

Andréia Tremarin

**MODELAGEM MATEMÁTICA DO CRESCIMENTO DE  
*Byssochlamys fulva* e *Neosartorya fischeri* EM SUCO DE MAÇÃ  
SOLIDIFICADO SOB CONDIÇÕES ISOTÉRMICAS E NÃO  
ISOTÉRMICAS**

Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como requisito para obtenção do Grau de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Gláucia Maria Falcão de Aragão

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Beatriz de Cássia Martins Salomão

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristina Luisa Miranda Silva

Florianópolis  
2013



Folha de assinatura



À melhor parte de mim, minha mãe Rosamar.



## AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, agradeço a Deus, pelo dom da vida, por me permitir concretizar mais um sonho, por sempre iluminar meu caminho e me dar forças pra seguir em frente.

À minha orientadora, Professora Gláucia, por ter me aceitado como orientanda, pela oportunidade de participar do seu grupo de pesquisa, por todo apoio, pelos ensinamentos, confiança, carinho e amizade. Agradeço pelo grande crescimento pessoal e profissional que conquistei com a tua experiência.

À minha co-orientadora Beatriz por ter me transmitido seu amor pela microbiologia, pela paciência, por todo carinho comigo e contribuição nesta etapa de minha formação. Pela amizade e por todos os momentos de descontração, tua alegria contagia a todos!

Às professoras Cristina Silva e Teresa Brandão por terem aberto as portas da Universidade Católica Portuguesa, pela co-orientação e apoio para a realização deste trabalho, pela forma e carinho com que me receberam, meu muito obrigada!

Aos professores da banca examinadora: Bruno, Débora, João, Ligia, Morgana e Sandra, por terem aceitado contribuir com este trabalho.

Agradeço aos meus pais, João e Rosa, por estarem sempre presentes, mesmo a quilômetros de distância. Agradeço pela compreensão em todos momentos, por todo carinho e amor ao longo da vida, pela educação que me deram, pelo exemplo que são para mim. O meu muito obrigada é pequeno diante da grandeza do que vocês representam.

Agradeço especialmente à minha mãe, meu anjinho na terra e exemplo de ser humano, tu me ensinou a amar as pessoas, me deu princípios e me ensinou valores. Sempre acreditou nos meus sonhos e me incentivou a correr atrás deles, mesmo que isso acarretasse eu ficar longe de ti. Teus conselhos e tua força que me motivaram e motivam a seguir em frente e nunca desistir. Te amo com com toda força do meu coração!

Ao meu irmão Alexandre a minha super cunhada Amanda, por sempre torcerem por mim, pelo sorriso amigo procurando amenizar minha ansiedade diante dos obstáculos.

Aos demais familiares, que me perguntavam quando eu ia parar de estudar e começar a trabalhar, acho que agora vai! Em especial a minha dinda Hermari que sempre torceu e vibrou a cada conquista

minha. Às minhas primas e grandes amigas Carol, Jana e Kari por todo carinho e preocupação, amo vocês!

À família Rech que me acolheu como filha, e assim eu me sinto. Agradeço especialmente à minha “amora” Rê, minha grande amiga de muitos anos, que desde quando eu entrei no doutorado já me chamava de Doutora. Tu sempre esteve ao meu lado nos momentos bons e nos ruins também, foi você que sempre me estendeu a mão quando eu mais precisei e vibrou comigo a cada notícia boa, a cada sonho conquistado. Meu muito obrigada pelas longas conversas, pelas muitas e muitas risadas, pelo ombro amigo, por partilhar comigo a pessoa maravilhosa que és, eu te amo minha amiga!

Às minhas amigas da faculdade Beta, Mila, Lili e Gi, que mesmo distante sempre estiveram muito presentes na minha vida, é muito bom poder contar com vocês e cultivar essa amizade!

Aos colegas e amigos do laboratório Engebio: Américo, Ana Paula, Carol, Denise, Glenise, Jean, Jonathan, Kellen, Kelin, Mélodi, Peque, Rosana e todos os alunos de IC, pelos coleguismo e momentos de descontração.

As minhas IC's fofíssimas Sil e Fran por toda ajuda na parte experimental, foi muito bom trabalhar e contar com vocês!

À Denise, minha mãe emprestada, que além dos muitos conselhos profissionais sempre foi uma grande amiga. Obrigada por toda tua disponibilidade em ajudar sempre, seja na vida pessoal, profissional, amorosa ou sentimental, te admiro muito e é muito bom te ter por perto. Obrigada também ao Jonathan, que junto com a Dê, não mediu esforços para que as análises de ergosterol fossem realizadas!

Às minhas amigonas Jaci, Fran Schmidt e Fran Dalcanton, meu muito obrigada por todo incentivo, por sempre me motivarem a continuar, pelos conselhos, ensinamentos, boas conversas, jantinhas e tragos. Vocês são meu exemplo de pessoas e profissionais e definitivamente moram no meu coração.

À Kellen, Kelin, Ana e Carol, que além de colegas de trabalho se tornaram grandes amigas. Obrigada por tornarem os momentos no laboratório e fora dele tão especiais, com vocês dividi muitos momentos bons, acalmei aflições. Meu muito obrigada por tudo que vocês representam para mim, por toda força ao longo desses anos e principalmente por nunca me deixarem desistir.

Ao meu menino Jean Correia pelas longas horas de conversa, pela sua ajuda na parte experimental, por me mostrar a vida de uma forma mais leve. Teu coração é gigantesco e tua amizade é muito especial!



Ao meu “guru espiritual” Daniel Longhi por sua incansável ajuda, por todo ensinamento na modelagem matemática, por me fazer acreditar no meu trabalho e no meu potencial. Tu és um ser humano de inteligência e alma admiráveis.

Aos meus queridos amigos e amigas de perto e de longe: Ana e Silvio, Bruno, Carol Flock, Claudia Flores, Daniel Veras, Gu, Pri, Vanessa, Manu, Lelê, Bianquinha, Fabets, Dudu, Peque, Rodrigo, Emilia e Rafa, Neivinha, Maurícia, Quel e Ana. Obrigada por todos momentos que passamos juntos, pelas boas conversas, por todas risadas dadas, pelas festas, pelas jantinhas, pelos conhecimentos trocados, por toda ajuda nos momentos difíceis, por partilharem momentos alegres, pelo carinho e amizade. A Mari, Vivi e Leandro por tornarem a vida no Porto mais alegre!

A todas as pessoas que contribuíram e torceram para o desenvolvimento deste trabalho. Vocês foram fundamentais. Minha eterna gratidão.

À Raquel que sempre se disponibilizou a ajudar, ao seu Zé por sempre nos receber com um super bom dia e café fresquinho.

À UFSC e ao programa de pós-graduação em Engenharia de Alimentos pela oportunidade do desenvolvimento desta pesquisa.

À CAPES pelo apoio financeiro tanto no Brasil, quanto em Portugal, que foi fundamental para a execução deste trabalho.

Para vocês que estiveram ao meu lado, meus sinceros agradecimentos!

*Déia*



*“Um dia você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida.”*

William Shakespeare



## RESUMO

O suco de maçã é um produto popular e tem grande importância comercial, sendo que a região sul do Brasil é a principal responsável pela produção nacional de maçãs. *Byssoschlamys fulva* e *Neosartorya fischeri* são fungos termorresistentes que podem ser encontrados em sucos de maçã, causando sua deterioração e produzindo micotoxinas. O crescimento de fungos pode ser afetado, entre outros fatores, pela atividade de água do produto e temperatura de armazenamento. A modelagem do crescimento de fungos termorresistentes tem sido realizada a partir de dados de medida de diâmetro da colônia. Entretanto, este método, como medida de biomassa fúngica, não leva em conta a densidade da colônia. Assim, o método da avaliação da concentração de ergosterol, metabólito produzido exclusivamente por fungos, tem sido proposto como alternativa de avaliação de crescimento. Na maioria dos trabalhos apresentados na literatura, apenas condições isotérmicas são avaliadas na predição do crescimento fúngico, apesar de variações na temperatura poderem ocorrer na cadeia de distribuição dos alimentos. Neste contexto, o objetivo geral deste trabalho foi estudar a modelagem do crescimento dos fungos termorresistentes *B. fulva* e *N. fischeri* utilizando o método de medida do crescimento radial das colônias comparado ao método de determinação de ergosterol, verificando a influência da concentração de sólidos solúveis e da temperatura no crescimento isotérmico e não isotérmico destes fungos em suco de maçã solidificado. Primeiramente, o modelo primário de Gompertz Modificado foi ajustado aos dados experimentais de crescimento em diferentes temperaturas (10, 15, 20, 25 e 30 °C) e concentrações de sólidos solúveis (12, 20, 25, 35, 45, 55 e 70 °Brix) para se obter os parâmetros de crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri* em suco de maçã solidificado. As equações que descrevem a influência da temperatura e da concentração de sólidos solúveis sobre os parâmetros primários foram incluídas na equação do modelo de Gompertz Modificado obtendo-se um modelo Global que mostrou uma boa previsão do crescimento, especialmente para *B. fulva*, sendo uma ferramenta útil para prever o comportamento deste fungo nas condições estudadas. Como, para algumas situações de predição de crescimento de *N. fischeri*, o modelo Global não apresentou uma boa predição, três modelos primários foram ajustados às curvas de crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri* em suco de maçã solidificado em cinco diferentes temperaturas isotérmicas e cinco concentrações de sólidos solúveis. Dentre estes modelos, foi selecionado o modelo primário que apresentou

melhor ajuste aos dados experimentais. O modelo de Baranyi e Roberts simplificado (sem considerar a fase estacionária) foi selecionado, pois na maioria das curvas não era possível se observar a fase estacionária de crescimento. Foram avaliados também cinco modelos secundários, sendo a influência da temperatura sobre a fase lag ( $\lambda$ ) melhor descrita pela equação da potência e o modelo da raiz quadrada foi o que melhor descreveu a influência da temperatura sobre a velocidade específica de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ). A influência da concentração de sólidos solúveis sobre os dois parâmetros estudados foi melhor descrita pela equação linear. O método de medida de diâmetro da colônia é muito utilizado na literatura para quantificação da biomassa fúngica, mas não leva em conta a densidade da colônia e é de difícil realização em vários alimentos embalados. Como método alternativo para a avaliação do crescimento dos fungos estudados, foi avaliada a evolução da concentração de ergosterol. Foi modelado o crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri* avaliados pelos métodos de medida do diâmetro da colônia e da evolução do conteúdo de ergosterol no meio. O modelo de Baranyi e Roberts simplificado mostrou boa capacidade de descrever o crescimento fúngico em ambos os métodos e uma correlação linear foi observada entre os parâmetros de crescimento obtidos nos dois métodos testados. Além das condições isotérmicas testadas, foi estabelecido um modelo de crescimento não isotérmico, baseado no modelo de Baranyi e Roberts simplificado. O modelo proposto foi validado com dados experimentais de *B. fulva* e *N. fischeri* em suco de maçã solidificado sob quatro diferentes perfis de temperatura e pode prever corretamente o crescimento destes fungos sob diferentes perfis de temperatura, tanto para a medida do diâmetro da colônia quanto para o conteúdo de ergosterol. Os modelos preditivos estabelecidos neste estudo podem ser úteis para prever o comportamento dos microrganismos que determinam a vida útil de suco de maçã sob as condições não isotérmicas estudadas. Este trabalho pode trazer inúmeras contribuições para a indústria processadora de sucos uma vez que, a partir dos dados obtidos, podem ser estabelecidas as condições que influenciam o crescimento de microrganismos incidentes em suco de maçã.

**Palavras-chave:** fungos termorresistentes, microbiologia preditiva, temperatura, crescimento não isotérmico, ergosterol.

## ABSTRACT

Apple juice is a popular product and has great commercial importance. The south of Brazil is the main responsible for the national production of apples. *Byssochlamys fulva* and *Neosartorya fischeri* are heat resistant fungi that can be found in apple juice, causing deterioration and producing mycotoxin in these products. Fungi growth can be affected, among other factors, by the water activity of the product and storage temperature. Fungi growth can be affected, among other factors, by the water activity of the product and storage temperature. Modeling the growth of heat resistant fungi have been made from measured diameter of the colony. However, this method, as a measure of fungal biomass, does not take into account the density of the colony. Thus, the method of assessment of the ergosterol concentration, metabolite produced only by fungi, has been proposed as an alternative assessment of growth. In most of the works presented in the literature, only isothermal condition are evaluated in the prediction of fungal growth. Then, the main aim of this study was to model the growth of heat resistant fungi, *B. fulva* and *N. fischeri*, using the method of measuring the radial growth of the colonies compared to the method of determination of ergosterol, verifying the influence of soluble solids concentration and temperature in isothermal and non-isothermal growth of these fungi in solidified apple juice. Firstly, primary model Gompertz Modified was fitted to the growth experimental data at different temperatures (10, 15, 20, 25 and 30 °C) and soluble solids concentrations (12, 20, 25, 35, 45, 55 and 70 °Brix) to obtain the growth parameters of *B. fulva* and *N. fischeri* in solidified apple juice. The equations which describe the influence of temperature and soluble solids concentration on the primary parameters were included in the Modified Gompertz model equation and a Global model was obtained and showed good prediction of growth, especially for *B. fulva*, being a useful tool to predict the behavior of this fungi in the conditions studied. As for some situations in prediction of growth of *N. fischeri*, the Global model didn't have a good prediction, three primary models were fitted to the growth curves of *B. fulva* and *N. fischeri* in solidified apple juice under five different isothermal temperatures and five soluble solids concentrations and selected primary model that showed the best fit to the experimental data. The simplified Baranyi and Roberts model (disregarding the stationary phase) was selected, because in most curves it was not possible to observe the stationary phase of growth. Were also evaluated five secondary models, the influence of temperature on the lag phase ( $\lambda$ ) was better described by the power

equation and square root model describing better the influence of temperature for the maximum specific growth rate ( $\mu_{\max}$ ) The influence of the concentration of soluble solids on the two parameters was better described by the linear equation. The method of measurement of the diameter of the colony is highly used in the literature to quantify fungal biomass, but does not take into account the density of the colony and is difficult to perform in many packaged foods. As an alternative method for the assessment of fungal growth studies, the evolution of ergosterol concentration was evaluated. The growth of *B. fulva* and *N. fischeri* was modeled evaluated to methods by measuring the diameter of the colony and ergosterol content in the medium. The Baranyi and Roberts simplified model showed good ability to describe fungal growth in both methods and a linear correlation was observed between the growth parameters obtained in the two tested methods. In addition to the isothermal conditions tested, it was established non-isothermal growth model, based on the Baranyi and Roberts model. The proposed model was validated with experimental growth curves of *B. fulva* and *N. fischeri* in solidified apple juice under four different temperature profiles and can correctly predict the growth of these fungi under different temperature profiles, both for the measurement of the diameter of the colony as well as for the ergosterol content. The predictive models established in this study can be useful for predicting the behavior of microorganisms that determine the shelf life of apple juice under non-isothermal conditions studied. This work can bring numerous contributions to the juice processing industry, since it, from the data obtained can be established the conditions that influence the incident microorganisms growth in apple juice.

**Keywords:** heat resistant fungi, predictive microbiology, temperature, non-isothermal growth, ergosterol.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Estrutura molecular do ergosterol.....	40
Figura 2.2 Representação esquemática da via metabólica da biossíntese do ergosterol e os sítios de ação de seus principais inibidores.....	41
Figura 2.3 Representação das curvas características de crescimento de fungos em meio sólido.....	44
Figura 2.4 Curva típica de crescimento microbiano em função do tempo.....	45
Figura 3.1 Fluxograma da metodologia de preparo o meio de crescimento e avaliação do crescimento de <i>B. fulva</i> e <i>N. fischeri</i> em suco de maçã solidificado.....	68
Figura 3.2 Placa com marcação em sua base para monitoramento do crescimento do diâmetro da colônia.....	69
Figura 3.3 Fluxograma para extração de ergosterol em amostras de suco de maçã solidificado e fungo.....	71
Figure 4.1.1 Growth of <i>B. fulva</i> in agar added apple juices with soluble solids content of 12 °Brix (a), 20 °Brix (b), 25 °Brix (c), 35 °Brix (d) and 45 °Brix (e) and at the temperatures 30 °C (●), 25 °C (■), 20 °C (○), 15 °C (□) and 10 °C (▲). Solid lines represent individual model fits (eq. 4.1.1) and dotted lines represent model prediction (eq. 4.1.11). .....	78
Figure 4.1.2 Influence of temperature on growth parameters $\lambda$ , $\mu_{max}$ and $A$ , for different soluble solids concentration: 12 °Brix (a), 20 °Brix (b), 25 °Brix (c), 35 °Brix (d) and 45 °Brix (e). Solid lines represent models fits.....	90
Figure 4.1.3 Variation of the parameters $k_1$ and $k_2$ (eqs. 4.1.5, 4.1.6, 4.1.7, 4.1.8, 4.1.9 and 4.1.10) with soluble solids content. Solid lines represent model fits. ....	93
Figura 4.1.4 Crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de maçã solidificado, com teor de sólidos solúveis de 12 ° Brix (a), 20 °Brix (b), 25 °Brix (c), 35 °Brix (d) e 45 °Brix (e) às temperaturas de 30 °C (●), 25 °C (■), 20 °C (○), 15 °C (□) e 10 °C (▲). As linhas contínuas representam ajustes do modelo de Gompertz Modificado (eq. 4.1.1) e as linhas tracejadas representam a previsão do modelo Global (eq. 4.1.12). .....	99

Figura 4.1.5 Variação dos parâmetros  $\lambda$ ,  $\mu_{\max}$  e A de *N. fischeri* com a temperatura, para diferentes concentrações de sólidos solúveis: 12 °Brix (a), 20 °Brix (b), 25 °Brix (c), 35 °Brix (d) e 45 °Brix (e). Linhas contínuas representam ajustes do modelo..... 104

Figura 4.2.1 Curvas de crescimento de *B. fulva* em suco de maçã solidificado, às temperaturas de (●) 30 °C, (■) 25 °C, (○) 20 °C, (□) 15 °C e (▲) 10 °C e concentrações de sólidos solúveis de 12 °Brix (a), 20 °Brix (b), 25 °Brix (c), 35 °Brix (d) e 45 °Brix (e). A linha contínua cinza representa o ajuste do Modelo de Gompertz Modificado (—), a linha pontilhada representa o ajuste do Modelo de Baranyi e Roberts (--) e a linha contínua preta representa o ajuste do Baranyi e Roberts simplificado (—) aos dados experimentais..... 112

Figura 4.2.2 Curvas de crescimento de *N. fischeri* em suco de maçã solidificado, às temperaturas de (●) 30 °C, (■) 25 °C, (○) 20 °C, (□) 15 °C e (▲) 10 °C e concentrações de sólidos solúveis de 12 °Brix (a), 20 °Brix (b), 25 °Brix (c), 35 °Brix (d) e 45 °Brix (e). A linha contínua cinza representa o ajuste do Modelo de Gompertz Modificado (—), a linha pontilhada representa o ajuste do Modelo de Baranyi e Roberts (--) e a linha contínua preta representa o ajuste do Baranyi e Roberts simplificado (—) aos dados experimentais..... 114

Figura 4.2.3 Efeito da temperatura sobre os parâmetros de crescimento (a)  $\lambda$  - Modelo da potência, (b)  $\mu_{\max}$  - Modelo da raiz quadrada, obtidos na concentração de sólidos solúveis de 12 °Brix. As linhas representam o ajuste do modelo aos parâmetros de crescimento (símbolos). (●) *B. fulva* e (■) *N. fischeri*. ..... 123

Figura 4.2.4 Efeito da concentração de sólidos solúveis sobre os parâmetros de crescimento (a)  $\lambda$  - modelo linear, (b)  $\mu_{\max}$  - modelo linear, obtidos na temperatura de 30 °C. As linhas representam o ajuste do modelo aos parâmetros de crescimento (símbolos). (●) *B. fulva* e (■) *N. fischeri*..... 126

Figure 4.3.1 *B. fulva* (filled symbol) and *N. fischeri* (unfilled symbol) growth curves assessed by colony diameter measurement in solidified apple juice at soluble solid concentration of 12 °Brix. The continuous line (—) represents Baranyi model fitted to the experimental data at (●○) 30 °C (■□) 25 °C (▲Δ) 20 °C and (◆◇) 15 °C..... 146

Figure 4.3.2 Square Root model fitted to  $\mu_{\max}$  and  $\lambda$  parameters data for colonies radial growth of *B. fulva* (●) and *N. fischeri* (□)...... 148

Figure 4.3.3 *B. fulva* (filled symbol) and *N. fischeri* (unfilled symbol) growth curves assessed by quantification of ergosterol content in solidified apple juice at soluble solid concentration of 12 °Brix. The continuous line (–) represents Baranyi and Roberts model fitted to the experimental data at (●○) 30 °C (■□) 25 °C (▲△) 20 °C and (◆◇) 15 °C. ....149

Figure 4.3.4 Fitting of Square Root model to the  $\mu_{\max}$  and  $\lambda$  parameters data of ergosterol content for *B. fulva* (●) and *N. fischeri* (□). ....151

Figure 4.3.5 Correlations between *B. fulva* (●) and *N. fischeri* (□) growth rates and lag phases estimated either through colony size measurement or ergosterol content in solidified apple juice at soluble solid concentration of 12 °Brix. ....153

Figura 4.4.1 Curvas de crescimento experimentais e previstas, sob condições não isotérmicas com perfil de temperatura de 20-10 °C. As linhas (-) são as previsões dos modelos e os símbolos são dados experimentais de (a) *B. fulva* (●) e (b) *N. fischeri* (○), (c) perfil de temperatura T (t). ....175

Figura 4.4.2 Curvas de crescimento experimentais e previstas, sob condições não isotérmicas com perfil de temperatura de 20-30 °C. As linhas (-) são as previsões dos modelos e os símbolos são dados experimentais de (a) *B. fulva* (●) e (b) *N. fischeri* (○), (c) perfil de temperatura T (t). ....176

Figura 4.4.3 Curvas de crescimento experimentais e previstas, sob condições não isotérmicas com perfil de temperatura de 10-30 °C. As linhas (-) são as previsões dos modelos e os símbolos são dados experimentais de (a) *B. fulva* (●) e (b) *N. fischeri* (○), (c) perfil de temperatura T (t). ....171

Figura 4.4.4 Curvas de crescimento experimentais e previstas, sob condições não isotérmicas com perfil de temperatura de 30-10 °C. As linhas (-) são as previsões dos modelos e os símbolos são dados experimentais de (a) *B. fulva* (●) e (b) *N. fischeri* (○), (c) perfil de temperatura T (t). ....173

Figura 4.4.5 Curvas de crescimento experimentais e previstas, sob condições não isotérmicas avaliadas pela medida do conteúdo de ergosterol com perfil de temperatura de 10-30 °C. As linhas (-) são as previsões dos modelos e os símbolos são dados experimentais de (a) *B. fulva* (■) e (b) *N. fischeri* (□), (c) perfil de temperatura T (t). ....182

Figura 4.4.6 Curvas de crescimento experimentais e preditas, sob condições não isotérmicas avaliadas pela medida do conteúdo de ergosterol com perfil de temperatura de perfil 30-10 °C. As linhas (-) são as predições dos modelos e os símbolos são dados experimentais de (a) *B. fulva* (■) e (b) *N. fischeri* (□), (c) perfil de temperatura T (t). ----- 184

Figura 4.4.7 Curvas de crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri* sob condições isotérmicas e não isotérmicas. As linhas (-) são as predições dos modelos e os símbolos são dados experimentais de (a) *B. fulva* (\*) e (b) *N. fischeri* (×), (c) perfil de temperatura T (t) na condição 20-10 °C. Onde 10 °C (▲), 20 °C (●) e 30 °C (○). ..... 191

Figura 4.4.8 Curvas de crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri* sob condições isotérmicas e não isotérmicas. As linhas (-) são as predições dos modelos e os símbolos são dados experimentais de (a) *B. fulva* (\*) e (b) *N. fischeri* (×), (c) perfil de temperatura T (t) na condição 20-30 °C. Onde 10 °C (▲), 20 °C (●) e 30 °C (○). ..... 192

Figura 4.4.9 Curvas de crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri* sob condições isotérmicas e não isotérmicas. As linhas (-) são as predições dos modelos e os símbolos são dados experimentais de (a) *B. fulva* (\*) e (b) *N. fischeri* (×), (c) perfil de temperatura T (t) na condição 10-30 °C. Onde 10 °C (▲), 20 °C (●) e 30 °C (○). ..... 193

Figura 4.4.10 Curvas de crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri* sob condições isotérmicas e não isotérmicas. As linhas (-) são as predições dos modelos e os símbolos são dados experimentais de (a) *B. fulva* (\*) e (b) *N. fischeri* (×), (c) perfil de temperatura T (t) na condição 30-10 °C. Onde 10 °C (▲), 20 °C (●) e 30 °C (○). ..... 194

## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 Modelos primários usados para ajustar os dados de crescimento dos fungos.....	72
Tabela 3.2 Modelos secundários usados para descrever a influência da temperatura e da concentração de sólidos solúveis nos parâmetros de crescimento dos fungos.....	73
Tabela 3.3 Índices estatísticos para validação dos modelos.....	75
Tabela 3.4 Resumo das condições e modelos utilizados.....	76
Tabela 4.1.1 Secondary models tested to describe the temperature and soluble solids concentration effects (generally designated as Effect) in the parameters $\mu_{\max}$ , $\lambda$ or A (generally designated as Parameter) of the Gompertz model.....	83
Tabela 4.1.2 Estimated parameters of the Gompertz model applied to <i>B. fulva</i> growth in agar added apple juices with different soluble solids content ( $^{\circ}\text{Brix}/a_w$ ) at given isothermal conditions; Coefficient of determination ( $R^2$ ) of the regression analyses performed. ....	80
Tabela 4.1.3 Parâmetros estimados do modelo de Gompertz Modificado aplicado ao crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de maçã solidificado com diferentes teores de sólidos solúveis ( $^{\circ}\text{Brix}/a_w$ ) e em condições isotérmicas determinadas e coeficiente de determinação ( $R^2$ ). ....	102
Tabela 4.2.1 Modelos primários utilizados para ajustar os dados de crescimento dos fungos.....	105
Tabela 4.2.2 Índices estatísticos referentes aos ajustes dos modelos de Gompertz Modificado (GM), Baranyi e Roberts (B) e Baranyi e Roberts simplificado (BS) aos dados experimentais de crescimento de <i>B. fulva</i> e <i>N. fischeri</i> em suco de maçã solidificado.....	112
Tabela 4.2.3 Parâmetros de crescimento $\lambda$ e $\mu_{\max}$ para os modelos de Gompertz Modificado (GM), Baranyi e Roberts (B) e Baranyi e Roberts simplificado (BS) ajustados aos dados de crescimento do diâmetro da colônia de <i>B. fulva</i> e <i>N. fischeri</i> na concentração de sólidos solúveis.....	115
Tabela 4.2.4 Modelos secundários para os parâmetros de crescimento $\lambda$ e $\mu_{\max}$ de <i>B. fulva</i> e <i>N. fischeri</i> em função da temperatura, obtidos a $12^{\circ}\text{Brix}$ .....	118

Tabela 4.2.5 Modelos secundários para os parâmetros de crescimento  $\lambda$  e  $\mu_{\max}$  de *B. fulva* e *N. fischeri* em função da concentração de sólidos solúveis, obtidos a 30 °C.....120

Tabela 4.2.6 Coeficientes de correlação ( $R^2$ ) obtidos pelos ajustes dos modelos secundários que descrevem a influência da temperatura nos parâmetros de crescimento  $\lambda$  (h) e  $\mu_{\max}$  (mm/h) de *B. fulva* e *N. fischeri* nas concentrações de sólidos solúveis de 12, 20, 25, 35 e 45 °Brix.....128

Tabela 4.2.7 Coeficientes de determinação ( $R^2$ ) obtidos pelos ajustes dos modelos secundários que descrevem a influência da concentração de sólidos solúveis nos parâmetros de crescimento  $\lambda$  (h) e  $\mu_{\max}$  (mm/h) de *B. fulva* e *N. fischeri*.....130

Table 4.3.1  $R^2$  and RMSE values for Baranyi and Roberts model fitted to the experimental data for *B. fulva* and *N. fischeri* colonies radial growth on solidified apple juice at 15, 20, 25 and 30 °C.....147

Table 4.3.2  $\mu_{\max}$  and  $\lambda$  parameters obtained by Baranyi and Roberts model fitted to the experimental data of colonies radial growth for *B. fulva* and *N. fischeri* in solidified apple juice at 15, 20, 25 and 30 °C.. ..... 147

Table 4.3.3 Secondary models for growth parameters  $\mu_{\max}$  and  $\lambda$  of *B. fulva* and *N. fischeri* function of temperature of colony diameter.....148

Table 4.3.4  $R^2$  and RMSE values for Baranyi and Roberts model fitted to the experimental data of *B. fulva* and *N. fischeri* growth assessed by ergosterol content on solidified apple juice at 15, 20, 25 and 30 °C.....150

Table 4.3.5  $\mu_{\max}$  and  $\lambda$  parameters of Baranyi and Roberts model obtained by fitting to the experimental data of ergosterol content of *B. fulva* and *N. fischeri* on solidified apple juice at 15, 20, 25 and 30 °C. .... 151

Table 4.3.6 Secondary models for growth parameters  $\mu_{\max}$  and  $\lambda$  of *B. fulva* and *N. fischeri* function of temperature of ergosterol content....152

Table 4.3.7 Correlations between *B. fulva* (●) and *N. fischeri* (□) growth rates and lag phases estimated either through colony size measurement or ergosterol content in solidified apple juice at soluble solid concentration of 12 °Brix..... 153



Tabela 4.3.8 Coeficientes de determinação ( $R^2$ ) obtidos pelos ajustes dos modelos secundários que descrevem a influência da temperatura nos parâmetros de crescimento $\lambda$ (h) e $\mu_{\max}$ (mm/h) de <i>B. fulva</i> e <i>N. fischeri</i> para a medida do diâmetro da colônia e conteúdo de ergosterol a 12 °Brix. ....	160
Tabela 4.4.1 Índices estatísticos para validação dos modelos.....	169
Tabela 4.4.2 Índices estatísticos para a medida do diâmetro da colônia de <i>B. fulva</i> e <i>N. fischeri</i> para os diferentes perfis de temperatura. ....	179
Tabela 4.4.3 Índices estatísticos para o conteúdo de ergosterol de <i>B. fulva</i> e <i>N. fischeri</i> para os diferentes perfis de temperatura.....	186





## LISTA DE ABREVIATURAS

- $\mu_{\text{máx}}$  - Velocidade específica de crescimento  
 $\mu_{\text{máx diam}}$  - Velocidade específica de crescimento do diâmetro  
 $\mu_{\text{máx erg}}$  - Velocidade específica de crescimento do ergosterol  
A – Aumento logarítmico da população ou fase estacionária  
APPCC – Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle  
 $a_w$  – Atividade de água  
B – Baranyi e Roberts  
BS – Baranyi Simplificado  
CYA – Czapeck Extrato de Levedura  
GM – Gompertz Modificado  
HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
k – Parâmetro do modelo  
KOH – Hidróxido de Potássio  
m – Massa  
M – Molar  
MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento  
MEA – Ágar Extrato de Malte  
MSE – Erro médio quadrático  
OMS – Organização Mundial da Saúde  
PDA – Potato dextrose Agar  
PET - Poli(etileno tereftalato)  
PMP – Pathogen Modeling Program  
 $q_0$  – Estado fisiológico da célula  
 $R^2$  – Coeficiente de correlação ou coeficiente de determinação  
RMSE – Raiz do erro médio quadrático  
SSSP – Seafood Spoilage Safety Predictor  
T – Temperatura  
t – Tempo  
 $T_{\text{min}}$  - Temperatura mínima  
UFC – Unidade Formadora de Colônia  
UV – Ultravioleta  
v - Volume  
 $\lambda$  – Fase lag ou fase de adaptação  
 $\lambda_{\text{diam}}$  – Fase lag ou fase de adaptação do diâmetro  
 $\lambda_{\text{erg}}$  – Fase lag ou fase de adaptação do ergosterol



## SUMÁRIO

<i>CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO</i> .....	29
<i>CAPÍTULO 2 - REVISÃO DA LITERATURA</i> .....	35
2.1. Produção de Maçã e Suco de Maçã.....	35
2.2 Contaminantes do Suco de Maçã .....	38
2.2.1 <i>Byssochlamys fulva</i> .....	40
2.2.2 <i>Neosartorya fischeri</i> .....	42
2.3. Determinação do Crescimento de Fungos.....	43
2.3.1 <i>Medida do Diâmetro da Colônia</i> .....	45
2.3.2 <i>Teor de Ergosterol</i> .....	46
2.4 Microbiologia Preditiva.....	48
2.4.1 <i>Modelagem do Crescimento de Microrganismos</i> .....	49
2.4.1.1 <i>Modelos Primários de Crescimento</i> .....	51
2.4.1.2 <i>Modelos Secundários</i> .....	56
2.4.1.3 <i>Modelos Terciários</i> .....	58
2.4.1.4 <i>Modelos Não Isotérmicos</i> .....	59
2.5 Validações dos modelos .....	61
<i>CAPÍTULO 3 - MATERIAL E MÉTODOS</i> .....	65
3.1 Microrganismos e Preparo da Suspensão de Esporos .....	65
3.2 Quantificação da Suspensão de Esporos .....	66
3.3 Meios de Crescimento - Suco de Maçã Solidificado.....	66
3.4 Avaliação do crescimento de <i>Byssochlamys fulva</i> e <i>Neosartorya fischeri</i> .....	67
3.4.1 <i>Medida do Diâmetro da Colônia</i> .....	69
3.4.2 <i>Avaliação da Cinética de Produção de Ergosterol na Biomassa Fúngica e Comparação com o Método de Medida Radial de Crescimento</i> .....	70

3.5 Modelagem matemática das curvas de crescimento de <i>B. fulva</i> e <i>N. fischeri</i> .....	71
3.5.1 Modelos Primários.....	71
3.5.2 Modelos Secundários .....	72
3.5.3 Modelagem do Crescimento Microbiano em Armazenamento Não Isotérmico.....	73
3.5.4 Análise Estatística dos Modelos.....	75
<b>CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>77</b>
4.1 Modelagem Matemática do Crescimento de <i>Byssochlamys fulva</i> e <i>Neosartorya fischeri</i> em Suco de Maçã Solidificado em Condições Isotérmicas ao longo do tempo e estabelecimento de um Modelo Global que descreve a influência da temperatura e da concentração de sólidos solúveis sobre o crescimento do fungo. ....	78
4.2 Modelagem Matemática do Crescimento de <i>Byssochlamys fulva</i> e <i>Neosartorya fischeri</i> em Suco de Maçã Solidificado em Diferentes Temperaturas de Incubação e Diferentes Concentrações de Sólidos Solúveis.....	101
4.3 Modelagem do Crescimento de <i>Byssochlamys fulva</i> e <i>Neosartorya fischeri</i> e Comparação com o Método de Medida do Diâmetro da Colônia com a Quantificação de Ergosterol.....	138
4.4 Modelagem Matemática do Crescimento de <i>Byssochlamys fulva</i> e <i>Neosartorya fischeri</i> sob Condições Não Isotérmicas .....	162
<b>CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES.....</b>	<b>195</b>
<b>CAPÍTULO 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>197</b>

## CAPÍTULO 1

### 1. INTRODUÇÃO

A região sul do Brasil é responsável por grande parte da produção nacional de maçãs, esta fruta é uma das que oferece as mais promissoras perspectivas para a industrialização. Entre os vários produtos desta fruta, o suco de maçã é o produto derivado mais popular e que apresenta grande importância comercial, além de ser fonte de diversos componentes benéficos à saúde, como os antioxidantes (LU e FOO, 2000; IBRAHIM et al., 2011).

Uma das grandes preocupações da indústria de suco de maçã está principalmente relacionada aos microrganismos toxigênicos e deteriorantes capazes de sobreviver às condições de pasteurização, uma vez que o processo de aquecimento requerido para inativá-los é também responsável por produzir mudanças sensoriais inaceitáveis. Desta forma, a investigação da microbiota dos sucos engloba o desafio de se avaliar a capacidade de sobrevivência e multiplicação de microrganismos resistentes ao calor (BAHÇECI e ACAR, 2007).

Os fungos filamentosos, na sua maioria, apresentam limitada resistência ao calor. Mas, há alguns gêneros de fungos termorresistentes cuja principal característica é a presença de ascósporos que sobrevivem aos processos usuais de pasteurização aplicados a sucos de frutas. Além disto, toleram baixas tensões de oxigênio e seu crescimento nos produtos de fruta resulta em grande degradação e perda da consistência devido à ação de enzimas pectinolíticas (SALOMÃO, 2002; UGWUANYI e OBETA, 1999). Os gêneros de bolores termorresistentes mais comumente encontrados em produtos de frutas são *Byssochlamys*, *Neosartorya*, *Talaromyces* e *Eupenicillium*.

*Byssochlamys fulva* e *Neosartorya fischeri* são os gêneros mais comumente encontrados em sucos de frutas (SALOMÃO 2009; ZIMERMANN, 2008; SANT'ANA, 2007). O fato dos gêneros *Byssochlamys* e *Neosartorya* não serem destruídos facilmente pelo calor representa um grande risco à saúde, pois estes fungos são produtores de micotoxinas como a patulina produzida por *Byssochlamys fulva*, bem como terrina e verruculogena, produzida por *Neosartorya fischeri*. Essas toxinas podem apresentar características mutagênicas, carcinogênicas e teratogênicas e, portanto, implicam em grave problema de saúde pública (MOAKE et al., 2005; SANT'ANA, 2007).

A capacidade de crescimento dos microrganismos em um meio varia com a temperatura, da cepa e da natureza do meio (pH, °Brix, tipo de meio, etc.). Assim, o estudo destes fatores no crescimento dos fungos é fundamental, uma vez que podem formar um sistema de múltipla barreira capaz de evitar ou retardar o desenvolvimento dos microrganismos. O teor de sólidos solúveis no meio pode exercer um efeito inibidor no crescimento de microrganismos porque promove um abaixamento da atividade de água e pode aumentar a viscosidade do meio. A diminuição simultânea da atividade de água e da temperatura de armazenamento exerce ação sinérgica na conservação de alimentos (BEUCHAT & RICE, 1979; NIELSEN et al., 1988). A variação de temperatura pode existir em qualquer ponto da cadeia de produção/distribuição de alimentos perecíveis e comprometer o produto, sendo que as oscilações podem ocorrer desde o carregamento até o consumo do produto em casa.

A microbiologia preditiva apresenta modelos matemáticos que descrevem o crescimento e a inativação de microrganismos, sendo, portanto, uma área de grande interesse na microbiologia de alimentos (VAN IMPE et al., 1995; LOBACZ e BARANYI, 2007; GOUGOLI et al., 2012). Vários modelos mostram o efeito da temperatura sobre os parâmetros cinéticos de crescimento de microrganismos distintos e são construídos supondo que a temperatura se mantém constante com o tempo (GIANUZZI, et al., 1998; McMEEKIN et al., 2007). Entretanto, condições como temperatura e pH do alimento, na grande maioria dos casos, não se mantêm constantes durante o armazenamento. Devido a isto, a modelagem matemática poderá ser direcionada para a obtenção de modelos em armazenamento não isotérmico, ou seja, modelos que permitam prever a vida útil dos alimentos em condições de temperatura variáveis (ROSS e McMEEKIN, 1994; SMITH-SIMPSON et al., 2007; GOUGOLI et al., 2010).

A avaliação do crescimento de fungos pela medida do diâmetro da colônia, é, provavelmente, a medida mais simples e direta para se avaliar o crescimento de fungos. Quando medidos durante vários intervalos de tempo, os diâmetros da colônia podem ser traduzidos em velocidades de crescimento, que são frequentemente lineares e têm sido amplamente utilizados em estudos verificando a influência da temperatura e da atividade de água sobre o crescimento. No entanto, o método de medida de diâmetro da colônia, como medida de biomassa fúngica, não leva em conta a densidade da colônia (GIBSON e HOCKING, 1997; PITT e MISCAMBLE, 1995; TANIWAKI et al., 2006; MARÍN et al., 2008).

Em nosso grupo de pesquisa, alguns trabalhos têm sido realizados na avaliação do crescimento de fungos termorresistentes (CUNHA, 2003; LEAL, 2007; ZIMMERMANN, 2008). Métodos de avaliação de crescimento de *Byssochlamys fulva* e de *Neosartorya fischeri* foram avaliados por Cunha (2003) em sucos naturais de abacaxi e maracujá, às temperaturas de 20 e 30°C. O autor observou que os métodos de diluição e plaqueamento apresentaram bons resultados e o modelo de Gompertz Modificado foi ajustado aos dados experimentais apresentando bons coeficientes de determinação. Leal (2007) estudou o crescimento de *B. nivea* e *N. fischeri* em suco de abacaxi e mamão, em garrafa de poli(etileno tereftalato) (PET), em diferentes temperaturas, e verificou que o método que melhor representou o crescimento microbiano foi a medida do diâmetro da colônia. Zimmermann (2008) estudou o efeito da atividade de água (0,90-0,99) e da idade dos ascósporos (30-90 dias), a 30 °C, sobre o crescimento radial de *B. nivea* e *N. fischeri* em suco de abacaxi e mamão, armazenados em garrafas de PET, utilizando o método de medida do crescimento radial das colônias. Os resultados mostraram que a idade do esporo não influencia o crescimento do microrganismo em praticamente nenhuma das condições testadas e que a variação da  $a_w$  afetou significativamente os parâmetros de crescimento. Um dos principais problemas relacionados à avaliação do crescimento de fungos nos trabalhos realizados foi relativo à metodologia de quantificação fúngica.

Ensaio químicos têm sido utilizados para medir o crescimento de fungos, sendo que substâncias como o ergosterol são comumente analisadas. O ergosterol não é encontrado de forma significativa em plantas, animais ou bactérias e é um esterol presente na maioria dos fungos (SCHWARDORF e MULLER, 1989). Assim, a sua quantificação pode ser utilizada como um indicativo da presença de fungos e da medida de acompanhamento do crescimento de fungos em alimentos (MILLER e YOUNG, 1997; MARÍN et al., 2008, TANIWAKI et al., 2006, TANIWAKI et al., 2010). Pesquisas têm mostrado que as concentrações de ergosterol aumentam em paralelo com o crescimento dos fungos (STAHL e PARKIN, 1996; FREIRE, 2006, MARÍN et al., 2008, TANIWAKI et al., 2006, TANIWAKI et al., 2010). A determinação do ergosterol na biomassa fúngica pode ser realizada por espectrofotometria de ultravioleta e infravermelho, associadas a métodos cromatográficos como camada delgada, líquida de alta eficiência e gasosa (ZHAO et al., 2005). As vantagens deste método são a alta sensibilidade, especificidade e tempo de análise relativamente curto (SEITZ et al., 1977; SCHWARDORF e MULLER, 1989). Poucos



estudos foram encontrados na literatura utilizando o conteúdo de ergosterol para quantificação fúngica; além disso, o uso da microbiologia preditiva para modelagem do crescimento de fungos termorresistentes a partir da quantificação do ergosterol também tem sido pouco estudado (MARÍN et al., 2008; TANIWAKI et al., 2006; MARÍN et al., 2005; TANIWAKI et al., 2009; MARÍN et al., 2006; TANIWAKI et al., 2001).

Neste contexto, o objetivo geral do presente trabalho foi estudar a modelagem do crescimento dos fungos termorresistentes *Byssochlamys fulva* e *Neosartorya fischeri* utilizando o método de medida do crescimento radial das colônias e o método de quantificação de ergosterol, verificando a influência da concentração de sólidos solúveis e da temperatura no crescimento isotérmico e não isotérmico destes fungos em suco de maçã solidificado. Para atingir este objetivo geral, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

➤ Estudar a influência da temperatura de armazenamento (10, 15, 20, 25 e 30 °C) e da concentração de sólidos solúveis (12, 20, 25, 35, 45, 55 e 70 °Brix, correspondendo a diferentes valores de atividade de água de 0,99, 0,98, 0,97, 0,95, 0,93, 0,88 e 0,75, respectivamente) no crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri* em suco de maçã solidificado, sob condições isotérmicas;

➤ Estabelecer um Modelo Global que inclua o efeito da temperatura e da concentração de sólidos solúveis para prever o crescimento destes fungos, dentro da faixa estudada;

➤ Comparar os modelos de Gompertz Modificado, Baranyi e Roberts e Baranyi e Roberts simplificado (sem considerar a fase estacionária de crescimento), verificando a influência de dois fatores: temperatura e teor de sólidos solúveis (modelos secundários) sobre o crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri* em suco de maçã solidificado, e avaliar a capacidade destes modelos para descrever o crescimento do diâmetro da colônia;

➤ Determinar o conteúdo de ergosterol em suco de maçã solidificado, ao longo do tempo, durante o crescimento dos fungos;

➤ Modelar o crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri* e estabelecer uma correlação entre o crescimento do diâmetro da colônia e a evolução do conteúdo de ergosterol;

➤ Estabelecer um modelo para prever o crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri* em condições não isotérmicas, a partir do modelo primário e dos modelos secundários obtidos em condições isotérmicas, através da medida do diâmetro da colônia e do conteúdo de ergosterol;



➤ Validar o modelo não isotérmico proposto para prever o crescimento dos fungos pela quantificação do diâmetro da colônia e do conteúdo de ergosterol com a realização de experimentos com *B. fulva* e *N. fischeri* em suco de maçã solidificado sob condições de temperatura variáveis.

