunto integral destes organismos, visto que alguns, tais como *Penicillium roqueforti* são capazes de crescimento mesmo a níveis de 80% de dióxido de carbono e 4,2% de oxigénio.

2.1.4.6 Matriz alimentar

A matriz alimentar é um dos fatores capaz de influenciar a degradação dos alimentos. No que toca a fungos, uma matriz líquida auxiliaria a propagação de leveduras, uma vez que estes são organismos unicelulares e assim mais facilmente capazes de se dispersar sobre um meio líquido e teriam acesso às condições anaeróbicas que procuram para a fermentação. Por outro lado, fungos filamentosos preferem substratos firmes, com fácil acesso a oxigénio.

2.2 Preservação de alimentos ao longo da história

Desde a infância da humanidade houve uma necessidade de encontrar maneiras de preservar os alimentos. Enquanto durante a pré-história os alimentos eram recolhidos (ou mortos) numa base

diária e consumidos imediatamente, escondendo assim a necessidade de encontrar mecanismos de preservação, com o aparecimento de práticas agrícolas, pecuária e com o advento do sedentarismo esta necessidade realçou-se. Por engenho ou acaso, tentativa e erro, os nossos antepassados gradualmente desenvolveram técnicas de conservação dos alimentos (Block 1991).

A maior parte das técnicas utilizadas que permaneceram de alguma forma registada e até utilizadas na atualidade consistia em alguma forma de secagem, salmoura, defumação, fermentação ou refrigeração, no entanto, a tecnologia presente permitia até recentemente apenas formas rudimentares de muitos destes métodos (Sperber 2009). Apenas nos últimos 200 anos da nossa civilização desenvolvemos métodos mais avançados de produção, preservação e distribuição alimentar. De fato, só no século dezanove é que surgiram alguns procedimentos que são agora comuns, destacando-se o início do uso de enlatados como forma de preservação, assim como a pasteurização, inventada por Louis Pasteur, que em paralelo com outros microbiologistas começaram a descobrir as causas das contaminações alimentares, e, da mesma forma, como as controlar (Sperber 2009). Daí, sucedeu um século inteiro até haver a disseminação de mais avanços significativos, uma vez que, só após 1945 se atestou a vulgarização de mecanismos de refrigeração mecânicos, tais como o frigorífico e congeladores domésticos, por volta da mesma época na qual se desenvolveu também a logística e uso de transportes refrigerados de alimentos (Sperber 2009).

Nas últimas décadas, não obstante de terem sido desenvolvidas novas técnicas e aperfeiçoado as previamente mencionadas – ambos processos ininterruptos – uma das mais importantes medidas no que toca à segurança alimentar foi o desenvolvimento e aplicação de códigos de higiene e boas práticas. Destes, é de destacar o Codex Alimentarius, criado pela Codex Alimentarius Commission, uma comissão multidisciplinar formulada pela FAO (Food and Agriculture Organization) (Vojir, Schübl et al. 2012). O Codex Alimentarius pavimentou o caminho para a génese de vários protocolos de proteção e segurança alimentar, tais como, o plano HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point)(Troller 1993, Wallace and Mortimore 2013), assim como, as normas IFS e BRC. Estes princípios de segurança alimentar baseiam-se na regulação de comportamentos e práticas capazes de garantir a higiene e qualidade em qualquer etapa da produção dos alimentos, desde a colheita até que este chegue aos consumidores (Vojir, Schübl et al. 2012).

2.2.1 Processamento térmico

O processamento térmico é uma prática com uma longa história e ainda se mostra hoje em dia como um dos mais relevantes métodos de conservação usados na indústria alimentar. A estabilização através de processamento térmico foi patenteada por Appert em 1810, sem qualquer conhecimento sobre microbiologia (Smelt and Brul 2014). Foi apenas no final do século XIX que Louis Pasteur “inventou” o processo de aquecer líquidos, tais como, vinho e cerveja a temperaturas relativamente baixas (55 °C) durante um curto espaço de tempo, com vista a evitar a deterioração destes produtos. Este método foi depois denominado de pasteurização e aplicado ao leite de modo a reduzir o número de microrganismos presentes, como forma a evitar qualquer patogenicidade e aumentar o tempo de vida do alimento. Desta forma a pasteurização tradicional refere-se ao tratamento térmico de alimentos (a temperaturas geralmente inferiores a 100 °C) com o objetivo de destruir organismos patogénicos (Smelt and Brul 2014).

A avaliação e otimização de processos de aquecimento térmico como modo de preservação alimentar necessitam de conhecimento prévio, tais como a temperatura e o tempo necessários para a destruição dos esporos, de modo a que seja possível inferir a resistência térmica dos esporos alvo. Enquanto este conceito possa parecer simples à primeira vista, a obtenção de um sistema de quantificação para quantificar estas características prova-se ilusivo e complexo. É ainda de salientar que este procedimento é de particular importância quando confrontando esporos de espécies patogénicas ou responsáveis pela deterioração de alimentos.

A determinação da resistência dos esporos ao calor foi evoluindo com a pesquisa feita neste tópico, e desde a sua origem até ao tempo corrente podemos salientar três períodos (Mafart, Leguérinel et al. 2010). Inicialmente, o conceito de resistência individual de esporos não tinha sido de algum modo considerada, assim, a resistência de uma dada amostra estava dependente de a população global ser considerada viva ou morta. A morte microbiana é geralmente representada por uma equação de primeira ordem (Simpson 2009), ou seja, a taxa de destruição é proporcional à concentração de microrganismos, como exemplificado em:

$$-dc/dt = kc, \quad (2)$$

onde, t é o tempo, c a concentração de microrganismos e k a constante da velocidade da reação de inativação do microrganismo.

Neste período vemos a emergência de alguns conceitos como o de *z-value*, também conhecido como o fator de resistência térmica, e o de TDT (Bigelow 1921), cuja maior falha foi a dependência do

número inicial de espécimes vivos. Outros dos primeiros trabalhos aplicaram com sucesso a equação de Arrhenius, de modo a quantificar o efeito da temperatura na velocidade específica de inativação (Mafart, Leguérinel et al. 2010). Esta resulta da integração da equação 2, resultando na equação 3

$$c/c_0 = e^{-kt}, \quad (3)$$

Onde se pode determinar a concentração a cada valor de tempo (t), sendo a concentração para o tempo 0 c_0 . O valor de k pode ser descoberto através da equação 4.

$$k = Ae^{-E/RT}, \quad (4)$$

Onde, A é o fator pré exponencial, E a energia de ativação e R a constante universal dos gases. Esta é a equação de van't Hoff e este sistema constitui o modelo de Arrhenius. Alternativamente, antes da descoberta do z-value, foi observada uma relação linear entre o logaritmo da velocidade de inativação específica e a temperatura.

O segundo período a considerar na história da quantificação da resistência térmica dos esporos foi iniciado pela introdução do parâmetro D (Katzin, Sandholzer et al. 1943), o tempo de redução decimal. Este parâmetro consistia no tempo de aquecimento necessário para obter uma taxa de sobrevivência de 10% da população. Este conceito estava profundamente relacionado com o previamente introduzido conceito de z-value. A maneira prática de obter D consiste em ilustrar o logaritmo do número de esporos contra o tempo obtendo-se um gráfico semi-linear inclinação negativa. Isto tem um interceção N_0 e uma inclinação de $-1/D$, onde D é chamado de tempo de redução decimal para espécies microbianas (Singh 2008), este processo pode ser representado pela equação 5. Este valor é frequentemente usado para esporos altamente resistentes ao calor.

$$\log N = \log N_0 - t/D \quad (5)$$

Segundo este modelo, verifica-se que o valor do $\log D$ varia linearmente com a temperatura (T). Desta forma é possível comparar diferentes organismos desde que haja uma temperatura de referência (T_{ref}), por exemplo, 121,1°C correspondente a D_{ref} . Utilizando isto para definir o relacionamento de morte térmica resulta na próxima equação 6:

$$\log (D/D_{ref}) = -(T-T_{ref})/z \quad (6)$$

onde, z é a mudança de temperatura necessária para alterar o valor D em 1 ciclo logarítmico, ou seja, em altera-lo por um fator de 10. Aplicando o modelo de Arrhenius à equação anterior é possível obter valor de z é através da equação 7 que segue:

$$z = 2.303RTT_{ref}/E \quad (7)$$

Finalmente, o mais recente estágio desta área, introduziu novas formas de complexidade com considerações sobre curvas de sobrevivência não log-lineares, com a consideração da influência de

fatores ambientais para além da temperatura e com a perceção da variabilidade dos parâmetros de resistência (Mafart, Leguérinel et al. 2010). Obtendo-se por exemplo, modelos mais complexos para representar a morte térmica de microrganismos incluindo especialmente o efeito do pH, como o representado na equação 8

$$\ln k = C_0 + C_1T^{-1} + C_2pH + C_3pH^2 \quad (8)$$

3. Metodologia

3.1 Material biológico

3.1.1 Providência

O fungo utilizado para o propósito do estudo foi *C. fastigiata*. A(s) estirpe(s) foram isoladas em ambiente industrial e fornecidas pela Micoteca da Universidade do Minho para posterior análise.

3.1.2 Crescimento do fungo

O material biológico facultado foi plaqueado numa série de meios desde Spezieller Nährstoffarmer agar (SNA), a SGA-MI 0.5 %, Czapek com celobiose e *cornmeal agar* (CMA). O crescimento deste nos vários meios foi denotado ao longo de um período de um mês e meio, de modo a observar na totalidade o seu crescimento.

3.1.3 Crescimento de clamidósporos

Com vista a obter-se uma vasta quantidade de clamidósporos utilizou-se uma metodologia adaptada de Li *et al*, (2005). É de registar que mesmo quando não especificamente mencionado todos os passos foram levados a cabo em condições de assepsia.

Primeiramente foi necessário obter uma cultura de *Bacillus subtilis*, providenciada pela Micoteca da Universidade do Minho. Esta foi paralelamente colocada em ambos 100 mL de caldo nutritivo (NB) e incorporada e homogeneizada em 100 mL de meio *plate count agar* PCA.

3.1.3.1 Meio NB

O meio NB fez-se a partir de 0.5 g de peptona bacteriológica, 0.3 g de extrato de levedura e 0,5 g de NaCl, e preencheu-se com água destilada de modo a que na sua totalidade resultasse em 100 mL. Este foi esterilizado, e seguidamente inoculado com a estirpe de *Bacillus subtilis* previamente obtida. Incubou-se o meio inoculado a uma temperatura de 35 °C durante um período de cerca de 72 horas.