O presente trabalho está estruturado em capítulos, sendo que neste Capítulo 1 é apresentada a Introdução. A Revisão da Literatura, apresentada no Capítulo 2, aborda os assuntos referentes ao tema proposto neste trabalho. No Capítulo 3, estão descritos o Material e Métodos utilizados no desenvolvimento do trabalho. Os Resultados e as discussões estão apresentados no Capítulo 4, que está estruturado sob a forma de artigos, sendo que o Artigo 1 foi desenvolvido na Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa (ESB/UCP) – Porto – Portugal, sob co-orientação das professoras Cristina Luisa Miranda Silva e Teresa Brandão, durante o estágio realizado através do Programa Institucional de Bolsas de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE). Os Artigos 2, 3 e 4 foram desenvolvidos no Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). No Capítulo 5 estão apresentadas as Conclusões e no Capítulo 6 são apresentadas as Referências Bibliográficas utilizadas para elaboração deste trabalho.



## CAPÍTULO 2

### 2. REVISÃO DA LITERATURA

#### 2.1. Produção de Maçã e Suco de Maçã

A produção de maçãs está presente em todos os continentes, sendo que no ano de 2009 a produção mundial de maçãs foi de aproximadamente 72 milhões de toneladas, tendo como principais países produtores a China, os Estados Unidos, a Polônia, o Irã, a Turquia e a Itália. Do total da maçã produzida, 70 % destinam-se ao consumo *in natura* e 30 % para a indústria, sendo que metade desta quantidade é utilizada para a fabricação de diversos tipos de suco e o restante para outros produtos, tais como: purê de maçã, chips de maçã, pratos prontos, entre outros destinos (BRDE, 2011).

A maçã é a terceira fruta mais consumida pelos brasileiros, ficando atrás apenas da banana e das frutas cítricas (IBGE, 2010). O consumo no Brasil é sobretudo de frutas de pequeno e médio calibre, diferente do calibre exportado, que é de frutas grandes, sendo que os picos de consumo ocorrem quando o preço apresenta queda. Um dos desafios no âmbito da cadeia produtiva é a ampliação do consumo *per capita* da fruta *in natura* e de seus diversos derivados. Segundo o Instituto Brasileiro de Frutas (IBRAF) (2004) o consumo de fruta *in natura* no Brasil é da ordem de 57 kg/ano, razão que se mantém abaixo da recomendação da Organização Mundial da Saúde (OMS), que sugere um consumo de 146 kg de frutas/ano. O consumo brasileiro de bebidas prontas também apresenta potencial de crescimento; enquanto que o consumo nacional é da ordem de 3 litros per capita, os países europeus apresentam um consumo médio de 24 litros per capita.

A região sul do Brasil é responsável por mais de 95 % de toda a produção nacional de maçãs. O estado de Santa Catarina permanece na liderança do *ranking* nacional, sendo responsável, de acordo com os dados de 2011/2012, por aproximadamente 49 % da produção total, seguido por Rio Grande do Sul, com 46 %. A safra catarinense de maçã em 2012 atingiu uma produção de aproximadamente 660 mil toneladas (CEPA, 2013; IBGE, 2012). Em Santa Catarina, a produção centraliza-se ao redor dos municípios de Friburgo e São Joaquim, e do município gaúcho de Vacaria (TOGNON e CABRAL, 2008). De acordo com a finalidade, as maçãs são classificadas em comerciais ou industriais. As maçãs comerciais são as maçãs consumidas frescas (*in natura*), que

devem atender aos rígidos padrões de qualidade, e, aquelas que não possuem o padrão comercial, são destinadas à industrialização.

O suco concentrado é o principal produto derivado da maçã, sendo que cerca de mais de 90 % da produção brasileira deste é exportada para os Estados Unidos, onde são elaborados sucos de maçã (através da reconstituição) e produtos infantis, cuja matéria-prima se constitui de cultivares de mesa com baixos teores de ácidos e taninos e elevados teores de açúcares, com corpo de boa aceitação sensorial (NOGUEIRA ET al., 2007). Entre janeiro e maio de 2012 foram consumidos aproximadamente 352,1 milhões de litros de sucos prontos para beber no Brasil, sendo que o mercado cresceu cerca de 16 % nos últimos dois anos. Nos Estados Unidos, o consumo *per capita* de suco pronto é de 175 copos por ano, enquanto no Brasil esse número é de apenas 50 (SOARES, 2012; ACNIELSEN, 2011).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através da Instrução Normativa nº 01, de 07 de janeiro de 2000 (BRASIL, 2000), define o suco de maçã como bebida não fermentada, obtida da parte comestível da maçã (*Malus domestica*) através de processo tecnológico adequado. A bebida deve possuir cor translúcida, sabor e aroma característico. Com relação à composição físico-química, o suco de maçã deve ter um teor de sólidos solúveis mínimo de 10,5 °Brix, a 20 °C; acidez total, expressa em ácido málico, mínima de 0,15 g/100 g; açúcares totais naturais da maçã, máximo de 13,5 g/100 g e acidez volátil, em ácido acético, máxima de 0,04 g/100 g.

O suco de maçã pode ser processado e comercializado de muitas formas. O suco fresco ou *sweet cider* é considerado o produto da fruta sã, madura e que foi prensada e engarrafada ou embalada sem a utilização de nenhuma forma de preservação, a não ser a refrigeração. Este tipo de suco é muito comum nos Estados Unidos e é normalmente comercializado em pequenas lojas ou mercados não muito distante dos locais de produção. O suco de maçã fermentado é conhecido como “sidra”. O suco de maçã durante sua vida útil tem sido tratado por diferentes métodos de conservação e pode ser apresentado de diferentes formas: suco clarificado, suco não clarificado, suco concentrado congelado (clarificado ou não, com aproximadamente 42 °Brix) e suco concentrado de alto teor de sólidos solúveis (70 °Brix). Nos Estados Unidos, o tipo mais popular do suco de maçã é o clarificado (ROOT e BARRET, 2005). No Brasil, apesar do consumo ser ainda pequeno, em torno de 3 litros per capita, a grande maioria das empresas produtoras fabricam o suco não clarificado (SANT’ANA, 2007).

De acordo com Sant'Ana (2007), o suco pasteurizado de maçã pronto para beber pode ser obtido ou a partir das frutas recém processadas ou a partir da reconstituição do suco concentrado até o teor de sólidos solúveis desejado. A etapa de formulação é utilizada na fabricação dos néctares, os quais têm em sua formulação uma mistura de suco, açúcar e água, além de antioxidantes, como ácido ascórbico e acidulantes, como ácido cítrico (BRASIL, 1988) e é realizada a partir do suco recém extraído ou do suco concentrado (CODEX, 2005). Na fabricação do suco de maçã, o suco concentrado é diluído com água e aroma de maçã é adicionado na mistura final para evitar perdas por evaporação (LEA, 1990). Posteriormente, o suco é desaerado para prevenir o escurecimento devido à reação do O<sub>2</sub> dissolvido com o ácido ascórbico (RUTLEDGE, 1996), sendo comumente pasteurizados em temperaturas entre 90-98 °C por poucos segundos. Após o resfriamento, o suco pode ser envasado em embalagens de papel cartonado, garrafas plásticas ou de vidro, sendo estas estocadas e comercializadas usualmente à temperatura ambiente.

Segundo Fioravanzo e Lazzarotto (2012), o consumidor, além de buscar frutas com elevada qualidade organoléptica e com os demais atributos de qualidade (aparência, uniformidade, tamanho, etc.), vem dando maior atenção a aspectos diretamente relacionados à saúde. Nesse sentido, a composição nutricional, as propriedades nutracêuticas e a segurança (ausência de resíduos químicos ou contaminantes bióticos) constituem atributos cada vez mais valorizados. A comprovada relação entre o aumento da ocorrência de determinadas enfermidades, como as doenças cardiovasculares, o diabetes tipo 2, a hipertensão, a osteoporose e certos tipos de câncer, e o baixo consumo de frutas e hortaliças assume papel decisivo na compra desses produtos.

Além dos benefícios à saúde, a maçã é uma das frutas que melhor se encaixa no estilo de vida atual, pois para ser consumida, não exige ser preparada ou descascada, apenas higienizada. Entretanto, para o consumo *in natura* ou processada, é imprescindível que a fruta esteja livre de contaminantes bióticos ou abióticos capazes de afetar a saúde dos consumidores. Muitos fatores podem contribuir para a presença de microrganismos em frutas frescas ou processadas, como: uso de água contaminada nos processos de produção e beneficiamento; baixa eficiência dos sistemas de desinfecção usados nos *packing houses*; higiene dos operários e dos materiais utilizados na manipulação e no acondicionamento das frutas; condições de higiene durante os processos de empacotamento e armazenamento; o processamento térmico adotado, entre outros (BRDE, 2011).

Uma das principais preocupações da indústria de suco de maçã está relacionada com microrganismos deteriorantes que produzem toxinas resistentes ao calor. As temperaturas necessárias para um processo de pasteurização eficaz, a partir do ponto de vista microbiológico, podem também produzir alterações organolépticas indesejáveis. Assim, a investigação sobre a flora microbiana de sucos inclui o desafio de avaliar a capacidade de sobrevivência e multiplicação dos microrganismos resistentes ao calor (BAHÇECI e ACAR, 2007).

## 2.2 Contaminantes do Suco de Maçã

As maçãs são suscetíveis a desordens e injúrias que tornam o fruto mais sensível ao ataque de fungos. Os fungos termorresistentes produzem esporos resistentes (ascósporos) que permite que eles sobrevivam à exposição das temperaturas utilizadas durante o processo de pasteurização (TOURNAS, 1994; PIECKOVÁ et al., 1994). Muitos relatos mostram que estes fungos são capazes de sobreviver a temperaturas superiores a 90-95°C por cerca de 20 minutos, dependendo da espécie ou do meio de aquecimento (SALOMÃO et al., 2008; SALOMÃO et al., 2007, KOTZEKIDOU, 1997).

A deterioração por estes fungos geralmente caracteriza-se pelo crescimento visível do mesmo, produção de odor desagradável, sabor ácido, formação de gás, desintegração das frutas e solubilização da pectina por enzimas pectinolíticas, gerando a separação de fases dos sucos (SALOMÃO, 2002; SPLITTSTOESSER, 1991).

De acordo com Panagou et al. (2010), algumas características dos fungos termorresistentes os tornam microrganismos deteriorantes de interesse em produtos de frutas, enlatados e pasteurizados, tais como: crescerem em ambientes com baixa pressão parcial de oxigênio e acidificados; serem capazes de produzir enzimas pectinolíticas, resultando em mudanças na textura de frutas sobre as quais se desenvolvem; poderem produzir micotoxinas, como a patulina, bissotoxina A e ácido bissoclâmico; terem esporos resistentes ao processamento térmico normalmente aplicado na indústria de suco de frutas.

Fungos capazes de produzir esporos termorresistentes estão amplamente distribuídos no meio ambiente, em especial no solo. Frequentemente, são encontrados em frutas frescas, principalmente aquelas que se desenvolvem em contato com o solo (CHAPMAN et al., 2007; VALÍK, PIECKOVÁ, 2001; PITT e HOCKING, 1999). Devido a



essa característica, fungos termorresistentes são agentes deteriorantes em sucos de frutas ou produtos à base de frutas, mesmo aqueles tratados termicamente.

Os ascósporos dos fungos termorresistentes apresentam-se em um estado de dormência e necessitam ser ativados para germinarem. A ativação dos ascósporos dormentes se dá pela aplicação de um choque térmico (TOURNAS, 1994). Assim, durante a pasteurização dos sucos de frutas, os ascósporos destes fungos são ativados em um meio repleto de nutrientes, o que leva à germinação com conseqüente crescimento e deterioração dos produtos durante a estocagem (HOCKING e PITT, 1984).

As espécies de fungos termorresistentes mais comumente isoladas e/ou associadas à deterioração de alimentos pertencem aos gêneros *Byssochlamys*, *Neosartorya*, *Talaromyces*, *Eupenicillium* (HOCKING et al., 2001; KOTZEKIDOU, 1997).

A grande preocupação com fungos termorresistentes em frutas e seus derivados, além da elevada termorresistência em produtos ácidos, se deve ao fato de alguns gêneros como *Byssochlamys* e *Neosartorya* serem capazes de crescer sob baixas concentrações de oxigênio (como as encontradas em embalagens cartonadas) (PANAGOU et al., 2010; HOCKING e PITT, 1984), deteriorando o produto. Todavia, é importante considerar que algumas vezes a extensão do crescimento destes microrganismos é tão limitada, que colônias ou material micelial podem não ser detectados visualmente (SPLISTTOESSER, 1991). Nesse caso, a comprovação dos causadores da deterioração pode ser feita por meio da detecção e enumeração de fungos termorresistentes usando metodologia apropriada. Outro ponto importante é a capacidade de algumas espécies serem capazes de produzir micotoxinas, como patulina, ácido bissoclâmico, bissotoxina A, assimetrina, variotina, fumitremorginas A e C, verrucológeno, fischerina e eupenifeldina (TANIWAKI et al., 2010; SALOMÃO, 2009; TOURNAS, 1994).

Valík e Piecková (2001) mostraram que dentre as três espécies de fungos termorresistentes pesquisadas por estes autores – *N. fischeri*, *T. avellaneus* e *B. fulva* – essa última apresentou velocidade de crescimento de 20,2 mm/dia, em condições ótimas. Para as outras espécies, a máxima velocidade de crescimento foi de, aproximadamente, 13 mm/dia. Esse trabalho mostrou ainda que, em produtos com atividade de água próximo a 0,99, o tempo necessário para que apareçam as primeiras colônias de fungo em produto contaminado é em torno de 28 horas. Isto representa um curto tempo de vida útil para o alimento, em tais condições, quando contaminado com esporos desses

fungos. Neste sentido, avaliar o efeito de fatores ambientais sobre a resposta de crescimento desses fungos torna-se um aspecto importante para controlar seu desenvolvimento e estender o tempo de vida útil de produtos alimentícios.

### 2.2.1 *Byssochlamys fulva*

As espécies de *Byssochlamys fulva* e *Byssochlamys nivea* são significantes na deterioração dos alimentos (SANT'ANA, 2007; BEUCHAT e RICE, 1979). O primeiro caso de deterioração de alimentos associados a fungos termorresistentes foi registrado na literatura na Inglaterra na década de 30, cujo agente causador foi *B. fulva* (TOURNAS, 1994).

O gênero *Byssochlamys* é caracterizado pela ausência de cleistotécio, gimnotécio ou quaisquer estruturas de proteção de seus ascos durante o desenvolvimento e maturação. Os ascos livres deste gênero são produzidos em cachos irregulares e abertos. O estágio anamorfo deste gênero é conhecido como *Paecilomyces*, sendo *Paecilomyces fulvus* a fase imperfeita do *B. fulva*. As colônias de *B. fulva* apresentam coloração oliva a marrom e reverso de cor similar ou pálido em Ágar Extrato de Malte (MEA) ou Ágar Czapeck Extrato de Levedura (CYA), podendo apresentar filamentos brancos em meio CYA (PITT e HOCKING, 1999).

Macroscopicamente, as colônias de *B. fulva* têm ao menos 60 mm de diâmetro em MEA e CYA, frequentemente cobrindo toda a placa de Petri. As colônias são relativamente esparsas, baixas ou flocosas.

Microscopicamente, *B. fulva* forma ascos a partir de hifas brancas retorcidas, não estando, no entanto, envelopadas por elas. Os ascos são melhor desenvolvidos a 30 °C, maturando em 7-12 dias, sendo formados ocasionalmente a 25 °C em isolados recentes, mas maturando vagarosamente. Os ascos apresentam-se de forma esférica a subsféricas, com 9-12 µm de diâmetro e os ascósporos são elipsoidais, com 5-7 µm de comprimento com paredes lisas. Penicílios são as estruturas reprodutivas anamórficas, melhor observadas a 25 °C, nascidas de hifas superficiais ou de hifas aéreas longas. As estipes têm comprimento entre 10 e 30 µm e as fiálides com comprimento entre 12-20 µm, possuem aparência não uniforme, estreitando-se gradualmente até os ápices. Os conídios com paredes lisas são principalmente cilíndricos ou em formato de barril, usualmente estreitos e com comprimento entre 7-10 µm, mas algumas vezes mais longos e largos ou elipsoidais a partir de fiálides individuais. Microscopicamente *B. fulva* pode ser diferenciado de *P. variotii* por produzir conídios elipsoidais ao



invés de cilíndricos (SALOMÃO, 2009; SANT'ANA, 2007; PITT e HOCKING, 1999; BEUCHAT e RICE, 1979).

De acordo com Olliver e Rendle (1934), com relação ao teor de sólidos, a máxima concentração de sacarose tolerada por *Byssochlamys* encontra-se na faixa de 60 a 65 %, sendo a faixa ótima para crescimento próxima aos 10 %. A produção dos ascos ocorre com concentrações de sacarose entre 5 e 20 %, sendo concentrações acima de 30 % inibitórias para a produção dos ascos.

A espécie *Byssochlamys* apresenta temperatura ótima de crescimento entre 30 °C e 37 °C, não havendo crescimento abaixo de 7 °C (ROLAND e BEUCHAT, 1984; OLLIVER e RENDLE, 1934). A influência da temperatura sobre a atividade de água mínima para crescimento de *Byssochlamys* foi demonstrada por Roland e Beuchat (1984). Os autores observaram que a atividade de água mínima para crescimento do microrganismo em xaropes de maçã foi de 0,915, 0,886 e 0,871 a 21 °C, 30 °C e 37 °C, respectivamente. Tournas (1994) descreveu uma faixa de pH para crescimento de *Byssochlamys* entre 2,0 e 9,0, sendo que o pH ótimo para crescimento está em torno de 3,0 o que torna a manipulação do pH como alternativa para restrição do crescimento do microrganismo inviável.

Sant'Ana et al. (2010a) demonstraram que *B. fulva* IOC 4518 foi determinada como a cepa mais termoresistente, sobrevivendo ao choque térmico de 95 °C por 5 min, sendo capaz de produzir patulina em suco de maçã, atingindo concentrações de até 220 µg/kg, quando o limite máximo tolerável estabelecido pelo *Codex Alimentarius* e FDA (*Food and Drug Administration*) é 50 µg/kg. Além da termorresistência de seus esporos, a capacidade de produzir micotoxinas também torna este microrganismo de especial interesse na indústria de processamento de frutas.

Panagou et. al (2010) estudaram o efeito da temperatura (10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C) e da atividade de água (0,88, 0,90, 0,92, 0,94, 0,96 e 0,99) sobre o crescimento de *Byssochlamys fulva* e *Byssochlamys nivea* em meio sintético e verificaram que tanto a temperatura quanto a atividade de água apresentaram influência no crescimento de ambas as espécies estudadas, sendo que as maiores temperaturas de crescimento e os valores mais elevados de  $a_w$  apresentaram um maior crescimento para *B. fulva*. Não foi observado nenhum crescimento na  $a_w$  0,88, independentemente da temperatura estudada.

Estudos realizados por Sant'Ana et al. (2010b) mostraram a capacidade de deterioração do *B. fulva* em suco de maçã clarificado. De acordo com os resultados obtidos por esses pesquisadores, a presença de

5 esporos/100 mL gerou contaminação em mais de 90 % das garrafas contendo esse suco, em 100 horas, quando armazenadas a temperatura de 30 °C.

Em trabalho desenvolvido por Kotzekidou (1997) revelou-se que esporos de determinada cepa de *B. fulva* foram capazes de tolerar o tratamento térmico de 90 °C/20 minutos em suco de tomate. O estudo concluiu, ainda, que a presença de açúcares no meio utilizado para o tratamento térmico tem efeito protetor para os esporos.

### 2.2.2 *Neosartorya fischeri*

*Neosartorya fischeri* é um ascomiceto que produz cleistotécios com parede celular e ascósporos transparentes a brancos, não amarelados. Esta espécie produz vesículas pequenas e piriformes que aumentam à medida que se aproximam dos ápices. Todas as espécies conhecidas até o momento (um total de dez) são termodúricas (SANT'ANA, 2007).

O gênero *Neosartorya* apresenta ascos recobertos por cleistotécio, dando à colônia uma aparência granular. Estes ascos podem sofrer ruptura instantânea de modo que só os ascósporos livres são observados (ZIMMERMANN et al., 2011; UGWUANYI e OBETA, 1991; NIELSEN, 1991; KAVANAGH et al., 1963). As colônias em MEA são de coloração branca-creme e o reverso varia de amarelo a rosa-pálido ou marrom. Sua fase anamorfa é identificada como *Aspergillus fischeri* (PITT e HOCKING, 1999; TOURNAS, 1994).

Algumas linhagens de *N. fischeri* são capazes de produzir terrina (MISAWA et al., 1962), fumitremorginas A e B (HOIRE e YAHMAZAKI, 1981) e verruculogena (PATTERSON et al., 1981). Estas toxinas agem no sistema nervoso central causando tremores, convulsões e a morte de animais (PERERA et al., 1982; YAMAZAKI, et al., 1979; YAMAZAKI, et al., 1971).

Pitt e Hocking (1999) constataram que a temperatura ótima de crescimento de *N. fischeri* está na faixa de 25 a 37 °C, não apresentando crescimento a 5 °C. *N. fischeri* cresce em pH ente 3 e 7,95. A atividade de água mínima para crescimento de *N. fischeri* é de 0,915 na temperatura de 25 °C (BAGLIONI, 1998). Zimmermann et al. (2011) estudaram a influência da  $a_w$  (0,99 a 0,90) e da idade de formação dos esporos de *Neosartorya fischeri*, em suco de abacaxi à temperatura de 30 °C e verificaram que a idade de formação do esporo não influenciou no crescimento em praticamente nenhuma das condições testadas e que o fator  $a_w$  foi significativo na grande maioria dos casos.

De acordo com Salomão et al. (2008), *Neosartorya fischeri* foi selecionado como o fungo mais termorresistente e de maior importância

comercial, uma vez que foi isolado de concentrado de maçã e sobreviveu ao choque térmico de 95 °C/20 minutos, cujo binômio (tempo/temperatura) é bastante superior aos tratamentos de pasteurização aplicados a produtos de maçã (95 °C/30 segundos).

Atmosferas com níveis de oxigênio que impedem o desenvolvimento de fungos termorresistentes (*B. fulva* e *B. nivea*) não são letais para estes microrganismos, uma vez que, se forem expostos ao ar após estarem submetidos ao oxigênio limitado durante certo tempo, desenvolvem colônias normalmente (TANIWAKI et al., 2010).

### 2.3. Determinação do Crescimento de Fungos

Os fungos filamentosos são responsáveis pela deterioração de alguns alimentos e produção de micotoxinas. É importante ter-se métodos adequados para medir o crescimento desses microrganismos. O crescimento de fungos filamentosos não é tão fácil de quantificar, pois, ao contrário de bactérias e leveduras, os fungos filamentosos não crescem como células únicas, mas como hifas filamentosas que não podem ser quantificadas pela técnica de enumeração normalmente aplicada para quantificar bactérias e leveduras. As hifas fúngicas podem penetrar em substratos sólidos, como alimentos, tornando difícil a sua extração. Além disso, os fungos se diferenciam por produzir esporos, resultando em grandes aumentos na contagem de viáveis muitas vezes com pouca relação com a biomassa (PITT e HOCKING, 2009; TANIWAKI et al., 2006; PITT e HOCKING, 1997; PITT, 1984).

Alguns métodos foram desenvolvidos para quantificar o crescimento de fungos e os seus princípios e aplicações foram bem revisados (HARTOG e NOTERMANS, 1988; NEWELL, 1992; SAMSON et al., 1992; de RUITER et al., 1993; PITT e HOCKING, 1997). O método mais utilizado é a contagem de viáveis, uma técnica derivada de bacteriologia de alimentos. Para avaliar o crescimento de fungos, este método apresenta alguns inconvenientes, pois geralmente reflete o número de esporos em vez da biomassa (TANIWAKI et al., 2006; PITT, 1984).

A estimativa do peso seco do micélio é um método comumente utilizado para avaliar o crescimento de fungos ou a biomassa fúngica. Este método é utilizado para avaliar o crescimento em sistemas líquidos, tais como fermentadores, no entanto, a medida do peso seco do micélio apresenta baixa sensibilidade e é destrutiva. Outra abordagem, a medição do comprimento de hifas, apresenta a vantagem de medir o

crescimento, mas é particularmente trabalhosa. Entretanto, nenhum destes métodos pode ser adequadamente usado para estimar a biomassa fúngica em alimentos (TANIWAKI et al., 2006).

Outro método utilizado é a medição do diâmetro das colônias (BRANCATO e GOLDING, 1953). A velocidade de crescimento radial é uma medida intrínseca de cada espécie de fungo filamentosos, em determinadas condições. Ocorre a formação do micélio vegetativo em condições favoráveis para tal, seguido do desenvolvimento de hifas, caracterizando o crescimento do fungo. O diâmetro das colônias pode ser traduzido em taxas de crescimento, quando medido ao longo do tempo, apresentando muitas vezes, um comportamento linear (PITT e HOCKING, 1997). Este método é amplamente utilizado em estudos de atividade de água (PITT e MISCABLE, 1995) e para modelagem do crescimento de fungos (GIBSON et al., 1994; MARÍN et al., 2008; GARCIA et al., 2009; ZIMMERMANN et al., 2011; BAERT et al., 2007; BAHÇECI e ACAR, 2007; GIBSON et al., 1994; PANAGOU et al., 2010), entretanto não leva em conta a densidade da colônia (TANIWAKI et al., 2006).

Os ensaios químicos também têm sido utilizados para medir o crescimento de fungos. As duas substâncias usualmente analisadas são quitina e ergosterol. O ensaio de quitina apresenta desvantagens como falta de sensibilidade, ser demorado e estar sujeito a interferência por fragmentos de insetos (TANIWAKI et al., 2006; PITT e HOCKING, 1997). O ergosterol é o esteroide dominante na maioria dos fungos (WEETE, 1974) e não é encontrado em quantidade significativa em plantas, animais ou bactérias. Assim, a sua medição pode ser utilizada como um índice da presença de fungos (MARÍN et al., 2008; TANIWAKI et al., 2006; MARÍN et al., 2005; TANIWAKI et al., 2009; MARÍN et al., 2006; TANIWAKI et al., 2001; DHINGRA et al., 2009; GAWRYSIAK-WITULSKA et al., 2008; KADAKAL et al., 2005). As vantagens deste método são a elevada sensibilidade, a especificidade e a análise em tempo relativamente curto (TANIWAKI et al., 2006; MILLER e YOUNG, 1997; SCHWARDORF e MULLER, 1989; SEITZ et al., 1977).

O ajuste adequado de variáveis operacionais durante o processamento e o armazenamento de alimentos é fundamental para minimizar a ação e o crescimento dos fungos. Neste aspecto, a microbiologia preditiva surge como uma ferramenta útil, pois com ela é possível simular diversas condições de operação e verificar rapidamente seus efeitos sobre o crescimento microbiano. A microbiologia preditiva se baseia em dados quantitativos sobre o impacto de diferentes fatores

sobre o crescimento de fungos e germinação de esporos de fungos (GOUGOLI et al., 2011; DANTIGNY et al., 2005; DANTIGNY, 2004).

O crescimento dos fungos é influenciado por diversos fatores ambientais. No entanto, os principais determinantes de crescimento fúngico são atividade de água ( $a_w$ ) e temperatura (MOUSA et al., 2013; PARDO et al., 2006; DANTIGNY et al., 2005). Um número cada vez maior de modelos preditivos para o crescimento de fungos vem sendo desenvolvido (GARCIA et al., 2011; GOUGOLI e KOUTSOUMANIS, 2010; CUPPERS et al., 1997; MARIN et al., 2009; NEVAREZ et al., 2009; PANAGOU et al., 2003; SAMAPUNDO et al., 2005a). A maioria destes modelos estuda o efeito simples ou combinado da temperatura,  $a_w$  e outros fatores ambientais sobre o crescimento do micélio através de um número elevado de esporos inoculados (GOUGOLI et al., 2011).

### *2.3.1 Medida do Diâmetro da Colônia*

A modelagem preditiva do crescimento de fungos filamentosos não tem recebido tanta atenção quanto o crescimento bacteriano, provavelmente devido à complexidade de se quantificar o crescimento destes fungos (BARANYI et al., 1996). Contrariamente às bactérias, que se reproduzem por cissiparidade e cujo crescimento normalmente ocorre apenas na superfície de meios sólidos ou de forma homogênea através de um meio líquido, as hifas produzidas pelos fungos podem penetrar nos alimentos em três dimensões (SAMAPUNDO et al., 2005).

O método de medida do diâmetro da colônia, expresso em milímetro (GARCIA et al., 2013; ZIMMERMANN et al., 2011; GARCIA et al., 2009; MARÍN et al., 2008; TANIWAKI et al., 2006; DANTIGNY et al., 2006; DANTIGNY et al., 2005), quando medido em diferentes intervalos de tempo, os diâmetros da colônia podem ser traduzidos em velocidades de crescimento (mm/h ou mm/dia) e têm sido amplamente utilizados para verificar a influência da  $a_w$  e da temperatura no crescimento de fungos (GARCIA et al., 2013; ZIMMERMANN et al., 2011; PANAGOU et al., 2010; BAERT et al., 2007; BAHÇECI e ACAR, 2007; GIBSON et al., 1994). Entretanto, o diâmetro da colônia, como medida de biomassa fúngica, não leva em conta a densidade da colônia (TANIWAKI et al., 2006; GIBSON e HOCKING, 1997).

As hifas de fungos podem penetrar em substratos sólidos, como alimentos, tornando difícil a sua extração (PITT, 1984). A medida do



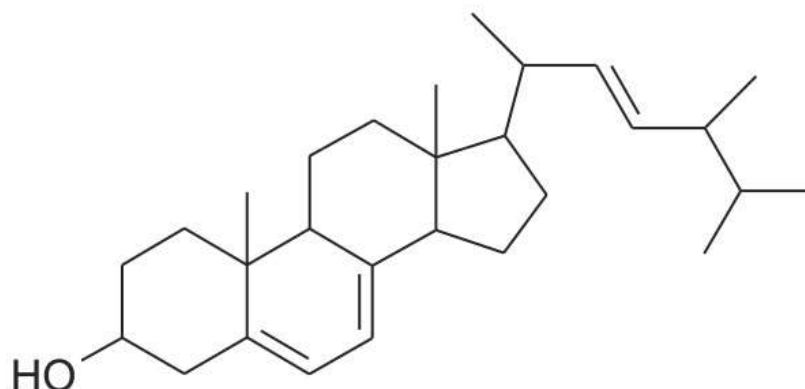
diâmetro das colônias, embora seja facilmente aplicada, é difícil de ser medida em substratos alimentares reais (GARCIA et al., 2013).

### 2.3.2 Teor de Ergosterol

O ergosterol é o esterol mais abundante na maior parte dos fungos (WEETE, 1989). Este composto é restrito a um grupo taxonomica e ecologicamente bem definido de organismos, sendo, principalmente, um componente da membrana. Ele pode ser um indicativo do conteúdo citoplasmático de células metabolicamente ativas, portanto, basicamente um indicador de células fúngicas vivas (PITT e HOCKING, 2009; GAWRYSIK-WITULSKA et al., 2008; PRONYK et al., 2006; MARÍN et al., 2005; MONTGOMERY et al., 2000; NEWELL, 1992; KUHN et al., 1990; SEITZ et al., 1977).

A estrutura do ergosterol é mostrada na Figura 2.1. O ergosterol possui duas insaturações em um dos anéis e uma insaturação na cadeia lateral.

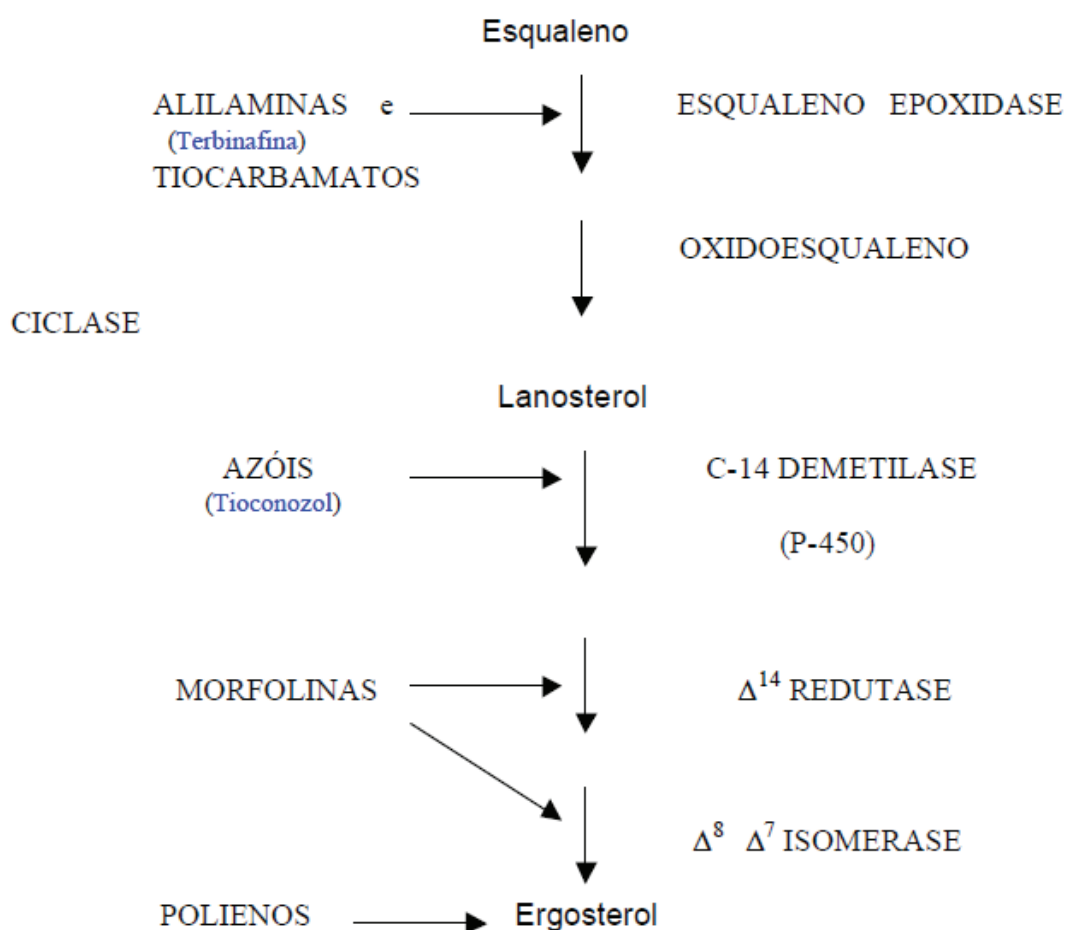
Figura 2.5 Estrutura molecular do ergosterol. Fonte: CARVALHO, 2004.



Os esteróis são derivados de terpenos, dentro de uma grande família química de terpenóides; tais compostos são numerosos e amplamente distribuídos em eucariotos. Alguns esteróis são conhecidos por terem papel essencial no crescimento, desenvolvimento, metabolismo e integridade das células. Os esteróis estão localizados na membrana celular, conferindo estabilidade e controlando a permeabilidade. Nos fungos, o ergosterol, sintetizado a partir do acetil-CoA, é o principal esterol, e apresenta papel essencial na manutenção das funções da membrana celular, e uma redução em sua disponibilidade pode vir a romper a integridade da membrana (FORCELINI et al.,

2001). A Figura 2.2 mostra a representação esquemática da via metabólica da biossíntese do ergosterol.

Figura 2.6 Representação esquemática da via metabólica da biossíntese do ergosterol e os sítios de ação de seus principais inibidores. Fonte: FERRAZ (2005).



Como o ergosterol é um importante componente nas células fúngicas, detecções analíticas podem se tornar eficientes para quantificar o crescimento fúngico. A análise de ergosterol é proposta como medida de acompanhamento do crescimento de fungos em meio sólido (MARÍN et al., 2008, TANIWAKI et al., 2006; MARÍN et al., 2005; TANIWAKI et al., 2009) e em alimentos (DHINGRA et al., 2009; GAWRYSIAK-WITULSKA et al., 2008; MARÍN et al., 2006, KADAKAL et al., 2005; TANIWAKI et al., 2001). No entanto, o conteúdo de ergosterol varia com a fase do crescimento do fungo e também pode variar entre as espécies. Alguns trabalhos têm mostrado que o teor de ergosterol é maior em micélios jovens do que em micélio na fase estacionária (NEWELL et al., 1987; HUNG et al., 1985). Outros fatores como

velocidade de crescimento, disponibilidade de nutrientes e carbono, temperatura e composição gasosa, podem afetar o conteúdo de ergosterol micelial (TANIWAKI et al. 2010; TANIWAKI et al., 2009; MONTGOMERY et al., 2000).

Diferentes métodos de extração do ergosterol estão apresentados na literatura. Mas, de uma forma geral, os métodos baseiam-se em extrair os lipídeos de uma amostra com metanol em refluxo, saponificar a amostra com solução de hidróxido de potássio e fazer uma nova extração com um solvente apolar, como o hexano (MONTGOMERY et al., 2000; SEITZ et al. 1979). Após a extração, a análise do ergosterol é feita geralmente por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) com detector de UV visível, com comprimento de onda de 282 nm.

Em um dos poucos modelos dedicados para descrever a produção de metabólitos secundários, como uma função da biomassa, Pitt (1984) assume que estes metabólitos foram produzidos simultaneamente com o crescimento, sendo que sua taxa de produção pode ser considerada proporcional à taxa de crescimento.

## 2.4 Microbiologia Preditiva

O desenvolvimento de novas ferramentas na microbiologia de alimentos se faz necessário visto que envolve o contínuo progresso da ciência e da tecnologia na preservação dos alimentos. Neste contexto, a necessidade de garantir a segurança microbiológica e a qualidade dos alimentos tem estimulado a aplicação das ferramentas da microbiologia preditiva (NAKASHIMA et al., 2000). No campo da pesquisa, que basicamente se concentra no desenvolvimento de modelos matemáticos para descrever o crescimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes em alimentos, tem havido um interesse crescente na aplicação desta ferramenta (ANTWI et al., 2008), cujo seu objetivo é desenvolver modelos capazes de descrever a resposta de bactérias e fungos (crescimento/inativação) frente às mudanças em condições intrínsecas e extrínsecas de produtos alimentícios.

A microbiologia preditiva tem recebido significativa atenção científica nos últimos anos, fornecendo base de dados e pacotes de *softwares* que podem ser ferramentas úteis na análise de riscos. O estudo da microbiologia preditiva fornece informações sobre o comportamento de microrganismos sob diferentes condições químicas, físicas e físico-químicas, tais como temperatura,  $a_w$ , pH ou teor de sólidos solúveis. Isto pode ajudar a identificar os pontos críticos da produção e dos processos de distribuição e auxiliar na elaboração de planos de Análise de Perigos



e Pontos Críticos de Controle (APPCC) (McMEEKIN e ROSS, 2002; BRUL et al., 2008; VELOGUTI et al., 2010).

A complexidade do sistema microrganismo/alimento e a interação microrganismo/microrganismo são fatores que limitam as aplicações da microbiologia preditiva. Segundo Ross e McMeekin (1994), no alimento há diversos microrganismos se desenvolvendo simultaneamente e a presença de um pode interferir no crescimento de outro. Outra limitação apontada por esses pesquisadores diz respeito ao fato de que em um alimento as condições ambientais são dinâmicas, principalmente no que se refere à temperatura do meio, enquanto os modelos preditivos são obtidos em condições estáticas.

Marín et al. (2008) afirmaram que a natureza não patogênica dos fungos e a falta de bons métodos para avaliar seu crescimento são os fatores responsáveis pelo pouco interesse das pesquisas de microbiologia preditiva a respeito desses microrganismos.

Os modelos matemáticos usados na microbiologia preditiva podem ser divididos principalmente em modelos primários e secundários, os modelos primários descrevem o comportamento do microrganismo ao longo do tempo e os secundários descrevem como os parâmetros obtidos nos modelos primários se comportam com a variação de um parâmetro ambiental (temperatura, pH,  $a_w$ ). Nos últimos anos, a modelagem matemática está orientada para obtenção de modelos dinâmicos, ou seja, modelos que permitam prever a segurança ou vida útil dos alimentos sob condições que variam com o tempo, principalmente condições não isotérmicas (CORRADINI et al., 2006; WHITING, 1995).

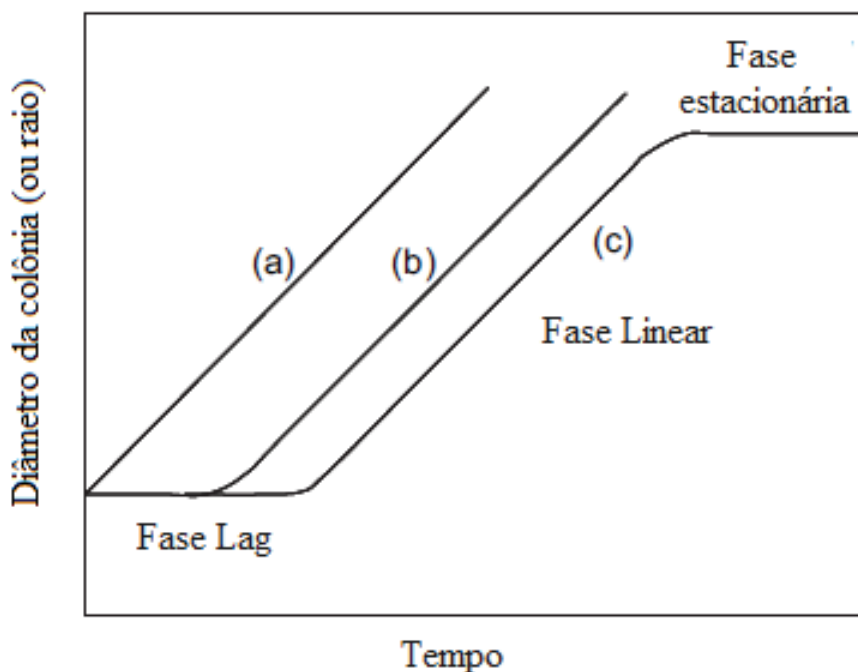
#### *2.4.1 Modelagem do Crescimento de Microrganismos*

Os modelos de crescimento podem ser do tipo empírico, que descrevem um conjunto de dados através de uma relação matemática conveniente, ou do tipo determinístico, que fornecem a interpretação dos parâmetros do modelo em termos de fenômenos e processos conhecidos (McMEEKIN et al., 1993).

De maneira clássica, são utilizados três parâmetros na caracterização da curva de crescimento bacteriano: a velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{max}$ ), a duração da fase lag ( $\lambda$ ) e o aumento logarítmico da população (A).

Devido às suas particularidades, a curva de crescimento de fungos pode apresentar uma das formas apresentadas na Figura 2.3.

Figura 2.7 Representação das curvas características de crescimento de fungos em meio sólido. Fonte: Adaptado de Garcia et al., 2009.



Na Figura 2.3 nota-se que, em condições ótimas de cultivo (a), o crescimento de fungos segue um padrão linear, sem ocorrência de fase de adaptação (ou fase lag) e sem fase estacionária (curva a), ou com seu surgimento de fase de adaptação (curva b). Em condições subótimas (curva c), a curva de crescimento passa a apresentar uma fase estacionária, em que cessa o desenvolvimento do fungo.

A proposta de organização dos modelos matemáticos apresentada por Whiting e Buchanan (1993) tem sido amplamente utilizada na microbiologia preditiva. Segundo esses pesquisadores, os modelos preditivos podem ser estruturados em três categorias:

- modelos primários – são aqueles que visam descrever como os microrganismos ou metabólitos secundários variam ao longo do tempo, sob determinadas condições ambientais. A resposta pode ser medida de forma direta através da densidade populacional microbiana (contagem em placas, microscopia, etc.), medidas indiretas (absorbância, impedância, etc.) ou pelos produtos do metabolismo microbiano (produção de ácidos, síntese de toxinas, etc.). Cada curva de população em função do tempo pode ser escrita por um conjunto de valores específicos para cada parâmetro no modelo ( $\mu_{\max}$ ,  $\lambda$ , A).

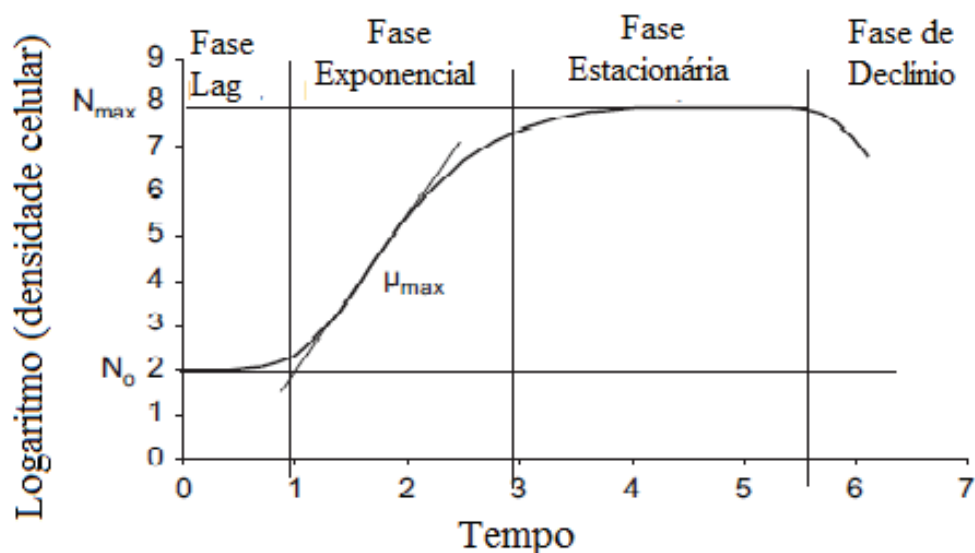
- modelos secundários – consistem em um conjunto de equações que indicam como os parâmetros do modelo primário ( $\mu_{\max}$ ,  $\lambda$ , A) respondem a variações nas condições ambientais (temperatura, pH,  $a_w$ ).

modelos terciários – são *softwares* constituídos por modelos primários e secundários, com uma interface amigável, por meio dos quais é possível simular e comparar rapidamente o comportamento microbiano sob diferentes condições, através da geração de curvas de crescimento ou de inativação. Podem incluir algoritmos para calcular mudanças em condições (como variações de temperatura com o tempo de armazenamento), comparar o comportamento microbiano em diferentes condições (duas concentrações salinas, por exemplo) ou construir gráficos de mais de um microrganismo simultaneamente.

#### 2.4.1.1 Modelos Primários de Crescimento

Os modelos primários descrevem as mudanças no crescimento de microrganismos ou de metabólitos secundários em função do tempo, em um ambiente específico. A partir dos dados obtidos em função do tempo nas diferentes temperaturas de cultivo, são calculados os parâmetros de crescimento. Estes parâmetros podem ser visualizados na Figura 2.4.

Figura 2.8 Curva típica de crescimento microbiano em função do tempo. Fonte: adaptada de Lebert e Lebert, 2006.



Após a inoculação em um determinado meio de cultura, os microrganismos passam por um período de adaptação, não sendo observado um aumento significativo no número de células. Essa etapa, conhecida como fase de adaptação ou fase lag, é caracterizada pelo seu tempo de duração ( $\lambda$ ). Em seguida, observa-se um aumento exponencial no número de células ao longo do tempo e, portanto, essa etapa é denominada de fase exponencial. Essa fase é caracterizada pela velocidade máxima de crescimento ( $\mu_{max}$ ). Na fase posterior,

denominada fase estacionária, o número de células alcança um valor máximo ( $N_{\max}$ ) que permanece constante por determinado período de tempo. Por fim, devido ao acúmulo de metabólitos tóxicos, esgotamento de nutrientes ou de oxigênio, o número de microrganismos no meio sofre um decréscimo constante, caracterizando a fase de declínio (SWINNEN et al., 2004; BORZANI et al., 2001).

Os modelos primários de crescimento mais utilizados na literatura são o modelo de Gompertz (ERKMEN, 2000) e Gompertz modificado (ZWIETERING et al., 1991), modelo Logístico (ERKMEN, 2000; GIBSON et al., 1987), modelo Logístico modificado (CORRADINI e PELEG, 2005), modelo de Baranyi e Roberts (BARANYI & ROBERTS, 1994), modelo linear de três fases, também conhecido como modelo de Buchanan (BUCHANAN et al., 1997) e o modelo de Huang (HUANG, 2008). Serão descritos abaixo somente os modelos utilizados neste trabalho.

### Modelo de Gompertz Modificado

Zwietering et al. (1991) propuseram a reparametrização da função de Gompertz, visando incluir parâmetros com relevância microbiológica, para obter a representação direta dos parâmetros de interesse: tempo de duração da fase lag ( $\lambda$ ) e velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\max}$ ), resultando no modelo de Gompertz Modificado (Equação 1).

$$D(t) = A \cdot \exp \left\{ - \exp \left[ \frac{\mu_{\max} \cdot e}{A} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (1)$$

onde  $D(t)$  é o diâmetro da colônia;  $t$  é o tempo em horas,  $A$  é o aumento da densidade microbiana (equivalente ao log da contagem microbiana máxima durante a fase estacionária menos o log da contagem inicial),  $\mu_{\max}$  é a velocidade específica máxima de crescimento (mm/h),  $\lambda$  é a duração da fase lag (h) e  $e=2,7182$ .

Este modelo é comumente utilizado para descrever o comportamento microbiano em diferentes meios de cultivo e alimentos (SLONGO et al., 2009; CAYRÉ et al., 2003; NAKASHIMA et al., 2000; JUNEJA e MARKS, 1999).

Apesar dos modelos de Gompertz e de Gompertz modificado descreverem satisfatoriamente as diversas fases de crescimento de um microrganismo, desde a fase lag até a fase estacionária, eles não foram

deduzidos a partir de considerações mecanísticas e, por isso, há uma lacuna de bases biológicas. Muitas vezes, isso dificulta a interpretação física de seus parâmetros (McDONALD, SUN, 1999). Neste sentido, novos modelos vêm sendo desenvolvidos a partir de uma fundamentação biológica mais mecanística, como o modelo de Baranyi e Roberts.

### **Modelo de Baranyi e Roberts**

Baranyi e Roberts (1995) desenvolveram uma nova abordagem para tratar o crescimento bacteriano, criando um modelo matemático a partir de princípios biológicos. Este modelo é amplamente utilizado em microbiologia preditiva (DERLINDEN et al., 2013; GARCIA et al., 2013; PANAGOUE et al., 2010; GARCIA et al., 2009; MARÍN et al., 2008).

A facilidade de uso, o fato de ser aplicável a condições com variações dinâmicas no ambiente, ter uma boa capacidade de ajuste e da maioria dos parâmetros do modelo serem biologicamente interpretáveis, faz com que este modelo seja muito utilizado (VAN IMPE et al., 2005). Aliado a isso, contribuindo de forma significativa para a popularidade de uso deste modelo, o desenvolvimento de um macro do *software Excel*<sup>®</sup> (DMFit), para facilitar o ajuste do modelo de Baranyi e Roberts, é disponibilizado de forma gratuita e incluso no site *ComBase* ([www.combase.cc](http://www.combase.cc)).

A função de ajuste do modelo de Baranyi e Roberts busca descrever o mecanismo biológico da evolução do estado fisiológico das células do microrganismo ao novo ambiente pela Equação (2):

$$\mu_{\text{lag}} = \frac{q(t)}{q(t) + 1} \quad (2)$$

onde a função  $q(t)$  representa a evolução de uma substância crítica  $v$ , relacionada às reações enzimáticas envolvendo o microrganismo. A função  $q(t)$  é obtida a partir da equação diferencial (3).

$$\frac{dq(t)}{dt} = vq(t) \quad (3)$$

onde a velocidade específica da substância crítica  $v$  é considerada igual à velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{max}}$ ).

A função de inibição  $v(t)$  pertence à família de curvas de Richards (1959), Equação (4), sendo que não há mecanismo biológico envolvido.

$$\mu_{\text{est}} = 1 - \left[ \frac{N(t)}{N_{\text{max}}} \right]^m \quad (4)$$

onde  $m$  é um parâmetro de curvatura e  $N_{\text{max}}$  é a população microbiana máxima.

Considerando as equações para  $\mu_{\text{lag}}$  e  $\mu_{\text{est}}$ , e as condições ambientais constantes, a equação diferencial (5) é construída.

$$\frac{dD(t)}{dt} = \left[ \frac{q_0}{q_0 + \exp(-\mu_{\text{max}} t)} \right] \mu_{\text{max}} \left[ 1 - \left[ \frac{N(t)}{N_{\text{max}}} \right]^m \right] N(t) \quad (5)$$

A equação (5) tem solução explícita, apresentada na Equação (6).

$$D(t) = y_0 + \mu_{\text{max}} A(t) - \left[ \frac{1}{m} \right] \ln \left( 1 + \frac{\exp(m\mu_{\text{max}} A(t)) - 1}{\exp(m[y_{\text{max}} - y_0])} \right) \quad (6)$$

onde  $D(t)$  é o diâmetro da colônia. Sendo que a função  $A(t)$  é dada pela Equação (7).

$$A(t) = t + \left[ \frac{1}{\mu_{\text{max}}} \right] \ln \left( \frac{q_0 + \exp(-\mu_{\text{max}} t)}{1 + q_0} \right) \quad (7)$$

onde  $q_0$  é o estado fisiológico inicial da célula.

É possível considerar o parâmetro  $m$  igual a um, pois o mesmo não melhora de forma significativa a qualidade dos ajustes em muitos casos (LONGHI, 2012).

A fim de tornar o ajuste da equação mais estável, para o ajuste do modelo aos dados experimentais, os autores aconselham a transformação do parâmetro  $q_0$  no parâmetro  $h_0$  através da Equação (8).

$$h_0 = \ln \left( 1 + \frac{1}{q_0} \right) \quad (8)$$



Sendo assim, a Equação (7) pode ser transformada na Equação (9).

$$A(t) = t + \left[ \frac{1}{\mu_{\max}} \right] \ln(\exp(-\mu_{\max} t) + \exp(-h_0) - \exp(-\mu_{\max} t - h_0)) \quad (9)$$

Sendo que a duração da fase lag ( $\lambda$ ) pode ser obtida pela Equação (10).

$$\lambda = \frac{h_0}{\mu_{\max}} \quad (10)$$

É importante salientar que, originalmente, as variáveis  $D(t)$ ,  $y_0$  e  $y_{\max}$  que aparecem nas equações anteriores referem-se à concentração microbiana no instante  $t$ , em  $t = t_0$  e no estado estacionário, respectivamente. Em alguns estudos é comum encontrarmos formas alternativas para essas variáveis, como sua substituição pela densidade óptica da população bacteriana (BELLARA et al., 2000) e o diâmetro da colônia de fungos (MARÍN et al., 2008; VALÍK et al., 1999).

Assumindo que não há limitação no crescimento da colônia, pois o micélio estará sempre crescendo em regiões periféricas da colônia onde o meio seria caracterizado como novo, Garcia et al. (2009) mostraram que é possível simplificar ainda mais o modelo de Baranyi e Roberts para avaliar o crescimento de fungos, omitindo o termo logarítmico da Equação (6), obtendo uma função de crescimento sem fase estacionária. Assim, o modelo Baranyi e Roberts, que originalmente é trifásico (fase de adaptação – fase exponencial – fase estacionária), torna-se bifásico (fase de adaptação – fase exponencial). Esses autores ainda afirmaram que, em alguns estudos, adota-se o diâmetro da placa de Petri como o valor para o diâmetro na fase estacionária o que, segundo eles, não teria sentido biológico e afetaria a estimação dos outros parâmetros da curva.

Outra consideração no crescimento de fungos, é a inoculação de colônias com diâmetros próximos de zero (menores que 1 mm) se comparados ao diâmetro final atingido pela colônia (maiores que 50 mm, por exemplo). Desta forma, o diâmetro inicial pode ser considerado igual a 0 ( $y_0=0$ ) e então o modelo é reduzido em mais um parâmetro. O sistema de equações diferenciais do modelo de Baranyi e Roberts (Equações (2), (3) e (4)), com estas considerações geram as equações diferenciais (11) e (12):

$$\frac{dD(t)}{dt} = \mu_{\max} \left( \frac{q}{q+1} \right) \quad (11)$$

$$\frac{dq}{dt} = \mu_{\max} q \quad (12)$$

onde  $D(t)$  é o diâmetro da colônia. O parâmetro  $q$  representa o estado fisiológico da célula  $q$ , que pode ser transformado no parâmetro  $h$ . Sob condições ambientais constantes, o sistema pode ser resolvido analiticamente, gerando a equação (13):

$$D(t) = \ln \left[ 1 + \exp(\mu_{\max} (t - \lambda)) - \exp(-\mu_{\max} \lambda) \right] \quad (13)$$

Ao estudar o crescimento de 14 espécies de fungos deteriorantes de alimentos, Marín et al. (2008) observaram que em relação ao diâmetro da colônia, quando uma tendência assintótica não foi observada, o modelo de Baranyi e Roberts gerou melhores estimativas de velocidade máxima de crescimento e fase de adaptação. Sendo que o modelo de Gompertz levou, em geral, a parâmetros superestimados.

O modelo de Baranyi e Roberts pode ser aplicado na maioria das situações. Existe também uma necessidade de padronizar o uso de raios ou diâmetro das colônias para a modelagem, o que facilitaria a comparação entre as taxas de crescimento máximas publicadas por diferentes autores (GARCIA et al., 2009).

#### 2.4.1.2 Modelos Secundários

Os modelos secundários são utilizados para descrever como os parâmetros dos modelos primários variam com os fatores ambientais como temperatura, pH, atividade de água, concentração de sólidos solúveis, entre outros (WHITING, 1995). O conhecimento dos parâmetros ambientais que mais influenciam o crescimento microbiano é essencial para o desenvolvimento, bem como para o uso prático dos modelos preditivos (McKELLAR e LU, 2004). Qualquer equação que apresente uma boa descrição dos parâmetros do modelo primário com a temperatura pode ser usada como modelo secundário (LONGHI, 2012).

O ajuste secundário pode ser modelado por qualquer equação que apresente o melhor ajuste para os dados experimentais, sem levar em conta o mecanismo, considerando-se que a utilidade do modelo secundário é a descrição da variação dos parâmetros de interesse em



função de fatores ambientais através de funções. Entretanto, ao utilizar modelos gerais, deve-se levar em consideração o comportamento da curva de crescimento. Sendo assim, diversas equações podem ser usadas, como por exemplo, linear (14), potência (15), logarítmica (16) e exponencial (17).

$$k = b + rT \quad (14)$$

$$k = bT^n \quad (15)$$

$$k = a + b \log(cT) \quad (16)$$

$$k = a \exp(bT) \quad (17)$$

onde  $k$  é o parâmetro de interesse do modelo primário ( $\mu_{\max}$ ,  $\lambda$  ou  $A$ ),  $T$  é a temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) e  $a$ ,  $b$ ,  $r$  e  $n$  são coeficientes dos modelos.

Alguns modelos secundários são considerados clássicos na literatura, pois são usados em muitos trabalhos na área da microbiologia preditiva. O modelo da raiz quadrada proposto por Ratkowsky et al. (1982) é um dos modelos secundários mais amplamente utilizado (GOSPAVIC et al., 2008; LEE et al., 2007; XANTHIAKOS et al., 2006; BARANYI et al., 1995). Este modelo descreve uma relação linear entre a raiz quadrada do parâmetro e a temperatura e é dado pela Equação 18.

$$\sqrt{k} = b(T - T_{\min}) \quad (18)$$

onde  $k$  é o parâmetro de interesse do modelo,  $b$  representa o coeficiente de regressão,  $T$  é a temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) e  $T_{\min}$  é a temperatura mínima para o crescimento ou coeficiente do modelo.

Embora esse modelo tenha sido desenvolvido originalmente para descrever a dependência da velocidade de crescimento microbiano apenas com a temperatura, verifica-se que ele tem sido estendido para incluir outros fatores ambientais, como o pH e a atividade de água.

Outro modelo secundário bastante utilizado em microbiologia preditiva é a equação do tipo Arrhenius. Quando a temperatura é o fator primário de interesse, como é frequentemente o caso, estas equações podem ser baseadas nas equações do tipo Arrhenius (Equação 19) que têm sido proposta para descrever o efeito da temperatura no crescimento microbiano (GIL et al., 2006; MOROZUMI, 2004; CAYRÉ et al., 2003; SKINNER et al., 1994; FUJIKAWA et al., 2004; DAVEY, 1991).

$$\ln k = a \left( \frac{1}{T} \right) + b \quad (19)$$

onde  $k$  é o parâmetro de interesse do modelo,  $a$  e  $b$  são coeficientes do modelo e  $T$  é a temperatura (°C).

Corradini e Peleg (2005) demonstraram que modelos empíricos podem ser utilizados para descrever a variação dos parâmetros dos modelos primários com a temperatura e outros fatores como atividade de água, pH, concentração de sal, entre outros.

#### 2.4.1.3 Modelos Terciários

Os modelos terciários consistem na integração entre modelos primários e secundários por meio de uma interface amigável com o usuário (GARCIA et al., 2009), incorporados a *softwares*, cujo uso facilita a aplicação das equações matemáticas. Os *softwares* podem incluir algoritmos para calcular mudanças em condições ambientais (como variações de temperatura com o tempo de armazenamento), comparar o comportamento microbiano em diferentes condições (duas concentrações salinas, por exemplo) ou construir curvas de crescimento de mais de um microrganismo simultaneamente (LONGHI, 2012). Como vantagem, estes programas apresentam respostas rápidas e eficientes ao avaliar o crescimento microbiano em um determinado produto sob condições específicas, não se fazendo necessário o uso de recursos experimentais (LEBERT e LEBERT, 2006; McMEEKIN e ROSS, 2002; McDONALD e SUN, 1999; WHITING, 1995).

Embora existam alguns modelos terciários disponíveis atualmente, segundo Garcia et al. (2009) eles estão focados na modelagem e na simulação do crescimento de bactérias patogênicas. Não há notícias de aplicativos que contemplam o crescimento de fungos ou a produção de micotoxinas.

Muitos modelos de predição foram desenvolvidos, tanto para microrganismos deteriorantes como para patogênicos, que apresentam seus respectivos modelos de crescimento e inativação. Como exemplos destes programas podem ser citados:

- *Seafood Spoilage Safety Predictor* (SSSP) (<http://sssp.dtuaqua.dk/>);

- *Pathogen Modeling Program* (PMP) (BUCHANAN, 1993), (<http://pmp.arserrc.gov/>);

- *Growth Predictor* (Institute of Food Research, UK, <http://www.ifr.ac.uk/safety/growthpredictor>);
- Combase (ComBase Consortium, <http://www.combase.cc/>);
- Sym'Previus (LEPORQ et al., 2005) (<http://www.symprevius.org>);
- *Food Spoilage Predictor*. (NEUMEYER et al., 1997).

#### 2.4.1.4 Modelos Não Isotérmicos

A temperatura é um dos fatores mais importantes para controle de crescimento de microrganismos e que pode variar consideravelmente durante a cadeia de produção e distribuição de alimentos perecíveis, sendo que a exposição a diferentes temperaturas pode ocorrer e comprometer a qualidade do produto (FU; LABUZA, 1992; VAN IMPE et al., 1992). Como a capacidade descritiva de modelos primários pode ser garantida apenas para condições ambientais constantes, é necessário o uso de outras abordagens para prever o crescimento microbiano em condições não isotérmicas. Assim sendo, um modelo efetivo que possa descrever o crescimento microbiano sob condições variáveis de tempo e temperatura durante o armazenamento torna-se necessário para aplicação prática (FUJIKAWA et al., 2004).

Nos últimos anos, tem aumentado o interesse por modelos dinâmicos, ou seja, modelos que permitam prever o crescimento dos microrganismos sob condições que variam com o tempo de armazenamento, principalmente condições não isotérmicas (LONGHI, 2012; DALCANTON, 2010; McMEEKIN et al., 2006; PELEG, 2006).

Quando a temperatura é o fator ambiental que tem maior influência no crescimento microbiano, outros fatores (como pH e  $a_w$ ) podem ser considerados constantes. A modelagem do crescimento microbiano é avaliada para condições não isotérmicas, e, desta forma, os parâmetros do modelo tornam-se função exclusivamente da temperatura, sendo que o perfil da variação da temperatura com o tempo deve ser descrito através de funções apropriadas (LONGHI, 2012).

Para o estabelecimento de um modelo não isotérmico, algumas considerações são definidas de acordo com cada estudo, dependendo do microrganismo e do ambiente de crescimento. Segundo Corradini e Peleg (2005), a base do desenvolvimento de um modelo de crescimento não isotérmico é dada por duas etapas principais. A primeira etapa consiste em gerar os dados de crescimento microbiano em diferentes temperaturas constantes, ajustando um modelo primário aos dados para

a obtenção dos parâmetros de crescimento. Em seguida, a influência da temperatura nestes parâmetros é descrita pelos modelos secundários. Para estimar o crescimento microbiano sob condições de variação de temperatura, a forma diferencial do modelo primário pode ser usada, com a inclusão dos modelos secundários.

Segundo Corradini e Peleg (2005), os modelos primários e secundários, derivados de dados de crescimento isotérmico, podem ser utilizados para prever padrões de crescimento microbianos sob uma variedade de condições não isotérmicas.

### Modelo de Baranyi e Roberts

Compondo o modelo de Baranyi e Roberts, as equações diferenciais (20) e (21) são utilizadas para a predição do crescimento microbiano em condições ambientais não isotérmicas:

$$\frac{dy(t)}{dt} = \mu_{\max} \left[ \frac{1}{1 + e^{-Q(t)}} \right] [1 - \exp(y(t) - y_{\max})] \quad (20)$$

$$\frac{dQ(t)}{dt} = \mu_{\max} \quad (21)$$

onde  $y(t)$  é o logaritmo natural da contagem microbiana no tempo  $t$ ;  $Q(t)$  é a função logarítmica do estado fisiológico das células ( $Q(t)=\ln(q(t))$ ); e os parâmetros  $\mu_{\max}$  e  $y_{\max}$  são funções da temperatura, descritos por modelos secundários.

As condições iniciais para resolução das equações diferenciais (20) e (21) são apresentadas nas Equações (22) e (23), respectivamente:

$$y(0) = y_0 \quad (22)$$

$$Q(0) = Q_0 \quad (23)$$

onde  $y_0$  é o valor do logaritmo natural da contagem microbiana inicial, ou seja,  $y(0)=\ln(N_0)$ , e  $Q_0$  é o valor logarítmico do estado fisiológico inicial das células, sendo que  $Q_0$  se relaciona com o parâmetro  $h_0$  através da Equação (24).

$$Q(0) = -\ln(\exp(h_0) - 1) \quad (24)$$

Ao estudar a modelagem do crescimento microbiano considerando que a curva do crescimento microbiano é avaliada até a

fase exponencial, desconsiderando a fase estacionária, pode-se obter a modelagem sob condições não isotérmicas, aplicando o uso dos modelos secundários apropriados, para descrever o efeito da temperatura sobre os parâmetros ou da primeira derivada da equação (13), gerando a equação diferencial (25):

$$\frac{dD(t)}{dt} = \frac{\mu_{\max}(T(t))}{\left[1 + \exp(\mu_{\max}(T(t))[\lambda(T(t)) - t]) - \exp(-\mu_{\max}(T(t))t)\right]} \quad (25)$$

## 2.5 Validações dos modelos

A validação é uma etapa fundamental na modelagem matemática de processos e de fenômenos físicos, químicos ou biológicos. Para que os modelos possam ser aplicados, é fundamental que estes sejam validados. A aplicação técnicas estatísticas adequadas permite uma avaliação da capacidade de predição do modelo que está sendo validado (NAKASHIMA et al., 2000).

A validação de modelos preditivos pode ser realizada em duas etapas. A primeira consiste na validação interna, ou seja, a comparação entre os valores preditos pelo modelo e aqueles obtidos experimentalmente, que foram utilizados em seu desenvolvimento. A segunda forma é por meio da validação externa, onde os valores preditos pelo modelo matemático são comparados com dados experimentais obtidos em ensaios independentes ou a partir de informações da literatura (GIFFEL e ZWIETERING, 1999). Em ambas as etapas, essa comparação pode ser feita graficamente ou a partir do emprego de índices matemáticos e estatísticos. De acordo com van Boekel e Zwietering (2007), esse é um teste que permite averiguar o quão bem o modelo matemático consegue ajustar-se aos dados experimentais.

Na microbiologia preditiva, alguns índices matemáticos podem ser usados para avaliar a confiabilidade ou qualidade do ajuste dos modelos preditivos de crescimento, bem como para comparar o ajuste de uma série de modelos aos dados utilizados para a sua elaboração (McCLURE et al., 1994).

Com relação aos índices matemáticos e estatísticos que podem ser empregados para avaliar o desempenho de modelos matemáticos, os frequentemente utilizados na literatura são o coeficiente de determinação ( $R^2$ ), o erro médio quadrático (MSE) ou raiz do erro médio quadrático (RMSE), o fator bias e o fator exatidão.

O coeficiente de correlação, também chamado de coeficiente de determinação ou de regressão ou simplesmente  $R^2$ , é frequentemente

utilizado como uma medida global da predição obtida. O  $R^2$  mede a fração de variação sobre a média que é explicada pelo modelo. Seu valor varia entre 0 e 1 ( $0 < R^2 < 1$ ) e quanto mais próximo a 1, melhor é a predição obtida pelo modelo.

O MSE é um índice que avalia o desvio médio existente entre dados experimentais e valores preditos por modelos matemáticos, penalizando aqueles que utilizam maior quantidade de parâmetros, sendo uma medida da variabilidade residual. Quanto menor o valor do índice MSE, melhor o modelo consegue ajustar-se aos dados experimentais (SUTHERLAND et al., 1994). Segundo McKellar e Lu (2004), provavelmente a mais simples e informativa medida de bom ajuste para modelos de regressão, linear e não linear, é o MSE. A discrepância média entre os dados observados e os valores preditos pode ser causada por vários motivos, incluindo a variabilidade natural ou erros sistemáticos. Esse índice é calculado conforme mostra a Equação 26.

$$MSE = \frac{\sum (\text{Valor}_{\text{observado}} - \text{Valor}_{\text{preditado}})^2}{n - p} \quad (26)$$

onde  $n$  é o número de dados experimentais e  $p$  é o número de parâmetros do modelo

Dois índices simples são propostos para avaliar o desempenho dos modelos: o fator bias e o fator exatidão. Estes índices são amplamente utilizados na literatura, pois proporcionam um fácil resumo da confiabilidade dos modelos e ainda servem no processo de validação dos modelos preditivos. Também são usados para comparar o ajuste de modelos primários (ZIMMERMANN et al., 2011; SAUCEDO-REYES et al., 2009; ZHOU et al., 2008; CHOWDHURY et al., 2007). O objetivo inicial destes índices é de estimar a qualidade do ajuste dos modelos quando se comparam com observações que não tenham sido utilizadas para gerar o modelo predito.

O fator bias indica o desvio médio relativo existente entre os valores preditos e os valores observados. Matematicamente, esse índice é calculado pela Equação 27.

$$\text{fator bias} = 10^{\left( \frac{\sum \log(\text{Valor}_{\text{observado}} / \text{Valor}_{\text{preditado}})}{n} \right)} \quad (27)$$

onde  $n$  é o número de dados experimentais.

O valor do índice bias fornece informações importantes sobre o tipo de desvio verificado nos valores preditos pelo modelo matemático, ou seja, se eles são sub ou super estimados. Fator bias igual a 1 indica



acordo perfeito entre valores preditos e observados. Para curvas de crescimento microbiano, um fator bias maior que 1 indica que o modelo falha de forma segura, enquanto fator bias menor que 1 indica que o modelo falha de forma perigosa.

O fator de exatidão é uma indicação de como os valores experimentais se dispõem em torno dos valores preditos. Indica a distância entre cada ponto e a linha de equivalência, como uma medida de quão próximo, na média, estão os dados experimentais e os valores preditos. Esse índice é calculado pela Equação 28.

$$\text{fator exatidão} = 10^{\left( \frac{\sum \left| \log(\text{Valor}_{\text{observado}} / \text{Valor}_{\text{predito}}) \right|}{n} \right)} \quad (28)$$

Esse índice não indica o sentido de desvio do modelo e poderá assumir valores maiores ou iguais a 1. Quanto maior o valor do índice fator de exatidão, menos exato é o modelo matemático ao descrever o comportamento dos dados experimentais. Quando ambos os índices (bias e exatidão) tem o valor de 1, significa que existe concordância perfeita entre os valores observados e os preditos pelo modelo.

Os valores dos parâmetros cinéticos observados podem ser representados graficamente em relação às predições correspondentes do modelo matemático avaliado. A partir desta representação podem-se visualizar rapidamente quais as predições que poderiam resultar inseguras na prática e ainda estimar a confiabilidade do modelo (CARRASCO et al., 2006; DEVLIEGHERE et al., 2000).





## CAPÍTULO 3

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentadas as descrições das metodologias e dos equipamentos que foram utilizados para realização deste trabalho.

Os experimentos realizados neste trabalho seguiram um procedimento padronizado composto pelas seguintes etapas:

- seleção dos microrganismos e preparo da suspensão de esporos;
- quantificação da suspensão de esporos;
- preparo dos meios de crescimento - suco de maçã solidificado;
- avaliação do crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri* pela medida do diâmetro da colônia e quantificação do ergosterol;
- modelagem matemática das curvas de crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri*.

Nas próximas seções deste estudo, descreve-se detalhadamente como foi realizada cada uma dessas etapas.

#### 3.1 Seleção dos Microrganismos e Preparo da Suspensão de Esporos

Neste estudo foram avaliados o crescimento de *Byssochlamys fulva* e *Neosartorya fischeri*. O fungo *N. fischeri* foi isolado e identificado no Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina por Salomão (2002) em amostras retiradas da linha de processamento de néctar de maçã. A cepa de *B. fulva* IOC 4518 (Instituto Oswaldo Cruz) foi isolada do suco concentrado de maçã (SALOMÃO et al., 2008).

O preparo da suspensão de esporos de *B. fulva* e *N. fischeri*, realizado de acordo com Salomão et al. (2007), iniciou pela pré-esporeção em placas de Petri contendo meio PDA (pH 3,5) por 7 dias a 30 °C. Os esporos coletados foram adicionados às placas de esporulação contendo meio MEA e incubados por 30 dias a 30 °C. Após este período, adicionou-se 1 mL de água destilada estéril em cada placa e, depois da raspagem com espátula de borracha, todo o conteúdo foi filtrado em 4 camadas de gaze estéril e centrifugado a 3500 rpm (2000 x g) por 15 minutos. A centrifugação foi repetida duas vezes ou até a constatação microscópica da ausência de hifas. A suspensão final foi preparada ressuspensando o precipitado em um volume de água mínimo, suficiente para se obter uma suspensão concentrada (na ordem

de  $10^5$  esporos/mL). As suspensões de *B. fulva* e *N. fischeri* foram transferidas para um frasco âmbar mantido a 4° C até posterior utilização. De acordo com Pitt e Hocking (2009), PDA e MEA são os meios recomendados para detecção, enumeração e isolamento de fungos termorresistentes em sucos de fruta pasteurizados.

### 3.2 Quantificação da Suspensão de Esporos

Para a verificação do número de esporos nas suspensões, expresso em esporos/mL, foi realizada, de forma asséptica, uma diluição das suspensões de esporos de *Byssochlamys fulva* IOC 4518 e *Neosartorya fischeri*. Para este procedimento utilizaram-se tubos de diluição com rosca de 16X100 mm contendo 4,5 mL de água destilada estéril e 0,5 mL de cada suspensão de esporos.

Em seguida, estes tubos (diluição  $10^{-1}$ ) foram ativados em banho termostático (Tecnal-TE-184), ajustado previamente à temperatura de 80 °C, por 10 minutos (SALOMÃO, 2009). Transcorrido este tempo, os tubos foram colocados imediatamente em banho de gelo. A ativação térmica teve por finalidade interromper o estado de dormência dos esporos pela aplicação do choque térmico (SALOMÃO, 2002).

Após a ativação, foram realizadas, em câmara de fluxo laminar, diluições seriais em ordem crescente ( $10^{-1}$  até  $10^{-7}$ ) com o objetivo de quantificar os ascósporos ativados. A partir das diluições, foram realizados plaqueamentos por profundidade em meio PDA acrescido de solução de ácido tartárico 10 % (m/v) até pH 3,5 e 1 mL/L de solução de rosa de bengala 5 % (m/v), para evitar dispersão das colônias e inibir outras formas microbianas (BAGLIONI, 1998). As placas foram incubadas a 30 °C e envolvidas por um filme plástico para evitar ressecamento do meio. A leitura das placas para determinar o número de colônias formadas foi realizada no terceiro dia após o plaqueamento e confirmada no quinto dia. A contagem foi expressa em UFC/mL.

### 3.3 Meio de Crescimento - Suco de Maçã Solidificado

O desenvolvimento da metodologia proposta envolveu o preparo do suco de maçã adicionado de ágar, conforme descrito a seguir. O suco de maçã clarificado foi elaborado a partir do suco de maçã concentrado (70 °Brix) fornecido pela empresa de sucos Fischer S/A de Videira, SC. A correção do pH do suco foi realizada com soluções de hidróxido de sódio 1 M ou ácido clorídrico 1 M, conforme a necessidade, até atingir o

pH de 3,8. Para o ajuste dos valores de concentração de sólidos solúveis e de  $a_w$  do suco, foram utilizados o suco concentrado e água destilada. O teor de sólidos solúveis foi ajustado com o auxílio de um refratômetro (AR200 Reichert) e, posteriormente, foi realizada a medição da  $a_w$  no medidor de  $a_w$  modelo Aqua Lab Models Series 3TE. Após formulação do suco, adicionou-se 1,5 g de ágar para cada 100 mL de suco e as amostras foram tratadas termicamente a 115 °C/1 minuto. Este tempo foi fixado, baseado em Mioreselli (2009), para evitar a degradação do meio de crescimento nas temperaturas consideradas normais de esterilização (121 °C/ 15 min).

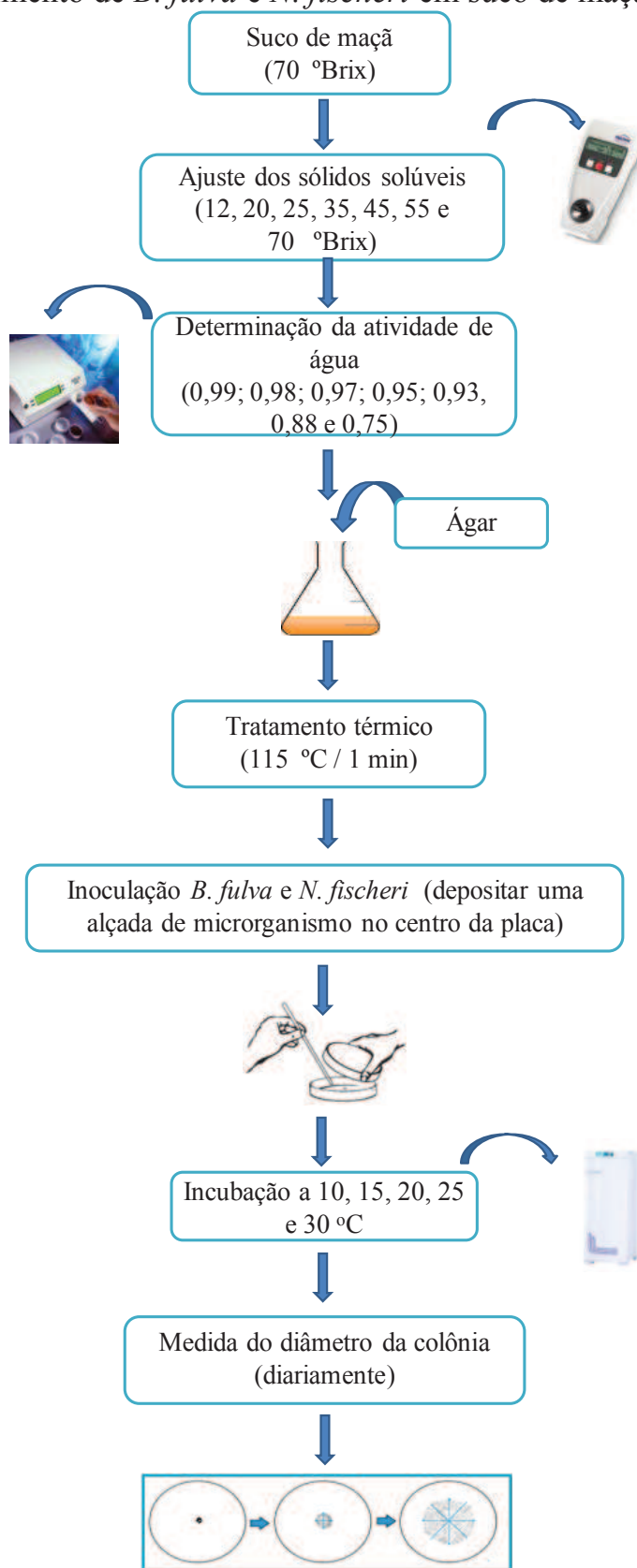
### **3.4 Avaliação do crescimento de *Byssochlamys fulva* e *Neosartorya fischeri***

A avaliação do crescimento dos fungos *B. fulva* e *N. fischeri* foi realizada utilizando os métodos de medida do crescimento radial e quantificação de ergosterol nas colônias que cresceram na superfície do suco de maçã solidificado. Foram analisados os crescimentos em diferentes temperaturas de incubação (10, 15, 20, 25 e 30 °C).

As análises foram realizadas em duplicata, em placas de Petri de 150x15 mm preenchidas com suco de maçã e ágar com diferentes teores de sólidos solúveis (12, 20, 25, 35, 45, 55 e 70 °Brix) e, respectivamente, diferentes atividades de água (0,99; 0,98; 0,97; 0,95; 0,93, 0,88 e 0,75), tratadas termicamente a 115 °C/1 minuto (MIORELLI, 2009). As placas contendo o suco solidificado foram individualmente inoculadas em câmara de fluxo laminar depositando-se uma alçada da suspensão de microrganismos, preparada conforme descrito no item 3.1, no centro de cada placa. Posteriormente, as placas foram incubadas a 10, 15, 20, 25 e 30 °C, durante 3 meses ou até que o crescimento do fungo atingisse toda a placa. As placas foram fechadas e sua borda foi recoberta com filme de PVC transparente, para minimizar a perda de água e evitar contaminação do material.

A Figura 3.1 apresenta o fluxograma da metodologia de preparo do meio de crescimento e avaliação do crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri* em suco de maçã solidificado

Figura 3.1 Fluxograma da metodologia de preparo o meio de crescimento e avaliação do crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri* em suco de maçã solidificado.



A escolha da concentração de sólidos solúveis utilizadas neste trabalho foi baseada no fato dos sucos de maçã normalmente serem comercializados nas concentrações próximas a 12 °Brix, a 20 °C, de acordo com o MAPA, 45 °Brix, para suco concentrado congelado (clarificado ou não) e 70 °Brix, para suco concentrado de alto teor de sólidos solúveis. As demais concentrações (20, 25, 35 e 55 °Brix) foram escolhidas por estarem entre as três principais concentrações.

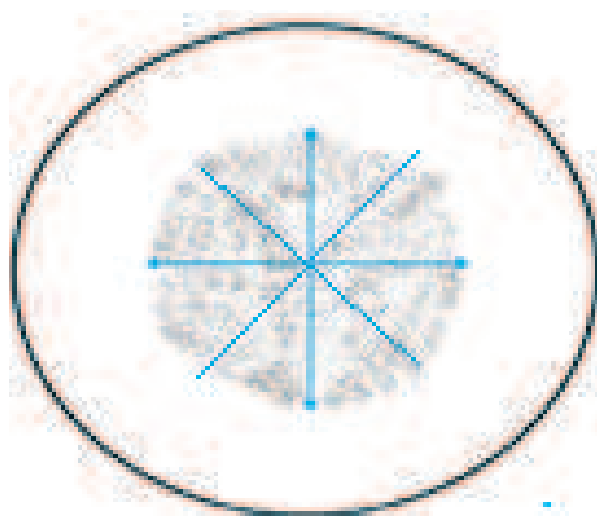
As culturas foram consideradas sem crescimento quando as alterações visíveis para o inóculo não ocorreram depois de 90 dias.

#### *3.4.1 Medida do Diâmetro da Colônia*

Os dados foram a média de medições em oito colônias, em 4 posições diferentes, para cada placa resultando em valores médios dos diâmetros lidos em um mesmo instante. Os cálculos foram baseados nos diâmetros médios calculados a partir de todas as quatro medidas do diâmetro lidas em um determinado ponto. A mudança do tamanho do diâmetro foi considerada a expressão do crescimento do fungo. Desta forma, foram geradas as curvas de crescimento expressas pela variação do diâmetro da colônia (mm) em função do tempo (h).

Para permitir melhor monitoramento do diâmetro da colônia de fungos, previamente à inoculação, as placas foram marcadas com traços perpendiculares em sua base, como é ilustrado na Figura 3.2.

Figura 3.2 Placa com marcação em sua base para monitoramento do crescimento do diâmetro da colônia.



Segundo Gibson et al. (1994) o diâmetro mínimo das colônias deve ser considerado no tempo em que estas atingirem 3 mm, sendo este o tamanho mínimo possível de ser observado a olho nu e necessário para o produto ser rejeitado pelo consumidor.

Foi realizado um plaqueamento de controle do suco de maçã e ágar, sem inoculação dos fungos estudados, na concentração de 12 °Brix e incubado a cada temperatura testada para verificação se o meio estava livre de microrganismos.

### *3.4.2 Avaliação da Cinética de Produção de Ergosterol na Biomassa Fúngica e Comparação com o Método de Medida Radial de Crescimento*

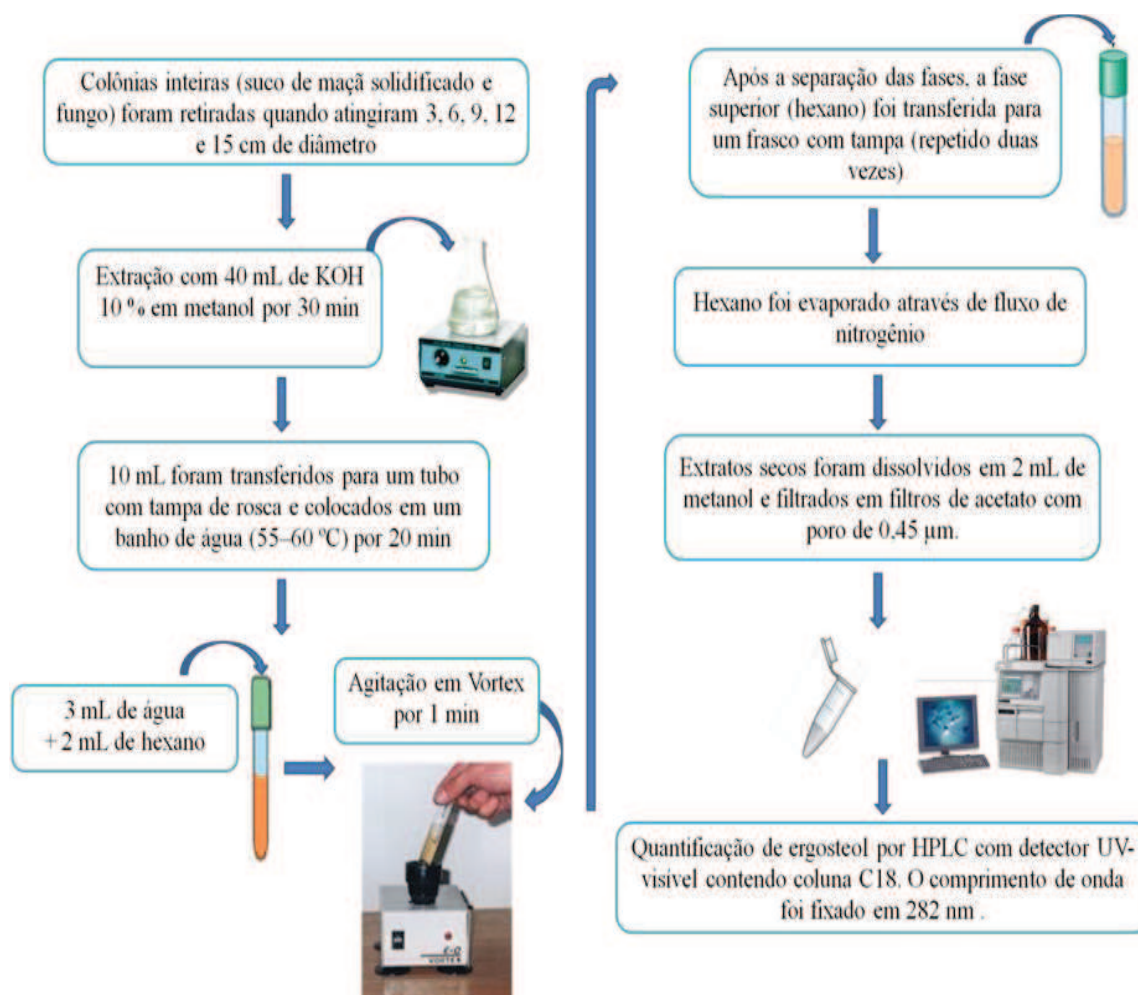
Para determinação do teor de ergosterol, as colônias (mais o suco de maçã solidificado) de *B. fulva* e *N. fischeri* foram retiradas inteiras quando as colônias atingiram os tamanhos de aproximadamente 30, 60, 90, 120 e 150 mm ao longo do tempo de incubação, depois se procedeu a extração para quantificação de ergosterol. Os experimentos para extração de ergosterol foram realizados nas condições de crescimento do fungo na concentração de sólidos solúveis de 12 °Brix e temperaturas de 10, 15, 20, 25 e 30 °C.