Ao fim destas 72 horas o meio foi centrifugado, de modo a separar as células de *B. subtilis* do meio, possibilitando assim o seu descarte. Do meio resultante foram retirados 20 mL, dos quais 10 mL foram homogeneizados num *Erlenmeyer* estéril com 90 mL de água estéril e inoculados com uma

solução de esporos de *C. fastigiata* que ficou a incubar cerca de 72 horas a 25 °C, após este tempo ficou em crescimento a temperatura ambiente durante cerca de um mês e meio, com observações feitas a períodos regulares.

Os restantes 10 mL de meio NB foram homogeneizados num *Erlenmeyer* com 90 mL de meio PDA estéril, deixou-se este arrefecer um pouco e depois procedeu-se ao seu plaqueamento numa câmara de classe 2, mantendo condições assépticas. Aquando do arrefecimento do meio nas placas, estas foram inoculadas com uma solução de esporos de *C. fastigiata* com o auxílio de um espalhador. Estas placas foram postas em crescimento numa incubadora a 25 °C, durante um período de cerca de um mês e meio, com observações feitas a períodos regulares.

3.1.3.2 Meio PCA

Após a incorporação de *B. subtilis* em 100 mL de meio PCA estéril, este meio é plaqueado. As placas resultantes são posteriormente incubadas a 35 °C durante um período de cerca de 48 horas. Subsequentemente produziu-se 50 mL de meio PDA e aquando da sua conclusão verter uma pequena camada sobre as placas de PCA. Ao verificar-se a solidificação deste, inoculou-se com uma solução de *C. fastigiata* com o auxílio de um espalhador. Estas placas foram depois incubadas a 25 °C durante um período de cerca de mês e meio, com observações feitas a períodos regulares.

3.1.4 Observações e colheita dos esporos

Ao longo do período de crescimento do fungo até à data esperada de obtenção de clamidósporos foram efetuadas observações regulares do seu crescimento. Cerca de duas semanas após plaquear o fungo foram ocasionalmente retiradas pequenas porções deste para observação.

Com auxílio de uma agulha estéril, colocou-se cada porção numa lâmina de microscopia, com uma gota de água. Espalhou-se o material biológico na lâmina, de modo a permitir mais fácil análise, aplicou-se uma lamela sobre este material com vista a completar a preparação e procedeu-se à visualização num microscópio ótico composto numa ampliação de 400x.

Cerca 45 dias após o início do crescimento, adicionou-se entre 5 a 10 mL de água destilada às placas e com um espalhador esfregou-se levemente de modo a soltar as estruturas fúngicas do meio sólido. Prontamente soltas as estruturas, verteu-se a água que as contem por um funil contendo 6

camadas de gaze, para um *falcon* de 15 mL, pode-se desta forma separar a maior parte do micélio de forma a obter a solução de esporos. Estas soluções foram depois armazenadas a 4 °C.

3.2 Tratamento térmico

Para propósitos de tratamento térmico selecionou-se primeiramente a solução de esporos a utilizar, tendo todas as soluções utilizadas concentrações na ordem de 1×10^6 . Uma vez selecionada a solução de esporos retirou-se 50 μ L desta para cada *Eppendorf* de 0,5 mL.

O tratamento térmico realizou-se num banho-maria, no qual os tubos *Eppendorf*, permaneciam maioritariamente submersos, por reforço de um suporte. Imediatamente após a saída do banho a cada intervalo de tempo respetivo, colocou-se os tubos *Eppendorf* num suporte à temperatura de -20 °C de modo a impedir que o calor residual continuasse a inativa-los.

3.3 Coloração vital com diacetato de fluoresceína (FDA)

Preparou-se uma solução “*stock*” de FDA [0,001% w/v] ao dissolver-se 25 mg de cristais de diacetato de fluoresceína (Sigma, F 7378) em algumas gotas de acetona, verteu-se esta solução para um balão volumétrico e fez-se um volume de 25 mL com metanol. Este foi armazenado a -20 °C até necessário.

Posteriormente ao tratamento térmico e arrefecimento das amostras injetou-se 5 μ L em cada *Eppendorf* e deixou-se repousar por 5 minutos, no final deste intervalo homogeneizou-se a solução e retirou-se 10 μ L para uma lâmina e sobrepôs-se com uma lamela. Usou-se seguidamente o microscópio OLYMPUS BX51 com um filtro FITC 470 – 490 nm e observou-se os esporos viáveis, os quais mostram fluorescência devido à hidrólise de FDA, na ampliação de 400x.

Por forma a verificar a fidelidade do método executou-se vários tipos de controlo, para isto, autoclavou-se 300 μ L de amostra e procedeu-se a criar a seguinte ordem de tubos *Eppendorf*, em duplicado, para validar a metodologia referente à coloração vital com diacetato de fluoresceína e à contagem dos esporos totais e viáveis. Dividiu-se a amostra autoclavada e não tratada pelos tubos *Eppendorf* nas seguintes proporções: 1 – 100% autoclavada, 0% não tratada (controlo negativo); 2 – 0% autoclavada, 100% não tratada (controlo positivo); 3 – 90% autoclavada, 10% não tratada; 4 – 10% autoclavada, 90% não tratada; 5 – 50% autoclavada, 50% não tratada.

3.4 Contagem dos esporos totais e viáveis

Seguiu-se o procedimento indicado em 3.3, no entanto, ao invés de usar uma lâmina de microscopia usou-se uma câmara de *Neubauer* ou hemocitômetro. Procedeu-se à contagem do número de esporos viáveis com o filtro FITC e o número de esporos total em cada quadrado, contando-se os esporos presentes em 3 quadrados, como exemplificado na Figura 3.

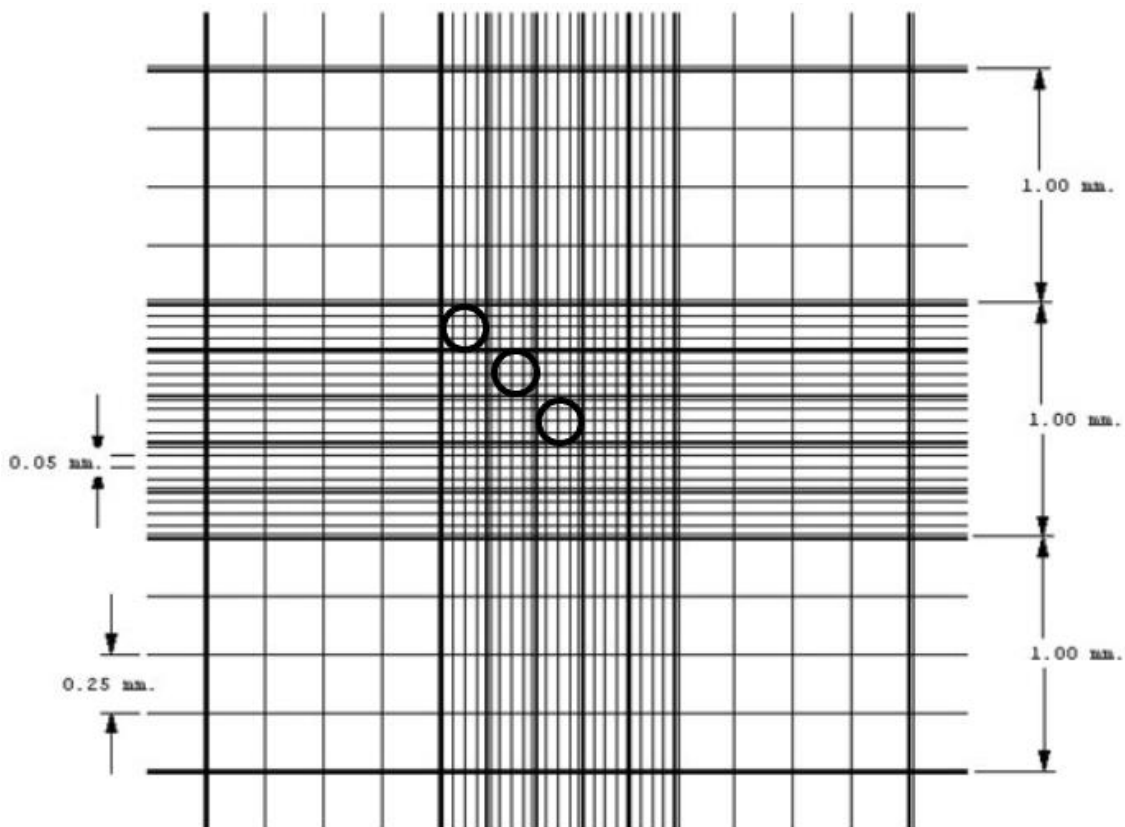


Figura 3 Câmara de Neubauer com as áreas de contagem destacadas, adaptado de (Giri)

3.5 Amostras utilizadas

3.5.1 Água destilada; pH 6,5

O pH das soluções de esporos foi medido com papel medidor de pH. Procedeu-se à colocação dos tubos *Eppendorf* com 50 μ L de solução de esporos no banho-maria.

Os tubos *Eppendorf* encontravam-se em duplicado, existindo 2 deles para cada intervalo de temperatura e tempo. Usaram-se as temperaturas de 50, 55, 60, 65 e 70 °C. Os intervalos de tempo

utilizados a estas temperaturas foram de 0, 5, 10, 15 e 20 minutos, verificando-se o uso de intervalos adicionais quando adequado.

3.5.2 Solução de sacarose 20%; pH 4

De forma a simular mais realisticamente as condições da ocorrência da contaminação por ação deste fungo formulou-se uma solução de esporos com 20% de sacarose, seguidamente mediu-se o pH desta. Uma vez concluídos estes passos executou-se o mesmo método para tratamento térmico que aplicado no ponto 3.5.1, divergindo apenas no intervalo de temperaturas utilizado, sendo este constituído pelos valores de 45, 50 e 55 °C.

3.5.3 Água acidificada; pH 4

Com forma a obter uma melhor comparação com os dados da solução de sacarose criou-se uma solução de esporos em água acidificada a pH 4. Esta solução obteve-se através da centrifugação de uma solução de esporos a pH 6,5 e separação e descarte do sobrenadante. Este sobrenadante foi substituído em igual volume por água acidificada a pH 4.

Quanto ao tratamento térmico em si, este tomou lugar seguindo a metodologia assinalada em 3.5.1, no entanto, utilizaram-se apenas as temperaturas de 50 e 55 °C.

3.6 Tratamento dos dados

Introduziu-se os números obtidos pela contagem dos esporos viáveis e inviáveis no *software* de folha de cálculo Excel, utilizou-se este em todas as fases que respeitam ao tratamento de dados.

Calculou-se a proporção de viáveis ao dividir o número de viáveis pelo número total de esporos. Utilizou-se depois este número para produzir os gráficos que demonstram a proporção do número de viáveis por cada binómio de tempo/temperatura, assim como, para o cálculo do tempo de redução decimal D e o fator de resistência térmica z e execução dos respetivos gráficos.