Para extração do ergosterol das amostras (colônia de fungo contendo suco de maçã solidificado) foi aplicado o método de Gourama e Bullerman (1995) modificado. As colônias de fungo foram extraídas com 40 mL de KOH 10 % em metanol através de agitação magnética por 30 minutos. Alíquotas de 10 mL foram transferidas para tubos com tampa de rosca e colocados em um banho de água (55-60 °C) por 20 min. Os tubos foram, em seguida, resfriados em banho de gelo. Adicionou-se 3 mL de água e 2 mL de hexano aos tubos e agitou-se em Vortex por 1 min. Após a separação das camadas, a camada superior (hexano) foi transferida para um frasco com tampa. A extração com hexano foi repetida duas vezes com 2 mL de cada vez. O hexano foi evaporado através de fluxo de nitrogênio. Para quantificação do ergosterol, os extratos secos foram dissolvidos em 2 mL de metanol e filtrados em filtros de acetato com poro de 0,45 µm. As amostras foram injetadas em (HPLC) utilizando bomba Parkin Elmer Series 200, com detector UV visível Parkin Elmer Series 200, contendo coluna Brownlee Analytical C18 5 µm (4,6 x 250 mm) com poro de 100 Å. O comprimento de onda foi fixado em 282 nm (MARÍN et al., 2008). A fase móvel foi metanol a 1 mL/min e utilizou-se padrão de Ergosterol



Sigma<sup>®</sup> para curva de calibração em concentrações entre 0 e 10 mg/L (FREIRE, 2006). A Figura 3.3 apresenta o fluxograma com a metodologia para extração de ergosterol.

Figura 3.3 Fluxograma para extração de ergosterol em amostras de suco de maçã solidificado e fungo.



### 3.5 Modelagem matemática das curvas de crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri*

#### 3.5.1 Modelos Primários

A partir dos dados de crescimento dos fungos, obtidos nas cinco temperaturas de incubação testadas, o modelo primário de Gompertz Modificado, modelo de Baranyi e Roberts e o modelo simplificado de Baranyi e Roberts foram ajustados para a obtenção dos parâmetros de crescimento: duração da fase lag ( $\lambda$  (h)), velocidade específica máxima

de crescimento ( $\mu_{\max}$  (mm/h)), e aumento logarítmico da população microbiana (A). O *software* Matlab 7.10 (MathWorks<sup>®</sup>, Natick, USA) foi utilizado para ajustar as curvas de crescimento.

A Tabela 3.1 apresenta as equações que representam cada modelo primário.

Tabela 3.1 Modelos primários usados para ajustar os dados de crescimento dos fungos.

Modelo Primário	Equação
Gompertz Modificado	$D(t) = A \cdot \exp \left\{ - \exp \left[ \frac{\mu \cdot e}{A} (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$
Baranyi e Roberts	$D(t) = y_0 + \mu_{\max} A(t) - \ln \left( 1 + \frac{\exp(\mu_{\max} A(t)) - 1}{\exp([y_{\max} - y_0])} \right)$ $A(t) = \left( t + \left( \frac{1}{\mu_{\max}} \right) \ln(\exp(-\mu_{\max} t) - \exp(-\mu_{\max} t - (\mu_{\max} \lambda)) + \exp(-\mu_{\max} \lambda)) \right)$
Baranyi e Roberts Simplificado	$D(t) = \ln[1 + \exp(\mu_{\max} (t - \lambda)) - \exp(-\mu_{\max} \lambda)]$

Além do diâmetro da colônia, foi modelado o teor de ergosterol para as diferentes temperaturas testadas utilizando o modelo de Baranyi e Roberts simplificado.

### 3.5.2 Modelos Secundários

Após a obtenção dos parâmetros primários de crescimento ( $\lambda$ ,  $\mu_{\max}$  e A), seis equações correspondentes aos modelos secundários (Tabela 3.2) foram comparadas para seleção do modelo que melhor descreveu a influência da variação da temperatura e da concentração de sólidos solúveis sobre estes parâmetros. Os modelos secundários foram ajustados usando o *software* Microsoft Excel.



Tabela 3.2 Modelos secundários usados para descrever a influência da temperatura e da concentração de sólidos solúveis nos parâmetros de crescimento dos fungos.

Modelo Secundário	Equação
Linear	$k = b + rT$
Potência	$k = b.T^n$
Exponencial	$k = a.\exp(b.T)$
Logarítmico	$k = a + b \log(c.T)$
Raiz Quadrada	$k^{1/2} = b(T - T_{min})$
Tipo Arrhenius	$\ln k = a \left( \frac{1}{T} \right) + b$

onde  $k$  é o parâmetro de interesse do modelo primário ( $\mu_{max}$ ,  $\lambda$  ou  $A$ ),  $T$  é a temperatura ( $^{\circ}C$ ),  $T_{min}$  é a temperatura mínima para o crescimento ou coeficiente do modelo e  $a$ ,  $b$ ,  $r$  e  $n$  são coeficientes dos modelos.

### 3.5.3 Modelagem do Crescimento Microbiano em Armazenamento Não Isotérmico

Após a seleção dos modelos primários e secundários, foi utilizada a avaliação das respostas obtidas (condições isotérmicas) para prever o crescimento microbiano em condições experimentais não isotérmicas, baseando-se no modelo de Baranyi e Roberts, descrito na revisão da literatura (item 2.4.1.4), Equação (25). Após a definição dos diferentes perfis de temperatura e da predição das curvas de crescimento nestas condições não isotérmicas, foram realizados os experimentos para posterior validação do modelo proposto.

Os quatro perfis de temperatura estudados representam a variação de temperatura em diferentes intervalos de tempo.

Na primeira condição estudada, as placas permaneceram incubadas na temperatura de 20  $^{\circ}C$  por 24 h, em seguida a 10  $^{\circ}C$  por mais 24 h e assim sucessivamente, até atingir toda a placa. A Equação 3.1 foi utilizada por melhor descrever o perfil de temperatura utilizado.

$$T(t) = 15 + 5.\text{sen} \left( 1,3 + \left( \frac{\pi.t}{23,6} \right) \right) \quad (3.1)$$

onde:  $T$  é a temperatura em  $^{\circ}C$ ;  $t$  é o tempo (h).

A equação foi acrescida da condição: se  $T > 15\text{ °C}$ ,  $T=20\text{ °C}$  e quando  $T \leq 15\text{ °C}$ ,  $T=10\text{ °C}$ .

No segundo perfil de temperatura estudado, as placas foram incubadas na temperatura de  $20\text{ °C}$  durante 170 h e posteriormente a  $30\text{ °C}$  até atingir toda a placa (aproximadamente 180 h). O perfil de temperatura nestas condições foi obtido através das condições: se  $t \leq 170\text{ min}$ ,  $T=20\text{ °C}$ ; se  $t > 170\text{ min}$ ,  $T=30\text{ °C}$ .

No terceiro perfil de temperatura estudado, a incubação das placas ocorreu na temperatura inicial de  $10\text{ °C}$ , aumentando gradativamente (cerca de  $1,27\text{ °C}$  a cada 24 h) até atingir a temperatura de  $30\text{ °C}$ , permanecendo nesta temperatura até que o crescimento atingisse toda a placa.

A Equação 3.2 descreve o perfil de temperatura nestas condições.

$$T(t) = 0,0531.t + 10 \quad (3.2)$$

onde:  $T$  é a temperatura em  $\text{°C}$ ;  $t$  é o tempo (h).

Sendo que foi acrescentada à equação a condição: se  $T \geq 30\text{ °C}$ ,  $T=30\text{ °C}$ . Com estas condições, as temperaturas ficaram dentro do perfil estudado ( $10\text{-}30\text{ °C}$ ).

No quarto perfil de temperatura, incubaram-se as placas na temperatura inicial de  $30\text{ °C}$ , diminuindo gradativamente (cerca de  $1,27\text{ °C}$  a cada 24 h) até atingir a temperatura de  $10\text{ °C}$ , permanecendo nesta temperatura até que o crescimento atingisse toda a placa.

A Equação 3.3 descreve o perfil de temperatura nestas condições

$$T(t) = 30 - 0,0531.t \quad (3.3)$$

onde:  $T$  é a temperatura em  $\text{°C}$ ;  $t$  é o tempo (h).

Foi acrescentada à equação a condição: se  $T \leq 10\text{ °C}$ ,  $T=10\text{ °C}$ . Com estas condições, as temperaturas ficaram dentro do perfil estudado ( $30\text{-}10\text{ °C}$ ).

A predição do crescimento em tais condições baseou-se no pressuposto de que, após uma mudança de temperatura, a taxa de crescimento é adotada instantaneamente à nova temperatura ambiente.

Os dados para os perfis não isotérmico foram tratados utilizando-se o programa Matlab 7.10, tanto para o diâmetro da colônia quanto para quantificação do ergosterol.

### 3.5.4 Análise Estatística dos Modelos

A validação dos modelos preditivos foi realizada através dos seguintes índices estatísticos: coeficiente de determinação ( $R^2$ ), raiz do erro médio quadrático (RMSE), fator bias e fator de exatidão.

O coeficiente de correlação também chamado de coeficiente de determinação ou simplesmente  $R^2$  é uma medida da proporção da variação explicada pela equação de regressão em relação à variação total das respostas.

O cálculo do RMSE, fator bias e fator exatidão foram realizados através das equações descritas na Tabela 3.3 (ROSS, 1996; SUTHERLAND et al., 1994).

Tabela 3.3 Índices estatísticos para validação dos modelos.

Índice Estatístico	Equação
RMSE	$RMSE = \sqrt{\frac{\sum (\text{Valor}_{\text{observado}} - \text{Valor}_{\text{predito}})^2}{n - p}}$
Fator bias	$\text{fator bias} = 10^{\left( \frac{\sum \log(\text{Valor}_{\text{predito}} / \text{Valor}_{\text{observado}})}{n} \right)}$
Fator exatidão	$\text{fator exatidão} = 10^{\left( \frac{\sum  \log(\text{Valor}_{\text{predito}} / \text{Valor}_{\text{observado}}) }{n} \right)}$

onde  $n$  é o número de dados experimentais e  $p$  é o número de parâmetros do modelo.

Tabela 3.4 Resumo das condições e modelos utilizados.

	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Condições</b>	<b>Concetração de sólidos solúveis (°Brix)</b>	<b>Modelos Primários</b>	<b>Modelos Secundários</b>	<b>Método de avaliação de crescimento</b>
<b>Parte 1</b>	10, 15, 20, 25 e 30	Isotérmica	12, 20, 25, 35 e 45	Gompertz Modificado	Linear Exponencial Potência Raiz Quadrada Tipo Arrhenius	Diâmetro da colônia
<b>Parte 2</b>	10, 15, 20, 25 e 30	Isotérmica	12, 20, 25, 35 e 45	Gompertz Modificado Baranyi e Roberts Baranyi e Roberts Simplificado	Linear Exponencial Potência Raiz Quadrada Tipo Arrhenius	Diâmetro da colônia
<b>Parte 3</b>	15, 20, 25 e 30	Isotérmica	12	Baranyi e Roberts Simplificado	Raiz Quadrada	Diâmetro da colônia e Concentração do ergosterol
<b>Parte 4</b>	20-10 10-30 30-10 20-30	Não Isotérmica	12	Baranyi e Roberts Simplificado	Raiz Quadrada	Diâmetro da colônia e Concentração do ergosterol

## **CAPÍTULO 4**

### **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados são apresentados em quatro partes, como descrito a seguir:

4.1 Parte 1: Modelagem matemática do crescimento de *Byssochlamys fulva* e *Neosartorya fischeri* em suco de maçã solidificado em condições isotérmicas, ao longo do tempo e estabelecimento de um Modelo Global que descreve a influência da temperatura e da concentração de sólidos solúveis sobre o crescimento do fungo.

4.2 Parte 2: Modelagem matemática do crescimento de *Byssochlamys fulva* e *Neosartorya fischeri* em suco de maçã solidificado em diferentes temperaturas de incubação e diferentes concentrações de sólidos solúveis.

4.3 Parte 3: Modelagem matemática do crescimento de *Byssochlamys fulva* e *Neosartorya fischeri* e comparação do método de medida do diâmetro da colônia e quantificação de ergosterol.

4.4 Parte 4: Modelagem matemática do crescimento de *Byssochlamys fulva* e *Neosartorya fischeri* sob condições não isotérmicas.

#### **4.1 Modelagem Matemática do Crescimento de *Byssochlamys fulva* e *Neosartorya fischeri* em Suco de Maçã Solidificado em Condições Isotérmicas ao longo do tempo e estabelecimento de um Modelo Global que descreve a influência da temperatura e da concentração de sólidos solúveis sobre o crescimento do fungo.**

Foram realizados experimentos para a avaliação do crescimento do fungo *B. fulva* em suco de maçã solidificado utilizando-se diferentes temperaturas e diferentes concentrações de sólidos solúveis. Para cada concentração de sólidos solúveis (12, 20, 25, 35, 45, 55 e 70 °Brix) e, respectivamente, diferentes atividades de água (0,99; 0,98; 0,97; 0,95; 0,93; 0,88 e 0,75), foram testadas diferentes temperaturas de incubação (10, 15, 20, 25 e 30 °C).

Este primeiro artigo teve como objetivo estudar a influência da temperatura e da concentração de sólidos solúveis no crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri* em suco de maçã solidificado, sob condições isotérmicas, e estabelecer um Modelo Global que inclua o efeito destes parâmetros para predizer o crescimento destes fungos, dentro das faixas estudadas. Foi realizada também a comparação de diferentes modelos secundários para descrever a influência da temperatura nos parâmetros de crescimento ( $\lambda$ ,  $\mu_{\max}$  e  $A$ ), obtidos pelo modelo primário. A comparação estatística do modelo primário e dos modelos secundários foi realizada através do índice  $R^2$ . As equações obtidas pelos modelos secundários permitirão a predição do crescimento do fungo sob diferentes condições dentro do intervalo de temperatura estudado. Esta espécie de fungo foi selecionada por estar presente em frutas e derivados, além de sua elevada termorresistência nos produtos ácidos e capacidade de crescer sob baixas concentrações de oxigênio (como as encontradas em embalagens cartonadas).

Na parte final do capítulo, a mesma análise apresentada para *B. fulva* foi realizada para *N. fischeri*.

#### 4.1.1 Parte 1: Mathematical Modeling of *Byssochlamys fulva* Growth in Apple Juice Under Isothermal Conditions

##### Abstract

Apple juice is a popular product, widely accepted by consumers and attractive from the industrial point of view. The presence of fungi in juices compromises product's safety and quality. *Byssochlamys fulva* is an ascospores producer fungus known to be heat resistant and commonly found in fruit juices. The aim of this work was to study the influence of soluble solids concentration and storage temperature on the growth of *B. fulva* in solidified apple juice. Apple juices added of agar (1.5 g agar per 100 ml), adjusted to different levels of soluble solids by various dilutions (12, 20, 25, 35, 45, 55, 70 °Brix), were put into Petri dishes. A loop of microorganisms (approximately  $6 \times 10^5$  ascospores.ml<sup>-1</sup>) was inoculated in the center of each plate. Thereafter, plates were incubated at different temperatures (10, 15, 20, 25, 30 °C). Microorganisms' growth was assessed by measuring the diameter of the approximately circular colony every day for 3 months or until the growth reached entire plate. Experimental results of the measured diameter throughout time showed a lag time, followed by a maximum growth rate period, tending, in some experimental conditions, to an asymptotic value. Such complete or incomplete sigmoidal tendencies were adequately described by a Gompertz-based model. Kinetic parameters were estimated by nonlinear regression procedures and the quality of model fits was assessed by residual analysis and the coefficient of determination. The soluble solids and temperature effects were included in the mathematical model resulting in a global model. The predictive ability of this global model was successfully proven for the range of conditions tested.

**Keywords:** Apple juice, *Byssochlamys fulva*, radial growth, soluble solids and temperature effects, Gompertz-based model.

##### 1. Introduction

Apple is a fruit that offers promising prospects for industrialization. Among the various products derived from this fruit, apple juice presents the greatest commercial value for some countries, being a source of several beneficial health components such as antioxidants (Lu and Foo, 2000; Ibrahim et al., 2011).



One of the concerns of the apple juice industry is related to toxigenic and deteriorative heat resistant microorganisms. Temperatures required for an effective pasteurization process from a microbiological point of view may also produce unacceptable organoleptic changes. Therefore, the investigation on the microbial flora of juices includes the challenge of evaluating the capability of survival and multiplication of heat resistant microorganisms (Bahçeci and Acar, 2007).

Some mold species are more heat resistant due to their capacity of ascospore production. Species like *Byssochlamys* sp., reported as mycotoxin producers, are responsible for spoilage and degradation of processed fruit juices and fruit-based products, since they can grow at low oxygen partial pressures and in acidic environments (Houbraken et al., 2006; Taniwaki et al., 2009; Sant'Ana et al., 2009).

Many methods have been developed to quantify the growth of fungi and their principles and applications have been extensively reviewed (Pitt and Hocking, 1997; Swanson et al., 1992; Marín et al., 2005; Taniwaki et al., 2010). Evaluation of fungal growth by measuring radial growth is probably the simplest and most direct measure. The variation of the radial growth by the time is often linear, and a growth rate can be estimated. This method has been used in studies that include the effect of water activity in filamentous fungal growth (Gibson and Hocking, 1997; Pitt and Miscamble, 1995; Taniwaki et al., 2006, Marín et al., 2008).

The growth ability of microorganisms in a medium depends on temperature, strain and medium characteristics (e.g., pH, soluble solids content, media type). Thus, the study of the influence of these factors on fungal growth is important for assessment of the quality and safety of target products.

Temperature has the soundest effect on microbial growth/inactivation. However, the medium soluble solids content is also a very important factor to be considered. The soluble solids amount (such as sugars) may exert a protective effect and increase medium viscosity (Beuchat and Rice, 1979). Thus, the study of these factors influence on fungi growth is essential since they can form a multiple barrier system, preventing or retarding microorganisms development.

The use of mathematical models to predict the growth of microorganisms under specific environmental conditions is an important tool for designing processes and controlling the quality and safety aspects of foods, particularly fruit juices. Several models have been suggested and applied in predictive microbiology studies, with the estimation of biological parameters of food-borne pathogens

(McMeekin and Ross, 2002; Lahlali et al. 2007). Among the models applied, Gompertz-based function has been successfully applied to describe microbial growth (Andres et al., 2001; Juneja et al., 2007).

Microbial kinetic parameters are temperature dependent. Additionally, those parameters depend on the soluble solids concentration of the juice. Such models are usually chosen on an empirical basis, being polynomials, exponential or power expressions (Ratkowsky et al., 1982; Corradini and Peleg, 2005). The main objectives of this work were to: i) study the influence of soluble solids concentration and storage temperature on the growth of *B. fulva* in solidified apple juice; and ii) develop a mathematical model able to predict the growth of *B. fulva* in apple juices as a function of soluble solids concentration and storage temperature. This model can be an important tool for assessment of the overall quality of the juices along storage.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1 Experimental procedures**

#### ***2.1.1 Microorganisms and ascospore suspension***

*B. fulva* strain was isolated from concentrated apple juice (Salomão et al., 2008). In a first step, *B. fulva* was plated on Potato Dextrose Agar (PDA) and incubated for 7 days at 30 °C. Thereafter, the colonies were suspended in sterile distilled water. The harvest of ascospores was performed using the methodology described by Salomão et al. (2007).

The collected spores were added to sporulation plates containing Malt Extract Agar medium (MEA) and incubated for 30 days at 30 °C. After 30 days, ascospores were harvested by flooding the medium surface with 1 ml of sterile water and the mold spores were gently collected from the surface with a rubber spatula. The suspension was filtered through layers of gauze and centrifuged at 3500 rpm (2000 x g) for 15 min. This procedure was repeated twice or until microscopic observation of hyphae absence.

The final suspension was prepared by resuspending the precipitate in a small volume of water enough to obtain a highly concentrated suspension ( $10^5$  spores.ml<sup>-1</sup>) and stored under refrigeration at 4 °C for further use.

The ascospore concentration in the suspension was determined after thermal activation at 80 °C for 30 min (Rajashekhara et al., 1996), followed by serial dilutions and pour plating in PDA added to 50 mg.l<sup>-1</sup> of bengal rose and acidified with tartaric acid solution (100 g.l<sup>-1</sup>) until pH 3.5 was attained (Baglioni , 1999). The plates were incubated at 30 °C for 5 days.

### **2.1.2 Growth of *Byssochlamys fulva* in apple juices**

Agar was added to concentrated apple juice (1.5 g agar per 100 ml of juice), adjusted with a refractometer (AR200 Reichert, USA) to different levels of soluble solids by dilution (12, 20, 25, 35, 45, 55 and 70 °Brix), corresponding, respectively, to water activity values of 0.99, 0.98, 0.97, 0.95, 0.93, 0.88 and 0.75). The concentrated apple juice was previously heat treated at 115 °C for 1 minute. The juices added of agar were poured into Petri dishes (150 mm diameter). The plates containing solidified juice were individually inoculated in laminar flow by depositing a loop of microorganisms suspension in the center of each plate (approximately 6x10<sup>5</sup> ascospores.ml<sup>-1</sup>). Thereafter, plates were packed in plastic film and incubated at five different temperatures (10, 15, 20, 25, 30 °C) for a period of 3 months or until the growth reached the board. The experiments were performed in octuplicates. The growth of *B. fulva* throughout storage period was assessed as following described.

Growth of *B. fulva* was assessed by measuring, with a ruler, the diameter of the colonies that grew on the surface of solidified apple juices samples. Measurements were done daily for all tested conditions. Data were the average of four measurements in four different locations of the colonies on each plate and the change in the size of the diameter was considered an expression of the fungal growth.

Apple juices added of agar at 12 °Brix without *B. fulva* inoculation and stored at all temperatures tested were used as control of microorganisms' absence in the medium.

## **2.2 Modeling procedures**

### **2.2.1 The growth model**

Assuming that *B. fulva* growth follows a sigmoidal behaviour, isothermal experimental data can be mathematically described by a re-parameterized Gompertz based model (Zwietering et al., 1990):

$$y = A \exp \left\{ - \exp \left[ \frac{\mu_{\max} \exp(1)}{A} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (4.1.1)$$

where  $y$  is the colony diameter at a given time  $t$ . The model parameters are the maximum specific growth rate ( $\mu_{\max}$ ), the lag time ( $\lambda$ ) and the asymptotic maximum reached diameter ( $A$ ).

The versatility of fitting linear data and those that contain lag and/or asymptotic effects makes the Gompertz is one attractive model.

### 2.2.2 Temperature and soluble solids effects

The models selected to describe temperature and soluble solids effects on primary parameters are the ones presented in Table 4.1.1.

Table 4.1.1 Secondary models tested to describe the temperature and soluble solids concentration effects (generally designated as Effect) in the parameters  $\mu_{\max}$ ,  $\lambda$  or  $A$  (generally designated as Parameter) of the Gompertz based model.

Secondary Model	Equation
Linear	$Parameter = k_1 + k_2 \text{ Effect}$
Square Root	$Parameter^{1/2} = k_1 (\text{Effect} - k_2)$
Arrhenius linearized	$Parameter = k_1 \left( \frac{1}{\text{Effect}} \right) + k_2$
Power	$Parameter = k_1 \text{ Effect}^{k_2}$
Exponential	$Parameter = k_1 \exp(k_2 \text{ Effect})$

$k_1$  and  $k_2$  are models parameters

### 2.2.3 Data analysis

The primary parameters of the Gompertz-based growth model (*i.e.*  $\mu_{\max}$ ,  $\lambda$  and  $A$ ) were estimated by non-linear regression analysis, fitting equation 1 to experimental data at given temperatures  $T$  ( $^{\circ}\text{C}$ ), and soluble solids concentration  $S$  ( $^{\circ}\text{Brix}$ ).

After estimation of the primary kinetic parameters, several secondary models were tested (Table 1). In a first step, the models were selected according to temperature dependence of  $\mu_{\max}$ ,  $\lambda$  and  $A$ . The secondary models describing primary parameters dependence on temperature present  $k_1$  and  $k_2$  as models parameters. In a further step,

the dependence of  $k_1$  and  $k_2$  on soluble solids concentration were described by mathematical equations. The equations describing parameters dependency on temperature and soluble solids were merged with the Gompertz-based model and a global regression with all data points at all temperature and soluble solids concentration was performed in one step aiming to obtain a global kinetic model that included those effects.

The analysis of variance (ANOVA) was previously performed to evaluate the effects of temperature and soluble solids concentration on kinetic parameters, using a significance level of 5% (Walpore and Myers, 1993).

The quality of the regressions was evaluated by the coefficient of determination ( $R^2$ ), randomness and normality of the residuals (by performing the Kolmogorov-Smirnov test; Walpore and Myers, 1993). Parameters' precision was evaluated by the 95% confidence interval.

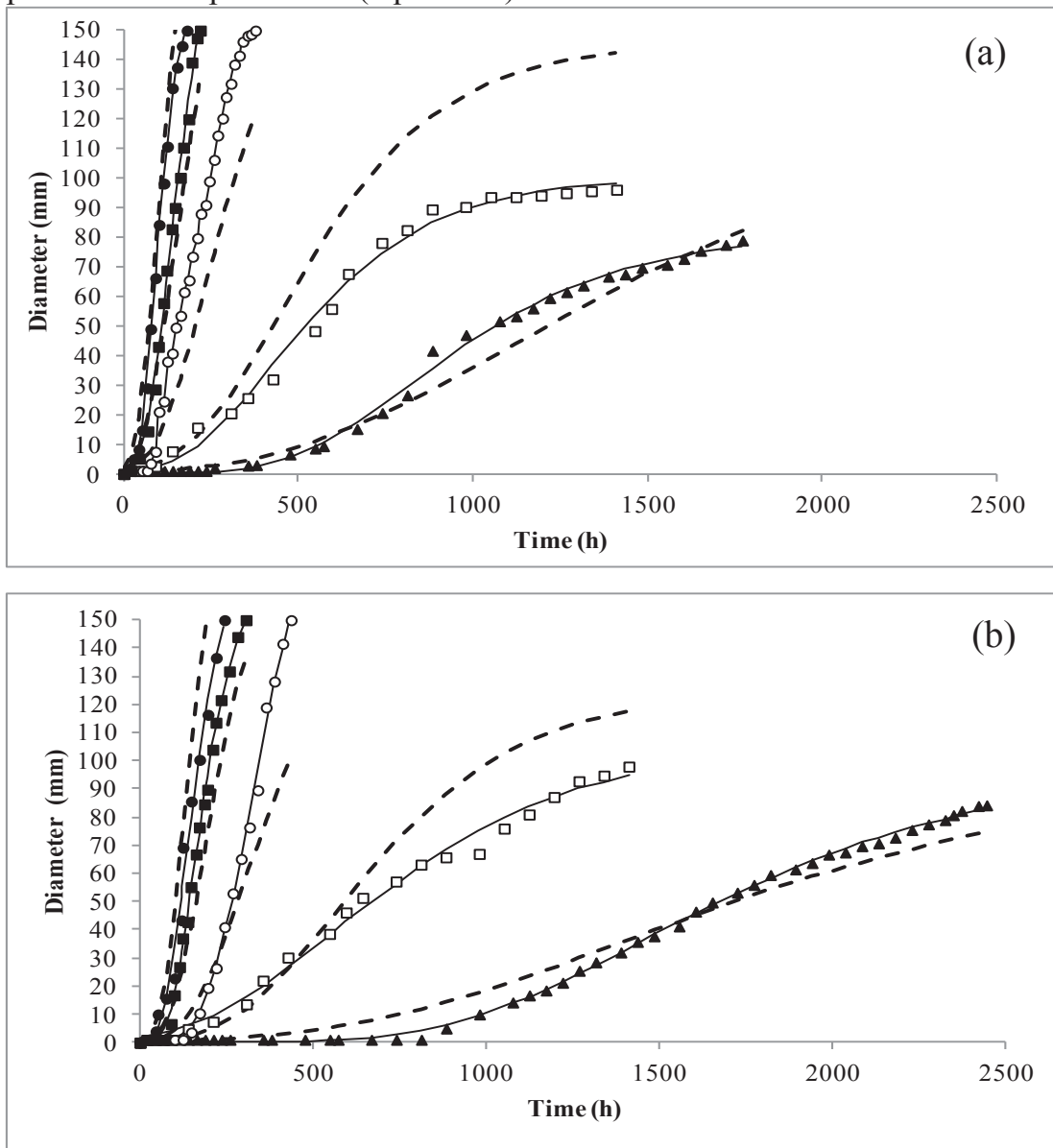
All regression analysis procedures and calculations were performed using Microsoft Excel 2000 (Microsoft Corporation, USA) and IBM SPSS Statistics (version 20).

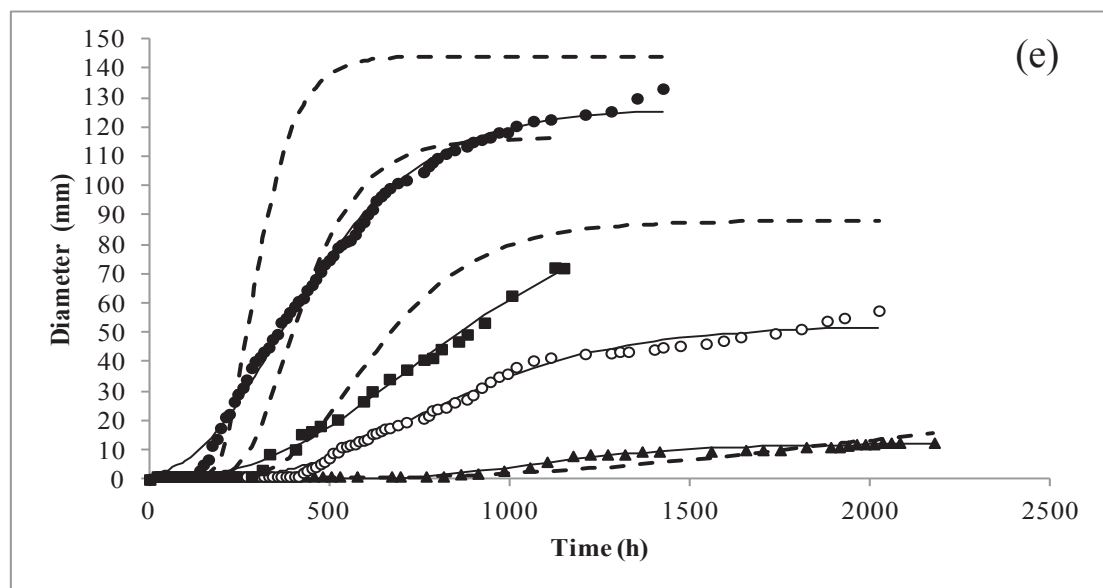
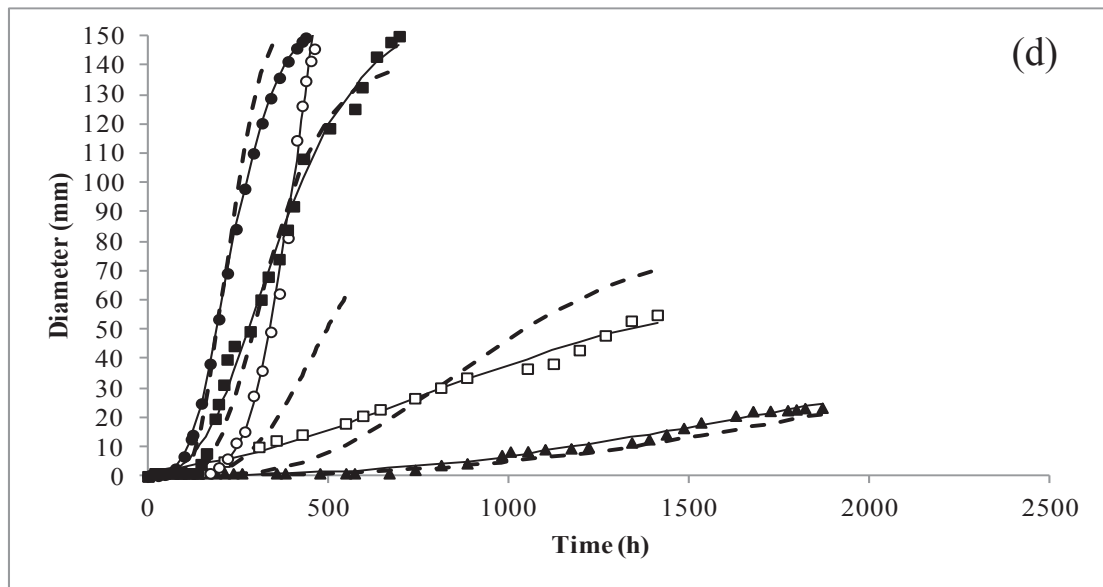
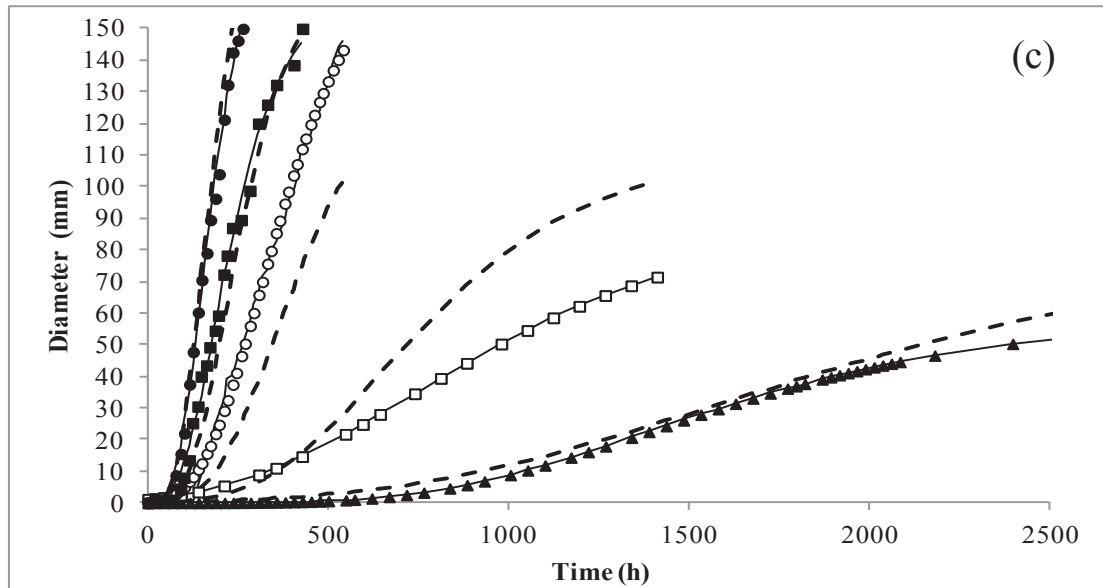
### **3. Results and discussion**

#### **3.1 Influence of temperature and soluble solids concentration on *B. fulva* growth**

The Gompertz based model (eq. 4.1.1) was fitted to the experimental data of the *B. fulva* growth in solidified apple juices with soluble solids concentration of 12, 20, 25, 35 and 45 °Brix (corresponding respectively to water activity values of 0.99, 0.98, 0.97, 0.95 and 0.93) and stored at 10, 15, 20, 25 and 30 °C (Figure 1). In general, the kinetic behavior showed a lag phase ( $\lambda$ ), followed by a maximum growth rate period ( $\mu_{\max}$ ), tending to an asymptotic value ( $A$ ). The Modified Gompertz model conveniently described such sigmoidal tendencies. The model adequacy was assessed by the analysis of the residuals: residuals were random and normally distributed ( $p > 0.05$ ). The goodness of model fit was also assessed by the coefficient of determination,  $R^2$  (values in Table 4.1.2), which in all cases was greater than 0.95, meaning that the model assumed represented 95% of the observed variability.

Figure 4.1.1 Growth of *B. fulva* in apple juices added of agar with soluble solids content of 12 °Brix (a), 20 °Brix (b), 25 °Brix (c), 35 °Brix (d) and 45 °Brix (e) and at the temperatures 30 °C (●), 25 °C (■), 20 °C (○), 15 °C (□) and 10 °C (▲). Solid lines represent individual model fits (eq. 4.1.1) and dotted lines represent model prediction (eq. 4.1.11).







The estimated kinetic parameters ( $\mu_{\max}$ ,  $\lambda$  and  $A$ ) and correspondent margin of errors, *i.e.* half width of the confidence interval at 95%, are included in Table 4.1.2. It can be concluded that high precision in parameter estimation was attained, since narrow confidence intervals were obtained in all situations.

Table 4.1.2 Estimated parameters of the Gompertz model applied to *B. fulva* growth in apple juices added of agar with different soluble solids content ( $^{\circ}\text{Brix}/a_w$ ) at given isothermal conditions; Coefficient of determination ( $R^2$ ) of the regression analyses performed.

$^{\circ}\text{Brix} / a_w$	Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	$A \pm$ margin of error (mm)	$\mu_{\max} \pm$ margin of error ( $\text{mm h}^{-1}$ )	$\lambda \pm$ margin of error (h)	$R^2$
12 / 0.99	10	81.64 $\pm$ 3.11	0.087 $\pm$ 0.006	475.40 $\pm$ 27.91	0.997
	15	100.35 $\pm$ 3.76	0.145 $\pm$ 0.014	175.08 $\pm$ 33.16	0.995
	20	176.94 $\pm$ 10.90	0.641 $\pm$ 0.037	82.38 $\pm$ 6.50	0.996
	25	199.24 $\pm$ 28.84	1.057 $\pm$ 0.084	61.92 $\pm$ 5.80	0.996
	30	165.61 $\pm$ 7.34	1.538 $\pm$ 0.093	47.32 $\pm$ 2.80	0.999
20 / 0.98	10	98.12 $\pm$ 3.23	0.064 $\pm$ 0.002	893.15 $\pm$ 18.89	0.999
	15	106.47 $\pm$ 9.03	0.099 $\pm$ 0.009	161.63 $\pm$ 42.90	0.993
	20	240.96 $\pm$ 45.22	0.646 $\pm$ 0.033	190.80 $\pm$ 8.42	0.997
	25	168.13 $\pm$ 8.83	0.895 $\pm$ 0.050	88.29 $\pm$ 4.30	0.998
	30	175.09 $\pm$ 37.79	1.025 $\pm$ 0.200	69.76 $\pm$ 12.91	0.988
25 / 0.97	10	59.43 $\pm$ 3.17	0.038 $\pm$ 0.002	801.76 $\pm$ 30.33	0.996
	15	92.14 $\pm$ 7.73	0.068 $\pm$ 0.003	232.32 $\pm$ 24.71	0.997
	20	183.14 $\pm$ 18.87	0.411 $\pm$ 0.023	146.85 $\pm$ 9.81	0.992
	25	158.52 $\pm$ 10.46	0.596 $\pm$ 0.048	92.21 $\pm$ 8.44	0.994
	30	185.85 $\pm$ 16.03	0.976 $\pm$ 0.059	80.76 $\pm$ 4.62	0.997
35 / 0.95	10	50.62 $\pm$ 19.08	0.022 $\pm$ 0.002	752.35 $\pm$ 98.98	0.950
	15	70.69 $\pm$ 14.64	0.046 $\pm$ 0.004	172.27 $\pm$ 54.61	0.988
	20	383.75 $\pm$ 172.93	0.909 $\pm$ 0.150	293.99 $\pm$ 23.53	0.996
	25	159.65 $\pm$ 10.73	0.370 $\pm$ 0.033	146.61 $\pm$ 14.86	0.992
	30	161.60 $\pm$ 6.28	0.654 $\pm$ 0.046	114.23 $\pm$ 7.51	0.998
45 / 0.93	10	12.06 $\pm$ 0.70	0.016 $\pm$ 0.003	750.09 $\pm$ 71.95	0.969
	20	52.52 $\pm$ 1.35	0.061 $\pm$ 0.003	396.66 $\pm$ 16.90	0.992
	25	98.23 $\pm$ 11.23	0.093 $\pm$ 0.004	318.96 $\pm$ 20.24	0.994
	30	126.40 $\pm$ 2.20	0.206 $\pm$ 0.007	123.40 $\pm$ 10.18	0.995

margin of error is the half width of the confidence interval at 95%

From the results, it can be concluded that temperature and soluble solids content had a significant effect on the growth behavior of *B. fulva*. This was verified by ANOVA procedures, using a significance level of 5 %. For given values of soluble solids content, increasing the temperature from 10 to 30 °C resulted in a decrease of the lag phase ( $\lambda$ ), and in an increase of the maximum growth rate ( $\mu_{\max}$ ) and in the asymptotic value (A).

When compared to the temperature influence, the soluble solids content effect on kinetic parameters is less relevant. The effect is opposite to the one observed for the temperature. For a given temperature, increasing the soluble solids content from 12 to 45 °Brix resulted in an increase of the lag phase ( $\lambda$ ), and in a decrease of the maximum growth rate ( $\mu_{\max}$ ) and in the asymptotic value (A).

Panagou et al. (2010) obtained similar results when studying the growth of *Byssochlamys fulva* and *Byssochlamys nivea* in synthetic medium as a function of water activity ( $a_w$ ) and temperature. Both fungal species grew on malt extract agar at different temperatures (10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 and 45 °C) and different  $a_w$  conditions (0.88, 0.90, 0.92, 0.94, 0.96 and 0.99) for a period of 30 days. Growth was evaluated by colonies diameter evolution over time. These authors observed that when the incubation temperature increased, the lag phase decreased and the maximum specific growth rate increased.

It should be remarked that the size of the colonies at 20 °C and higher temperature is limited by the diameter of the plate dishes used (150 mm). In these cases, the asymptotic growth was predicted but was not attained experimentally, because the size of the plate limited the colonies growth that could be reached. The exception was for the higher soluble solids concentration (45 °Brix), where a stabilization of growth was notoriously observed.

Marín et al. (2008) evaluated the growth of 14 species of food spoilage fungi on solid medium and studied the growth by measuring the diameter of the colony. The authors found that the growth curve was characterized by a lag phase, followed by a linear phase. However, in most cases, there was no decrease in growth rate before the edge of the Petri dish was reached, as occurred in this study.

Experiments were also carried out for soluble solids concentration of 55 and 70 °Brix ( $a_w$  of 0.88 and 0.75, respectively; data not shown). In such conditions, no growth was observed even after 3 months of incubation for the five temperatures studied. Panagou et al. (2010) got similar conclusions: independently of the temperature, no

growth of *Byssochlamys* was observed in synthetic medium with  $a_w$  of 0.88.