3.6.1 Cálculo do tempo de redução decimal D e fator de resistência térmica z

Com vista a obter D , multiplicaram-se todas as percentagens de viabilidade obtidas por um número estático, neste caso 1000. Seguidamente, utilizou-se a função LOG10, para obter o logaritmo de base 10 de cada um destes números. O resultado obtido desta função foi traçado em função do tempo. A partir dos pontos obtidos traçou-se uma linha de tendência e obteve-se a equação desta reta no formato $y=mx+b$. Ao dividir-se 1 por valor absoluto do declive de cada reta ($|m|$) é possível obter o valor de D em minutos.

Tencionando obter z , utilizou-se novamente a função LOG10 em cada D . O resultado obtido desta função foi traçado em função do tempo. Obteve-se um gráfico cujos pontos foram usados para traçar uma linha de tendência. Retirou-se desta reta a sua equação e tal como para inferir o D utilizou-se o declive da reta. Dividiu-se 1 pelo valor absoluto declive da reta, obtendo-se assim o valor de z em graus Celcius.

4. Resultados e Discussão

4.1 Crescimento fúngico e obtenção de clamidósporos

Verificou-se o crescimento fúngico de *C. fastigiata* em todos os meios utilizados, no entanto, visto que se pretendia a obtenção de um número vasto de clamidósporos, cada amostra era analisada microscopicamente com uma frequência máxima de uma semana.

4.1.1 Meios SNA, SGA-MI 0.5 %, Czapek com celobiose e CMA

Nestes meios verificou-se o crescimento do fungo, com a colónia a apresentar um aspeto tufado entre a segunda e terceira semanas. Em qualquer um destes o crescimento de *C. fastigiata* foi verificado; no entanto, não se atestou o aparecimento de clamidósporos. Aquando da marca de um mês e meio após o plaqueamento, confirmou-se o aparecimento de clamidósporos em algumas das placas. É de notar que a esta altura já se verificava uma desidratação do meio, possibilitando que o stresse hídrico verificado pelo fungo levasse à geração de clamidósporos (embora em números reduzidos).

4.1.2 Meio PDA + PCA

Neste meio verificou-se um crescimento normal do fungo, este apresentava novamente um aspeto macroscópico tufado a partir da 2 ou 3 semana, o qual cobria completamente a placa pela quarta semana. A partir da quarta semana começaram-se a distinguir clamidósporos, os quais eram vastamente mais frequentes pela sexta semana, como se pode verificar na Figura 4. É de inferir que a produção de clamidósporos nestas placas foi potenciada pelo composto 10M (Li, Qu et al. 2005) resultante da atividade de *Bacillus subtilis*, visto que este composto tem propriedades antifúngicas, resultando numa produção exagerada de clamidósporos, quando comparada com o seu crescimento habitual. Este efeito foi ainda amplificado pelo *stress* hídrico que se verificou nas últimas semanas da cultura.

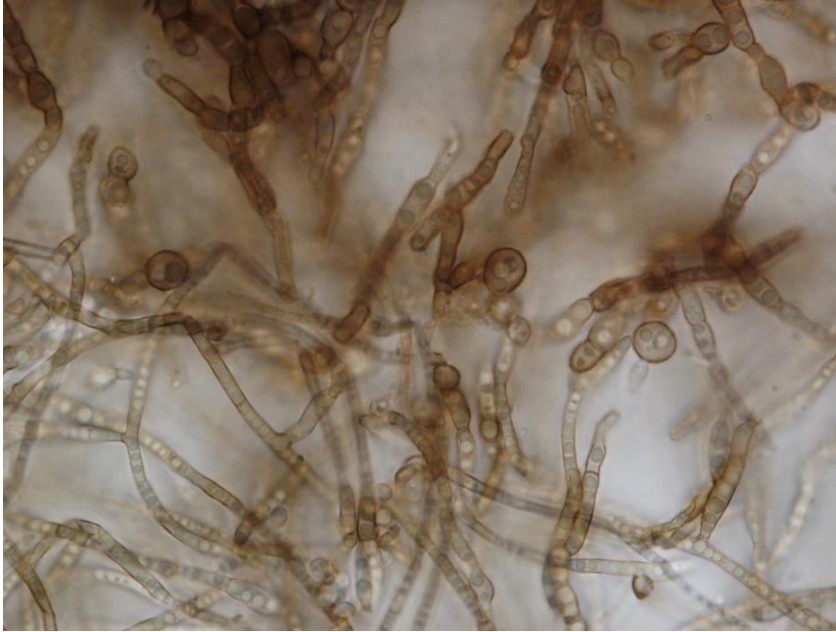


Figura 4 Crescimento fúngico com presença de clamidósporos.

4.2 Coloração FDA

A aplicação do método de FDA permitiu a distinção dos esporos viáveis, uma vez que se verificava a sua fluorescência quando submetidos a luz no espectro de 470 - 490 nm (Figura 5).

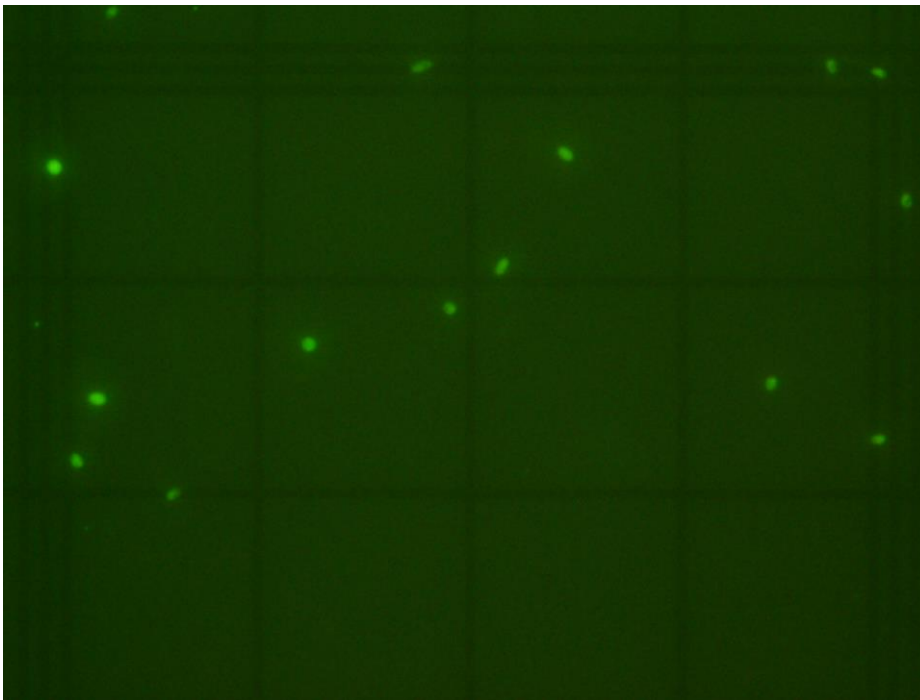


Figura 5 Esporos viáveis a apresentar fluorescência no campo de 470 – 490nm devido a FDA.

Desta forma, ao contar o número de esporos que apresentavam fluorescência e ao dividi-lo pelo número total de esporos contável sobre o espectro visível é possível extrapolar a percentagem ou proporção de esporos viáveis na amostra.

Para verificar a fidelidade do método de FDA, usaram-se várias amostras, sendo estas: 1 – 0% autoclavada, 100% não tratada (controlo negativo); 2 – 100% autoclavada, 0% não tratada (controlo positivo); 3 – 90% autoclavada, 10% não tratada; 4 – 10% autoclavada, 90% não tratada.

Fez-se posteriormente à aplicação do FDA a contagem de cada uma destas obtendo os números encontrados na Tabela 1, a partir destes obtém-se as percentagens de viabilidade respetivamente de: 1 – 0%; 2 – 64%; 3 – 18%; 4 – 68%. Uma vez que contagens em câmara de Neubauer tem um erro considerável associado admitiu-se que as proporções de viabilidade obtidas para cada amostra reputavam o método como fidedigno.

Tabela 1 Contagem dos esporos totais e viáveis de quatro amostras diferentes, somatório e proporção de viáveis encontram-se respetivamente no final da tabela. NT – Não submetidas a tratamento térmico; A – autoclavadas

	50(NT)/0(A)		0(NT)/50(A)		5(NT)/45(A)		45(NT)/5(A)	
	Totais	Viáveis	Totais	Viáveis	Totais	Viáveis	Totais	Viáveis
Área 1	30	23	55	0	63	11	66	42
Área 2	46	32	80	0	66	14	44	29
Área 3	51	26	82	0	68	11	54	39
Somatório	127	81	217	0	197	36	164	110
Proporção de viáveis	0,64		0		0,18		0,67	

4.3 Contagens de esporos

As contagens de esporos obtidas sobre o método FDA podem ser verificadas na sua totalidade nas tabelas que seguem, estas são pertinentes às três amostras diferentes, sendo estas, uma amostra de água destilada, a pH 6,5; uma amostra de solução de sacarose a 20%, a pH 4; e uma amostra de água acidificada, a pH 4. São utilizadas proporções ao invés dos números concretos, uma vez que esta metodologia é afetada de maneira muito mais ligeira por oscilações no número de esporos observados, providenciando conclusões menos falaciosas. Infelizmente apesar do uso do meio PCA com *B. subtilis* + PDA, o qual, devido à produção de 10M, induz a produção de clamidósporos, verificou-se um aumento

significativo de clamidósporos em relação aos outros meios, mas não de grandeza suficiente para ser viavelmente quantificado pela metodologia utilizada.

4.3.1 Amostra água destilada; pH 6,5

Para a amostra em água destilada a pH 6,5, foram efetuadas contagens a temperaturas de 50, 55, 60, 65 e 70 °C, expostos na Tabela 2. Os intervalos de tempo *standard* usados inicialmente foram de 0; 5; 10; 15; 20 minutos, estes foram ajustados, adicionando-se e retirando medições dependendo do necessário, os números obtidos podem ser encontrados no Anexo I.

4.3.2 Amostra solução de sacarose 20 %; pH 4

Para a amostra de solução de sacarose a 20 % a pH 4 foram efetuadas contagens às temperaturas de 45, 50 e 55 °C. Nas temperaturas de 45 e 50 °C foram efetuadas medições para os tempos de 0, 5, 10, 15 e 20 minutos. Por outro lado, para a temperatura de 55 °C foram apenas registadas medições para os tempos de 0, 5 e 10 minutos, uma vez que após estes tempos não se observaram esporos viáveis. Os números obtidos podem ser observados no Anexo I.

4.3.3 Amostra água acidificada; pH 4

Para a amostra de água acidificada a pH 4 foram efetuadas apenas contagens à temperatura de 50 °C a 0, 5, 8, 10, 12, 14, 15 minutos; adicionalmente foram também realizadas contagens à temperatura de 55 °C, para os tempos de 1, 2, 3 e 4 minutos. Os números obtidos podem ser observados como segue no Anexo I.

4.4 Proporção de esporos viáveis pelos binómios de temperatura/tempo

Através das contagens de esporos obtidas é possível calcular a proporção de esporos viáveis para cada binómio de temperatura/tempo. Para uma mais fácil visualização e posterior cálculo estas proporções foram multiplicadas por um número estático, neste caso 1000. Podem ser ilustradas como segue nas Figuras 6 – 8.

4.4.1 Água destilada, pH 6,5

Para a água destilada ao dividir o somatório de esporos viáveis pelo somatório de esporos totais obtém-se a proporção de esporos viáveis, estes, multiplicados por 1000 dão resultado às Tabelas A1 – A10, Anexo I uma vez que as contagens foram realizadas em duplicado. Nos cálculos consequentes foram utilizadas as médias dos resultados obtidos nestas tabelas para cada respetiva temperatura/tempo.

Podemos observar na Figura 6 o decréscimo da viabilidade dos esporos ao longo do tempo e da temperatura, tal como seria esperado. Apesar de se distinguirem alguns *outliers*, como os pontos resultantes de 50 °C a 20 minutos e 55 °C a 15 minutos, parece verificar-se uma tendência linear decrescente nos pontos de menor temperatura, sendo estes os de 50 e 55 °C. Estes pontos são vastamente incoerentes com os restantes resultados, como tal, não serão utilizados em cálculos posteriores. Nos pontos de temperatura mais elevada a tendência parece ser a de um decréscimo com aspeto logarítmico decrescente, existindo um ponto crítico na qual se dá uma severa queda de viabilidade dos esporos. Podemos observar este fenómeno em ambas as temperaturas de 60 e 65 °C por volta da marca dos 5 minutos e na temperatura de 70 °C por volta do primeiro minuto de tratamento térmico.

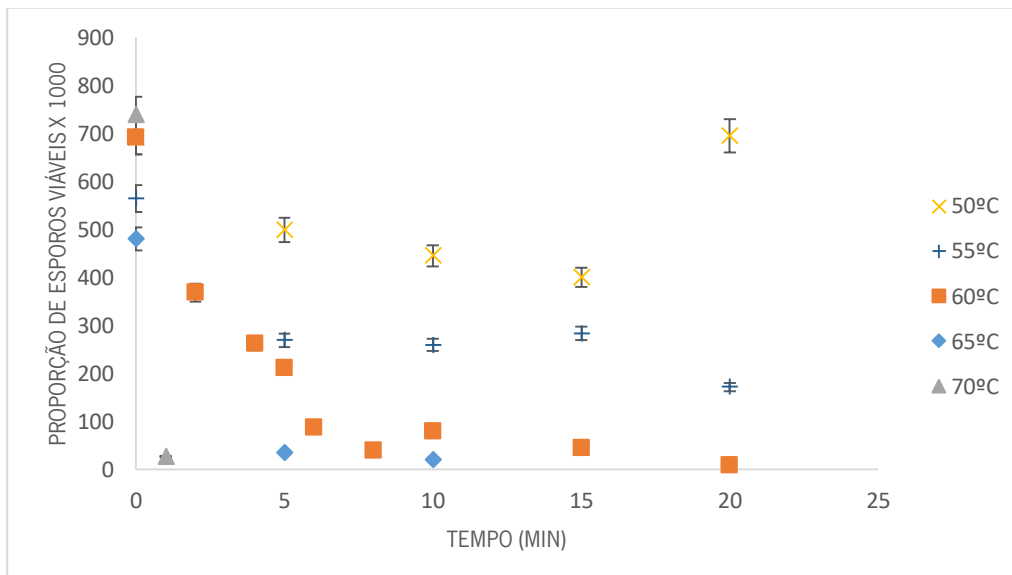


Figura 6 Ilustração da proporção de esporos viáveis x 1000 por tempo (minutos) para a amostra em água destilada a pH 6,5.

4.4.2 Amostra solução de sacarose 20%; pH 4

A amostra de solução de sacarose a 20% e pH 4, foi apenas submetida a três temperaturas diferentes. Tal como referido para 4.4.1, ao dividir o somatório de esporos viáveis pelo somatório de esporos totais encontrados nas Tabelas A11 – A16, Anexo, I obtém-se a proporção de esporos viáveis, que, quando multiplicados por 1000 dão origem aos resultados ilustrados na Figura 7, é novamente de destacar que é utilizada a média dos valores obtidos das contagens feitas em duplicado para amostras independentes.

Na Figura 7, podemos observar que enquanto na temperatura de 45 °C se verifica um decréscimo de temperatura com um aspeto maioritariamente linear, com ligeiros *outliers*, e a 55 °C nota-se uma tendência linear decrescente a tender para um aspeto logarítmico decrescente, tal como se observou com as temperaturas de menor e maior ordem na amostra de água destilada a pH 6,5. A temperatura de 50 °C vê os decréscimos esperados até aos 10 minutos, mas os valores relativos aos 15 e 20 minutos destacam-se ao mostrar um número de esporos viáveis acima do aceitável, apontando quase certamente para dois *outliers* enormes consecutivos ou alguma falha no processo de tratamento térmico. Desta forma, estes valores vão ser omissos em cálculos futuros, uma vez que o seu uso poderia criar um maior erro de análise.

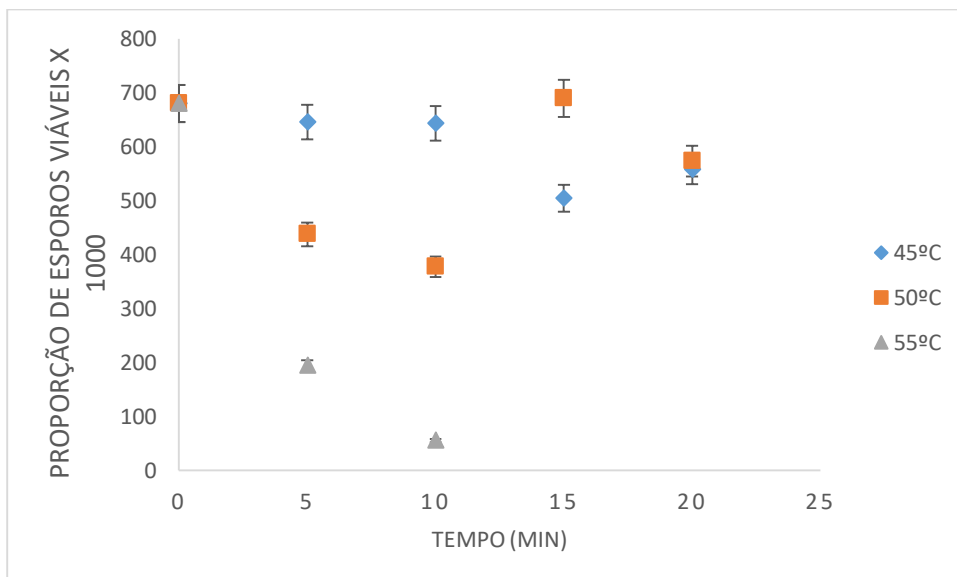


Figura 7 Ilustração da proporção de esporos viáveis x 1000 por tempo (minutos) para a amostra em solução de sacarose 20% a pH 4.

4.4.3 Amostra água acidificada; pH 4

Da mesma forma que para 4.4.1, pode-se também para a amostra em água acidificada a pH 4 obter a proporção de esporos viáveis ao dividir o somatório de esporos viáveis pelo somatório de esporos totais, encontrados nas Tabelas A17 – A20, Anexo I, esta proporção mostra-se disposta ao longo dos intervalos de tempo e temperatura na Figura 8. Uma vez mais, as contagens foram feitas em duplicado para amostras independentes e é como tal, utilizada a média destes valores, com forma a atenuar os efeitos dos erros associados.

Quanto aos esporos presentes na solução de água acidificada, podemos ver na Figura 8, que para a temperatura de 50 °C eles se encontram numa tendência linear decrescente, ainda que os pontos se encontrem com alguma dispersão, tal como anteriormente, parece verificar-se a existência de 3 *outliers* nos tempos entre 12 a 16 minutos, e como tal estes valores serão omissos nos cálculos futuros. Para a temperatura de 55 °C apresenta também uma tendência linear decrescente, muito mais acentuada e com uma menor dispersão dos pontos.

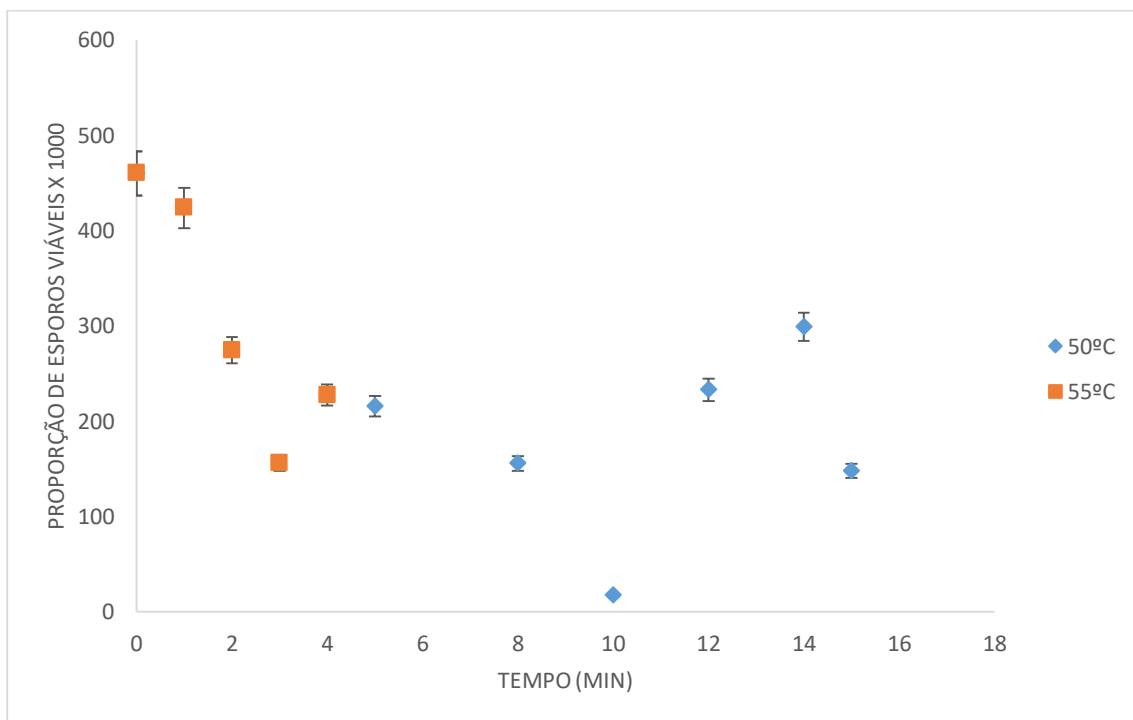


Figura 8 Ilustração da proporção de esporos viáveis x 1000 por tempo (minutos) para a amostra em água acidificada a pH 4.