### 3.2 Predictive model of *B. fulva* growth

Temperature and soluble solids concentration affected *B. fulva* growth in apple juices. Concerning predictive purposes, it is of utmost importance to include those relevant effects in a Global model. In a preliminary step, the influence of the temperature on  $\lambda$ ,  $\mu_{\max}$  and A was assessed by testing the models presented in Table 4.1.1. The models adequacy was based on residuals analysis (randomness and normality) and magnitude of  $R^2$ . Results showed that the models that best described the effect of temperature (T) on the parameters were:

$$\lambda = k_{1_\lambda} T^{k_{2_\lambda}} \quad (4.1.2)$$

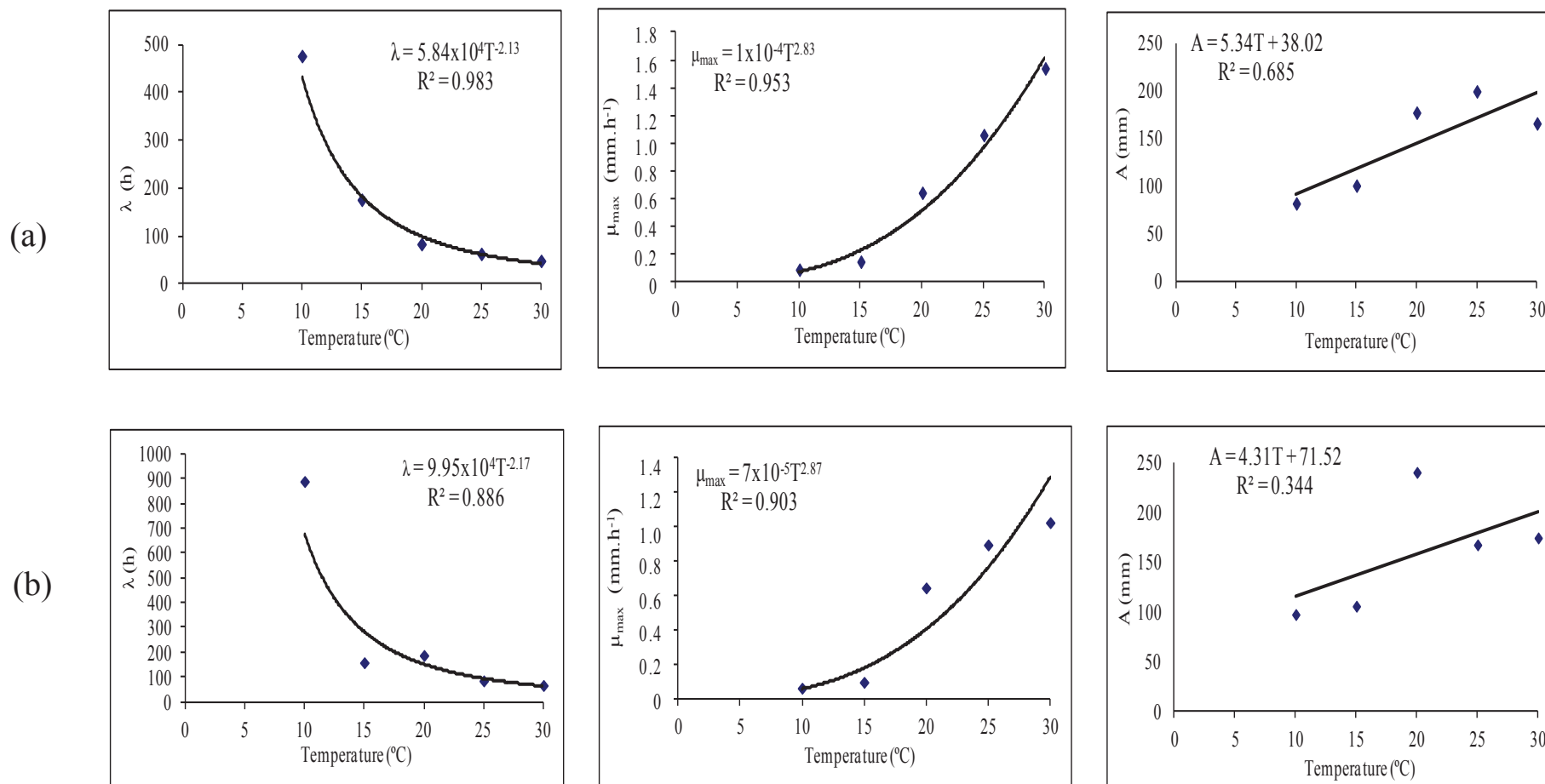
$$\mu_{\max} = k_{1_{\mu_{\max}}} T^{k_{2_{\mu_{\max}}}} \quad (4.1.3)$$

$$A = k_{1_A} + k_{2_A} T \quad (4.1.4)$$

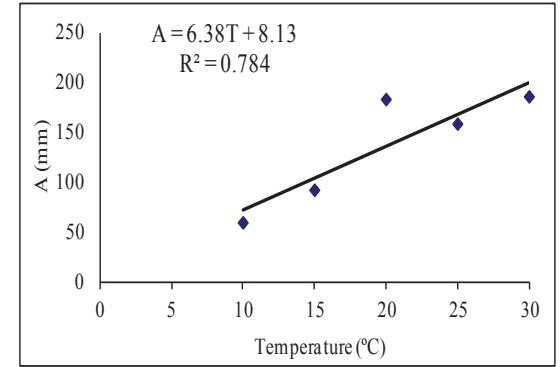
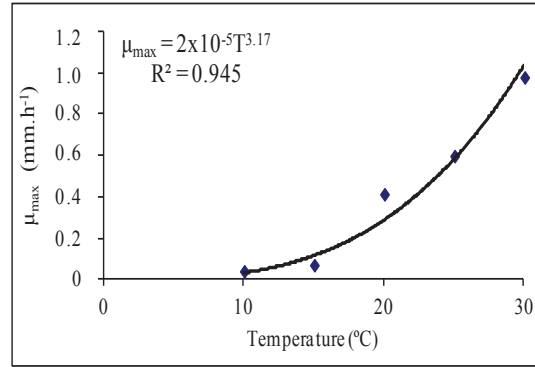
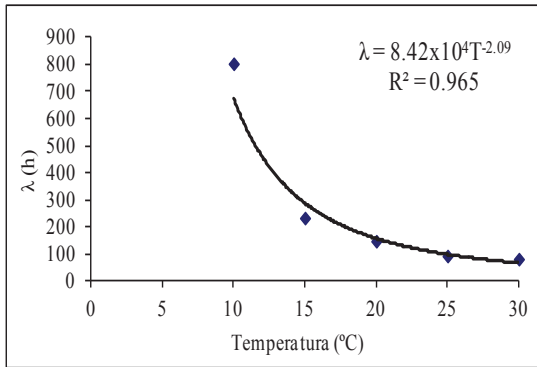
Herein  $k_1$  and  $k_2$  are model parameters; the sub-indexes indicate the primary kinetic parameter to which they are related ( $\lambda$ ,  $\mu_{\max}$  or A).

The variation of the kinetic parameters with temperature, for different soluble solids concentration is presented in Figure 4.1.2, as well as the obtained parameters.

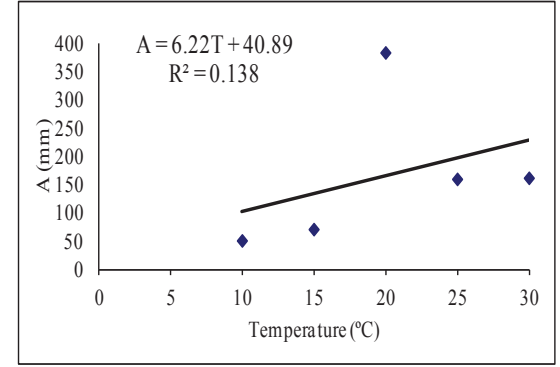
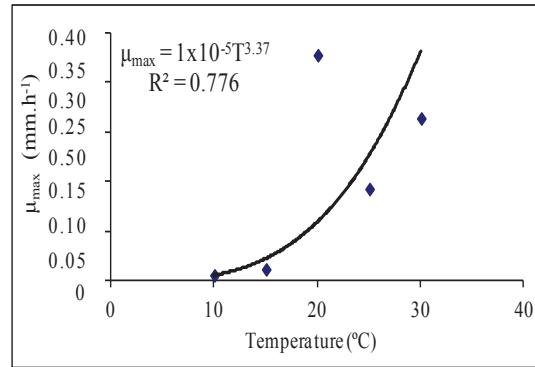
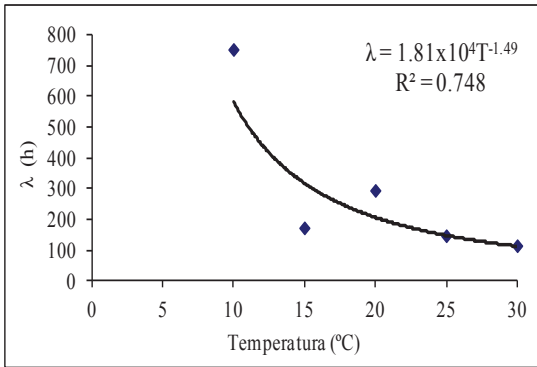
Figure 4.1.2 Influence of temperature on growth parameters  $\lambda$ ,  $\mu_{\max}$  and A, for different soluble solids concentration: 12 °Brix (a), 20 °Brix (b), 25 °Brix (c), 35 °Brix (d) and 45 °Brix (e). Solid lines represent models fits.



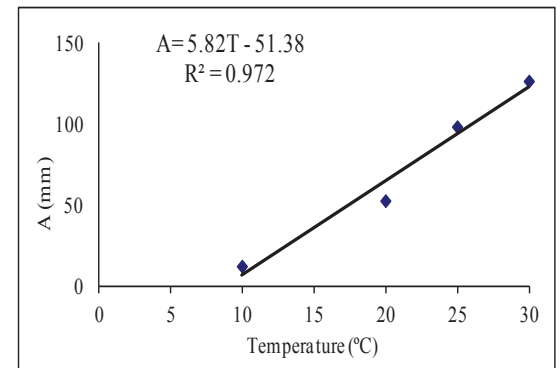
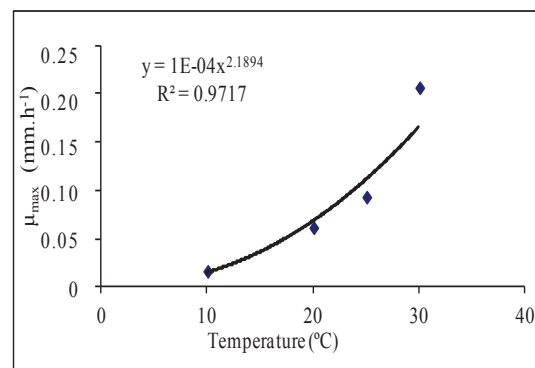
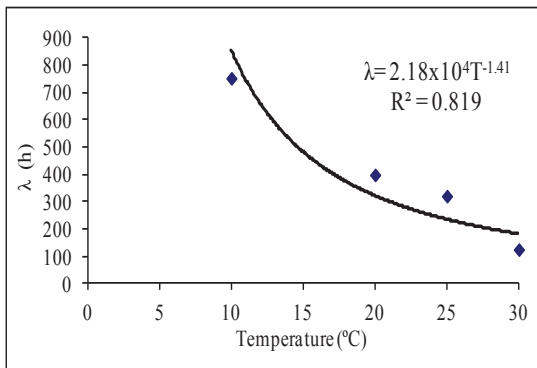
(c)



(d)



(e)



In a second step, the parameters secondary model, selected according to temperature dependence, were included in a new secondary model and equations that describe the influence of soluble solids concentration were obtained, being generally of the form:

$$k_{1_\lambda} = a_\lambda S + b_\lambda \quad (4.1.5)$$

$$k_{2_\lambda} = c_\lambda S + d_\lambda \quad (4.1.6)$$

$$k_{1_{\mu_{\max}}} = a_{\mu_{\max}} \exp(b_{\mu_{\max}} S) \quad (4.1.7)$$

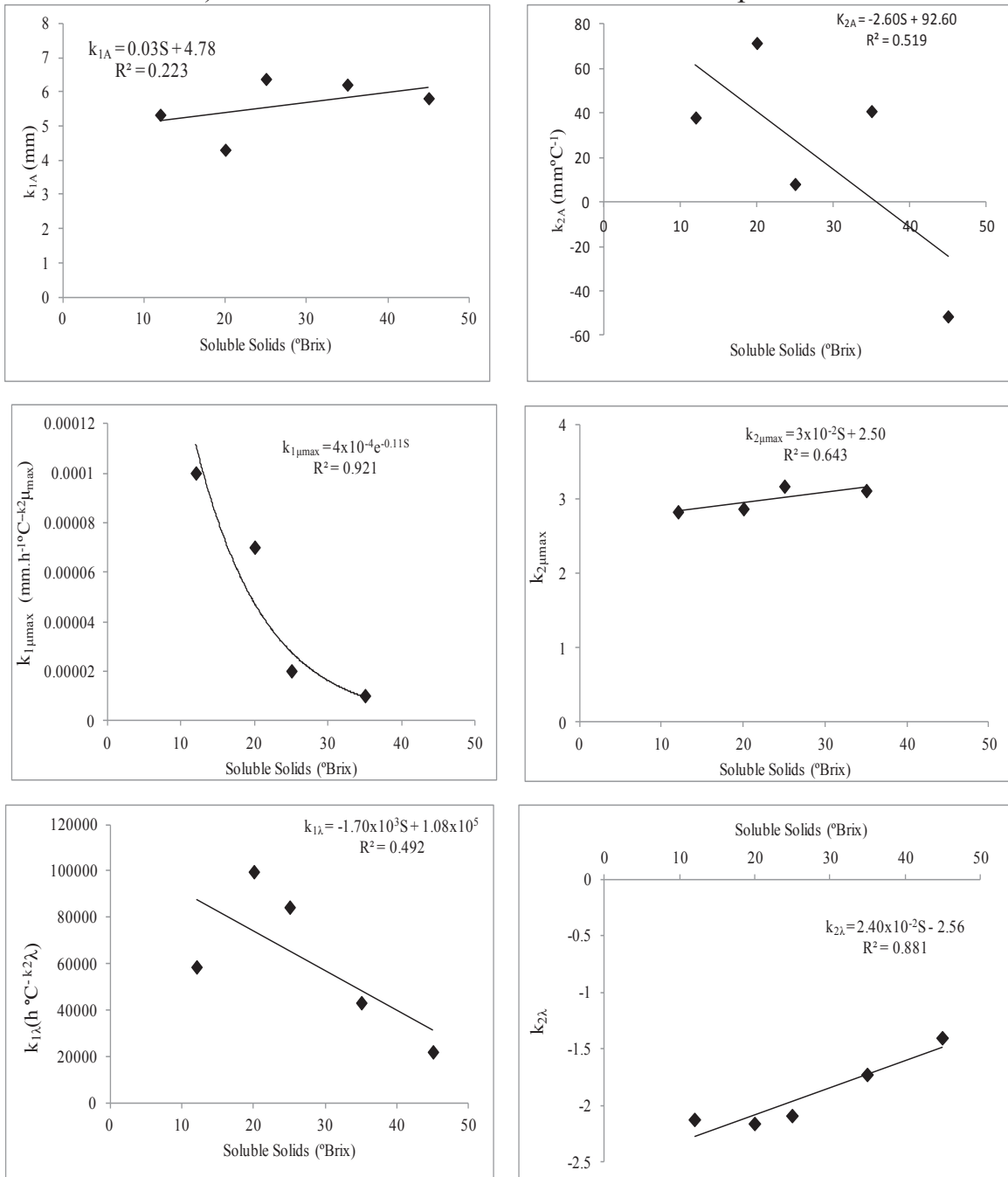
$$k_{2_{\mu_{\max}}} = c_{\mu_{\max}} S + d_{\mu_{\max}} \quad (4.1.8)$$

$$k_{1_A} = a_A S + b_A \quad (4.1.9)$$

$$k_{2_A} = c_A S + d_A \quad (4.1.10)$$

where  $S$  is soluble solids concentration (°Brix) and  $a$ ,  $b$ ,  $c$  and  $d$  are parameters; the indexes indicate the primary kinetic parameter to which they are related. The individual fits of the previous equations can be visualized in Figure 4.1.3.

Figure 4.1.3 Variation of the parameters  $k_1$  and  $k_2$  (eqs. 4.1.5, 4.1.6, 4.1.7, 4.1.8, 4.1.9 and 4.1.10) with soluble solids content. Solid lines represent model fits.



In some cases, a considerable dispersion of data was observed and consequently lower  $R^2$  values were obtained, which is indicative that model could lack prediction. However, the purpose of these prediction was to understand the dependence of kinetic parameters on soluble solids concentration and this was attained. The final objective was to develop a model, with a mathematical skeleton based on the previous equations that allows prediction of *B. fulva* growth for a given time, based on temperature conditions and soluble solids concentration.



With this in mind, the equations from 4.1.2 to 4.1.10 were merged with the Gompertz based model (eq. 4.1.1), and a global regression with all data points at all temperature and soluble solids concentration was performed in one step, aiming at obtaining a global kinetic model that included those effects. The obtained model is the following:

$$y = (5.6T + (-2.6S + 92.6)) \exp \left\{ - \exp \left[ \left[ \frac{4 \times 10^{-4} \exp(-0.1S) T^{(0.03S+2.5)} \exp(1)}{5.6T + (-2.6S + 92.6)} \right] \left[ (-1.7 \times 10^3 S + 1.1 \times 10^5) T^{(0.02S-2.6)} - t \right] + 1 \right] \right\} \quad (4.1.11)$$

The ability for prediction of the previous model, expressed in terms of temperature conditions and soluble solids content, can be seen in Figure 4.1.1 (dotted lines). In some situations, the model lacked adequate description of *B. fulva* growth. This was more pronounced at 20 °C and 15 °C. Nevertheless, in the cases where accuracy was sacrificed, the model made an overestimation of the fungal growth, except at 20 °C where an underestimation was observed. Such overestimation is not limitative, since if the model is used to predict quality degradation, it would predict higher quality degradation than the one that actually occurred, and risky situations are therefore avoided.

Overall it can be said that the model is a valuable tool for predicting *B. fulva* growth in apple juices with given soluble solids concentration and stored under isothermal conditions. It will also be a great contribution for the design of apple juices shelf life, in the range of conditions tested.

#### 4. Conclusions

*Byssochlamys fulva* growth in solidified apple juices under isothermal conditions has a sigmoidal tendency, showing a lag time, followed by a maximum growth rate period, tending, in some experimental conditions, to an asymptotic value. Such complete or incomplete sigmoidal tendencies were adequately described by a Gompertz-based model. Under the conditions tested, the storage temperature and the juices soluble solids content significantly affected the kinetic behavior of the fungal. Those effects were included in the primary Gompertz-based kinetic model and a mathematical Global model, expressed in terms of apple juices soluble solids content and temperature, that allowed satisfactory prediction of the *B. fulva* growth in the product throughout storage time was obtained. This model can be

used as a tool for designing shelf life conditions and predicting the risk and the extension of contamination of apple juices along storage.

## References

ANDRES, S. C., GIANNUZZI, L., & ZARITZKY, N. E. (2001). Mathematical modelling of microbial growth in packaged refrigerated orange juice treated with chemical preservatives. *Journal of Food Science*, 66, 724–728.

BAGLIONI, F. (1999). *Estudo da ocorrência de fungos filamentosos termoresistentes em polpa de tomate envasada assepticamente*. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas.

BAHÇEÇI, K. S., & ACAR, J. (2007). Modeling the combined effects of pH, temperature and ascorbic acid concentration on the heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *International Journal of Food Microbiology*, 120(3), 266-273.

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

CORRADINI, M. G. & PELEG, M. (2005). Estimating non-isothermal bacterial growth in foods from isothermal experiments data. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 187-200.

GIBSON, A. M., BARANYI, J., PITT, J. I., EYLES, M. J., & ROBERTS, T. A. (1994). Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 419-431.

GIBSON, A. M., & HOCKING, A. D. (1997). Advances in the predictive modeling of fungal growth in food. *Trends in Food Science and Technology*, 8, 353-358.

HOUBRAKEN, J., SAMSON, R. A., & FRISVAD, J. C. (2006). *Byssochlamys*: significance of heat resistance and mycotoxin production. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 571, 211 – 224.

IBRAHIM, G. E., HASSAN, I. M., ABD-ELRASHID, A. M., EL-MASSRY, K. F., EH-GHORAB, A. H., RAMADAN MANAL, M., &

OSMAN, F. (2011). Effect of clouding agents on the quality of apple juice during storage. *Food Hydrocolloids*, 25, 91-97.

JUNEJA, V. K., MELENDRES, M. V., HUANG, L., GUMUDAVELLI, V., SUBBIAH, J., & THIPPAREDDI, H. (2007). Modeling the effect of temperature on growth of *Salmonella* in chicken. *Food Control*, 24, 328-335.

LAHLALI, R., SERRHINI, M. N., FRIEL, D., & JIJAKLI, M. H. (2007). Predictive modelling of temperature and water activity (solutes) on the *in vitro* radial growth of *Botrytis cinerea*. *International Journal of Food Microbiology*, 114, 1-9.

LU, Y., & FOO, L.Y. (2000). Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. *Food Chemistry*, 68(1), 81-85.

MARÍN, S., MORALES, H., RAMOS, A. J., & SANCHIS, V. (2008). Fitting of colony diameter and ergosterol as indicators of food borne mould growth to known growth models in solid medium. *International Journal of Food Microbiology*, 121, 139-149.

MARÍN, S., RAMOS, A. J., & SANCHIS, V. (2005). Comparison of methods for the assessment of growth of food spoilage moulds in solid substrates. *International Journal of Food Microbiology*, 99, 329-341.

MCMEEKIN, T. A., & ROSS, T. (2002). Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management. *International Journal of Food Microbiology*, 78, 133-153.

PANAGOU, E. Z., CHELONAS, S., CHATZIPAVLIDIS, I., & NYCHAS, G.J.E. (2010). Modelling the effect of temperature and water activity on the growth rate and growth/no growth interface of *Byssochlamys fulva* and *Byssochlamys nivea*. *Food Microbiology*, 27, 618-627.

PITT, J. I., & HOCKING, A. D. (1997). *Fungi and food spoilage*. London: Blackie Academic and Professional.

PITT, J. I., & MISCAMBLE, B. F. (1995). Water relations of *Aspergillus flavus* and closely related species. *Journal of Food Protection*, 58, 86-90.

RAJASHEKHARA, E., SURESH, E. R., & ETHIRAJ, S. (1996). Influence of different heating media on thermal resistance of *Neosartorya fischeri* isolated from papaya fruit. *Journal of Applied Bacteriology*, 81(3), 337-340.

- RATKOWSKY, D. A., OLLEY, J., MCMEEKIN, T. A., & BALL, A. (1982). Relationship between temperature and growth-rate of bacterial cultures. *Journal of Bacteriology*, 149(1), 1-5.
- SALOMÃO, B. C. M., MASSAGUER, P. R., & ARAGÃO, G. M. F. (2008). Isolamento e seleção de fungos filamentosos termorresistentes do processo produtivo de néctar de maçã. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28(1), 116-121.
- SALOMÃO, B. C. M., SLONGO, A. P., & ARAGÃO, G. M. F. (2007). Heat resistance of *Neosartorya fischeri* in various juices. *LWT-Food Science and Technology*, 40(4), 676-689.
- SANT'ANA, A. S., ROSENTHAL, A., & MASSAGUER, P. R. (2009). Heat resistance and effects of continuous pasteurization on the inactivation of *Byssochlamys fulva* ascospores in clarified apple juice. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 197-209.
- SWANSON, K. M. J., BUSTA, F. F., PETERSON, E. H., & JOHNSON, M. G. (1992). Colony count methods. In: Vanderzant, C. & Splittstoesser, D. F. (Eds). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (pp. 75-96). Washington: American Public Health Association.
- TANIWAKI, M. H., HOCKING, A. D., PITT, J. I., & FLEET, G. H. (2010). Growth and mycotoxin production by fungi in atmospheres containing 80% carbon dioxide and 20% oxygen. *International Journal of Food Microbiology*, 143, 218-225.
- TANIWAKI, M. H., HOCKING, A. D., PITT, J. I., & FLEET, G. H. (2009). Growth and mycotoxin production by food spoilage fungi under high carbon dioxide and low oxygen atmospheres. *International Journal of Food Microbiology*, 132, 100-108.
- TANIWAKI, M. H., PITT, J. I., HOCKING, A. D., & FLEET, G. H. (2006). Comparison of hyphal length, ergosterol, mycelium dry weight and colony diameter for quantifying growth of fungi from foods. In: Hocking, A.D., Pitt, J.I., Samson, R.A., Thrane, U. (Eds.), *Advances in food mycology*. Springer, New York, 49-67.
- WALPORE, R. E. & MYERS, R. H. (1993). *Probability and statistics for engineers and scientists*. (5th ed.). New York: MacMillan Publishing Company.

ZWIETERING, M. H., JONGEBURGER, I., ROMBOUTS, F. M., & RIET, K. V. (1990). Modeling of bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 1875-1881.

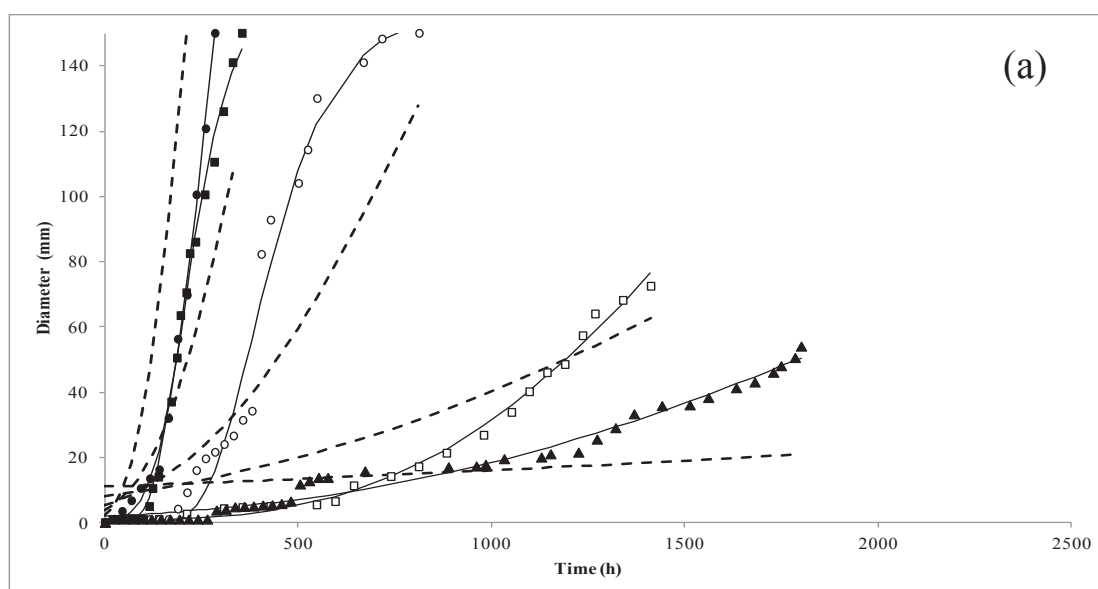
### 4.1.2 Informações Complementares

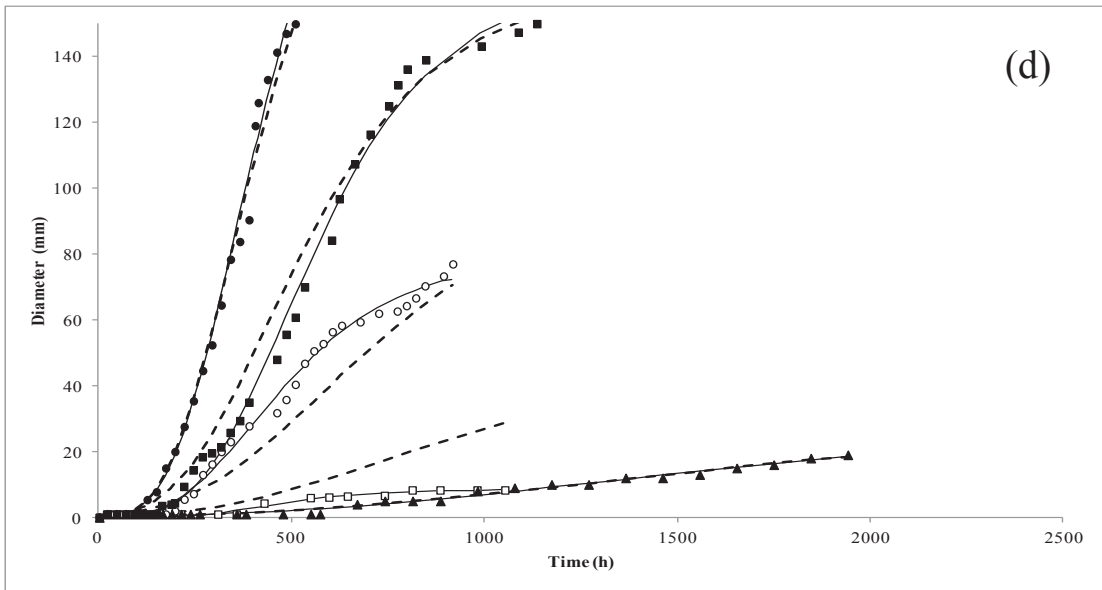
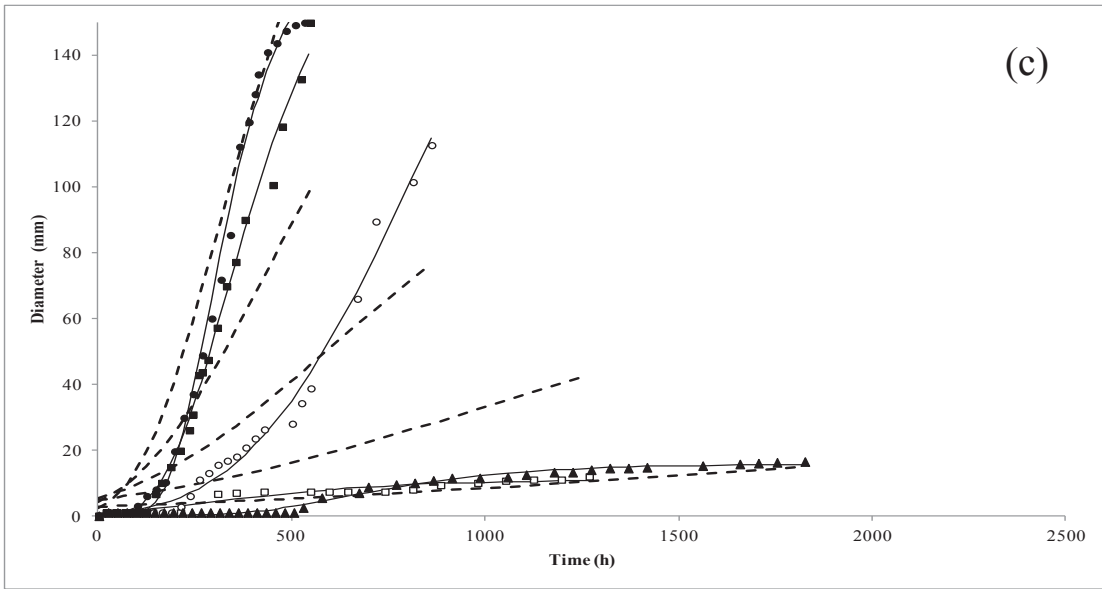
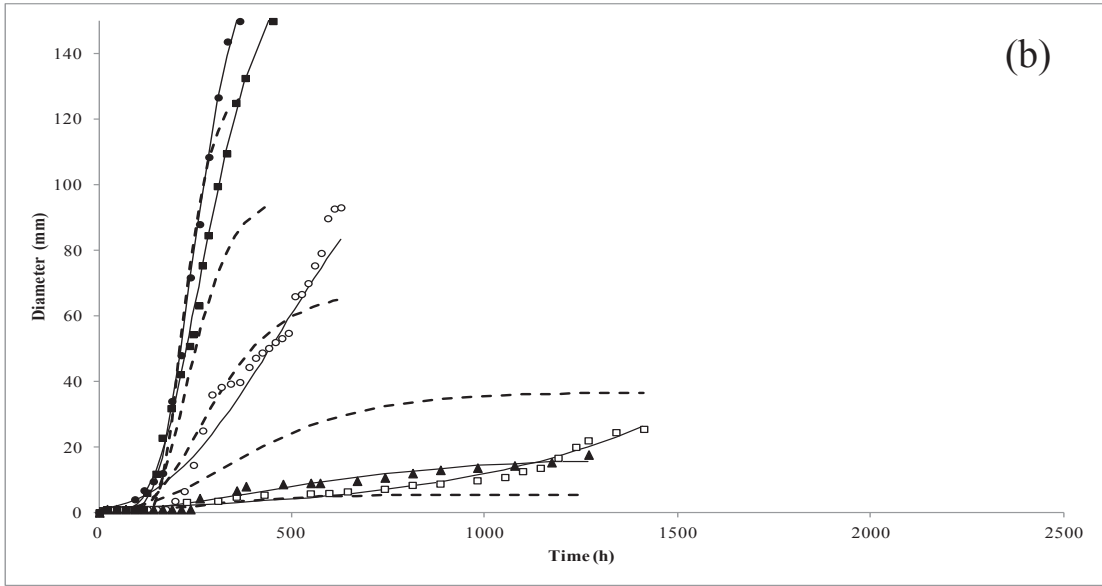
#### Avaliação da variação da temperatura e da concentração de sólidos solúveis no crescimento de *Neosartorya fischeri* em suco de maçã solidificado

Para avaliação da variação da temperatura e da concentração de sólidos solúveis no crescimento de *Neosartorya fischeri* em suco de maçã solidificado foi adotado o mesmo procedimento descrito no item 2 contido no artigo.

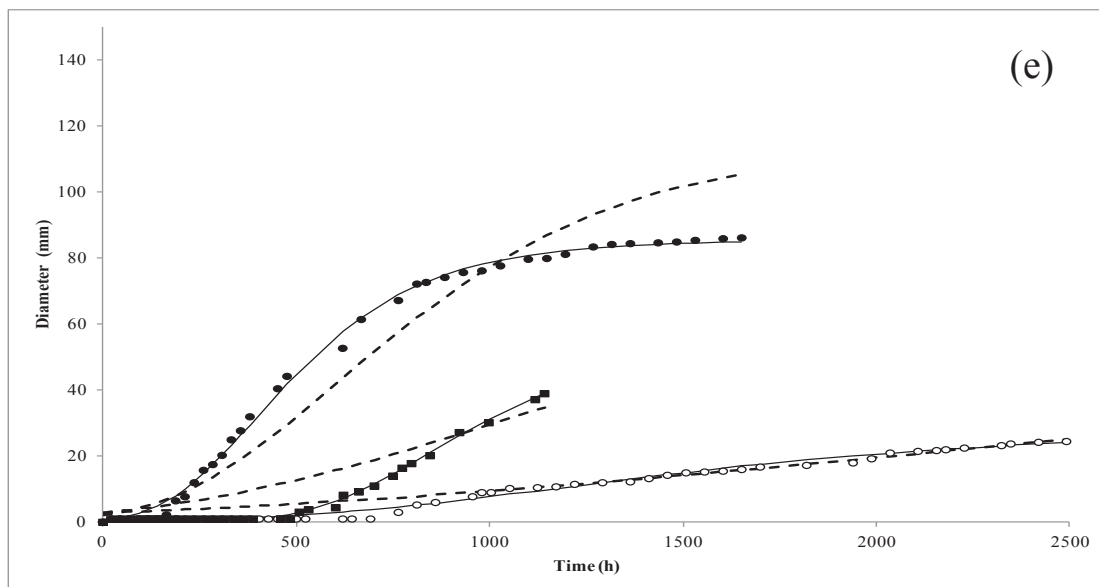
O modelo de Gompertz Modificado (eq. 4.1.1) foi ajustado aos dados experimentais de crescimento de *Neosartorya fischeri*, em suco de maçã solidificado ao longo do tempo, obtidos através da medida de diâmetro da colônia. A Figura 4.1.4 apresenta os dados experimentais e ajustes do modelo do crescimento de *N. fischeri* em suco de maçã solidificado.

Figura 4.1.4 Crescimento de *N. fischeri* em suco de maçã solidificado, com teor de sólidos solúveis de 12 ° Brix (a), 20 ° Brix (b), 25 ° Brix (c), 35 ° Brix (d) e 45 ° Brix (e) às temperaturas de 30 °C (●), 25 °C (■), 20 °C (○), 15 °C (□) e 10 °C (▲). As linhas contínuas representam ajustes do modelo de Gompertz Modificado (eq. 4.1.1) e as linhas tracejadas representam a previsão do modelo Global (eq. 4.1.12).









Em geral, o comportamento cinético mostrou um atraso inicial ( $\lambda$ ), seguido por um período exponencial representado pela velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\max}$ ), tendendo a uma fase estacionária (A). Tais tendências sigmoidais foram convenientemente descritas pelo modelo de Gompertz Modificado. O ajuste do modelo foi avaliado pelo coeficiente de determinação  $R^2$ . Os valores dos parâmetros para as curvas de crescimento de *N. fischeri*, em suco de maçã solidificado nas condições estudadas e os coeficientes de determinação, estão apresentados na Tabela 4.1.3.

Tabela 4.1.3 Parâmetros estimados do modelo de Gompertz Modificado aplicado ao crescimento de *N. fischeri* em suco de maçã solidificado com diferentes teores de sólidos solúveis (°Brix/ $a_w$ ) e em condições isotérmicas determinadas e coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

°Brix / $a_w$	Temperatura (°C)	A ± margem de erro (mm)	$\mu_{max} \pm$ margem de erro (mm h <sup>-1</sup> )	$\lambda \pm$ margem de erro (h)	$R^2$
12/0,99	10	237,42±239,41	0,05±0,03	905,51±114,41	0,978
	15	376,59±335,50	0,15±0,08	916,22±110,36	0,994
	20	157,33±15,41	0,48±0,09	264,18±25,51	0,979
	25	165,49±13,55	0,80±0,07	123,72±7,44	0,996
	30	477,77±343,58	1,19±0,39	158,21±38,10	0,996
20/0,98	10	16,74±2,33	0,02±0,01	101,08±61,22	0,965
	20	147,43±201,68	0,19±0,06	179,73±116,14	0,973
	25	179,27±13,79	0,62±0,04	146,24±7,01	0,997
	30	187,33±18,78	0,86±6,58	154,44±6,58	0,998
25/0,97	10	15,66±0,76	0,02±0,01	388,17±40,67	0,981
	15	11,02±1,70	0,01±0,01	7,92±110,06	0,924
	20	343,55±221,87	0,26±0,08	415,47±118,8	0,988
	25	182,75±25,37	0,42±0,03	171,43±11,10	0,993
	30	173,75±13,41	0,60±0,06	183,45±12,20	0,994
35/0,95	10	30,14±8,60	0,01±0,01	468,55±83,80	0,985
	15	8,56±1,22	0,02±0,01	249,71±82,11	0,942
	20	78,70±5,67	0,14±0,01	199,48±24,12	0,990
	25	162,97±7,26	0,27±0,02	259,83±16,37	0,995
	30	237,70±56,21	0,51±0,04	185,90±14,29	0,992
45/0,93	20	27,60±2,16	0,01±0,01	502,88±50,45	0,988
	25	55,98±7,92	0,07±0,01	541,99±16,17	0,994
	30	85,10±1,30	0,13±0,01	157,25±13,82	0,997

É possível verificar na Tabela 4.1.3 que o coeficiente de determinação foi superior a 0,92 no modelo estudado. Apesar do valor de  $R^2$  ser baixo em alguns casos (em torno de 0,924), o que é revelador de uma variabilidade considerável dos dados experimentais, a qualidade do ajuste não ficou comprometida.

Assim como para *B. fulva*, é difícil discutir sobre o diâmetro máximo da colônia (parâmetro A), visto que, na maioria das condições estudadas para *N. fischeri*, não se observa uma diminuição da atividade microbiana, sendo este parâmetro limitado pelo tamanho da placa. Observando a Figura 4.1.4 e a Tabela 4.1.3 percebe-se que os valores do parâmetro A preditos pelo modelo, em muitos casos, são superiores ao diâmetro total da placa. Ocorre apenas uma exceção na condição a

45 °Brix, onde uma estabilização do crescimento é observada antes do final da placa ser atingido, pois nesta concentração de sólidos solúveis os microrganismos têm uma maior dificuldade de crescer devido a baixa atividade de água.

Estudando o crescimento de fungos termorresistentes, Valik et al. (2001) constataram que uma colônia de *Neosartorya fischeri*, a 25 °C e  $a_w$  de 0,85 leva em torno de 3 dias para atingir 3 mm de diâmetro. Neste estudo, nas condições de  $a_w$  0,93 e temperatura de 25 °C só foi observado crescimento do fungo a partir de 21 dias de incubação.

Silva et al. (2010) avaliaram como o crescimento radial de *Aspergillus* IOC 4573 é afetado pela temperatura (17,2–22,8 °C) e pelo pH (3,28–4,7) em néctar de manga. A diminuição da temperatura de 22,8 para 17,2 °C resultou em um aumento de 16 vezes na fase de adaptação e o aumento da temperatura de 20 para 22,8 °C levou a um aumento de quatro vezes na velocidade máxima de crescimento. Neste trabalho, ao estudar o crescimento de *N. fischeri*, a elevação da temperatura de incubação de 10 para 30 °C, na concentração de sólidos solúveis de 12 °Brix, acarretou em uma diminuição na duração da fase de adaptação em torno de 6 vezes e um aumento na velocidade específica máxima de crescimento de aproximadamente 24 vezes.

Samapundo et al. (2007) investigaram o efeito de cinco temperaturas (16, 22, 25, 30 e 37 °C) e sete valores  $a_w$  entre 0,801 e 0,982 sobre o crescimento de *Aspergillus* isolados de milho. Os isolados estudados tinham temperaturas ideais de crescimento de aproximadamente 30 °C. Nenhum crescimento foi observado na  $a_w$  0,801, o crescimento só ocorre a 25 e 30 °C em  $a_w$  0,822. Nesta pesquisa não foi observado crescimento de *N. fischeri* nas  $a_w$  inferiores a 0,93.

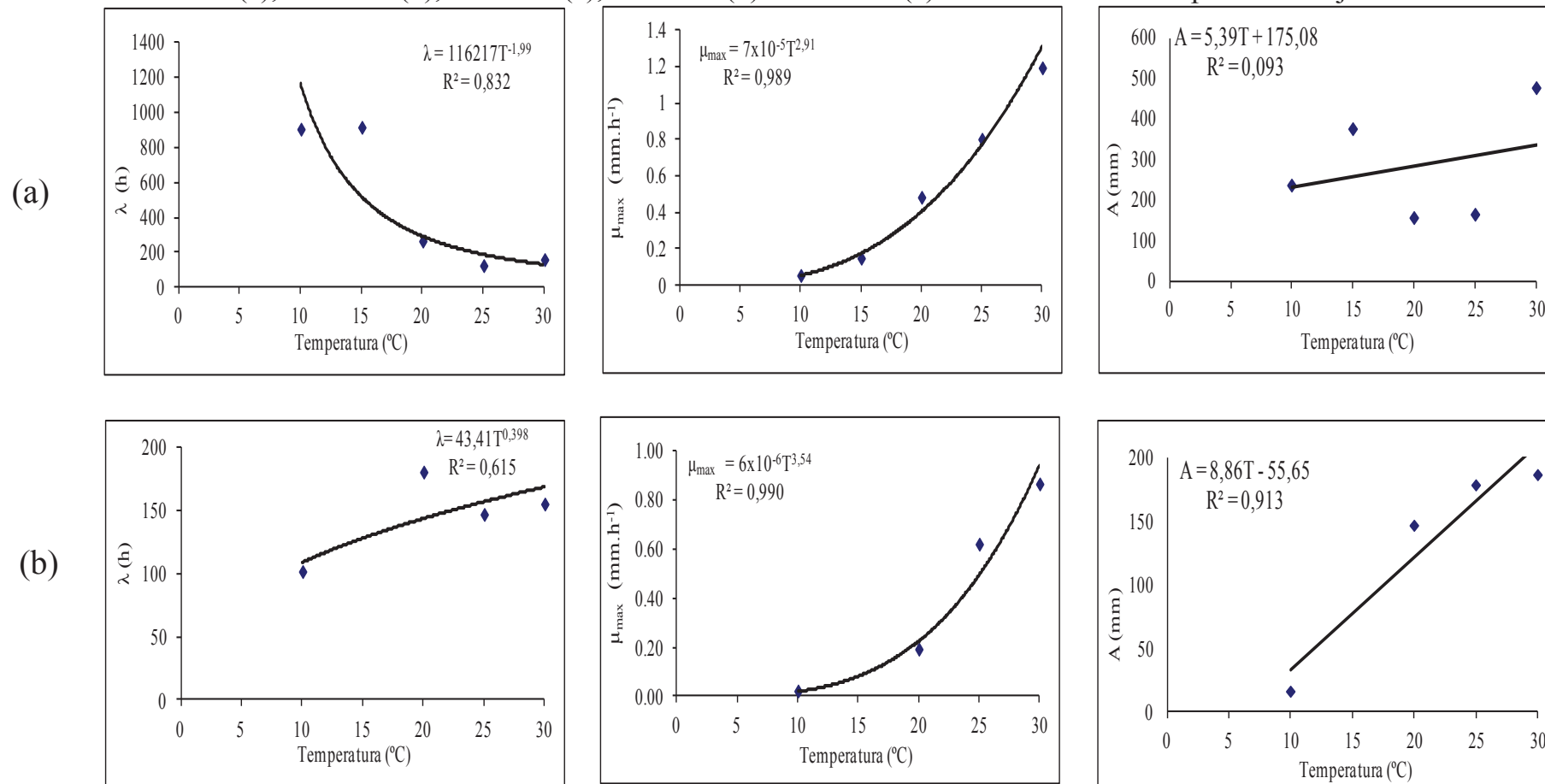
Baert et al. (2007) estudaram a validação de modelos que descrevem o efeito da temperatura de armazenamento (30, 25, 16, 10, 4 e 2 °C) sobre a velocidade de crescimento de *Penicillium expansum* em meio contendo purê de maçã e ágar. A temperatura em que *P. expansum* cresceu mais rapidamente variou entre 24 e 27 °C. Para *N. fischeri* foi observado que a melhor temperatura de crescimento, nas condições avaliadas neste trabalho, se encontra entre 25 e 30 °C.