Os resultados levam a crer que a temperaturas mais baixas os resultados sejam mais erráticos, havendo mais *outliers* nestas. As contagens de esporos e a representação gráfica destas leva a crer que a solução com água destilada tivesse a maior resistência, visto que necessitou de um maior binómio de

tempo temperatura até exibir uma inativação total (ou quase total) da população. Apesar de se acreditar que a sacarose tenha uma ação protetora sobre os esporos (A Gock, D Hocking et al. 2003, Smelt and Brul 2014) isto não se mostra aparente, tendo em conta que os resultados parecem muito similares para ambas as amostras de água acidificada e sacarose a 20%. Este facto pode ser uma indicação de que o pH possa ter uma maior influência que a presença de sacarose nestas quantidades.

Valores de temperatura acima e abaixo dos indicados para qualquer uma das amostras não são incluídos uma vez que aqueles que se encontravam abaixo se mostravam demasiado erráticos, sem seguir qualquer tipo de padrão e para temperaturas superiores verificava-se uma completa inviabilidade dos esporos.

4.5 Cálculo de D

Com modo a calcular o valor de D é primeiro necessário determinar os logaritmos dos valores representados nas Figuras 6 – 8, é possível depois representá-los contra os tempo/temperatura. Nos gráficos obtidos nas Figuras 9 – 11 verificam-se as linhas de tendência, assim como os valores de R^2 resultantes da execução de uma regressão linear sobre as respetivas séries de dados, permitindo inferir o grau de correlação entre a viabilidade dos esporos e as condições a que os submetemos.

Na Figura 9, pode-se verificar que as temperaturas mais altas continuam a demonstrar uma tendência visivelmente decrescente, esta tendência ainda que não da forma mais acentuada, pode-se verificar para todos os valores de temperatura. Da mesma forma, o valor de R^2 , mostra-se entre os valores de 0,77 e 1 para todas as temperaturas, o que indica que o tempo que cada série de esporos passou na sua devida temperatura foi responsável por bem mais que metade da variância que ocorreu nos números, uma vez que R^2 se encontra acima de 0,5.

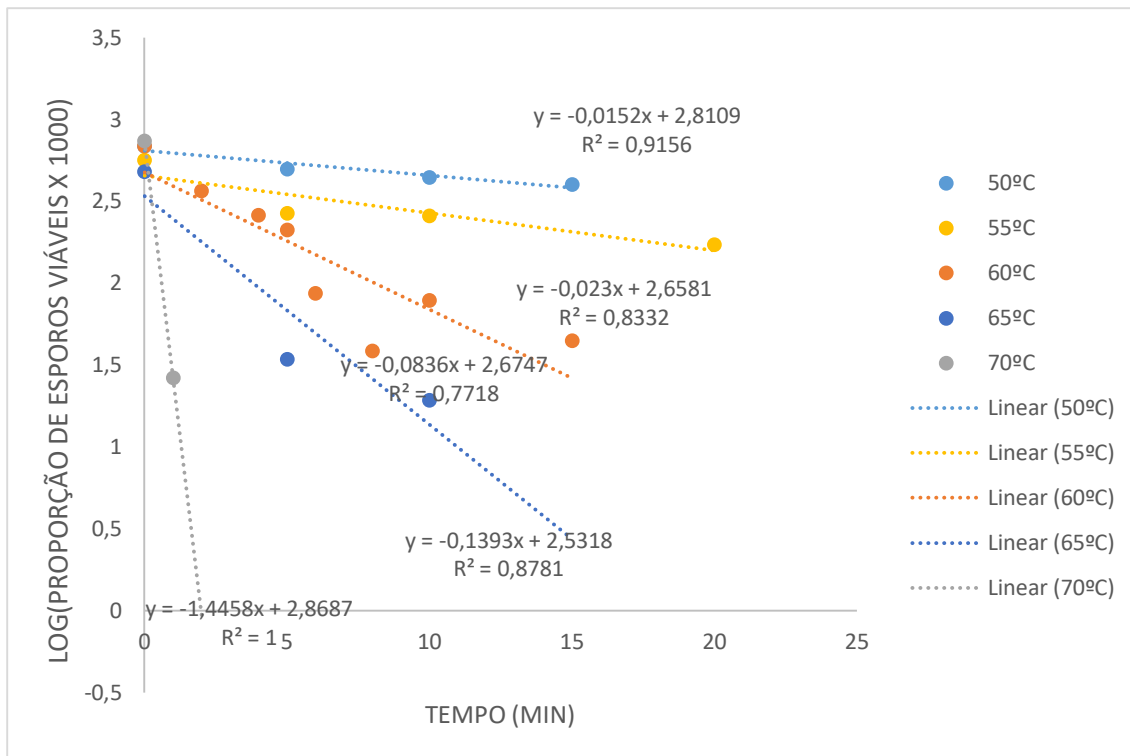


Figura 9 Log (proporção de esporos viáveis x 1000) por tempo (minutos) para a amostra de água destilada, pH 6,5.

Considerando a amostra de sacarose a 20%, reconhecemos na Figura 10, que esta apresenta tendências lineares decrescentes para as temperaturas de 50 e 55 °C. Apesar de a temperatura de 45 °C também mostrar uma tendência decrescente mostra-a de forma ligeiramente mais errática, o que é refletido pelo significativamente mais baixo valor de R².

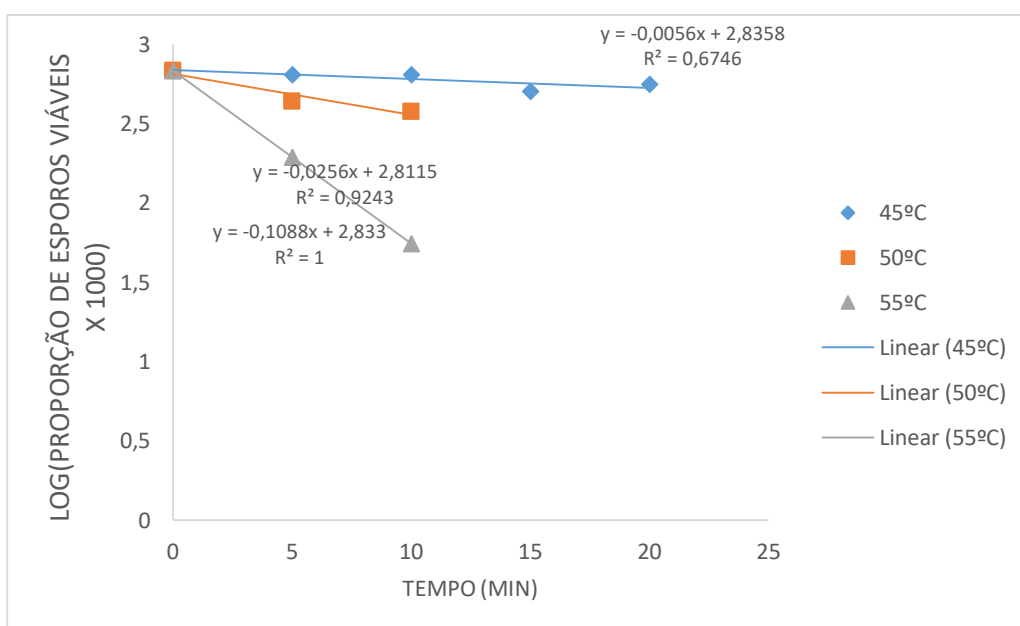


Figura 10 Log (proporção de esporos viáveis x 1000) por tempo (minutos) para a amostra de sacarose 20%, pH 4.

Na Figura 11, para água acidificada a pH4, enquanto vemos uma clara tendência decrescente para ambas as temperaturas de 50 e 55 °C os valores de R² apresentados são um pouco baixos. Este fenómeno deve-se ao fato de apesar seguirem tendências decrescentes existir uma grande dispersão dos valores.

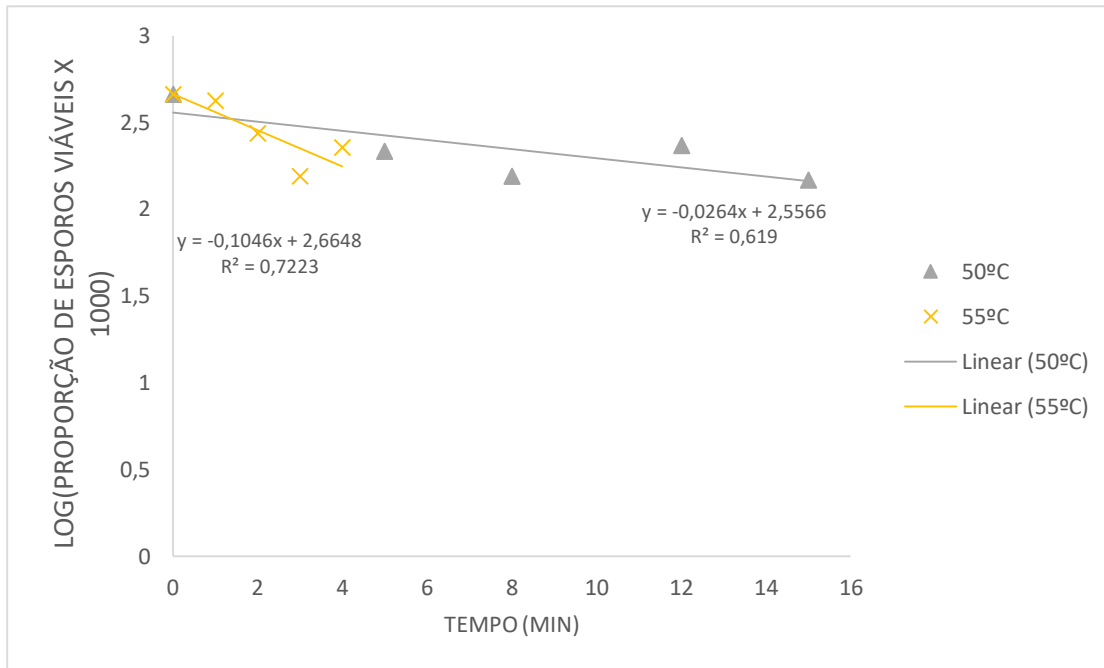


Figura 11 Log (proporção de esporos viáveis x 1000) por tempo (minutos) para a amostra de água acidificada, pH 4.