### **Modelo preditivo do crescimento de *N. fischeri***

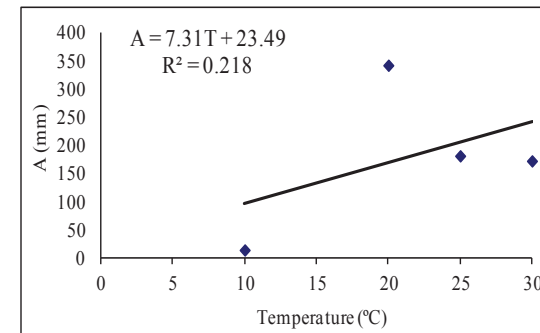
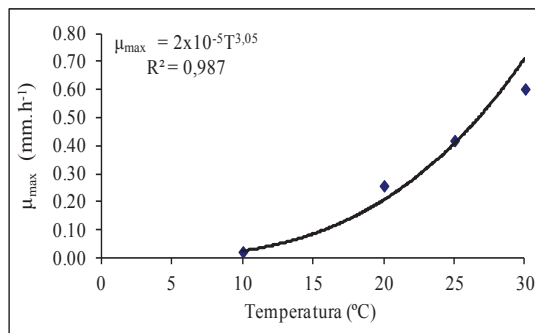
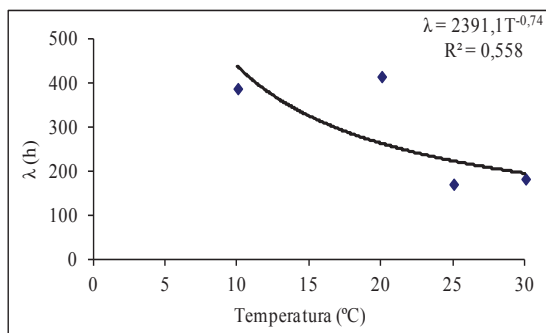
Uma análise similar à predição do crescimento de *B. fulva* pelo modelo Global foi realizada para *N. fischeri*.

A variação dos parâmetros de crescimento com a temperatura, para diferentes concentrações de sólidos solúveis é observada na Figura 4.1.5, bem como as equações dos modelos secundários obtidos.

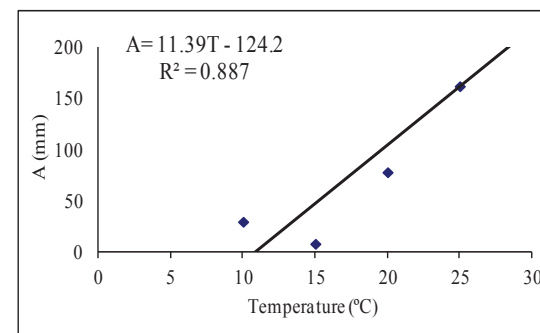
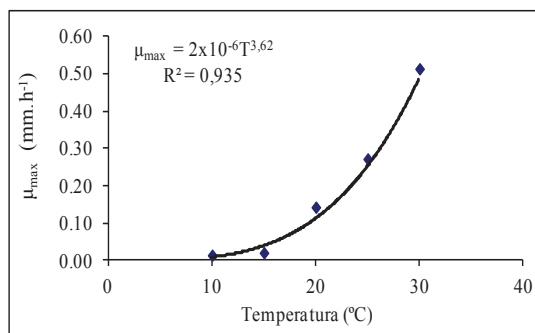
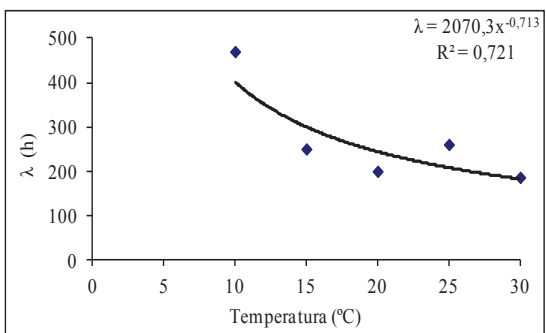
Figura 4.1.5 Variação dos parâmetros  $\lambda$ ,  $\mu_{\max}$  e  $A$  de *N. fischeri* com a temperatura, para diferentes concentrações de sólidos solúveis: 12 °Brix (a), 20 °Brix (b), 25 °Brix (c), 35 °Brix (d) e 45 °Brix (e). Linhas contínuas representam ajustes do modelo.



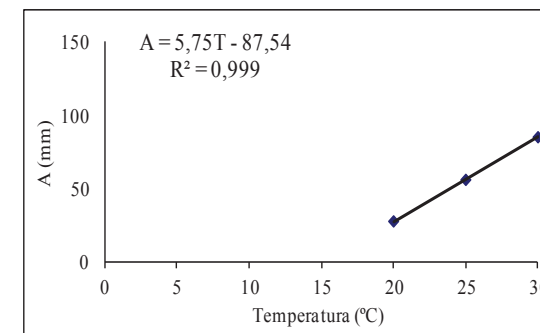
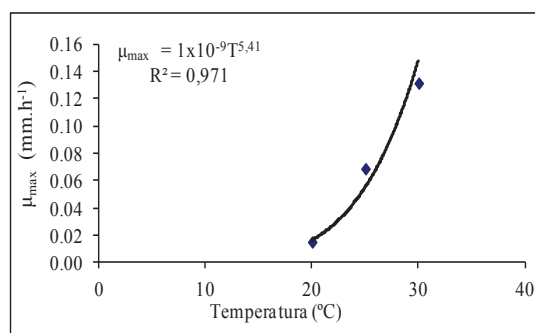
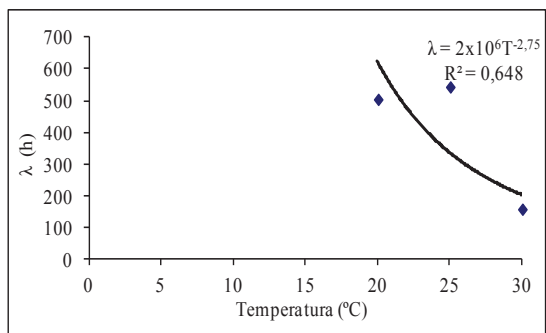
(c)



(d)



(e)



Com base nos valores de  $R^2$ , é possível concluir que o Modelo Linear descreve de uma forma satisfatória a influência da variação da temperatura sobre o aumento logarítmico da população ( $A$ ), assim como o Modelo da Potência descreve bem a influência da variação deste fator sobre os parâmetros duração da fase de adaptação ( $\lambda$ ) e velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\max}$ ).

Não foi possível encontrar uma equação que descrevesse a influência da variação do teor de sólidos solúveis sobre os parâmetros do modelo secundário obtidos em relação à temperatura, como na análise apresentada anteriormente para o *B. fulva* (eqs. 4.1.5, 4.1.6, 4.1.7, 4.1.8, 4.1.9 e 4.1.10). Desta forma, o modelo global para *N. fischeri* foi obtido apenas com a influência da temperatura sobre os parâmetros como descrito na equação 4.1.12.

$$y = (8,62T + 242,18) \exp \left\{ - \exp \left[ \frac{1,04 * 10^{-6} T^{4,13} \exp(1)}{8,62T + 242,18} \right] \left[ (1 * 10^6 T^{-2,72}) - t \right] + 1 \right\} \quad (4.1.12)$$

A capacidade de predição do Modelo Global (linhas tracejadas) expressa em termos de condições de temperatura, pode ser visto na Figura 4.1.4. A falta de descrição adequada do modelo para o crescimento de *N. fischeri* foi mais pronunciado nas temperaturas de 15 e 20 °C. Nas demais temperaturas, pode ser verificado que a inclusão da temperatura no Modelo Global permite uma boa predição de crescimento.

Zimmermann et al. (2011) avaliaram a influência da atividade de água (0,90-0,99) e da idade dos ascósporos (30-90 dias) sobre o crescimento radial de *N. fischeri* em suco de abacaxi pelo ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais e concluíram que ambos os modelos foram capazes de descrever o crescimento microbiano em suco de abacaxi. Os resultados mostraram que a  $a_w$  influenciou os parâmetros de crescimento. No presente estudo, também foi observado que a  $a_w$  influenciou nos parâmetros de crescimento de *N. fischeri* em suco de maçã.

Medina e Magan (2010) examinaram o efeito da atividade de água (0,995-0,90) e da temperatura (10-37 °C) sobre o crescimento radial de *Fusarium langsethiae* em um meio a base de aveia. Resultados mostraram que a melhor  $a_w$  para o crescimento estava entre 0,98-0,995 e 25 °C. Como pode ser observado nos resultados apresentados neste trabalho, os fungos estudados também se desenvolveram melhor nas  $a_w$  superiores a 0,97 e nas temperaturas ente 20 e 30 °C.

#### **4.2 Modelagem Matemática do Crescimento de *Byssochlamys fulva* e *Neosartorya fischeri* em Suco de Maçã Solidificado em Diferentes Temperaturas de Incubação e Diferentes Concentrações de Sólidos Solúveis**

A modelagem matemática do crescimento microbiano foi utilizada para estimar os parâmetros: velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\max}$ ) e tempo de duração da fase lag ( $\lambda$ ), necessários para o estudo do crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri* sob diferentes temperaturas de incubação (10, 15, 20, 25 e 30 °C) e diferentes concentrações de sólidos solúveis (12, 20, 25, 35, 45, 55 e 70 °Brix) e, respectivamente, diferentes atividades de água (0,99; 0,98; 0,97; 0,95; 0,93, 0,88 e 0,75).

Como verificado no artigo anterior, a maioria das curvas de crescimento não apresenta fase estacionária, sendo assim, outros modelos matemáticos foram estudados, desconsiderando-se esta fase. Os modelos de Gompertz Modificado, Baranyi e Roberts e Baranyi e Roberts simplificado, sem considerar a fase estacionária de crescimento, foram ajustados aos dados experimentais de crescimento ao longo do tempo, obtidos através da medida de diâmetro da colônia de *B. fulva* e *N. fischeri* em suco de maçã solidificado. Além disso, estão incluídas informações complementares referentes à comparação dos modelos secundários pelos índices estatísticos, para os dois microrganismos estudados.



#### 4.2.1 Parte 2: Modelagem matemática do crescimento de *Byssochlamys fulva* e *Neosartorya fischeri* em suco de maçã solidificado em diferentes temperaturas de incubação e diferentes concentrações de sólidos solúveis.

##### Resumo

O suco de maçã é um produto popular e tem grande importância comercial para alguns países. *Byssochlamys fulva* e *Neosartorya fischeri* são fungos produtores de ascósporos que são resistentes ao calor e podem ser encontrados em suco de maçã. O crescimento de fungos filamentosos não é fácil de quantificar, pois eles não crescem como células únicas, mas como hifas filamentosas. Assim, um dos métodos comumente utilizados para quantificar o crescimento de fungos é a medida do diâmetro das colônias em função do tempo. O objetivo deste estudo foi verificar a influência de dois fatores: temperatura (10, 15, 20, 25 e 30 °C) e teor de sólidos solúveis (12, 20, 25, 35, 45, 55 e 70 °Brix) e, respectivamente, diferentes atividades de água (0,99; 0,98; 0,97; 0,95; 0,93; 0,88 e 0,75), sobre o crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri* em suco de maçã solidificado e a capacidade dos modelos de Gompertz Modificado, Baranyi e Roberts e Baranyi e Roberts simplificado (sem considerar a fase estacionária de crescimento) para descrever o crescimento do diâmetro da colônia (mm) destes microrganismos ao longo do tempo (h). Os resultados mostraram que os modelos avaliados apresentaram boa capacidade em descrever o crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri* em suco de maçã solidificado em todas as condições estudadas. Pelos resultados obtidos, pode-se considerar que o modelo de Baranyi e Roberts simplificado é o mais indicado para descrever o crescimento destes fungos. A influência da temperatura e da concentração de sólidos solúveis nos parâmetros de crescimento  $\lambda$  e  $\mu_{\max}$ , obtidos por esse modelo, foi descrita através dos modelos secundários, sendo que a influência da temperatura na variação da fase lag foi melhor representada pelo modelo da potência e na velocidade específica máxima de crescimento pelo modelo da raiz quadrada. A influência da concentração de sólidos solúveis, tanto sobre  $\lambda$  quanto sobre  $\mu_{\max}$ , foi melhor descrita pelo modelo linear. Este trabalho pode trazer inúmeras contribuições para a indústria processadora de sucos, uma vez que, a partir dos dados obtidos, podem ser estabelecidas as condições que propiciam a inibição do crescimento de microrganismos incidentes em suco de maçã.

**Palavras-chave:** Suco de maçã, fungos termorresistentes, crescimento radial, modelagem matemática.

## 1. Introdução

A conservação pelo calor é o método normalmente utilizado para sucos a base de frutas. No entanto, os fungos termorresistentes podem ser ativados durante este processo e germinarem durante o armazenamento provocando a deterioração do produto, produção de micotoxinas e perdas econômicas (Engel & Teuber, 1991, Zimmermann et al., 2011).

Algumas espécies de fungos apresentam características que os tornam mais resistentes ao calor, devido à sua capacidade de produção de ascósporos. Espécies como *Byssochlamys* sp. e *Neosartorya fischeri* são descritos como produtores de micotoxinas (Sant'Ana et al., 2009; Moake et al., 2005).

O crescimento de fungos (expresso como o aumento do diâmetro da colônia) foi modelado empiricamente contra o tempo utilizando o modelo de Gompertz Modificado (Zwietering et al., 1990). Este modelo tem sido utilizado para modelagem do crescimento de fungos baseado na sua comprovada flexibilidade para diferentes dados de crescimento assimétrico (Char et al., 2005; Marín et al., 2008). O modelo de Baranyi e Roberts (1994), que originalmente foi desenvolvido para crescimento bacteriano, também tem sido utilizado com sucesso para descrever o crescimento de leveduras e fungos filamentosos tais como *Penicillium roqueforti* (Valik et al., 1999), *Aspergillus flavus* (Gibson et al., 1994), *Alternaria alternata*, *A. flavus*, *P. expansum*, dentre outros (Marín et al., 2008). Alguns autores, como Garcia et al. (2009) e Marín et al. (2008), assumem que não há limitação no crescimento da colônia, pois o micélio estará sempre crescendo em regiões periféricas da colônia, até atingir toda a placa. Sendo assim, é possível simplificar o modelo de Baranyi e Roberts para avaliar o crescimento de fungos, obtendo uma função de crescimento sem fase estacionária. A partir destes modelos primários, pode-se estimar os parâmetros de crescimento - velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\max}$ ) e duração da fase de adaptação ( $\lambda$ ) - que são subsequentemente utilizados na modelagem secundária (Marín et al., 2008).

O objetivo deste estudo foi comparar os modelos de crescimento, comumente usados para a modelagem primária, a fim de avaliar a sua utilidade para a estimativa dos parâmetros de crescimento. Também foi avaliado o uso da medida do diâmetro da colônia, como indicador do crescimento de fungos para modelagem primária e modelagem secundária.

## **2 Material e Métodos**

### **2.1 Microrganismos**

Neste estudo, foi analisado o crescimento de *Byssochlamys fulva* IOC 4518 isolado a partir de suco concentrado de maçã (Salomão et al., 2008) e de *Neosartorya fischeri* isolado de amostras retiradas da linha de processamento de néctar de maçã (Salomão, 2002).

### **2.2 Meios de crescimento**

A metodologia para obtenção dos meios de crescimento foi realizada de acordo com o Item 3.3 do Material e Métodos.

### **2.3 Avaliação do crescimento de *B. fulva* e *N. Fischeri***

A avaliação do crescimento dos fungos estudados foi realizada de acordo com o Item 3.4 e 3.4.1 da seção Material e Métodos.

### **2.4 Modelagem matemática**

Os modelos primários de Gompertz Modificado, Baranyi e Roberts e Baranyi e Roberts simplificado (sem fase estacionária) foram ajustados às curvas de crescimento experimentais e comparados estatisticamente através do cálculo dos seguintes índices: erro médio da raiz quadrática (RMSE) e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) utilizando-se o *software* Matlab 7.10 (MathWorks<sup>®</sup>, Natick, USA). Após a seleção do melhor modelo, foram obtidos os parâmetros de crescimento microbiano: velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\max}$  (mm/h)) e duração de fase de adaptação ( $\lambda$  (h)) para cada temperatura e teor de sólidos solúveis estudados.

A Tabela 4.2.1 apresenta as equações que representam os modelos primários utilizados para ajustar os dados de crescimento dos fungos.

Tabela 4.2.1 Modelos primários utilizados para ajustar os dados de crescimento dos fungos.

<b>Modelo Primário</b>	<b>Equação</b>
<b>Gompertz Modificado</b>	$D(t) = A \cdot \exp \left\{ - \exp \left[ \frac{\mu_{\max} \cdot e}{A} (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$
<b>Baranyi e Roberts</b>	$D(t) = y_0 + \mu_{\max} A(t) - \ln \left( 1 + \frac{\exp(\mu_{\max} A(t)) - 1}{\exp([y_{\max} - y_0])} \right)$
	Onde:
	$A(t) = \left( t + \left( \frac{1}{\mu_{\max}} \right) \ln(\exp(-\mu_{\max} t) - \exp(-\mu_{\max} t - (\mu_{\max} \lambda)) + \exp(-\mu_{\max} \lambda)) \right)$
<b>Baranyi e Roberts Simplificado</b>	$D(t) = \ln[1 + \exp(\mu_{\max} (t - \lambda)) - \exp(-\mu_{\max} \lambda)]$

onde  $D(t)$  é o diâmetro da colônia,  $y_0$  e  $y_{\max}$  referem-se à concentração microbiana no instante  $t$ , em  $t = t_0$  e no estado estacionário, respectivamente.

Estes parâmetros foram obtidos para as curvas de crescimento sob diferentes temperaturas isotérmicas e sob diferentes concentrações de sólidos solúveis. Após a obtenção dos parâmetros primários de crescimento ( $\lambda$  e  $\mu_{\max}$ ), modelos secundários (linear, exponencial, potência, raiz quadrada e do tipo Arrhenius) foram comparados para seleção do modelo que melhor descreve a influência da temperatura e da concentração de sólidos solúveis sobre estes parâmetros. Os modelos secundários foram ajustados usando o *software* Microsoft Excel.

### 3. Resultados e Discussão

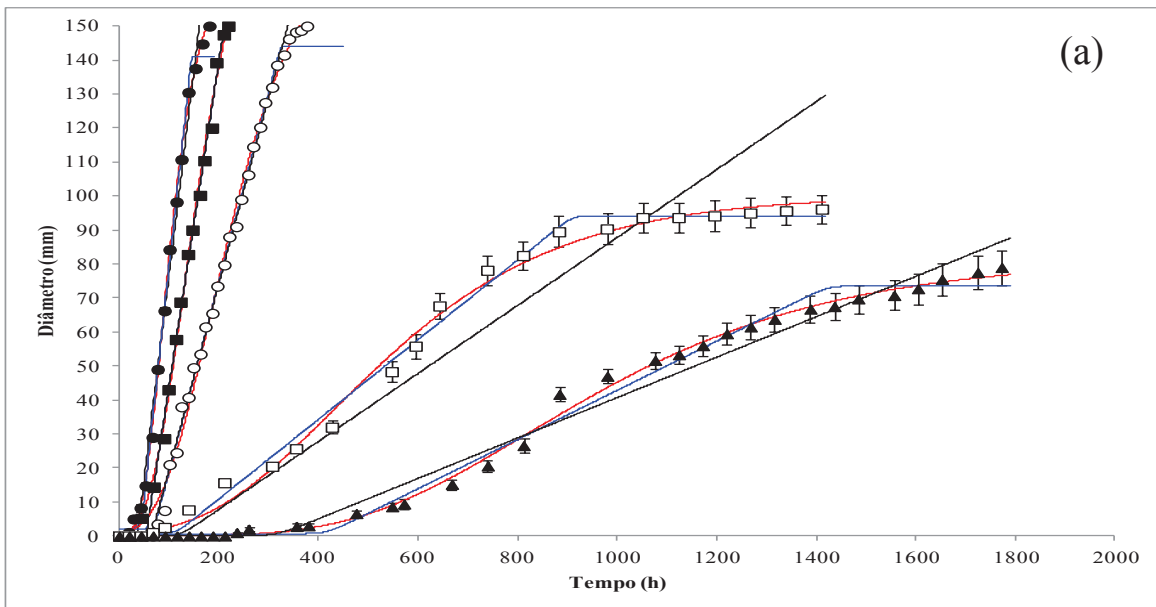
#### 3.1 Modelagem Primária do Diâmetro da Colônia: Comparação dos Modelos

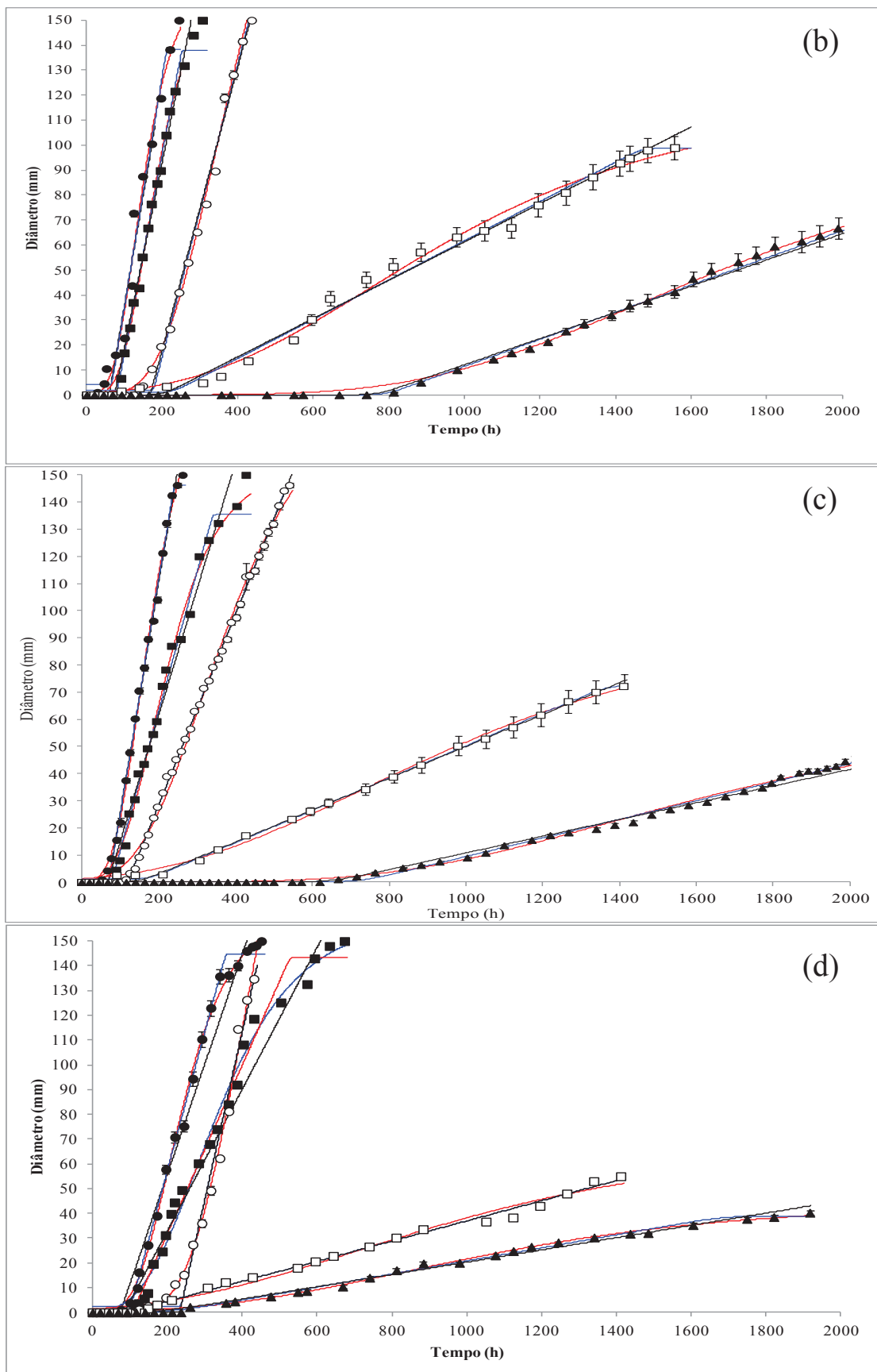
Os modelos de Gompertz Modificado, Baranyi e Roberts e Baranyi e Roberts simplificado foram ajustados aos dados experimentais

de crescimento ao longo do tempo, obtidos através da medida do diâmetro da colônia de *Byssochlamys fulva* e *Neosartorya fischeri*, em suco de maçã solidificado.

As Figuras 4.2.1 e 4.2.2 apresentam as curvas de crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri*, respectivamente, em suco de maçã solidificado nas temperaturas analisadas para as concentrações de sólidos solúveis de 12 °Brix (a), 20 °Brix (b), 25 °Brix (c), 35 °Brix (d) e 45 °Brix (e).

Figura 4.2.1 Curvas de crescimento de *B. fulva* em suco de maçã solidificado, às temperaturas de (●) 30 °C, (■) 25 °C, (○) 20 °C e (▲) 10 °C e concentrações de sólidos solúveis de 12 °Brix (a), 20 °Brix (b), 25 °Brix (c), 35 °Brix (d) e 45 °Brix (e). A linha azul representa o ajuste do Modelo de Gompertz Modificado (—), a linha vermelha representa o ajuste do Modelo de Baranyi e Roberts (—) e a linha preta representa o ajuste do Baranyi e Roberts simplificado (—) aos dados experimentais.





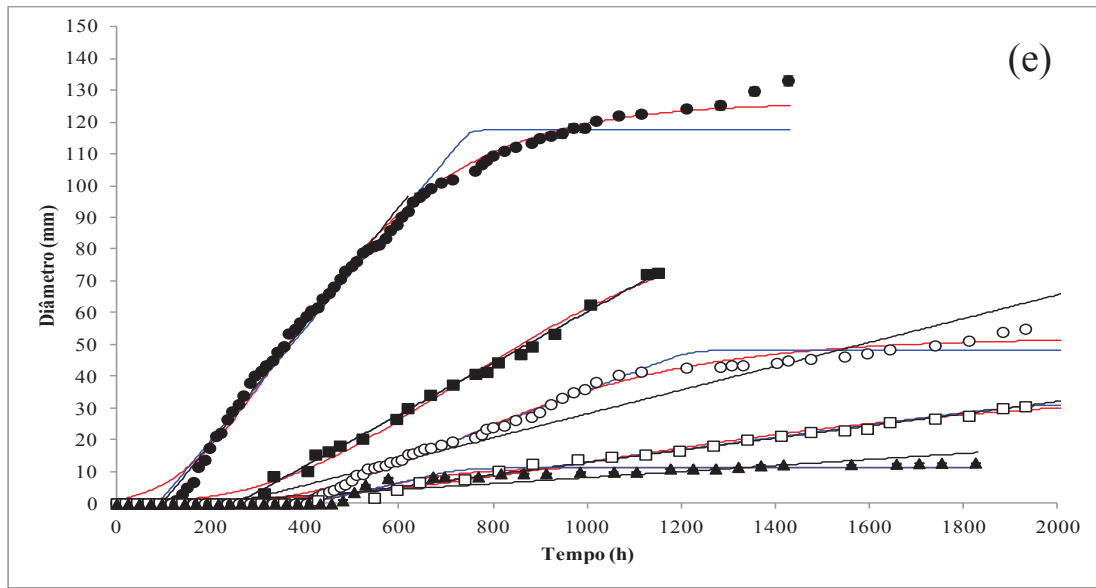
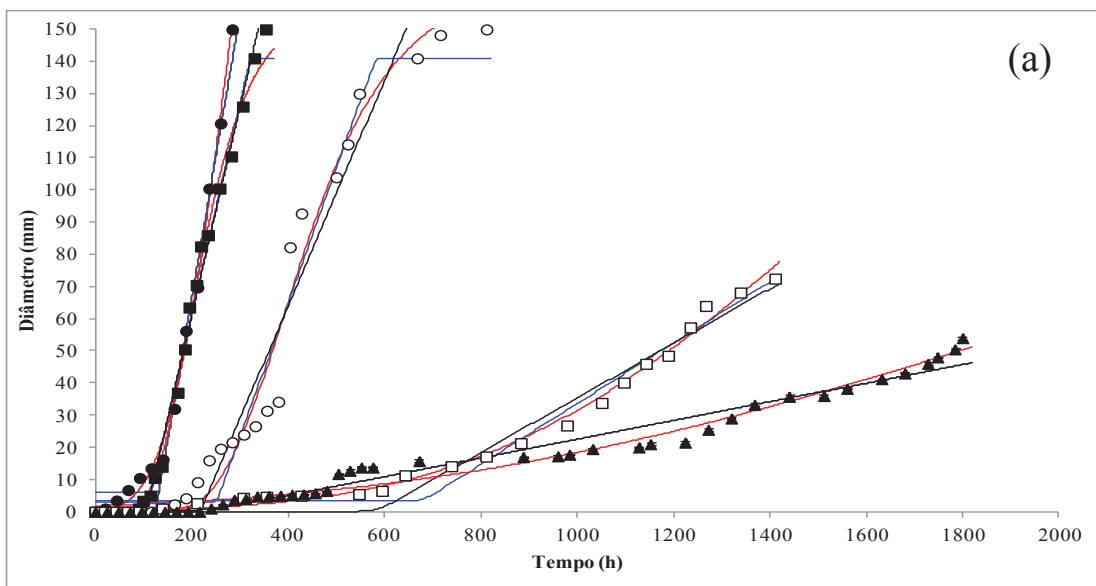
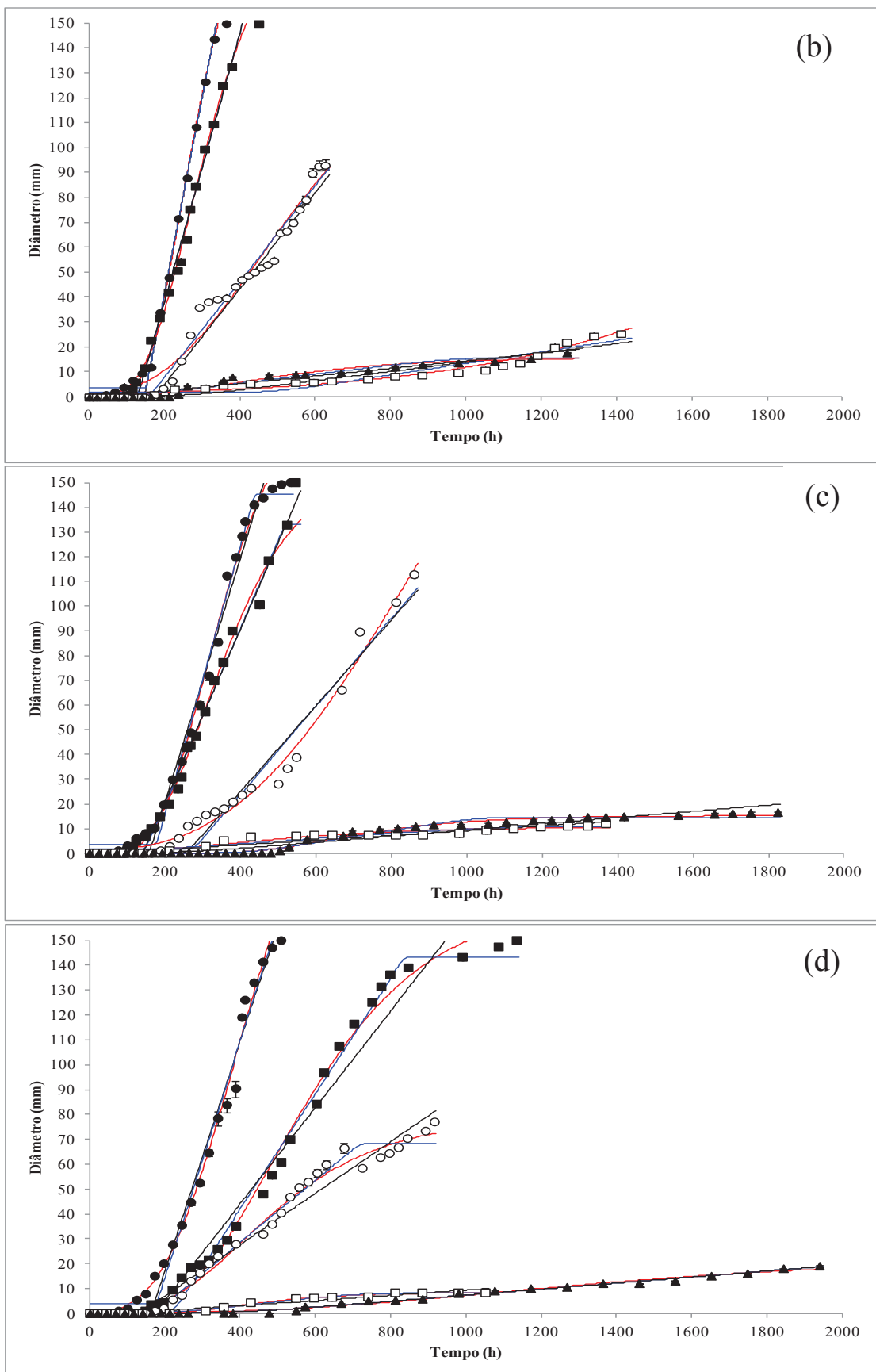
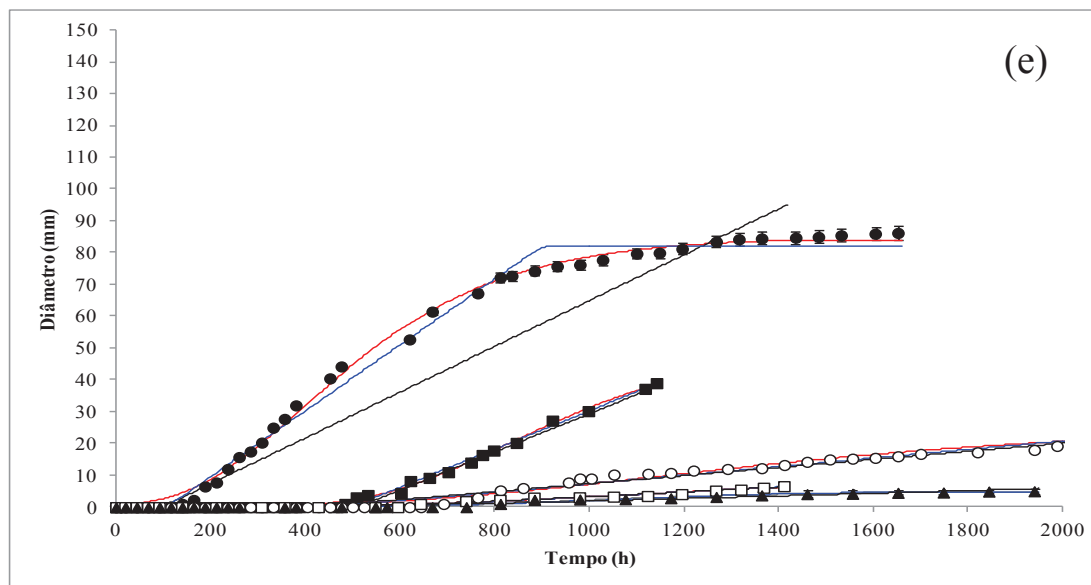


Figura 4.2.2 Curvas de crescimento de *N. fischeri* em suco de maçã solidificado, às temperaturas de (●) 30 °C, (■) 25 °C, (○) 20 °C, (□) 15 °C e (▲) 10 °C e concentrações de sólidos solúveis de 12 °Brix (a), 20 °Brix (b), 25 °Brix (c), 35 °Brix (d) e 45 °Brix (e). A linha azul representa o ajuste do Modelo de Gompertz Modificado (—), a linha vermelha representa o ajuste do Modelo de Baranyi e Roberts (—) e a linha preta representa o ajuste do Baranyi e Roberts simplificado (—) aos dados experimentais.









Analisando-se as Figuras 4.2.1 e 4.2.2, observa-se que, na maioria das condições estudadas, uma tendência linear de crescimento é observada com o tempo, após uma fase de adaptação. Nas temperaturas de 10 e 15 °C e concentrações de sólidos solúveis de 12, 20, 25 e 35 °Brix e na concentração de 45 °Brix em todas as temperaturas estudadas (10, 15, 20, 25 e 30 °C), observou-se a ocorrência de fase estacionária. Analisando-se os resultados obtidos neste estudo, pode-se afirmar que, em condições favoráveis de crescimento (temperaturas de 20, 25 e 30 °C e concentração de sólidos solúveis de 12, 20, 25 e 35 °Brix), o modelo de Baranyi e Roberts simplificado pode ser a melhor alternativa, pois desconsidera a fase estacionária. No entanto, se forem estudadas condições subótimas (temperaturas de 10 e 15 °C e concentração de sólidos solúveis de 45 °Brix), onde o crescimento dos fungos em estudo apresenta uma fase estacionária, este modelo não é conveniente. Os desvios padrão mostrados para cada condição são também vistos nessas figuras. É possível observar que há pequenos desvios padrão para todos os dados apresentados.

Nas concentrações de sólidos solúveis de 55 e 70 °Brix ( $a_w$  de 0,88 e 0,75, respectivamente) não foi observado crescimento dos fungos estudados mesmo após três meses de incubação para as cinco temperaturas em estudo. Panagou et al. (2010) estudaram o crescimento de *Byssochlamys* em meio sintético em função da atividade de água e da temperatura e também não observaram crescimento na  $a_w$  de 0,88, independente da temperatura.

Garcia et al. (2013), ao traçarem diâmetros (ou raios) de colônias de *Aspergillus flavus*, que cresceram em placas de Petri contendo meio sólido, relataram que uma fase de latência foi observada, seguido por

uma fase linear, mas na maioria dos casos não houve redução na velocidade de crescimento antes da borda da placa de Petri ser alcançada. Os autores ainda relatam que o crescimento de fungos (raios ou diâmetros das colônias) tem sido modelado por pesquisadores (Dantigny et al, 2005; Marín et al., 2008; Marín et al., 2012; Garcia et al., 2010), visando melhorar a segurança dos alimentos.

Para escolher qual modelo primário apresentou o melhor ajuste aos dados experimentais, foi necessário fazer uma análise dos índices estatísticos obtidos para esses modelos. Os valores dos índices estatísticos  $R^2$  e RMSE para as curvas de crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri*, em suco de maçã solidificado nas condições estudadas, apresentados na Tabela 4.2.2, permitem comparar os modelos avaliados neste estudo.

Tabela 4.2.2 Índices estatísticos referentes aos ajustes dos modelos de Gompertz Modificado (GM), Baranyi e Roberts (B) e Baranyi e Roberts simplificado (BS) aos dados experimentais de crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri* em suco de maçã solidificado.

°Brix	T(°C)	Modelo	<i>B. fulva</i>		<i>N. fischeri</i>	
			R <sup>2</sup>	RMSE	R <sup>2</sup>	RMSE
12	30	GM	0,998	2,335	0,994	5,215
		B	0,997	3,420	0,989	6,517
		BS	0,990	5,744	0,978	3,303
	25	GM	0,995	3,782	0,996	4,066
		B	0,996	3,475	0,994	3,995
		BS	0,996	3,347	0,994	8,658
	20	GM	0,995	3,951	0,969	9,811
		B	0,998	2,342	0,963	10,860
		BS	0,998	2,587	0,949	2,031
	15	GM	0,994	2,957	0,994	3,596
		B	0,995	2,889	0,981	3,931
		BS	0,919	11,470	0,975	2,685
10	GM	0,997	1,683	0,975	3,183	
	B	0,992	2,970	0,966	3,108	
	BS	0,983	4,104	0,966	5,215	
20	30	GM	0,998	7,761	0,998	2,575
		B	0,997	9,060	0,997	3,023
		BS	0,995	8,656	0,995	3,704
	25	GM	0,997	2,676	0,997	2,707
		B	0,997	2,928	0,995	3,648
		BS	0,994	3,953	0,994	3,549
	20	GM	0,997	3,074	0,971	5,427
		B	0,992	4,869	0,982	4,510
		BS	0,992	4,655	0,982	4,352
	15	GM	0,994	3,064	0,968	1,482
		B	0,995	2,915	0,917	2,423
		BS	0,993	3,052	0,912	2,396
10	GM	0,999	1,096	0,957	1,313	
	B	0,998	1,512	0,951	1,404	
	BS	0,997	1,725	0,943	1,479	
30	30	GM	0,996	3,305	0,995	4,080
		B	0,998	2,521	0,994	4,657
		BS	0,997	2,827	0,989	6,215
	25	GM	0,994	3,901	0,995	2,963
		B	0,995	3,658	0,993	3,647
		BS	0,984	6,067	0,993	3,567

°Brix	T(°C)	Modelo	<i>B. fulva</i>		<i>N. fischeri</i>	
			R <sup>2</sup>	RMSE	R <sup>2</sup>	RMSE
25	20	GM	0,996	3,287	0,988	3,757
		B	0,999	1,344	0,964	6,613
		BS	0,999	1,347	0,963	6,426
	15	GM	0,997	1,401	0,946	1,041
		B	0,999	0,823	0,934	1,145
		BS	0,998	1,034	0,919	1,214
	10	GM	0,996	1,117	0,808	0,788
		B	0,998	0,851	0,977	1,043
		BS	0,986	2,207	0,926	1,824
35	30	GM	0,998	3,210	0,993	4,773
		B	0,999	3,470	0,986	6,759
		BS	0,998	9,098	0,985	6,581
	25	GM	0,992	5,066	0,995	3,889
		B	0,993	4,918	0,994	4,183
		BS	0,979	7,997	0,972	8,794
	20	GM	0,992	3,438	0,992	2,571
		B	0,988	5,995	0,988	3,151
		BS	0,981	5,927	0,981	3,876
15	GM	0,986	2,332	0,989	0,370	
	B	0,995	1,413	0,985	0,469	
	BS	0,995	1,381	0,939	0,886	
10	GM	0,997	0,833	0,740	0,740	
	B	0,997	0,849	0,993	0,554	
	BS	0,994	1,166	0,993	0,544	
45	30	GM	0,995	3,087	0,997	1,874
		B	0,989	4,701	0,992	3,157
		BS	0,909	13,080	0,878	12,260
	25	GM	0,994	1,917	0,998	0,566
		B	0,998	1,030	0,996	0,741
		BS	0,998	1,001	0,996	0,721
	20	GM	0,992	1,669	0,987	1,045
		B	0,988	2,031	0,988	0,995
		BS	0,956	3,828	0,986	1,077
15	GM	0,992	1,039	0,977	0,366	
	B	0,995	0,819	0,978	0,352	
	BS	0,994	0,853	0,978	0,343	
10	GM	0,970	0,948	0,983	0,248	
	B	0,961	1,090	0,978	0,297	
	BS	0,872	1,943	0,953	0,418	

Como pode ser verificado na Tabela 4.2.2, o coeficiente de determinação foi superior a 0,90 na maioria das combinações de temperatura e concentração de sólidos solúveis e nos três modelos primários testados. O modelo de Baranyi e Roberts simplificado demonstra ser a melhor escolha na maioria dos casos estudados, apresentando valores de  $R^2$  variando entre 0,87 e 0,99.