A partir destas linhas de tendência podemos averiguar a equação da reta para cada uma das respetivas linhas. Com forma a determinar D, é necessário calcular o inverso do módulo de m, ou seja, podemos dividir 1 por |m| com vista a obter D, obtendo-se os valores nas Tabelas 2 – 4, para as amostras de água destilada, solução de sacarose 20% e água acidificada, respetivamente. Calculou-se também nestas tabelas o valor do logaritmo de D, o qual é necessário para posteriormente determinar z.

Tabela 2 Tabela para cálculo de D a partir de m para as várias temperaturas utilizadas no tratamento térmico da amostra de água destilada, pH 6,5.

Cálculo de D			
Temperatura (°C)	m	D (min)	LOG (D)
50	0,015	65,79 (±4,1)	1,82
55	0,023	43,48 (±22,7)	1,64
60	0,084	11,59	1,06
65	0,139	7,18	0,86
70	1,446	0,69	-0,16

Para a amostra de água destilada a pH 6,5 podemos ver, na Tabela 2, que os valores de D decrescem com a temperatura, como deveriam, uma vez que D representa o tempo necessário de modo a reduzir uma população em 90%. Assim, os valores indicam que a 50 °C a amostra necessitaria de 66 minutos, e a 70 °C apenas 0,69 minutos. Ainda que alguns destes sejam mais práticos de aplicar que outros estes binómios de temperatura/tempo permitiriam um processamento térmico capaz de inativar 90% dos esporos, tornando um alimento seguro sem comprometer as suas características organolépticas.

Tabela 3 Tabela para cálculo de D a partir de m para as várias temperaturas utilizadas no tratamento térmico da amostra de solução de sacarose 20%, pH 4.

Cálculo de D			
Temperatura (°C)	m	D (min)	LOG (D)
45	0,0056	178,57	2,25
50	0,026	39,06 (±8,52)	1,59
55	0,109	9,19 (±11,6)	0,96

A amostra de sacarose a 20% a pH 4 é aquela que tem condições mais próximas das encontradas num fruto, no entanto apresenta também mais fatores que possam alterar os valores de variabilidade obtidos. Verifica-se, na Tabela 3, que para a temperatura de 45 °C o valor de D é de 179 minutos, este valor além de pouco prático, é mais suscetível de ser irrealista devido às tendências erráticas observadas aquando dos ensaios a baixas temperaturas, assim como, devido à falta de suporte estatístico resultante do seu baixo valor de R². Para as temperaturas de 50 e 55 °C encontramos já valores de 39 e 9 minutos respetivamente, os quais são aptos de ser aplicados a nível industrial.

Tabela 4 Tabela para cálculo de D a partir de m para as várias temperaturas utilizadas no tratamento térmico da amostra de água acidificada, pH 4.

Cálculo de D			
Temperatura (°C)	m	D (min)	LOG (D)
50	0,026	37,88 (±9,7)	1,58
55	0,105	9,56 (±11,2)	0,98

Na amostra referente à água acidificada a pH 4, presente na Tabela 4, apenas encontramos dois valores, estes mostram D a decrescer com a temperatura como devia. É de destacar que para a temperatura de 55 °C tem um D de 9,56 minutos, este valor é bastante próximo do valor obtido para as mesmas condições de tempo/temperatura da amostra de sacarose 20% a pH 4, mais uma vez reforçando que o pH a nível terá precedência em comparação a uma concentração de sacarose ao grau

utilizado. Estes valores são ainda enfatizados quando comparados com o valor de D para as mesmas condições da primeira amostra, sendo este de 43 minutos em contraste, mostrando uma diferença de cerca de 36 minutos, muito provavelmente devido ao pH da amostra. Cálculo de z

Com o intuito de obter agora z, utilizou-se os valores de LOG (D) obtidos previamente nas Tabelas 2 – 4 para as amostras de água destilada, solução de sacarose 20% e água acidificada, respetivamente. Foi necessário ilustrar o valor do logaritmo de D pelas temperaturas utilizadas, pediu-se depois a linha de tendência com forma a obter os valores de m para cada uma das amostras, como se pode verificar nas Figuras 12 – 14.

Podemos ver na Figura 12, a ilustração do LOG (D) pela temperatura, tal como anteriormente, pretende-se obter os valores de m e é de destacar igualmente os valores de R². Nesta amostra verifica-se um declive de 0,09 e um valor de R² de aproximadamente 0,92, revelando uma forte ligação entre o tempo necessário para inativar os esporos e a temperatura usada.

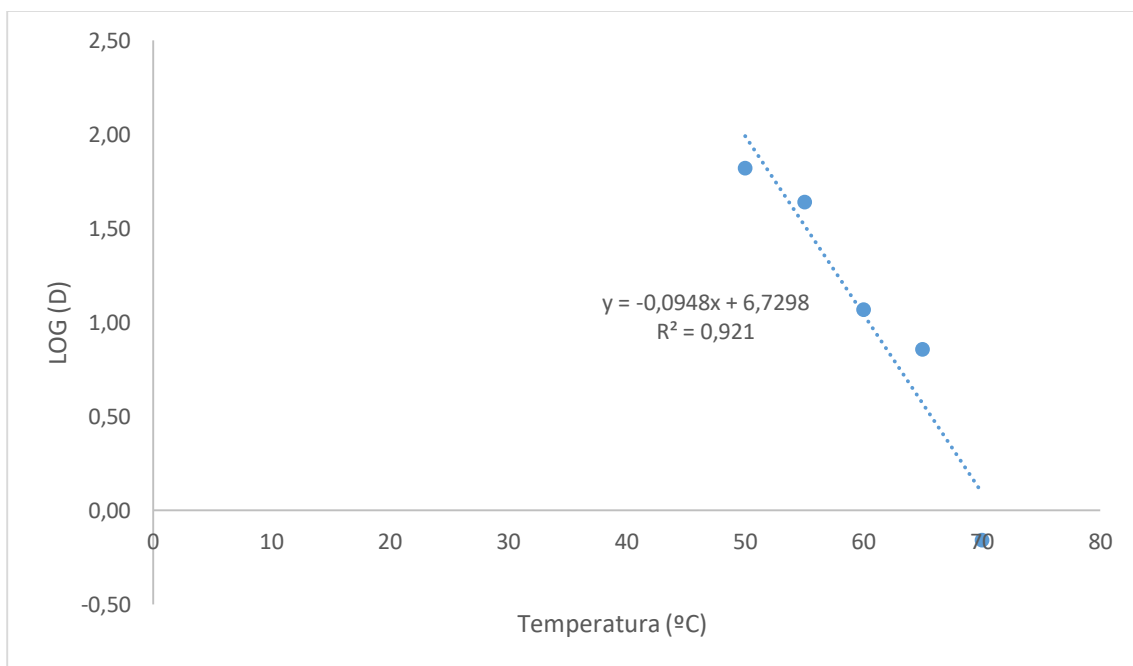


Figura 12 Gráfico de LOG (D) por temperatura (em Celsius), para a amostra de água destilada, pH 6,5

A Figura 13, exibe um muito alto valor de R², no entanto, deve-se ter em conta que o baixo número de pontos utilizado contribui significativamente para este facto. Verificamos para a reta ilustrada um valor de R² de 0,99 e um declive de 0,13.

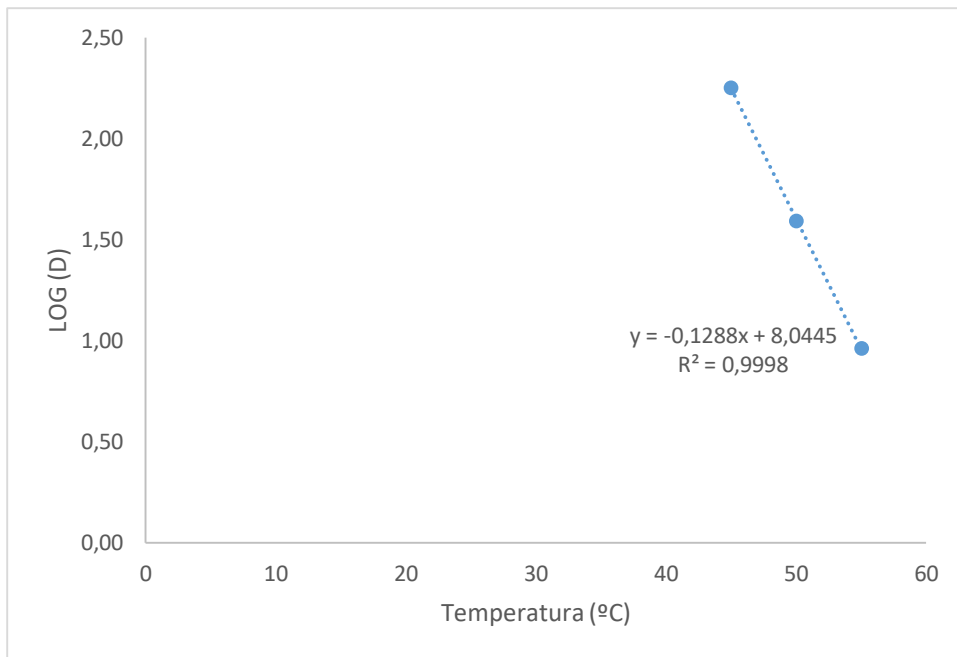


Figura 13 Gráfico de LOG (D) por temperatura (em Celsius), para a amostra de solução de sacarose, pH4.

O gráfico concernente à amostra de água acidificada a pH 4 não é disposto, uma vez que a sua reta resulta apenas da existência de apenas dois pontos. O seu valor de declive é de 0,12.

Com forma a obter z calculou-se o inverso do módulo deste do declive, na ordem previamente utilizada para as amostras de água destilada, solução de sacarose 20% e água acidificada, como disposto na Tabela 5.

Tabela 5 Tabela com valores de z para as diferentes amostras

	Cálculo de z	
	m	z
Água destilada pH 6,5	0,09	10,55
Solução de sacarose pH 4	0,13	7,76
Água acidificada pH 4	0,12	8,36

O fator de resistência térmica para a amostra de água destilada a pH 6,5, segundo a Tabela 14, é de aproximadamente 10,6 °C. Ou seja, é necessário um aumento de 10,6 °C para reduzir o valor de D por 10 vezes.

Apesar de se esperar uma ação protetora da sacarose sobre os esporos, a solução de sacarose apresenta o menor z a 7,76 °C. Este valor está bastante próximo do valor de z obtido para a amostra de água acidificada, a qual apresenta um z de 8,36 °C. Entre estas amostras é ainda mais surpreendente

o facto de a solução de sacarose apresentar o menor z, uma vez que a água acidificada foi conseguida através do uso de ácido acético, o qual demonstra por vezes atividade antifúngica.

Dito isto, é necessário ter em conta que a metodologia utilizada deixa grande margem para melhoramento, uma vez que tem erros consideráveis, podendo ser esta a razão pela qual a amostra de sacarose se encontra mais suscetível ao calor que a de água acidificada. É, no entanto, indubitável que o pH se mostra como um dos fatores de maior impacto no ensaio presente.

4.7 Caso prático

Foi requisitado da MUM que providenciasse a sua perícia em relação a uma contaminação por parte de *Cadophora fastigiata* em matrizes alimentares de origem frutífera.

A 54 °C e pH 4,5, condições semelhantes às utilizadas durante alguns dos ensaios, verificou-se na literatura os valores de D descritos para várias estirpes das seguintes bactérias: *STEC* 23,4 min – 30,4 min; *Salmonella* 8,2 min – 12,2 min; *L. monocytogenes* 12,6 min – 17,2 min (Dufort, Sogin et al. 2017). Comparativamente com os valores de D obtidos neste estudo para *C. fastigiata*, 9,19 min e 9,6 min em pH 4, estas bactérias mostram-se mais resistentes.

Do mesmo modo, para *Aspergillus pseudoglaucus* e *Aspergillus fischeri*, em condições de pH 6, verificaram-se valores de D de 1,63 min a 78 °C e 9,29 min a 90 °C respetivamente para cada uma das espécies de *Aspergillus*. Em condições semelhantes de pH (6,5) os ensaios com *C. fastigiata* revelaram um valor de D de 0,69 min a 70 °C, mostrando-se significativamente mais frágil que estas espécies de *Aspergillus*, como se pode averiguar na Tabela 6 (Buerman, Worobo et al. 2019).

Desta forma, de acordo com os valores de D obtidos para as temperaturas utilizadas, pode-se inferir que no caso do aparecimento de contaminações por parte de *C. fastigiata*, estas não ocorreriam isoladamente, da mesma forma, com os habituais parâmetros de processamento industrial HTLT (temperatura acima de 80 °C com tempo acima de 30 segundos) (Petruzzi, Campaniello et al. 2017) é garantida uma redução de pelo menos 90% da carga de esporos viáveis. Sugere-se desta forma, que a ocorrência de uma contaminação enquanto se mantém parâmetros normais de pasteurização seja devida a uma contaminação cruzada e não à sobrevivência de uma quantidade considerável de propágulos fúngicos na matriz alimentar.

Tabela 6 Valores de D e z para as várias condições de *C. fastigiata* em comparação com outras espécies de contaminantes alimentares

ESPÉCIE	CONDIÇÕES	D (MIN)	Z (°C)	FONTE
<i>C. FASTIGIATA</i>	55 °C; pH 4	9,19	7,76	N/A
<i>C. FASTIGIATA</i>	55 °C; pH 4	9,6	8,36	N/A
<i>STEC</i>	54 °C; pH 4,5	23,4 – 30,4	6,75	(Dufort, Sogin et al. 2017)
<i>SALMONELA</i>	54 °C; pH 4,5	8,2 – 12,2	6,60	(Dufort, Sogin et al. 2017)
<i>L. MONOCYTOGENES</i>	54 °C; pH 4,5	12,6 – 17,2	7,77	(Dufort, Sogin et al. 2017)
<i>C. FASTIGIATA</i>	70 °C; pH 6,5	0,69	10,55	N/A
<i>ASPERGILLUS PSEUDOGLAUCUS</i>	78 °C; pH 6	1,63	8,1	(Buerman, Worobo et al. 2019)
<i>ASPERGILLUS FISCHERI</i>	90 °C; pH 6	9,29	6,3	(Buerman, Worobo et al. 2019)

5. Conclusão e Considerações Futuras

5.1 Conclusão

Cadophora fastigiata é um fungo identificado quase há uma centena de anos, as suas aparições são invulgares no geral e relatórios de contaminações alimentares por parte deste são extremamente escassas. Enquanto possível uma contaminação alimentar por parte deste, provavelmente resultaria por contaminação cruzada devido ao contato com alguma madeira contaminada.

Ao passo que se encontraram alguns valores discordantes na obtenção dos valores de z e D , nas condições experimentais verificou-se que para condições de água destilada e pH 6,5 a uma temperatura de 70 °C seria necessário 0,69 minutos para a inativação de 90% dos esporos. Adicionalmente, nas outras condições de pH verificou-se que em 9,6 minutos a 55 °C haveria uma diminuição logarítmica do número de esporos viáveis, e a 60 °C não foram encontrados esporos viáveis após 5 minutos.

Em suma, aquando do fim dos estudos térmicos efetuados com este fungo, parece que qualquer contaminação ativa por parte deste numa matriz alimentar após o devido tratamento térmico seja factualmente insuportável, podendo apenas ocorrer por ação de contaminação cruzada ou de más práticas.

5.2 Considerações futuras

Ainda que se tenham obtido desta forma valores base do binómio de z e D para este organismo, os métodos utilizados foram de certa forma rudimentares e deixaram uma vasta margem para otimização.

Apesar de ser improvável a sua contaminação de matrizes alimentares, há a hipótese de contaminações cruzadas por contato com madeiras contaminadas, daí sugere-se um aprimoramento dos valores obtidos neste estudo.

Por último, recomenda-se um mais profundo estudo sobre clamidósporos, uma vez que apesar de se ter conseguido a sua indução, não foi em números significativamente grandes. Seria de significativa importância perceber propriamente o mecanismo da sua produção, assim como, conduzir estudos térmicos neles.

Referências bibliográficas

- A Gock, M., A. D Hocking, J. Pitt and P. Poulos (2003). "Influence of temperature, water activity and pH on growth of some xerophilic fungi." International journal of food microbiology **81**: 11-19.
- Bigelow, W. D. (1921). "The logarithmic nature of thermal death time curves." The Journal of Infectious Diseases **29**(5): 528-536.
- Blanchette, R. A., B. W. Held, J. A. Jurgens, D. L. McNew, T. C. Harrington, S. M. Duncan and R. L. Farrell (2004). "Wood-destroying soft rot fungi in the historic expedition huts of Antarctica." Applied and environmental microbiology **70**(3): 1328-1335.
- Block, S. S. (1991). Disinfection, sterilization, and preservation. Philadelphia, Lea & Febiger.
- Buerman, E. C., R. W. Worobo and O. I. Padilla-Zakour (2019). "Thermal Resistance of Xerophilic Fungi in Low-Water-Activity (0.70 to 0.80) Confectionery Model Foods." Journal of Food Protection **82**(3): 390-394.
- Chapman, A. (2009). Numbers of Living Species in Australia and the World 2nd edn.
- Cole, G. T. and B. Kendrick (1973). "Taxonomic Studies of Phialophora." Mycologia **65**(3): 661-688.
- Conant, N. F. (1937). "The Occurrence of a Human Pathogenic Fungus as a Saprophyte in Nature." Mycologia **29**(5): 597-598.
- Dufort, E. L., J. Sogin, M. R. Etzel and B. H. Ingham (2017). "Inactivation Kinetics of Pathogens during Thermal Processing in Acidified Broth and Tomato Purée (pH 4.5)." Journal of Food Protection **80**(12): 2014-2021.
- Giri, D.
- Grønvold, J., P. Nansen, S. A. Henriksen, M. Larsen, J. Wolstrup, J. Bresciani, H. Rawat and L. Friberg (2009). "Induction of traps by *Ostertagia ostertagi* larvae, chlamyospore production and growth rate in the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans*." Journal of Helminthology **70**(4): 291-297.
- Harrington, T. and D. McNew (2003). "Phylogenetic analysis places the Phialophora-like anamorph genus *Cadophora* in the Helotiales." Mycotaxon -Ithaca Ny- **87**: 141-151.
- Hawksworth, D. L. and R. Lücking (2017). "Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species." Microbiology Spectrum **5**(4).
- Hibbett, D., M. Binder, J. Bischoff, M. Blackwell, P. Cannon, O. E Eriksson, S. M. Huhndorf, T. Y. James, P. Kirk, R. Lücking, T. Lumbsch, F. Lutzoni, P. Brandon Matheny, D. J McLaughlin, M. Powell, S. Redhead, C. Schoch, J. Spatafora, J. Stalpers and N. Zhang (2007). "A Higher-Level Phylogenetic Classification of the Fungi." Mycological research **111**: 509-547.
- Katzin, L. I., L. A. Sandholzer and M. E. Strong (1943). "Application of the Decimal Reduction Time Principle to a Study of the Resistance of Coliform Bacteria to Pasteurization." Journal of bacteriology **45**(3): 265-272.
- Lagerberg, T., G. Lundberg and E. Melin (1927). "Biological and practical researches into Blueing in Pine and Spruce." Svenska Skogsvårdsföreningens Tidskrift **2**(2-4): 127.
- Li, L., Q. Qu, B. Tian and K. Q. Zhang (2005). "Induction of Chlamyospores in *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium roseum* by Antifungal Compounds Produced by *Bacillus subtilis* C2." Journal of Phytopathology **153**: 686-693.
- Lin, X. and J. Heitman (2005). "Chlamyospore Formation during Hyphal Growth in *Cryptococcus neoformans*." Eukaryotic Cell **4**(10): 1746-1754.
- Mafart, P., I. Leguérinel, O. Couvert and L. Coroller (2010). "Quantification of spore resistance for assessment and optimization of heating processes: A never-ending story." Food Microbiology **27**(5): 568-572.
- McElhatton, A. and R. J. Marshall (2007). "Food safety : a practical and case study approach."
- Medlar, E. M. (1915). "A New Fungus, *Phialophora verrucosa*, Pathogenic for Man." Mycologia **7**(4): 200-203.
- Melin, E. and J. A. Nannfeldt (1934). Researches into the blueing of ground wood-pulp: 397-616 pp.

Paraud, C., H. Hoste, Y. Lefrileux, A. Pommaret, V. Paolini, I. Pors and C. Chartier (2005). "Administration of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to goats to control gastro-intestinal nematodes: dose trials." Vet. Res. **36**(2): 157-166.

Peberdy, J. F. (1994). "Protein secretion in filamentous fungi — trying to understand a highly productive black box." Trends in Biotechnology **12**(2): 50-57.

Petruzzi, L., D. Campaniello, B. Speranza, M. R. Corbo, M. Sinigaglia and A. Bevilacqua (2017). "Thermal Treatments for Fruit and Vegetable Juices and Beverages: A Literature Overview." Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety **16**(4): 668-691.

Remy, W., T. N. Taylor, H. Hass and H. Kerp (1994). "Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae." Proceedings of the National Academy of Sciences **91**(25): 11841-11843.