Os valores de RMSE resultantes dos ajustes do modelo de Baranyi e Roberts simplificado aos dados experimentais do crescimento do diâmetro de colônias de *B. fulva* e *N. fischeri* em suco de maçã solidificado, nas diferentes temperaturas, apresentados na Tabela 4.2.2 indicam uma boa capacidade em descrever os dados experimentais, com a obtenção de baixos valores de RMSE. Os valores de RMSE maiores para as temperaturas de 20 °C, 25 °C e 30 °C podem ser explicados pelo fato de algumas vezes, a curva de predição apresentar erros mais pronunciados apenas em pequenos intervalos, como o RMSE é calculado levando em consideração toda a curva, seu valor acaba sendo afetado por estes erros. Os modelos foram capazes de descrever a tendência de crescimento do diâmetro de *B. fulva* e *N. fischeri* com o tempo, como pode ser visto nas Figuras 4.2.1 e 4.2.2.

Pela análise dos índices estatísticos, pode-se dizer que os modelos primários apresentaram bons ajustes aos dados experimentais em todas as temperaturas e concentrações de sólidos solúveis estudadas para a predição do crescimento tanto de *B. fulva* como de *N. fischeri*.

A Tabela 4.2.3 apresenta os parâmetros de crescimento  $\lambda$  e  $\mu_{\max}$  para os modelos de Gompertz Modificado (GM), Baranyi e Roberts (B) e Baranyi e Roberts simplificado (BS) ajustados aos dados de crescimento do diâmetro da colônia de *B. fulva* e *N. fischeri* na concentração de sólidos solúveis de 12 °Brix, em suco de maçã solidificado nas temperaturas estudadas.

Tabela 4.2.3 Parâmetros de crescimento  $\lambda$  e  $\mu_{\max}$  para os modelos de Gompertz Modificado (GM), Baranyi e Roberts (B) e Baranyi e Roberts simplificado (BS) ajustados aos dados de crescimento do diâmetro da colônia de *B. fulva* e *N. fischeri* na concentração de sólidos solúveis de 12 °Brix.

	Parâmetro	Modelo	Temperatura				
			10 °C	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C
<i>B. fulva</i>	$\lambda$ (h)	GM	476,90	176,30	82,81	61,95	47,74
		B	417,50	114,2	66,85	56,63	44,88
		BS	316,6	122,8	65,12	54,47	36,69
	$\mu_{\max}$ (mm/h)	GM	0,09	0,15	0,64	1,06	1,53
		B	0,07	0,11	0,56	0,95	1,35
		BS	0,06	0,09	0,55	0,95	1,20
<i>N. fischeri</i>	$\lambda$ (h)	GM	789,6	889,1	261,9	123,7	163,2
		B	229	678,8	252,6	108,1	132
		BS	229	584,4	218,6	105,8	125,3
	$\mu_{\max}$ (mm/h)	GM	0,05	0,14	0,47	0,81	1,25
		B	0,03	0,09	0,42	0,66	0,88
		BS	0,03	0,08	0,35	0,65	0,88

Analisando os parâmetros apresentados na Tabela 4.2.3, observa-se que na ausência de uma assíntota superior, o modelo de Baranyi e Roberts simplificado é a melhor alternativa, enquanto o modelo Baranyi e Roberts completo poderá ser o melhor quando uma fase estacionária é alcançada.

Em estudo realizado por Marín et al. (2008), quando o diâmetro (ou raio) de uma colônia de fungo é plotado contra o tempo, uma fase de latência é observada, seguido por uma fase linear, mas na maioria dos casos não é observada diminuição na velocidade de crescimento antes da borda da placa de Petri ser atingida. Estes autores afirmam que, sob condições constantes, uma colônia de fungos provavelmente cresce indefinidamente se a placa de Petri for ilimitada. Sendo assim, na ausência da borda da placa, o modelo de Baranyi e Roberts simplificado apresenta um melhor ajuste. Esta hipótese contraria os resultados obtidos por Valik et al. (1999) que descreveram que o crescimento pela medida do diâmetro da colônia para *P. roqueforti*, utilizando placas de Petri de 17 cm, apresentou uma curva típica de crescimento microbiano, com fase de adaptação, velocidade específica máxima de crescimento linear e fase estacionária, antes do limite da placa ser atingido.



O presente trabalho mostrou que os modelos utilizados apresentaram bons ajustes aos dados experimentais, sendo que o modelo de Baranyi e Roberts simplificado mostrou ser a melhor alternativa para uma estimativa precisa do  $\mu_{\max}$  e  $\lambda$  pois os fungos estudados, na maioria dos casos, não apresentam fase estacionária. Quando se trata da previsão e prevenção do crescimento de fungos em produtos alimentares, dois parâmetros podem ser considerados: o intervalo de tempo para colônia atingir um tamanho visível fazendo com que um produto seja rejeitado, e o intervalo de tempo para que a colônia atinja um tamanho que levará ao acúmulo de micotoxinas.

Begoude et al. (2007) avaliaram a influência dos parâmetros atividade de água, temperatura e pH sobre a velocidade de crescimento radial do fungo *Trichoderma asperellum*. O crescimento radial de quatro cepas de *T. asperellum* foi monitorado por 30 dias em meio PDA (ágar dextrose de batata) modificado. Seis níveis de  $a_w$  (0,99, 0,98, 0,96, 0,93, 0,91 e 0,88) foram combinados com três valores de pH (4,5, 6,5 e 8,5) e três temperaturas de incubação (20, 25 e 30 °C). A velocidade de crescimento foi maior nas  $a_w$  entre 0,99 e 0,98, independentemente da temperatura e do pH. Assim como nos resultados obtidos no presente trabalho, a redução da  $a_w$  acarretou num menor crescimento do *B. fulva* para todas as temperaturas estudadas.

O crescimento de três fungos termorresistentes, *Byssochlamys fulva*, *Neosartorya fischeri* e *Talaromyces avellaneus*, foi estudado por Valik et al. (2001), a 25 °C, em nove valores de  $a_w$  variando entre 0,995 e 0,85. O modelo de Baranyi e Roberts foi utilizado para descrever a mudança do diâmetro da colônia (mm) em relação ao tempo. Os valores de  $a_w$  em que os fungos cresceram mais rapidamente foram de 0,986, 0,985 e 0,990 e a velocidade máxima de crescimento das colônias foi de 12,6, 13,2 e 20,2 mm/d, respectivamente. Neste estudo, os autores constataram que o tempo que uma colônia de *B. fulva*, a 25 °C e  $a_w$  de 0,99, leva para atingir 3 mm de diâmetro é de aproximadamente 1 dia. Os resultados observados no presente estudo mostram que o tempo que uma colônia de *B. fulva*, a 25 °C e a 12 °Brix, leva para atingir 3 mm de diâmetro também é aproximadamente 1 dia.

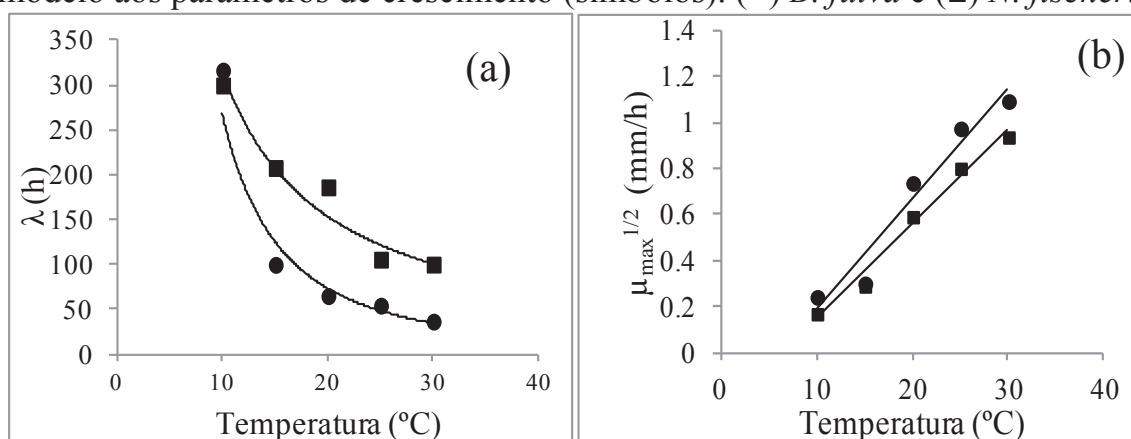
Ao avaliarem o efeito das condições ambientais (temperatura e atividade de água) sobre o crescimento e produção de micotoxinas de *Aspergillus carbonarius* comparando os parâmetros de crescimento, Garcia et al. (2011) observaram que o crescimento do fungo é mais afetado pela  $a_w$  do que pela temperatura. No presente trabalho verificou-se que tanto a temperatura quanto a atividade de água afetaram o crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri*.

### 3.2 Influência da Temperatura Sobre os Parâmetros de Crescimento ( $\lambda$ e $\mu_{\max}$ ) de *Byssochlamys fulva* e *Neosartorya fischeri*

Neste estudo, foram comparadas cinco equações matemáticas: equação linear, equação da raiz quadrada, equação tipo Arrhenius, equação da potência e equação exponencial para selecionar o modelo secundário que melhor descreve a influência da variação da temperatura (10, 15, 20, 25 e 30 °C) nos parâmetros de crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri* ( $\mu_{\max}$  e  $\lambda$ ) obtidos pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts simplificado às curvas de crescimento. Os resultados apresentados neste item foram obtidos a 12 °Brix e estão sendo apresentados no presente trabalho como exemplo. Os demais valores de Brix (20, 25, 35 e 45 °Brix) também foram estudados, e estão disponibilizados nas informações complementares. A escolha do modelo secundário foi feita pela comparação dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ), obtidos pelo ajuste de cada modelo aos dados experimentais (dados apresentados nas Informações complementares).

A Figura 4.2.3 apresenta o ajuste dos modelos secundários selecionados aos dados experimentais dos parâmetros de crescimento (a)  $\lambda$  (modelo da potência) e (b)  $\mu_{\max}$  (modelo da raiz quadrada), em função da temperatura, para *B. fulva* e *N. fischeri*, a 12 °Brix.

Figura 4.2.3 Efeito da temperatura sobre os parâmetros de crescimento (a)  $\lambda$  - Modelo da potência, (b)  $\mu_{\max}$  - Modelo da raiz quadrada, obtidos na concentração de sólidos solúveis de 12 °Brix. As linhas representam o ajuste do modelo aos parâmetros de crescimento (símbolos). (●) *B. fulva* e (■) *N. fischeri*.



Pela Figura 4.2.3, é possível verificar que há uma tendência de dependência linear entre a raiz quadrada do parâmetro  $\mu_{\max}$  e a

temperatura (modelo secundário da raiz quadrada), apresentando bons coeficientes de determinação ( $R^2$  igual a 0,948 para *B. fulva* e  $R^2$  igual a 0,981 para *N. fischeri*). A dependência do parâmetro  $\lambda$  com a temperatura foi melhor descrita pelo modelo da potência.

As equações dos modelos secundários, para os dois microrganismos são apresentadas na Tabela 4.2.4.

Tabela 4.2.4 Modelos secundários para os parâmetros de crescimento  $\lambda$  e  $\mu_{\max}$  de *B. fulva* e *N. fischeri* em função da temperatura, obtidos a 12 °Brix.

Parâmetro	Equação	$R^2$
<b><i>B. fulva</i></b>		
$\lambda$ (h)	$\lambda = 19590 \cdot (T)^{-1,87}$	0,959
$\mu_{\max}$ (mm/h)	$\mu_{\max}^{1/2} = 0,048 \cdot (T) - 0,28$	0,948
<b><i>N. fischeri</i></b>		
$\lambda$ (h)	$\lambda = 3445,7 \cdot (T)^{-1,038}$	0,931
$\mu_{\max}$ (mm/h)	$\mu_{\max}^{1/2} = 0,041 \cdot (T) - 0,261$	0,981

Com o uso das equações obtidas pelos ajustes dos modelos secundários apresentadas na Tabela 4.2.4, pode-se prever os parâmetros de crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri* dentro da faixa de temperatura estudada neste trabalho (de 10 °C a 30 °C), pelo fato dos modelos terem apresentado bons coeficientes de determinação, representando de forma coerente a variação de cada parâmetro em função da temperatura de armazenamento.

Em situações reais, de armazenamento e comercialização de produtos alimentícios, sabe-se que podem ocorrer flutuações de temperatura. Este trabalho mostra que pequenos aumentos na temperatura interferem em todos os parâmetros de crescimento, demonstrando a importância do controle da temperatura no crescimento de fungos. Fica evidente a diferença de crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri* quando este é armazenado em diferentes temperaturas, levando-se a concluir que o conhecimento e a previsão do crescimento destes fungos deteriorantes se fazem necessários quando há flutuações de temperatura.

Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com os resultados reportados na literatura. Corradini e Peleg (2005) demonstraram que a influência da temperatura sobre os parâmetros de crescimento microbiano pode ser descrita por outras equações empíricas como a exponencial, do tipo Arrhenius, polinomial e linear. A equação

de raiz quadrada é provavelmente o modelo mais amplamente estudado e utilizado para analisar o efeito da temperatura sobre a velocidade específica de crescimento microbiano.

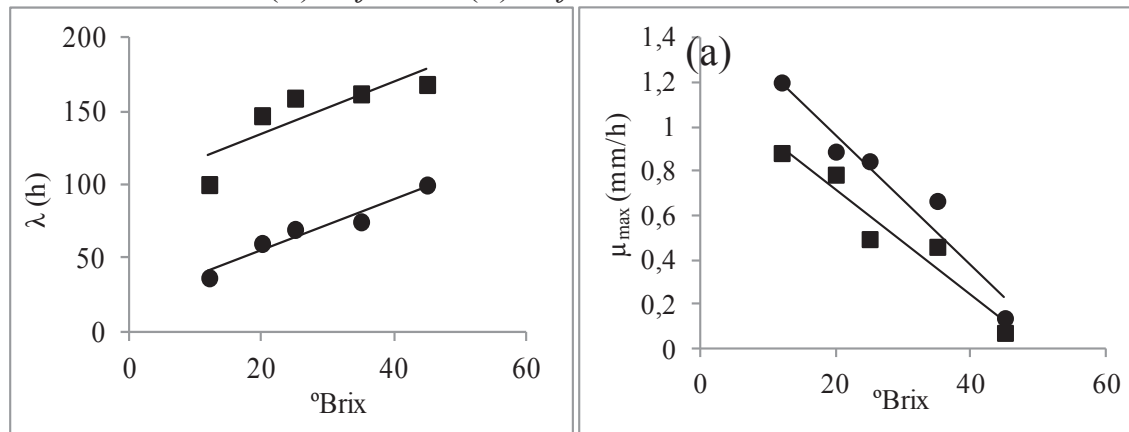
Longhi (2012) modelou o crescimento de *Byssochlamys fulva* em suco de maçã a 25 °Brix, nas temperaturas de 10, 15, 20, 25 e 30 °C, sem considerar a fase estacionária, utilizando diferentes modelos (Baranyi e Roberts (1994), Huang (2008) e Fujikawa (2010)) e todos apresentam capacidade de descrever o crescimento do diâmetro. Entretanto, o modelo de Baranyi e Roberts foi mais indicado para descrever o crescimento de *B. fulva* nestas condições, pois a dependência entre os parâmetros  $\lambda$  e  $\mu_{\max}$  do modelo de Baranyi e Roberts com a temperatura foi descrita através do modelo secundário da raiz quadrada, enquanto os parâmetros empíricos dos modelos de Huang e Fujikawa não mostraram correlação com a temperatura.

### ***3.3 Influência da concentração de sólidos solúveis sobre os parâmetros de crescimento ( $\lambda$ e $\mu_{\max}$ ) de *Byssochlamys fulva* e *Neosartorya fischeri****

Foram comparadas cinco equações matemáticas para selecionar o modelo secundário que melhor descreve a influência da variação da concentração de sólidos solúveis (12, 20, 25, 35 e 45 °Brix) nos parâmetros de crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri* ( $\mu_{\max}$  e  $\lambda$ ) obtidos pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts simplificado às curvas de crescimento. Os resultados apresentados neste item foram obtidos a 30 °C e estão sendo apresentados no presente trabalho como exemplo. Os demais valores de Brix (20, 25, 35 e 45 °Brix) e temperatura (10, 15, 20 e 25 °C) também foram estudados e estão apresentados nas informações complementares. A escolha do modelo secundário foi feita pela comparação dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ), obtidos pelo ajuste de cada modelo aos dados experimentais (dados apresentados nas Informações complementares).

A Figura 4.2.4 apresenta o ajuste dos modelos secundários aos dados experimentais dos parâmetros de crescimento (a)  $\lambda$  (modelo linear) e (b)  $\mu_{\max}$  (modelo linear), em função da temperatura, para *B. fulva* e *N. fischeri*, a 30 °C.

Figura 4.2.4 Efeito da concentração de sólidos solúveis sobre os parâmetros de crescimento (a)  $\lambda$  - modelo linear, (b)  $\mu_{\max}$  - modelo linear, obtidos na temperatura de 30 °C. As linhas representam o ajuste do modelo aos parâmetros de crescimento de (●) *B. fulva* e (■) *N. fischeri*.



Pela Figura 4.2.4, pode-se verificar que o modelo linear se ajustou bem aos dados experimentais para os parâmetros velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\max}$ ) e duração da fase de adaptação ( $\lambda$ ), tanto para *B. fulva* quanto para *N. fischeri*. Analisando a duração da fase de adaptação, ao aumentar a concentração de sólidos solúveis, este parâmetro aumenta. Com relação à velocidade específica máxima de crescimento, pode-se perceber que o aumento da concentração de sólidos solúveis leva a uma diminuição do valor deste parâmetro.

As equações dos modelos secundários, para os dois microrganismos são apresentadas na Tabela 4.2.5.

Tabela 4.2.5 Modelos secundários para os parâmetros de crescimento  $\lambda$  e  $\mu_{\max}$  de *B. fulva* e *N. fischeri* em função da concentração de sólidos solúveis, obtidos a 30 °C.

Parâmetro	Equação	R <sup>2</sup>
<b><i>B. fulva</i></b>		
λ (h)	$\lambda = 1,732 \cdot S + 20,829$	0,943
μ <sub>max</sub> (mm/h)	$\mu_{\max} = 0,029 \cdot S + 1,556$	0,942
<b><i>N. fischeri</i></b>		
λ (h)	$\lambda = 1,779 \cdot S + 98,807$	0,695
μ <sub>max</sub> (mm/h)	$\mu_{\max} = -0,024 \cdot S + 1,191$	0,929

Com o uso das equações obtidas pelos ajustes dos modelos secundários apresentadas na Tabela 4.2.5, pode-se prever os parâmetros de crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri* dentro da faixa de concentração de sólidos solúveis estudada neste trabalho (de 12 a 45 °Brix), pelo fato dos modelos terem apresentado bons coeficientes de determinação, representando de forma coerente a variação de cada parâmetro em função da concentração de sólidos solúveis, com exceção do modelo secundário que descreve a influência da concentração de sólidos solúveis sobre a duração da fase lag, para *N. fischeri* ( $R^2$  0,695). O baixo valor de  $R^2$  apresentado pelo ajuste deste modelo secundário pode ser explicado por este fungo apresentar colônias com bordas menos uniformes do que o *B. fulva*, o que pode ter levado à menor capacidade preditiva do modelo secundário.

Medina e Magan (2010) examinaram o efeito da atividade de água (0,995-0,90) e da temperatura (10-37 °C) sobre o crescimento radial de *Fusarium langsethiae* em um meio a base de aveia. Resultados mostraram que a melhor  $a_w$  para o crescimento estava entre 0,98-0,995 a 25 °C. Como pode ser observado nos resultados apresentados neste trabalho, os fungos estudados também se desenvolveram melhor nas  $a_w$  superiores a 0,97 (25 °Brix) e nas temperaturas ente 20 e 30 °C.

Ao avaliarem a influência da atividade de água e da idade dos ascósporos sobre o crescimento radial de *N. fischeri* em suco de abacaxi, Zimmermann et al. (2011) utilizaram modelos secundários (modelo da potência e modelo linear) para descrever a influência dos parâmetros de crescimento com a  $a_w$  e obtiveram boa predição. Neste trabalho o modelo linear foi o que descreveu melhor a influência dos parâmetros  $\lambda$  e  $\mu_{max}$  com a concentração de sólidos solúveis.

Uma contribuição importante deste trabalho é a avaliação do crescimento das colônias de *B. fulva* e *N. fischeri* em suco de maçã solidificado, uma vez que os dados de crescimento destas espécies de fungo são avaliados em diferentes meios de cultura, mas raramente em alimentos. Os microrganismos tendem a ter um comportamento diferente em meios de crescimento, principalmente em alimentos, devido à sua complexidade (McDonald & Sun, 1999). O crescimento de fungos em meios de cultura pode superestimar sua capacidade de crescer em alimentos e levar a uma predição das condições de crescimento pouco realista (Astoreca et al., 2012).



#### 4. Conclusões

O modelo primário que mostrou o melhor ajuste para as curvas de crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri* em temperaturas que variaram de 10 °C a 30 °C foi o modelo Baranyi e Roberts simplificado. Foi possível se obter modelos secundários que descrevem a influência da temperatura e da concentração de sólidos solúveis, de forma isolada, sobre o crescimento dos fungos estudados, permitindo a predição do crescimento destes fungos, sob a influência destes fatores, dentro da faixa estudada. É possível concluir que o crescimento dos fungos é fortemente influenciado pela temperatura de armazenamento e pela concentração de sólidos solúveis.



## Referências

- ASTORECA, A., VAAMONDE, G., DALCERO, A., RAMOS, A. J., MARÍN, S. (2012). Modelling the effect of temperature and water activity of *Aspergillus flavus* isolates from corn. *International Journal of Food Microbiology*, 156, 60-67.
- BARANYI, J., ROBERTS, T. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial-growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 277-294.
- BEGOUDE, B. A. D.; LAHLALI, R.; FRIEL, D.; TONDJE, P. R.; JIJAKLI, M. H. (2007) Response surface methodology study of the combined effects of temperature, pH, and aw on the growth rate of *Trichoderma asperellum*. *Journal of Applied Microbiology*. v.103, p.845–854.
- CHAR, C., GUERRERO, S., GONZALEZ, L., ALSAMORA, S. M. (2005). Growth response of *Eurotium chevalieri*, *Aspergillus fumigatus* and *Penicillium brevicompactum* in Argentine milk jam. *Food Science and Technology International* 11, 297–305.
- CORRADINI, M. G.; PELEG, M. Estimating non-isothermal bacterial growth in foods from isothermal. *Journal of Applied Microbiology*, v. 99, p. 187-200, 2005.
- DANTIGNY, P., GUILMART, A., BENSOUSSAN, M. (2005). Basis of predictive mycology. *International Journal of Food Microbiology*, 100, 187-196.
- ENGEL, G., TEUBER, M. (1991). Heat resistance of *Byssochlamys nivea* in milk and cream. *International Journal of Food Microbiology*, 12, 225-234.
- GARCIA, D., RAMOS, A. J., SANCHIS, V., MARÍN, S. (2009) Predicting mycotoxins in foods: a review. *Food Microbiology*, v.26, p.757-769.

GARCIA, D., RAMOS, A. J., SANCHIS, V., MARÍN, S. (2010). Modelling mould growth under suboptimal environmental conditions and inoculum size. *Food Microbiology* 27, 909-917.

GARCIA, D., RAMOS, A. J., SANCHIS, V., MARÍN, S. (2011). Modelling the effect of temperature and water activity in the growth boundaries of *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus parasiticus*. *Food Microbiology*, 28, 406-417.

GARCIA, D., RAMOS, A. J., SANCHIS, V., MARÍN, S. (2013). Modeling kinetics of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in maize-based medium and maize grain. *International Journal of Food Microbiology* 163, 182-189.

GIBSON, A. M., BARANYI, J., PITT, J. I., EYLES, M. J., ROBERTS, T. A. (1994). Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. *International Journal of Food Microbiology*, v.23, p.419-431.

LAHLALI, R., SERRHINI, M. N., FRIEL, D., JIJAKLI, M. H. (2007). Predictive modelling of temperature and water activity (solutes) on the *in vitro* radial growth of *Botrytis cinerea*. *International Journal of Food Microbiology*, 114, 1-9.

LONGHI, D. A. (2012) Avaliação da capacidade preditiva de diferentes modelos matemáticos para o crescimento microbiano em condições não-isotérmicas. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

MARÍN, S., CUEVAS, D., RAMOS, A. J., SANCHIS, V. (2008). Fitting of colony diameter and ergosterol as indicators of food borne mould growth to known growth models in solid medium. *International Journal of Food Microbiology*, 121, 139-149.

MARÍN, S., RAMOS, A. J., SANCHIS, V. (2012). Modelling *Aspergillus flavus* growth and aflatoxins production in pistachio nuts. *Food Microbiology* *In press*.

McDONALD, K., SUN, D. W. (1999). Predictive food microbiology for the meat industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 52, 1-27.

McMEEKIN, T.A., ROSS, T.(2002). Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management. *International Journal of Food Microbiology*, v.78, p.133-153.

MEDINA, A.; MAGAN, N. (2010). Comparisons of water activity and temperature impacts on growth of *Fusarium langsethiae* strains from northern Europe on oat-based media. *International Journal of Food Microbiology*, v.142, p.365–369.

MOAKE, M. M.; PADILLA-ZAKOUR, O. I.; WOROBO, R. W. (2005). Comprehensive review of patulin control methods in foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 4, n. 1, p. 8-21.

PANAGOÜ, E. Z., CHELONAS, S., CHATZIPAVLIDIS, I., NYCHAS, G. J. E. (2010). Modelling the effect of temperature and water activity on the growth rate and growth/no growth interface of *Byssochlamys fulva* and *Byssochlamys nivea*. *Food Microbiology*, 27,618-627.

SALOMÃO, B. C. M. Isolamento, identificação e estudo da resistência térmica de fungos filamentosos termorresistentes em produtos de frutas. Florianópolis, 2002, 99p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

SALOMÃO. B. C. M., MASSAGUER. P. R., ARAGÃO. G. M. F. (2008). Isolamento e seleção de fungos filamentosos termorresistentes do processo produtivo de néctar de maçã. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 28(1), 116-121.

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

VALIK, L.; BARANYI, J.; GORNER, F. (1999). Predicting 345 fungal growth: the effect of water activity on *Penicillium roqueforti*. *International Journal of Food Microbiology*, 47, 141-146.

VALIK, L.; PIECKOVA, E. (2001). Growth modelling of heat-resistant fungi: the effect of water activity. *International Journal of Food Microbiology*, 63, 11-17.

ZIMMERMANN, M., MIORELLI, S., MASSAGUER, P.R., ARAGÃO, G.M.F. (2011). Modeling the influence of water activity and ascospore age on the growth of *Neosartoryafischeri* in pineapple juice. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 239-243.

ZWIETERING, M. H.; KOOS, J. T.; HASENACK, B. E.; WIT, J. C.; RIET, K. V. (1991) Modeling of bacterial growth as a function of temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 57, p. 1094-1101.

## 4.2.2 Informações Complementares

Cinco equações matemáticas foram comparadas: equação linear, equação da raiz quadrada, equação tipo Arrhenius, equação da potência e equação exponencial para selecionar o modelo secundário que melhor descreveu a influência da variação da temperatura (10, 15, 20, 25 e 30 °C) e da concentração de sólidos solúveis (12, 20, 25, 35 e 45 °Brix) nos parâmetros de crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri* ( $\mu_{\max}$  e  $\lambda$ ) obtidos pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts simplificado às curvas de crescimento.

A Tabela 4.2.6 apresenta os coeficientes de determinação dos modelos secundários que descreveram a influência da temperatura nos parâmetros de crescimento, para os dois fungos estudados. A escolha do modelo secundário foi baseada na comparação dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ), obtidos pelos ajustes dos cinco modelos secundários.

Tabela 4.2.6 Coeficientes de determinação ( $R^2$ ) obtidos pelos ajustes dos modelos secundários que descreveram a influência da temperatura nos parâmetros de crescimento  $\lambda$  (h) e  $\mu_{\max}$  (mm/h) de *B. fulva* e *N. fischeri* nas concentrações de sólidos solúveis de 12, 20, 25, 35 e 45 °Brix.

Fungo	°Brix	Modelos secundários	Coeficiente de determinação ( $R^2$ )				
			Linear	Raiz Quadrada	Tipo Arrhenius	Potência	Exponencial
<i>B. fulva</i>	12°Brix	$\lambda$	0,689	0,785	0,989	<b>0,959</b>	0,886
		$\mu_{\max}$	0,955	<b>0,948</b>	0,882	0,928	0,915
	20°Brix	$\lambda$	0,692	0,806	0,965	<b>0,962</b>	0,914
		$\mu_{\max}$	0,931	<b>0,899</b>	0,863	0,894	0,866
	25°Brix	$\lambda$	0,628	0,712	0,968	<b>0,910</b>	0,812
		$\mu_{\max}$	0,931	<b>0,961</b>	0,909	0,949	0,934
	35°Brix	$\lambda$	0,849	0,906	0,998	<b>0,977</b>	0,947
		$\mu_{\max}$	0,808	<b>0,815</b>	0,847	0,861	0,818
	45°Brix	$\lambda$	0,986	0,961	0,712	<b>0,825</b>	0,913
		$\mu_{\max}$	0,907	<b>0,975</b>	0,914	0,979	0,998
<i>N. fischeri</i>	12°Brix	$\lambda$	0,929	0,942	0,872	<b>0,931</b>	0,944
		$\mu_{\max}$	0,966	<b>0,981</b>	0,963	0,981	0,944
	20°Brix	$\lambda$	0,995	0,991	0,806	<b>0,905</b>	0,970
		$\mu_{\max}$	0,915	<b>0,949</b>	0,832	0,905	0,921
	25°Brix	$\lambda$	0,893	0,889	0,876	<b>0,906</b>	0,879
		$\mu_{\max}$	0,939	<b>0,930</b>	0,759	0,834	0,854
	35°Brix	$\lambda$	0,829	0,869	0,999	<b>0,977</b>	0,907
		$\mu_{\max}$	0,841	<b>0,930</b>	0,773	0,867	0,912
	45°Brix	$\lambda$	0,998	0,990	0,765	<b>0,879</b>	0,961
		$\mu_{\max}$	0,857	<b>0,899</b>	0,819	0,905	0,944

Pela análise da Tabela 4.2.6, apesar do modelo do tipo Arrhenius apresentar um  $R^2$  maior que o modelo da potência para a duração da fase de adaptação do *B. fulva*, este último foi selecionado por apresentar melhor ajuste para *N. fischeri*. Para o parâmetro  $\mu_{\max}$ , o modelo da raiz quadrada foi o que apresentou melhores coeficientes de determinação para todas as condições de temperatura e concentrações de sólidos solúveis nos dois fungos estudados.

A Tabela 4.2.7 apresenta os coeficientes de determinação dos modelos secundários que descreveram a influência da concentração de sólidos solúveis nos parâmetros de crescimento, para os dois fungos estudados.



Tabela 4.2.7 Coeficientes de determinação ( $R^2$ ) obtidos pelos ajustes dos modelos secundários que descreveram a influência da concentração de sólidos solúveis nos parâmetros de crescimento  $\lambda$  (h) e  $\mu_{\max}$  (mm/h) de *B. fulva* e *N. fischeri*.

Fungo	T(°C)	Modelos secundários	Coeficiente de determinação ( $R^2$ )					
			Linear	Raiz Quadrada	Tipo Arrhenius	Potência	Exponencial	
<i>B. fulva</i>	10	$\lambda$	<b>0,702</b>	0,559	0,503	0,493	0,448	
		$\mu_{\max}$	<b>0,931</b>	0,884	0,773	0,808	0,909	
	15	$\lambda$	<b>0,631</b>	0,638	0,585	0,619	0,639	
		$\mu_{\max}$	<b>0,990</b>	0,981	0,681	0,836	0,945	
	20	$\lambda$	<b>0,664</b>	0,666	0,713	0,697	0,656	
		$\mu_{\max}$	<b>0,834</b>	0,788	0,409	0,567	0,719	
	25	$\lambda$	<b>0,734</b>	0,78	0,562	0,705	0,827	
		$\mu_{\max}$	<b>0,967</b>	0,987	0,684	0,84	0,948	
	30	$\lambda$	<b>0,943</b>	0,92	0,965	0,957	0,884	
		$\mu_{\max}$	<b>0,942</b>	0,883	0,509	0,664	0,802	
	<i>N. fischeri</i>	10	$\lambda$	<b>0,753</b>	0,7725	0,413	0,607	0,787
			$\mu_{\max}$	<b>0,823</b>	0,938	0,661	0,856	0,892
15		$\lambda$	<b>0,689</b>	0,719	0,439	0,6	0,75	
		$\mu_{\max}$	<b>0,541</b>	0,608	0,948	0,847	0,692	
20		$\lambda$	<b>0,659</b>	0,673	0,342	0,513	0,684	
		$\mu_{\max}$	<b>0,936</b>	0,964	0,601	0,752	0,873	
25		$\lambda$	<b>0,858</b>	0,901	0,697	0,84	0,939	
		$\mu_{\max}$	<b>0,974</b>	0,985	0,667	0,831	0,948	
30		$\lambda$	<b>0,636</b>	0,61	0,496	0,573	0,583	
		$\mu_{\max}$	<b>0,930</b>	0,889	0,512	0,669	0,807	

Analisando a Tabela 4.2.7, verifica-se que o modelo Linear apresentou um melhor coeficiente de determinação tanto para duração da fase de adaptação quanto para a velocidade específica máxima de crescimento para todas as condições de temperatura e concentrações de sólidos solúveis nos dois fungos estudados. Os baixos valores de  $R^2$  para os parâmetros de crescimento  $\lambda$  e  $\mu_{\max}$  de *B. fulva* e *N. fischeri* podem ser explicados pelo fato destes fungos, em determinadas condições, crescerem sem apresentar bordas uniformes das colônias, dificultando a medida de diâmetro das mesmas, levando à menor capacidade preditiva do modelo secundário.

### **4.3 Modelagem do Crescimento de *Byssochlamys fulva* e *Neosartorya fischeri* e Comparação com o Método de Medida do Diâmetro da Colônia com a Quantificação de Ergosterol**

Um dos métodos mais comumente usados para avaliar o crescimento de fungos em substratos sólidos é medida do diâmetro da colônia (ZIMMERMANN et al., 2011; TANIWAKI et al., 2010; PANAGOUE et al., 2010). Entretanto, este método tem a desvantagem de não levar em conta a densidade da colônia e ser difícil de ser aplicado a alimentos (TANIWAKI et al., 2006; PITT e MISCAMBLE, 1995; GIBSON e HOCKING, 1997). Alternativamente, o conteúdo de ergosterol tem sido utilizado para determinação de contaminação fúngica em cereais e outros alimentos (MARÍN et al., 2008; TANIWAKI et al., 2006; MARÍN et al., 2005; SAXENA et al., 2001; TANIWAKI et al., 2001; GOURAMA e BULLERMAN, 1995). Esta análise, que é relativa ao total de biomassa fúngica, tem se mostrado eficiente ao ser correlacionado com a medida de crescimento de diâmetro da colônia (TANIWAKI et al., 2009; MARÍN et al., 2008).

O objetivo deste trabalho foi modelar o crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri* e estabelecer uma correlação entre o crescimento do diâmetro da colônia e o conteúdo de ergosterol.

### 4.3.1 Parte 3: Modeling growth of *Byssochlamys fulva* and *Neosartorya fischeri* on solidified apple juice by measuring colony diameter and ergosterol content

#### Abstract

*B. fulva* and *N. fischeri* are heat-resistant fungi which are a concern to food industries since their growth represents significant economic liabilities. Although the most common method used to assess fungal growth in solid substrates is by measuring the colony's diameter, it is difficult to apply this method to food substrates. Alternatively, ergosterol contents have been used to quantify fungal contamination in some types of food. Current study aimed at modeling the growth of the heat-resistant fungi *B. fulva* and *N. fischeri* by measuring the colony diameter and ergosterol content by Baranyi and Roberts model. Whereas the colony diameter was measured daily, the quantification of ergosterol was performed when the colonies reached the diameters 30, 60, 90, 120 and 150 mm. Results showed that *B. fulva* and *N. fischeri* were able to grow successfully on solidified apple juice at 15, 20, 25 and 30 °C and Baranyi and Roberts model showed good ability to describe growth data. The correlation curves between the parameters of colony diameter and ergosterol content were obtained with satisfactory statistical indexes. The high sensitivity of the ergosterol determination made it extremely useful for measuring the quality of fungi in food.

**Keywords:** fungal growth; predictive microbiology; ergosterol; *Byssochlamys fulva*; *Neosartorya fischeri*

## 1 Introduction

Apples are fruits that offer the most promising possibilities for industrialization. Among their various products, apple juice is not only one of the most popular products with great commercial importance for some countries, but it is also a source of many beneficial components for health, such as antioxidant substances (Lu & Foo, 2000; Ibrahim, Hassan, Abd-Elrashid, El-Massry, Eh-Ghorab, Ramadan-Manal & Osman, 2011).

*Byssochlamys fulva* and *Neosartorya fischeri* are fungi species conspicuous for the production of resistant ascospores that enable them to survive at temperatures usually used for the pasteurization of fruit juices. Additionally, these fungi are commonly found in fruit juices where they are important spoilage agents (Tournas, 1994; Piecková, Bernát, & Jesenská, 1994; Salomão, Massaguer, Costa, & Aragão, 2004; Salomão, Slongo, & Aragão, 2007).

Fungal spoilage is often visible in the form of colonies on food surface and thus fungal growth has been studied by measuring the colonies diameter over a time period. The measurements of colony diameter is the most common method to evaluate fungal growth on solid substrates (Taniwaki, Hocking, Pitt, & Fleet, 2010; Panagou, Chelonas, Chatzipavlidis, & Nychas, 2010; Zimmermann, Miorelli, Massaguer, & Aragão, 2011). A growth rate function may be derived by plotting the colonies diameter measurements over a time period. Consequently, their radial growth rate and adaptation time may be calculated under several conditions (Gibson & Hocking, 1997).

The measurement of hyphal extension rate, usually reported as radial growth rate, is probably the simplest and the most direct method to measure fungal growth. Growth estimates for filamentous fungi, however, is more complicated due to the formation of surface colonies and hyphae all over the food (Marín, Ramos & Sanchis, 2005).

Fungal growth rate, or rather, the increase in colony diameter over a time period, is empirically calculated by model Baranyi and Roberts (1994), originally developed for bacterial growth. The model has been successfully used for the growth of bacteria, yeast and filamentous fungi (Valik, Baranyi & Gorner, 1999; Marín, Morales, Ramos & Sanchis, 2008). From this primary model, the adaptation time ( $\lambda$ ) and the maximum growth rate ( $\mu_{\max}$ ) parameters are estimated, which subsequently may be used for a secondary modeling if growth curves for different constant conditions are available. Modeling of colony diameter may be useful for research purposes, albeit not a routine

measurable parameter of food analysis. Ergosterol analysis, which accounts for the total fungal population in food samples, may be an alternative (Marín, Bellí, Lasram, Chebil, Ramos, Ghorbel & Sanchis, 2006; Marín, Morales, Ramos, & Sanchis, 2008; Taniwaki, Pitt, Hocking, & Fleet, 2006).

Ergosterol, an important component in fungal membranes, is involved in numerous biological functions, such as membrane fluidity regulation, activity and distribution of integral proteins and control of the cellular cycle. These facts make ergosterol and its biosynthetic pathway essential for fungal growth (Bard, Lees, Turi, Craft, Cofrin, & Barbuch, 1993; Alcazar-Fuoli, Mellado, Garcia-Effron, Lopez, Grimalt, & Cuenca-Estrella, 2008). Seitz, Mohr and Burroughs (1977) pioneered a High Performance/Pressure Liquid Chromatography (HPLC) method for the quantification of ergosterol that has become widely used to estimate the degree of fungal infection in grain and other plant materials. This method was used by some authors to calculate the degree of fungal infection in solid medium, grain and other foods (Marín, Bellí, Lasram, Chebil, Ramos, Ghorbel, & Sanchis, 2006; Marín, Morales, Ramos, & Sanchis, 2008; Taniwaki, Pitt, Hocking, & Fleet, 2006; Kadakal, Nas, & Ekinci, 2005).

Ergosterol content has been used to determine fungal contamination in cereals, juices and other food products (Kadakal, Nas, & Ekinci, 2005; Gourama & Bullerman, 1995; Saxena, Munimbazi, & Bullerman, 2001; Taniwaki, Pitt, Hocking, & Fleet, 2006; Taniwaki, Hocking, Pitt, & Fleet, 2001; Marín, Ramos, & Sanchis, 2005; Marín, Morales, Ramos, & Sanchis, 2008). The analysis is related to total fungal biomass and it has been correlated to colony diameter growth (Marín, Morales, Ramos, & Sanchis, 2008; Taniwaki et al., 2009).

Current assay aims at modeling the growth of the heat-resistant fungi *Byssochlamys fulva* and *Neosartorya fischeri* from data of colony diameter and ergosterol content so that temperature influence on the growth of these fungi on solidified apple juice and the correlation between the parameters of the two analytical methods could be verified.

## 2. Material and methods

### 2.1 Microorganisms and preparation of spore suspension

*B. fulva* IOC 4518 strain was isolated from apple juice concentrate by (Salomão, Massaguer & Aragão, 2008) and *N. fischeri* was isolated and identified in samples taken from apple nectar processing line by Salomão (2002). The preparation of *B. fulva* and *N. fischeri* spores started by the pre-sporulation in Petri dishes containing Potato Dextrose Agar (PDA) media (pH 3.5) for 7 days at 30 °C. The collected spores were added to the sporulation plates containing Malt Extract Agar (MEA) media and incubated for 30 days at 30 °C. After this period, 1 ml of sterile distilled water was added to each plate, which was scraped with a rubber spatula. The entire plate content was filtered through 4 layers of sterile gauze and centrifuged at 3500 rpm (2000 times the force of gravity (g)) for 15 minutes. This procedure was repeated until no hyphae were seen under the microscope. The final suspension was prepared with the precipitate in a minimum volume of water, sufficient to obtain a highly concentrated suspension ( $10^5$  spores.ml<sup>-1</sup>) (Salomão, Slongo & Aragão, 2007). *B. fulva* and *N. fischeri* suspensions were transferred to a flask and kept at 4 °C until use.

### 2.2 Spore suspension quantification

Dilutions of *B. fulva* and *N. fischeri* spores suspension were carried out to verify the number of spores in the suspension. For this procedure, 16x100 mm (diameter x length) screw-cap tubes with 4.5 ml sterile distilled water and 0.5 ml of each suspension were used. The above prepared solutions ( $10^{-1}$  dilutions) were then activated by inserting the tubes into a thermostatic bath (Tecnal-TE-184, Brazil) at 80 °C for 10 minutes and the tubes were then immediately placed in an ice bath (Salomão, 2009). The procedure halted the dormancy of the spores.

Further, appropriate decimal dilutions were performed and plated on PDA media plus tartaric acid solution (1/10, mass/volume) until pH 3.5 was reached and 0.1 % (in mass) of Rose Bengal solution (5/100 mass/volume) to inhibit the spread of other undesirable microbial organisms (Baglioni, Gumerato & Massaguer, 1999). The plates were wrapped in a plastic film to prevent drying. The colonies were enumerated after an incubation period of 3-5 days at 30 °C. Counts were expressed as CFU ml<sup>-1</sup> and each test was individually analyzed in octuplicate trials.



### **2.3 Growth medium**

Diluted apple juice was prepared from clarified and concentrated apple juice (70 °Brix) supplied by Fischer S/A, Videira SC Brazil. Juice's pH was adjusted to 3.8 by sodium hydroxide (1 mol L<sup>-1</sup>) or hydrochloric acid 1 (1 mol L<sup>-1</sup>) solutions. Soluble solids content was adjusted to 12°Brix (refractometer AR200 Reichert, USA) by dilution with distilled water. A hygrometer (Aqua Lab Model Series Models 3TE, Decagon Devices, USA) measured the juice's water activity ( $a_w$ ), equal to 0.99 for diluted apple juice. Growth medium was prepared with 100 ml of the formulated juice plus 1.5 g agar. The mixture was heated, maintained at 115 °C for 1 min (Miorelli, 2009) and the growth medium was then placed in Petri dishes (150 mm diameter).