Santos, I., A. Venâncio and N. Lima (1998). "Fungos Contaminantes na Indústria Alimentar." Simon, L., J. Bousquet, R. C. Lévesque and M. Lalonde (1993). "Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants." Nature **363**(6424): 67-69.

Simpson, R. (2009). "Engineering aspects of thermal food processing."

Singh, R. P. (2008). Computer applications in food technology : use of spreadsheets in graphical, statistical, and process analyses. San Diego, Academic Press.

Smelt, J. and S. Brul (2014). "Thermal Inactivation of Microorganisms." Critical reviews in food science and nutrition **54**: 1371-1385.

Smith, S. E. and D. J. Read (2002). INTRODUCTION. Mycorrhizal Symbiosis (Second Edition). S. E. Smith and D. J. Read. London, Academic Press: 1-8.

Sperber, W. H. (2009). Introduction to the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages. Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages. W. H. Sperber and M. P. Doyle. New York, NY, Springer New York: 1-40.

Troller, J. A. (1993). Sanitation in Food Processing (Second Edition). J. A. Troller. London, Academic Press: 1-5.

Vojir, F., E. Schübl and I. Elmadfa (2012). "The Origins of a Global Standard for Food Quality and Safety: Codex Alimentarius Austriacus and FAO/WHO Codex Alimentarius." International Journal for Vitamin and Nutrition Research **82**(3): 223-227.

Wallace, C. and S. Mortimore (2013). HACCP A practical Approach, 3rd Edition.

Weber, R. W. S. and D. Pitt (2001). Filamentous fungi — growth and physiology. Applied Mycology and Biotechnology. G. G. Khachatourians and D. K. Arora, Elsevier. **1**: 13-54.

Webster, J. and R. Weber (2007). Introduction to Fungi, Cambridge University Press.

Anexo I

Temperatura	50°C									
	0		5		10		15		20	
Tempo (min)	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis
Área 1	139	130	60	35	81	19	51	18	50	32
Área 2	204	139	58	27	86	27	56	17	39	28
Área 3	234	155	69	31	85	28	68	21	56	40
Somatório	577	424	187	93	252	74	175	56	145	100

Tabela A 1 Contagem dos esporos da amostra 50 A, para água destilada a pH 6,5

Temperatura	50°C									
	0		5		10		15		20	
Tempo (min)	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis
Área 1	72	47	24	10	34	25	21	17	33	27
Área 2	61	41	23	14	28	20	41	13	44	30
Área 3	62	38	23	11	42	17	40	19	50	32
Somatório	195	126	70	35	104	62	102	49	127	89

Tabela A 2 Contagem dos esporos da amostra 50 B, para água destilada a pH 6,5

Temperatura	55°C									
	0		5		10		15		20	
Tempo (min)	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis
Área 1	78	43	35	3	29	13	33	9	68	8
Área 2	77	49	61	12	52	17	59	13	75	13
Área 3	73	37	50	16	54	21	51	15	65	8
Somatório	228	129	146	31	135	51	143	37	208	29

Tabela A 3 Contagem dos esporos da amostra 55 A, para água destilada a pH 6,5

Temperatura	55°C									
	0		5		10		15		20	
Tempo (min)	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis
Área 1	75	41	69	20	71	12	62	15	58	11
Área 2	73	37	82	28	74	9	71	32	86	17
Área 3	71	45	95	32	76	10	85	20	67	15
Somatório	219	123	246	80	221	31	218	67	211	43

Tabela A 4 Contagem dos esporos da amostra 55 B, para água destilada a pH 6,5

Temperatura	60°C									
	0		2		4		5		6	
Tempo (min)	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis
Área 1	139	130	36	19	27	13	48	11	45	6
Área 2	204	139	46	27	47	4	41	4	45	2
Área 3	234	155	57	27	45	11	53	7	54	3
Somatório	577	424	139	73	119	28	142	22	144	11
Tempo (min)	8		10		15		20			
	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis		
Área 1	30	4	34	1	18	1	32	1		
Área 2	47	2	31	0	19	0	35	0		
Área 3	50	0	38	0	40	3	37	0		
Somatório	127	6	103	1	77	4	104	1		

Tabela A 5 Contagem dos esporos da amostra 60 A, para água destilada a pH 6,5

Temperatura	60°C									
	0		2		4		5		6	
Tempo (min)	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis
Área 1	72	47	63	12	27	13	31	8	67	6
Área 2	61	41	73	18	47	4	43	14	65	7
Área 3	62	38	72	14	45	11	42	9	64	6
Somatório	195	126	208	44	119	28	116	31	196	19
Tempo (min)	8		10		15		20			
	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis		
Área 1	56	3	45	5	52	2	34	0		
Área 2	81	2	53	8	62	1	42	0		
Área 3	61	1	51	9	48	3	59	1		
Somatório	198	6	149	22	162	6	135	1		

Tabela A 6 Contagem dos esporos da amostra 60 B, para água destilada a pH 6,5

Temperatura	65°C					
Tempo (min)	0		5		10	
	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis
Área 1	93	53	35	1	34	0
Área 2	72	34	49	0	31	2
Área 3	94	37	59	2	38	2
Somatório	259	124	143	3	103	4

Tabela A 7 Contagem dos esporos da amostra 65 A, para água destilada a pH 6,5

Temperatura	65°C					
Tempo (min)	0		5		10	
	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis
Área 1	171	88	61	2	45	0
Área 2	94	44	77	4	53	0
Área 3	127	57	72	4	51	0
Somatório	392	189	210	10	149	0

Tabela A 8 Contagem dos esporos da amostra 65 B, para água destilada a pH 6,5

Temperatura	70°C					
Tempo (min)	0		1		2	
	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis
Área 1	69	60	36	3	35	0
Área 2	69	43	56	0	43	0
Área 3	69	50	54	0	53	0
Somatório	207	153	146	3	131	0

Tabela A 9 Contagem dos esporos da amostra 70 A, para água destilada a pH 6,5

Temperatura	70°C					
Tempo (min)	0		1		2	
	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis
Área 1	69	60	70	7	72	0
Área 2	69	43	72	0	59	0
Área 3	69	50	74	0	62	0
Somatório	207	153	216	7	193	0

Tabela A 10 Contagem dos esporos da amostra 70 B, para água destilada a pH 6,5

Temperatura	45°C									
Tempo (min)	0		5		10		15		20	
	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis
Área 1	36	30	25	16	20	10	19	10	39	25
Área 2	55	50	32	22	22	16	18	7	51	28
Área 3	57	52	37	20	31	22	24	10	41	21
Somatório	148	132	94	58	73	48	61	27	131	74

Tabela A 11 Contagem dos esporos da amostra 45 A, para solução de sacarose a pH 4

Temperatura	45°C									
Tempo (min)	0		5		10		15		20	
	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis
Área 1	65	26	44	30	41	27	59	39	32	19
Área 2	77	38	47	33	43	28	43	23	35	16
Área 3	63	32	47	30	40	23	48	23	40	24
Somatório	205	96	138	93	124	78	150	85	107	59

Tabela A 12 Contagem dos esporos da amostra 45 B, para solução de sacarose a pH 4

Temperatura	50°C									
Tempo (min)	0		5		10		15		20	
	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis
Área 1	36	30	47	27	26	18	22	10	20	13
Área 2	55	50	45	36	30	17	22	16	31	17
Área 3	57	52	48	34	54	38	28	18	28	12
Somatório	148	132	140	97	110	73	72	44	79	42

Tabela A 13 Contagem dos esporos da amostra 50 A, para solução de sacarose a pH 4

Temperatura	50°C									
Tempo (min)	0		5		10		15		20	
	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis
Área 1	65	26	47	15	46	5	48	35	38	21
Área 2	77	38	50	5	44	3	41	32	44	25
Área 3	63	32	45	6	52	5	49	39	61	42
Somatório	205	96	142	26	142	13	138	106	143	88

Tabela A 14 Contagem dos esporos da amostra 50 B, para solução de sacarose a pH 4

Temperatura	55°C					
Tempo (min)	0		5		10	
	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis
Área 1	36	30	44	17	18	1
Área 2	55	50	52	15	34	2
Área 3	57	52	55	8	38	2
Somatório	148	132	151	40	90	5

Tabela A 15 Contagem dos esporos da amostra 55 A, para solução de sacarose a pH 4

Temperatura	55°C					
Tempo (min)	0		5		10	
	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis
Área 1	65	26	50	8	*	0
Área 2	77	38	69	5	*	0
Área 3	63	32	57	9	*	0
Somatório	205	96	176	22	*	0

Tabela A 16 Contagem dos esporos da amostra 55 B, para solução de sacarose a pH 4

Temperatura	50°C							
Tempo (min)	0		5		8		10	
	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis
Área 1	132	53	118	74	110	18	95	0
Área 2	160	65	105	4	69	19	103	0
Área 3	108	58	113	3	108	21	110	5
Somatório	400	176	336	81	287	58	308	5
Tempo (min)	12		14		15			
	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis		
Área 1	77	18	103	19	103	9		
Área 2	84	18	106	33	97	7		
Área 3	60	13	105	26	104	2		
Somatório	221	49	314	78	304	18		

Tabela A 17 Contagem dos esporos da amostra 50 A, para a água acidificada a pH 4

Temperatura	50°C							
Tempo (min)	0		5		8		10	
	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis
Área 1	86	38	63	15	61	4	36	0
Área 2	87	48	75	14	76	11	29	0
Área 3	77	34	72	11	101	11	43	2
Somatório	250	120	210	40	238	26	108	2
Tempo (min)	12		14		15			
	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis		
Área 1	53	13	44	20	76	22		
Área 2	52	13	59	14	93	18		
Área 3	71	17	63	24	89	21		
Somatório	176	43	166	58	258	61		

Tabela A 18 Contagem dos esporos da amostra 50 B, para a água acidificada a pH 4

Temperatura	55°C									
Tempo (min)	0		1		2		3		4	
	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis
Área 1	86	38	62	26	56	9	105	23	48	2
Área 2	87	48	60	27	42	10	107	21	52	9
Área 3	77	34	70	41	39	11	115	26	66	10
Somatório	250	120	192	94	137	30	327	70	166	21

Tabela A 19 Contagem dos esporos da amostra 55 A, para a água acidificada a pH 4

Temperatura	55°C									
Tempo (min)	0		1		2		3		4	
	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis	Esporos totais	Esporos viáveis
Área 1	132	53	65	27	55	18	113	9	87	35
Área 2	160	65	75	26	64	21	115	13	80	21
Área 3	108	58	64	20	69	23	100	10	104	33
Somatório	400	176	204	73	188	62	328	32	271	89

Tabela A 20 Contagem dos esporos da amostra 55 B, para a água acidificada a pH 4