### **2.4 Growth kinetics of *B. fulva* and *N. fischeri***

The growth kinetics of *B. fulva* and *N. fischeri* was analyzed by measuring the colony diameter on the surface of solidified apple juice over a time period at different incubation temperatures: 15, 20, 25 and 30 °C. The plates containing solidified juice were individually inoculated in a laminar flow chamber by depositing a loopful of the microorganisms' suspension in the center of each plate. Next, the plates were wrapped in plastic film and incubated at constant temperature for 3 months or until fungi reached the entire plate.

### **2.5 Measurements of Colony Diameter**

Experimental data were obtained by averaging the measurements of colonies of eight different plates at four different positions in each plate. The reverse sides of the colonies were daily measured with a ruler ( $\pm 0.5$  mm), resulting in the kinetics of the colony diameter (mm) over time (h). The plating of diluted apple juice with agar without inoculation was performed at each incubation temperature to verify whether the medium was contamination-free.

### **2.6 Ergosterol analysis**

Fungal colonies (plus solidified apple juice) were cut in small squares and the extraction was carried out following method by Gourama and Bullerman (1995) (with modifications). Samples were

added with 40 ml (or 20 ml, in case of tiny colonies) of 10 % (in mass) KOH in methanol and magnetically stirred for 30 min. A 10 ml aliquot was transferred to a screw-cap tube and placed in a hot water bath (55–60 °C) for 20 min. The tubes were then cooled to room temperature and 3 ml of water and 2 ml of hexane were added to the tubes, which were agitated in a Vortex mixer for 1 min. After the separation of layers, the upper layer (hexane) was transferred to a capped vial. The hexane extraction was repeated twice using 2 ml each time.

The extracts were combined and evaporated to dryness under a nitrogen stream. The dry extracts were dissolved in 2 ml of methanol and forced through 0.45 µm acetate filters. The samples were injected in HPLC using Parkin Elmer Series 200 pump with UV visible detector Parkin Elmer Series 200, containing C18 Analytical column Brownlee micrometer (4.6 x 250 mm) with 100 Å-size pores. The wavelength was set at 282 nm (Marín, Morales, Ramos & Sanchis, 2008). The mobile phase was methanol at 1 ml/min and Ergosterol Sigma® standard calibration curve was used for concentrations between 0 and 10 mg/ml (Freire, 2006).

The entire *B. fulva* and *N. fischeri* colonies were removed from the solidified apple juice when their size reached approximately 30, 60, 90, 120 and 150 mm and then extracted. Experiments for the extraction of ergosterol were performed under the same conditions for fungal growth (at 15, 20, 25 and 30 °C) and soluble solids at a concentration of 12 °Brix.

## 2.7 Mathematical modeling

In current study the Baranyi and Roberts model (Baranyi & Roberts, 1994) was employed to describe adaptation time and maximum growth rate of fungal growth. The model's differential equation was reduced so that the stationary growth phase could be discarded. The reduced Baranyi and Roberts model is shown by Equation (1), where  $D(t)$  is the colony diameter (mm) at time  $t$  (h);  $\mu_{max}$  is the maximum growth rate ( $\text{mm}\cdot\text{h}^{-1}$ );  $\lambda$  is the adaptation time (h).

$$D(t) = \ln[1 + \exp(\mu_{max}(t - \lambda)) - \exp(-\mu_{max}\lambda)] \quad (4.3.1)$$

Secondary models originally developed for bacteria have been used for modeling the growth parameters of fungi (Dantigny, Guilmar & Bensoussan, 2005). The Square Root model, shown on

Equation (4.3.2), was selected as the secondary model to describe the influence of temperature on the growth parameters  $\mu_{\max}$  and  $\lambda$ , where  $T$  is the temperature ( $^{\circ}\text{C}$ );  $T_{\min}$  is the theoretical temperature for minimal growth ( $^{\circ}\text{C}$ );  $k$  is the parameter of interest of the primary model ( $\lambda$  or  $\mu_{\max}$ ); and  $b$  is an empirical parameter.

$$\sqrt{k} = b(T - T_{\min}) \quad (4.3.2)$$

The fitting of primary models to the experimental data was performed by the Curve Fitting Tool of Matlab 7.10 software (MathWorks, Natick, USA), whereas the fitting of secondary models was performed with Excel (Microsoft Corporation, USA).

## 2.8 Statistical analysis

The Root Mean Square Error (RMSE) and the coefficient of determination ( $R^2$ ) assessed the ability of the primary and secondary models to reproduce the experimental data. Good fits were obtained when RMSE values were almost zero and  $R^2$  rates were close to 1.

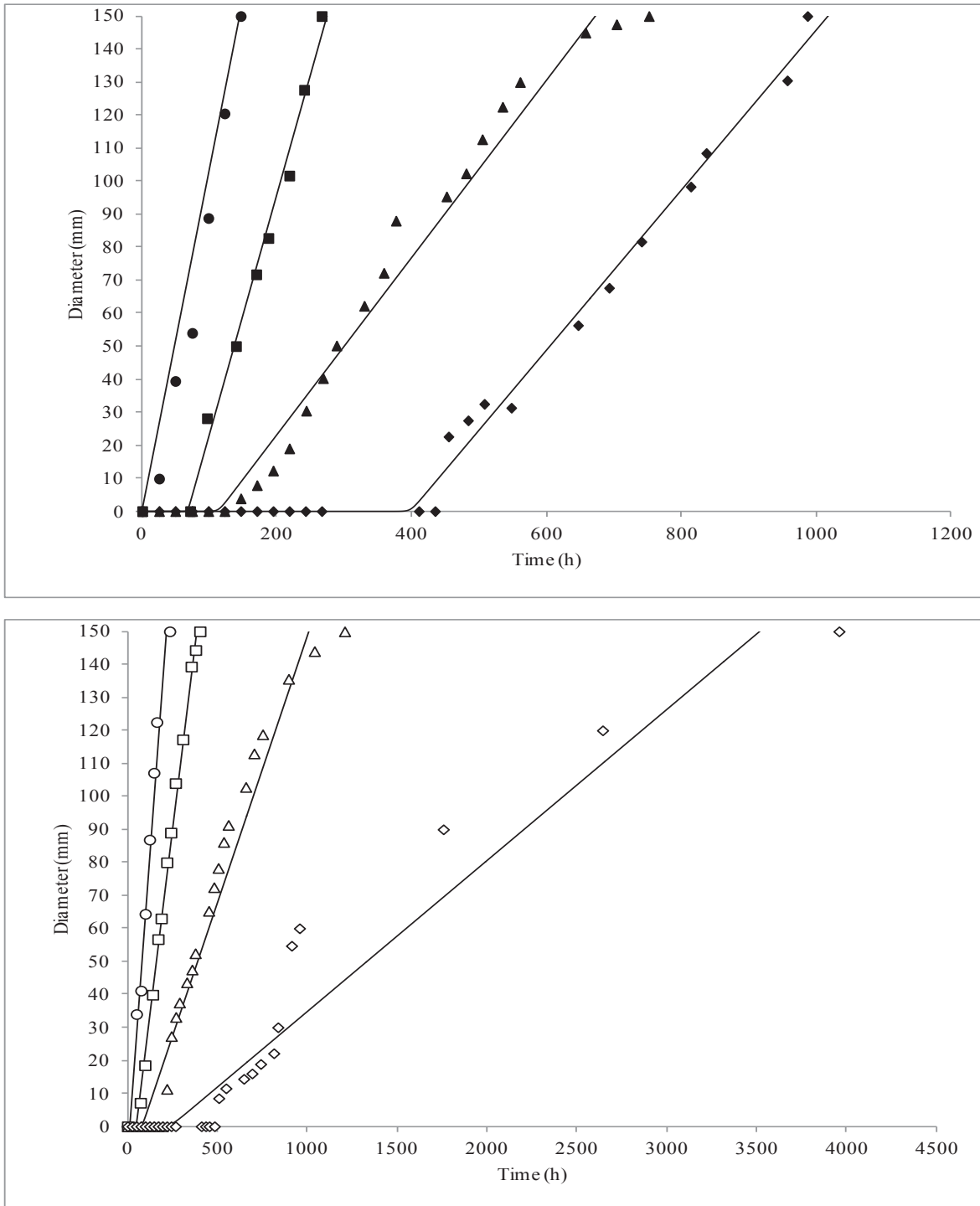
## 3 Results and discussion

### 3.1 Kinetics of ergosterol production in fungal biomass during growth and comparison with the colony diameter measurements

#### 3.1.1 Modeling the colony's diameter data

The colony's diameter growth of *B. fulva* and *N. fischeri* on solidified apple juice and the fitting of the Baranyi and Roberts model to the experimental data over a time period are shown in Figure 4.3.1. Figure 4.3.1 shows that temperature influences the growth of *B. fulva* and *N. fischeri*, with great growth changes at the 15 - 30  $^{\circ}\text{C}$  range. In the case of the two fungi, temperature increase led to an increase in maximum growth rate ( $\mu_{\max \text{ diam}}$ ) and a decrease in adaptation time ( $\lambda_{\text{diam}}$ ).

Figure 4.3.1 *B. fulva* (a) and *N. fischeri* (b) growth curves assessed by colony diameter measurement in solidified apple juice at soluble solid concentration of 12 °Brix. The continuous line (–) represents Baranyi model fitted to the experimental data at (●○) 30 °C (■□) 25 °C (▲△) 20 °C and (◆◇) 15 °C.



The growth curves for *B. fulva* and *N. fischeri* showed the format of the fungi's typical growth curves, with their clear adaptation and linear growth phases, absence of stationary growth phase (during the

evaluated time), and temperature-dependent growth rates. The Baranyi and Roberts model described the colony diameter of *B. fulva* and *N. fischeri* over a certain period of time. Table 4.3.1 shows the  $R^2$  and RMSE rates for the fitting of the Baranyi and Roberts model to the experimental data of colony diameter at different temperatures. The model's ability to describe the experimental data may be observed by RMSE and  $R^2$  rates.

Table 4.3.1  $R^2$  and RMSE values for Baranyi and Roberts model fitted to the experimental data for *B. fulva* and *N. fischeri* colonies radial growth on solidified apple juice at 15, 20, 25 and 30 °C.

	Statistical Index	Temperature			
		15 °C	20 °C	25 °C	30 °C
<i>B. fulva</i>	$R^2$	0.993	0.979	0.992	0.955
	RMSE	4.12	8.28	5.12	12.19
<i>N. fischeri</i>	$R^2$	0.934	0.956	0.994	0.974
	RMSE	10.21	10.88	4.05	9.15

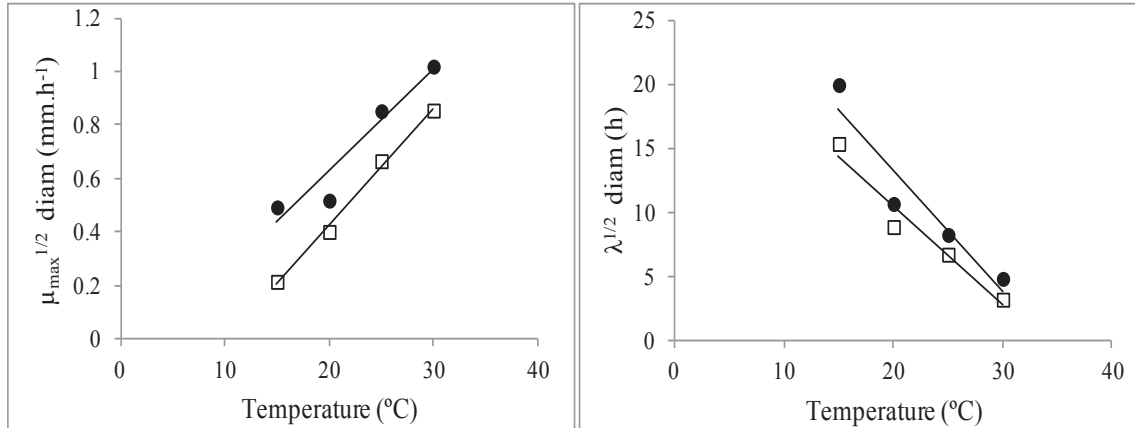
Table 4.3.2 shows the rates of  $\mu_{\max \text{ diam}}$  and  $\lambda_{\text{diam}}$  model parameters obtained by the fitting of the Baranyi and Roberts model to colony diameter data for *B. fulva* and *N. fischeri*. *B. fulva* had higher values for  $\mu_{\max \text{ diam}}$  and  $\lambda_{\text{diam}}$  model parameters than *N. fischeri*. Although *B. fulva* required a longer time to be adapted to the environment, it grew faster than *N. fischeri* when adapted.

Table 4.3.2  $\mu_{\max}$  and  $\lambda$  parameters obtained by Baranyi and Roberts model fitted to the experimental data of colonies radial growth for *B. fulva* and *N. fischeri* in solidified apple juice at 15, 20, 25 and 30 °C.

	Parameter	Temperature			
		15 °C	20 °C	25 °C	30 °C
<i>B. fulva</i>	$\mu_{\max}$ (mm.h <sup>-1</sup> )	0.24	0.27	0.73	1.04
	$\lambda$ (h)	398.30	113.90	68.12	23.27
<i>N. fischeri</i>	$\mu_{\max}$ (mm.h <sup>-1</sup> )	0.05	0.16	0.44	0.73
	$\lambda$ (h)	235.90	78.69	45.09	10.25

The fitting of secondary models to  $\mu_{\max \text{ diam}}$  and  $\lambda_{\text{diam}}$  parameters data for colony diameter are shown in Figure 4.3.2.

Figure 4.3.2 Square Root model fitted to  $\mu_{\max}$  and  $\lambda$  parameters data for colonies radial growth of *B. fulva* (●) and *N. fischeri* (□).



It may be observed that the Square Root secondary model described well the effect of temperature on  $\mu_{\max \text{ diam}}$  and  $\lambda_{\text{diam}}$  parameters, in which the fitting produced good statistical results (RMSE and  $R^2$ ) for the two fungi. Table 4.3.3 shows the equations obtained by the fitting of secondary models which may be used to predict the growth parameters of *B. fulva* and *N. fischeri* within the range of temperatures under analysis (from 15 °C to 30 °C) in which the models showed a good ability to describe the parameter variation as a function of storage temperatures.

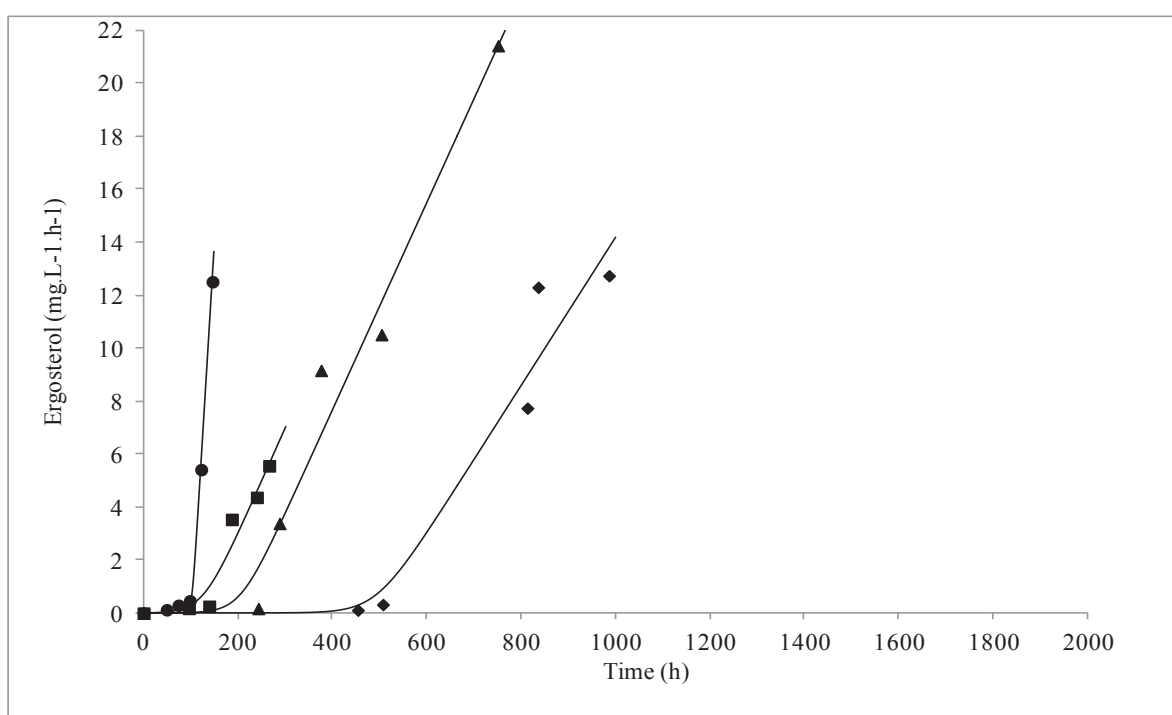
Table 4.3.3 Secondary models for growth parameters  $\mu_{\max}$  and  $\lambda$  of *B. fulva* and *N. fischeri* function of temperature of colony diameter.

Parameter	Equation	$R^2$
<b><i>B. fulva</i></b>		
$\lambda$ (h)	$\lambda^{1/2}_{\text{diam}} = -0.96 * T + 32.45$	0.907
$\mu_{\max}$ (mm/h)	$\mu_{\max}^{1/2}_{\text{diam}} = 0.038 * T - 0.14$	0.918
<b><i>N. fischeri</i></b>		
$\lambda$ (h)	$\lambda^{1/2}_{\text{diam}} = -0.77 * T + 25.92$	0.951
$\mu_{\max}$ (mm/h)	$\mu_{\max}^{1/2}_{\text{diam}} = 0.044 * T - 0.45$	0.995

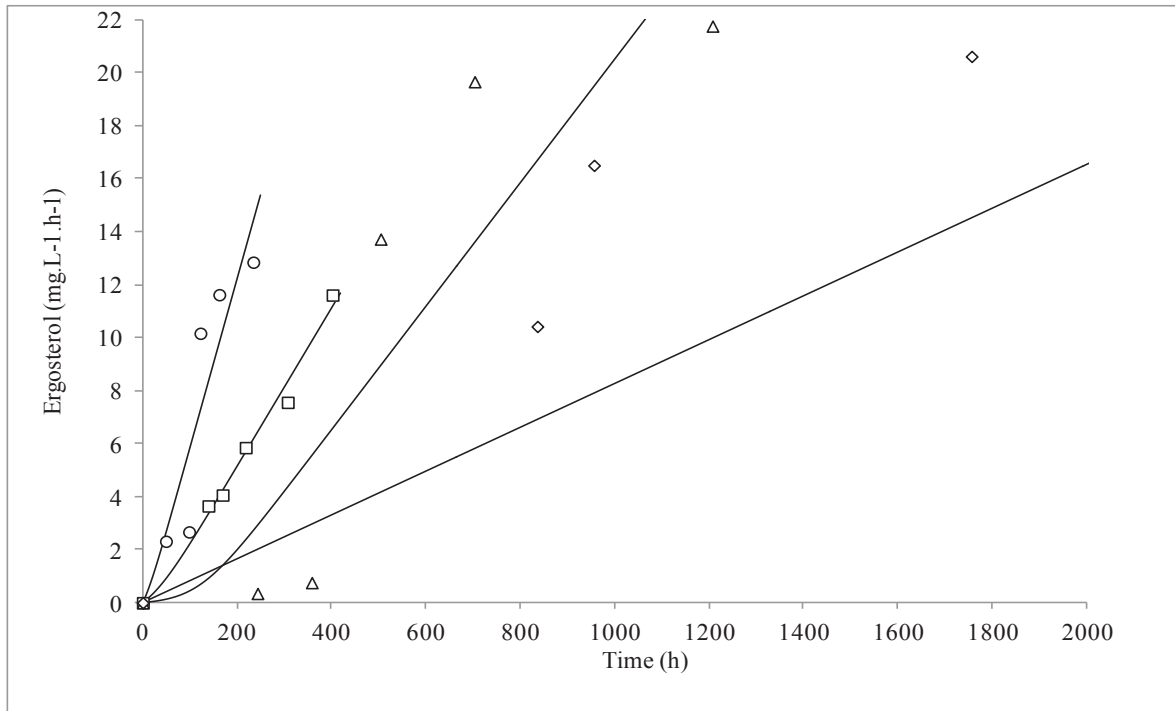
### 3.1.2 Modeling of ergosterol content

The ergosterol content for *B. fulva* and *N. fischeri* growth on solidified apple juice and the fitting of the Baranyi and Roberts model to the experimental data over a time period are shown in Figure 4.3.3.

Figure 4.3.3 *B. fulva* (a) and *N. fischeri* (b) growth curves assessed by quantification of ergosterol content in solidified apple juice at soluble solid concentration of 12 °Brix. The continuous line (—) represents Baranyi and Roberts model fitted to the experimental data at (●○) 30 °C (■□) 25 °C (▲△) 20 °C and (◆◇) 15 °C.







In fact, Figure 4.3.3 shows the same behavior for ergosterol content as the colony diameter measurements for the two fungi in which temperature increase led to an increase in maximum growth rate ( $\mu_{\max \text{ erg}}$ ) and a decrease in adaptation time ( $\lambda_{\text{erg}}$ ).

The Baranyi and Roberts model was able to describe the ergosterol content for *B. fulva* and *N. fischeri* over a time period.  $R^2$  and RMSE rates for fitting the Baranyi and Roberts model to the experimental data at different temperatures are shown on Table 4.3.4. RMSE and  $R^2$  rates revealed that the model was able to describe successfully the experimental data of ergosterol content over a time period. However, to *N. fischeri* at 15 °C a low value of  $R^2$  was found (0.622). One possibility for this lower value could be growth inhibition of this fungi can cause a possible change in the ergosterol metabolism on adverse conditions, such as low temperatures.

Table 4.3.4  $R^2$  and RMSE values for Baranyi and Roberts model fitted to the experimental data of *B. fulva* and *N. fischeri* growth assessed by ergosterol content on solidified apple juice at 15, 20, 25 and 30 °C.

	Statistical Index	Temperature			
		15 °C	20 °C	25 °C	30 °C
<i>B. fulva</i>	$R^2$	0.946	0.971	0.958	0.999
	RMSE	1.60	1.57	0.63	0.21
<i>N. fischeri</i>	$R^2$	0.622	0.805	0.988	0.847
	RMSE	6.65	5.05	0.49	2.43

Table 4.3.5 shows the rates of  $\mu_{\max \text{ erg}}$  and  $\lambda_{\text{erg}}$  model parameters estimated by the fitting of ergosterol content for *B. fulva* and *N. fischeri* over a time period.

Table 4.3.5  $\mu_{\max}$  and  $\lambda$  parameters of Baranyi and Roberts model obtained by fitting to the experimental data of ergosterol content of *B. fulva* and *N. fischeri* on solidified apple juice at 15, 20, 25 and 30 °C.

		Temperature			
Parameter		15 °C	20 °C	25 °C	30 °C
<i>B. fulva</i>	$\mu_{\max}$ (mm.h <sup>-1</sup> )	0.03	0.04	0.14	0.29
	$\lambda$ (h)	492.9	204.5	125.3	103.0
<i>N. fischeri</i>	$\mu_{\max}$ (mm.h <sup>-1</sup> )	0.01	0.02	0.03	0.06
	$\lambda$ (h)	658.4	120.2	27.5	8.1

The fitting of secondary models to  $\mu_{\max \text{ erg}}$  and  $\lambda_{\text{erg}}$  parameters data for ergosterol content are shown in Figure 4.3.4 whilst the equations of the secondary models of ergosterol content for *B. fulva* and *N. fischeri* are given in Table 4.3.6.

Figure 4.3.4 Fitting of Square Root model to the  $\mu_{\max}$  and  $\lambda$  parameters data of ergosterol content for *B. fulva* (●) and *N. fischeri* (□).

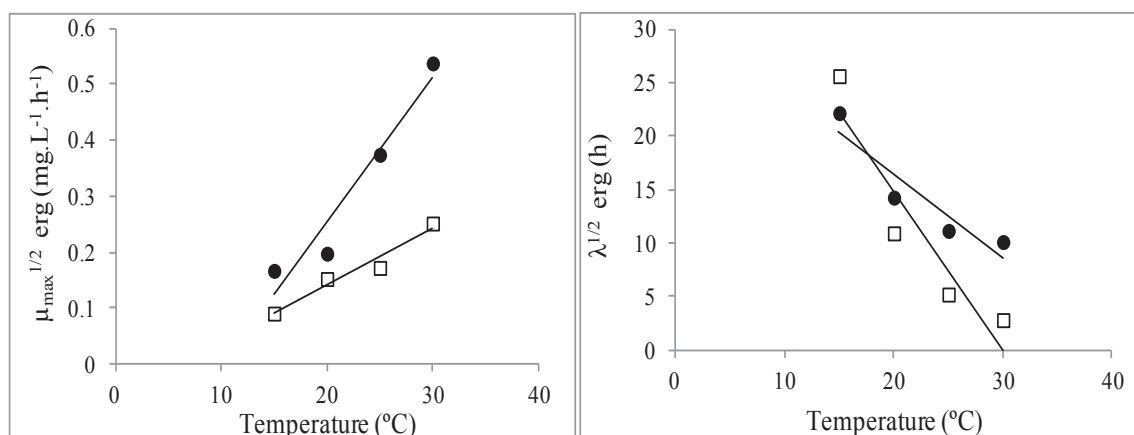


Table 4.3.6 Secondary models for growth parameters  $\mu_{\max}$  and  $\lambda$  of *B. fulva* and *N. fischeri* function of temperature of ergosterol content.

Parameter	Equation	R <sup>2</sup>
<b><i>B. fulva</i></b>		
$\lambda$ (h)	$\lambda^{1/2}_{\text{erg}} = -0.79 * T + 32.13$	0.864
$\mu_{\max}$ (mm.h <sup>-1</sup> )	$\mu_{\max}^{1/2}_{\text{erg}} = 0.026 * T - 0.261$	0.936
<b><i>N. fischeri</i></b>		
$\lambda$ (h)	$\lambda^{1/2}_{\text{erg}} = -1.48 * T + 44.54$	0.875
$\mu_{\max}$ (mm.h <sup>-1</sup> )	$\mu_{\max}^{1/2}_{\text{erg}} = 0.01 * T - 0.059$	0.955

It may be observed from Figure 4.3.4 and Table 4.3.6 that the Square Root model showed a good correlation for *B. fulva* and *N. fischeri* to describe the temperature influence on  $\mu_{\max}$  and  $\lambda$  parameters data for ergosterol content. As expected, these results confirm a strongly dependence of  $\mu_{\max \text{ erg}}$  and  $\lambda_{\text{erg}}$  of *B. fulva* and *N. fischeri* on the temperature. The growth parameters for both fungi, within the range of temperature studied, may be predicted from the above results.

### 3.1.3 Comparison between ergosterol content and colony diameter measurements

The correlation between the growth parameters obtained from the colony diameter ( $\mu_{\max \text{ diam}}$  and  $\lambda_{\text{diam}}$ ) and ergosterol content ( $\mu_{\max \text{ erg}}$  and  $\lambda_{\text{erg}}$ ) measurements are shown in Figure 4.3.5. A linear trend between the two growth assessment methods ( $\mu_{\max \text{ diam}}$  versus  $\mu_{\max \text{ erg}}$  and  $\lambda_{\text{diam}}$  versus  $\lambda_{\text{erg}}$ ) in which the increase in the colony diameter parameters caused an increase in ergosterol content parameters may be observed. The correlations between the  $\mu_{\max}$  and  $\lambda$  parameters estimated by colony diameter and ergosterol content measurements for *B. fulva* and *N. fischeri* on solidified apple juice are shown in Table 4.3.7.

Figure 4.3.5 Correlations between *B. fulva* (●) and *N. fischeri* (□) growth rates and lag phases estimated either through colony size measurement or ergosterol content in solidified apple juice at soluble solid concentration of 12 °Brix.

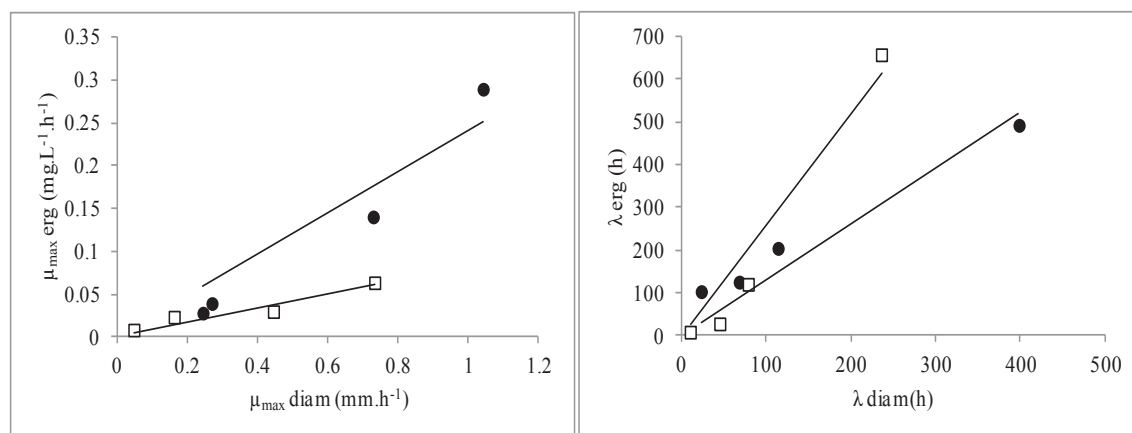


Table 4.3.7 Correlations between  $\mu_{\max}$  and  $\lambda$  parameters estimated for colony diameter and ergosterol content for *B. fulva* and *N. fischeri* growth on solidified apple juice at soluble solid concentration of 12 °Brix.

Parameter	Equation	R <sup>2</sup>
<b><i>B. fulva</i></b>		
$\lambda$ (h)	$\lambda_{\text{erg}} = 1.304 * \lambda_{\text{diam}}$	0.892
$\mu_{\max}$ (mm/h)	$\mu_{\max \text{ erg}} = 0.241 * \mu_{\max \text{ diam}}$	0.902
<b><i>N. fischeri</i></b>		
$\lambda$ (h)	$\lambda_{\text{erg}} = 2.59 * \lambda_{\text{diam}}$	0.938
$\mu_{\max}$ (mm/h)	$\mu_{\max \text{ erg}} = 0.084 * \mu_{\max \text{ diam}}$	0.892

Table 4.3.7 indicates the good statistical results (RMSE and R<sup>2</sup>) of the correlations between the parameters from colony diameter and ergosterol content. In fact, results showed that the evaluation of fungal growth may be assessed by measuring the ergosterol content since this measurement represents the actual fungal growth and may be correlated to information on the colony diameter. According to the literature, the ergosterol analysis may be used when the measurements of diameter are difficult to determine. Zimmermann, Miorelli, Massaguer and Aragão

(2011) studied the growth of heat-resistant fungi *B. nivea* and *N. fischeri* in bottled pineapple juice and reported the difficulty of measuring the diameter of fungal colonies. Since the colonies were visible only when they were dispersed on the juice surface, with a decrease in measurement accuracy, in this case, the quantification of ergosterol content could be useful. In current assay, the correlation curve converted the ergosterol content into the colony diameter.

Some studies in the literature reported the correlation between ergosterol content and other methods for quantifying fungal growth, such as colony diameter (Taniwaki et al., 2009; Marín, Morales, Ramos & Sanchis, 2008; Marín, Ramos & Sanchis, 2005), dry weight (Taniwaki et al., 2009), concentrations of patulin in different conditions (temperature, aw, pH) and with different substrates (solid media or food) (Kadalkal, Nas, & Ekinici, 2005).

Few reports were extant which applied primary models to obtain growth parameters ( $\mu_{\max}$  and  $\lambda$ ) from the evolution of ergosterol content and colony diameter over a time period and correlated them. In current assay, secondary models describing the influence of temperature on growth parameters were obtained. Marín et al. (2009) applied mathematical models for the prediction of growth of aflatoxigenic fungi in powdered Capsicum fruits as a function of their water availability. Two aflatoxigenic *A. flavus* from chili powder were grown on 3% chili powder extract agar at different water activity levels and their growth was evaluated over a time period for colony sizes and ergosterol accumulation. The two variables were modeled over a time period and the resulting parameters (maximum growth rates and adaptation times) were modeled as a function of water availability. Both isolates showed a similar pattern of behavior, with decreasing maximum growth rates and increasing adaptation times with decreasing water activity level. As verified in current study, the authors observed a linear relationship when maximum growth rates obtained for colony size and ergosterol content were compared.

#### 4 Conclusions

Results from current assay showed that *B. fulva* and *N. fischeri* were able to grow well on solidified apple juice at different temperatures (15, 20, 25 and 30 °C). Further, Baranyi and Roberts model describe in a satisfactory way the colony diameter and the ergosterol content for the growth of *B. fulva* and *N. fischeri* on solidified apple juice.

Correlation curves between the parameters of colony diameter and ergosterol content for *B. fulva* and *N. fischeri* on solidified apple juice were obtained, from which an analysis of ergosterol content would be used to describe fungal growth. In fact, current investigation may be a highly relevant contribution for the juice processing industry since conditions may be established to avoid fungal growth in apple juice from measurements of colony diameter or ergosterol content derived thereby from the data and growth models.

## Referências

ALCAZAR-FUOLI L., MELLADO E., GARCIA-EFFRON G., LOPEZ J. F., GRIMALT J. O., CUENCA-ESTRELLA, J. M., (2008). Ergosterol biosynthesis pathway in *Aspergillus fumigatus*. *Steroids*, 73, 339–347.

BARANYI, J., ROBERTS, T.A., MCCLURE, P. (1993). A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiology*, 10, 43–59.

BARANYI, J., ROBERTS, T.A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 277-294.

BARD, M., LEES, N. D., TURI, T., CRAFT, D., COFRIN, L., BARBUCH, R. (1993). Sterol synthesis and viability of erg11 (cytochrome P450 lanosterol demethylase) mutations in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Lipids*, 28, 963–967.

DANTIGNY, P., GUILMART, A., BENSOUSSAN, M. (2005). Basis of predictive mycology. *International Journal of Food Microbiology*, 100, 187-196.

FREIRE, M.M. (2006). Composição e atividade antifúngica do óleo essencial de hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.). Tese (Pós-Graduação em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa.

GIBSON, A.M., HOCKING, A.D. (1997). Advances in the predictive modeling of fungal growth in food. *Trends in Food Science and Technology*, 8, 353-358.

GIBSON, A. M., BARANYI, J., PITT, J. I., EYLES, M. J., ROBERTS, T. A. (1994). Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 419-431.

GOURAMA, H., BULLERMAN, L.B. (1995). Relationship between aflatoxin production and mold growth as measured by ergosterol and plate count. *LWT-Food Science and Technology*, 28, 185–189.

IBRAHIM, G.E., HASSAN, I. M., ABD-ELRASHID, A.M., EL-MASSRY, K.F., EH-GHORAB, A.H., RAMADAN MANAL, M., OSMAN, F. (2011). Effect of clouding agents on the quality of apple juice during storage. *Food Hydrocolloids*, 25, 91-97.

KADAKAL C., NAS S., EKINCI, R. (2005). Ergosterol as a new quality parameter together with patulin in raw apple juice produced from decayed apples. *Food Chemistry*, 90, 95-100.

LU, Y., FOO, L.Y. (2000). Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. *Food Chemistry*, 68, 81-85.

MARÍN, S., MORALES, H., RAMOS, A.J. SANCHIS, V., (2008). Fitting of colony diameter and ergosterol as indicators of food borne mould growth to known growth models in solid medium. *International Journal of Food Microbiology*, 121, 139-149.

MARÍN, S., BELLÍ, N., LASRAM, S., CHEBIL, S., RAMOS, A.J., GHORBEL, A., SANCHIS, V. (2006). Kinetics of ochratoxin A production and accumulation by *Aspergillus carbonarius* on synthetic grape medium at different temperature levels. *Journal Food Science*, 71, 196-200.

MARÍN, S., RAMOS, A. J., SANCHIS, V. (2005). Comparison of methods for the assessment of growth of food spoilage moulds in solid substrates. *International Journal of Food Microbiology*, 99, 329-341.



MIORELLI, S. (2009). Determinação dos parâmetros de resistência térmica de microrganismos contaminantes de alimentos ácidos. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis.

PANAGOOU, E. Z.; CHELONAS, S.; CHATZIPAVLIDIS, I.; NYCHAS, G. J. E. (2010). Modelling the effect of temperature and water activity on the growth rate and growth/no growth interface of *Byssochlamys fulva* and *Byssochlamys nivea*. *Food Microbiology*, 27, 618-627.

PIECKOVÁ, E.; BERNÁT, D.; JESENSKÁ, Z. (1994). Heat resistant fungi isolated from soil. *International Journal of Food Microbiology*, 22, 297-299.

PITT, J. I., HOCKING, A. D. (2009). *Fungi and Food Spoilage*, 3rd edn. Springer, New York.

PITT, J. I, MISCAMBLE, B. F (1995) Water relations of *Aspergillus flavus* and closely related species. *Jornal of Food Protection*, 58, 86-90.

SALOMÃO, B. C. M. (2009). Detecção de patulina e desinfecção de maçãs destinadas à produção de suco. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis.

SALOMÃO, B. C. M.; MASSAGUER, P. R.; ARAGÃO, G. M. F. (2008). Isolamento e seleção de fungos filamentosos termorresistentes do processo produtivo de néctar de maçã. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28, 116-121.

SALOMÃO, B. C. M.; SLONGO, A. P.; ARAGÃO, G. M. F. (2007). Heat resistance of *Neosartorya fischeri* in various juices. *LWT-Food Science and Technology*, 40, 676-689.

SALOMÃO, B. C. M.; MASSAGUER, P. R.; COSTA, C. A.; ARAGÃO, G. M. F. (2004) Influência de diferentes pH do meio de aquecimento na resistência térmica de *Neosartorya fischeri* isolado do processo produtivo de néctar de maçã. *Revista Alimentos & Nutrição*, 15, 7-10.

SALOMÃO, B. C. M. Isolamento, identificação e estudo da resistência térmica de fungos filamentosos termorresistentes em produtos de frutas. (2002). Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis

SAXENA, J., MUNIMBAZI, C., BULLERMAN, L. B. (2001). Relationship of mould count ergosterol and ochratoxin A production. *International Journal of Food Microbiology*, 71, 29–34.

SEITZ, L. M.; MOHR, H. E.; BURROUGHS, R. (1977). Ergosterol as an indicator of fungal invasion in grains. *Cereal Chemistry*, 54, 1207-1217.

TANIWAKI, M. H.; HOCKING, A. D.; PITT, J. I.; FLEET, G. H. (2010). Growth and mycotoxin production by fungi in atmospheres containing 80% carbon dioxide and 20% oxygen. *International Journal of Food Microbiology*, 143, 218–225.

TANIWAKI, M. H., PITT, J. I., HOCKING, A. D., FLEET, G. H. (2006). Comparison of hyphal length, ergosterol, mycelium dry weight and colony diameter for quantifying growth of fungi from foods. In: Hocking, A.D., Pitt, J.I., Samson, R.A., Thrane, U. (Eds.), *Advances in Food Mycology*. Springer, New York, 49–67.

TANIWAKI, M. H., HOCKING, A. D., PITT, J. I., FLEET, G. H. (2001). Growth of fungi and mycotoxin production on cheese under modified atmospheres. *International Journal of Food Microbiology*, 68, 125–133.

TOURNAS, V. (1994). Heat Resistant Fungi of importance to the food and beverage industry. *Critical Review Microbiology*, 20, 243-263.

VALIK, L.; BARANYI, J.; GORNER, F. (1999). Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Penicillium roqueforti*. *International Journal of Food Microbiology*, 47, 141-146.

ZIMMERMANN, M., MIORELLI, S., MASSAGUER, P. R., ARAGÃO, G. M. F. (2011). Modeling the influence of water activity and ascospore age on the growth of *Neosartorya fischeri* in pineapple juice. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 239-243.

### 4.3.2 Informações Complementares

A partir dos parâmetros primários obtidos através da modelagem do crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri* para a medida do diâmetro da colônia e conteúdo de ergosterol a 12 °Brix foi realizada a escolha do modelo secundário baseada na comparação dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) obtidos pelos ajustes dos cinco modelos secundários aos dados experimentais.

A Tabela 4.3.8 apresenta os coeficientes de determinação dos modelos secundários que descrevem a influência da temperatura nos parâmetros de crescimento, para os dois fungos estudados para a medida do diâmetro da colônia e conteúdo de ergosterol a 12 °Brix.

Tabela 4.3.8 Coeficientes de determinação ( $R^2$ ) obtidos pelos ajustes dos modelos secundários que descrevem a influência da temperatura nos parâmetros de crescimento  $\lambda$  (h) e  $\mu_{\max}$  (mm/h) de *B. fulva* e *N. fischeri* para a medida do diâmetro da colônia e conteúdo de ergosterol a 12 °Brix.

Fungo	°Brix	Modelos secundários	Coeficiente de determinação ( $R^2$ )				
			Linear	Raiz Quadrada	Tipo Arrhenius	Potência	Exponencial
<i>B. fulva</i>	Diâmetro	$\lambda$	0,799	<b>0,907</b>	0,963	0,979	0,978
		$\mu_{\max}$	0,916	<b>0,918</b>	0,825	0,879	0,914
	Ergosterol	$\lambda$	0,805	<b>0,864</b>	0,993	0,966	0,919
		$\mu_{\max}$	0,89	<b>0,936</b>	0,871	0,925	0,959
<i>N. fischeri</i>	Diâmetro	$\lambda$	0,848	<b>0,951</b>	0,908	0,948	0,972
		$\mu_{\max}$	0,969	<b>0,995</b>	0,996	0,993	0,968
	Ergosterol	$\lambda$	0,738	<b>0,875</b>	0,983	0,999	0,995
		$\mu_{\max}$	0,908	<b>0,955</b>	0,961	0,964	0,951

Pela análise da Tabela 4.3.8, observa-se que o modelo da Potência apresentou um  $R^2$  maior que o modelo da raiz quadrada. Entretanto, este último foi selecionado por apresentar melhor ajuste para *N. fischeri*.

Os modelos utilizados no presente estudo forneceram parâmetros que descreveram o crescimento ao longo do tempo, mostrando que o conteúdo do ergosterol pode ser um parâmetro alternativo adequado para a avaliação e modelagem do crescimento dos fungos, sendo útil quando os alimentos não permitirem o uso da medida do diâmetro da colônia.

#### **4.4 Modelagem Matemática do Crescimento de *Byssochlamys fulva* e *Neosartorya fischeri* sob Condições Não Isotérmicas**

O estudo do crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri* sob condições isotérmicas apresentado nos itens anteriores, não descreve muitas das condições de armazenamento a que os produtos que podem conter estes fungos são normalmente submetidos. Assim, é necessário estudar o crescimento de fungos em condições não isotérmicas.

De acordo com as informações obtidas no estudo anterior, os modelos (primário e secundários) que apresentaram melhores ajustes foram selecionados para estabelecer o modelo preditivo não isotérmico, baseando-se na metodologia proposta por Baranyi e Roberts. O modelo proposto neste estudo foi comparado com dados experimentais de crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri* em suco de maçã solidificado. O crescimento foi avaliado pela medida do diâmetro da colônia e pelo conteúdo de ergosterol obtidos de quatro diferentes perfis de temperatura.

Após a apresentação do artigo, estão incluídas algumas informações complementares referentes à descrição dos perfis de temperatura durante os experimentos. Também são apresentadas, para melhor visualização e comparação, as curvas não isotérmicas no mesmo gráfico que as isotérmicas, referentes ao intervalo de temperaturas dos perfis estudados.

#### 4.4.1 Parte 4: Modelagem matemática do crescimento de *Byssochlamys fulva* e *Neosartorya fischeri* sob condições não isotérmicas.

##### Resumo

A temperatura é um dos fatores ambientais mais importantes a ser considerado quando se trata de segurança de alimentos, pois pode mudar consideravelmente durante a cadeia de produção e distribuição, expondo os produtos a diferentes temperaturas e comprometendo assim a sua qualidade. A capacidade descritiva de modelos primários pode apenas ser assegurada em condições ambientais constantes, sendo necessário um modelo eficaz que leve em conta o crescimento microbiano em diferentes condições ambientais durante o transporte, distribuição e armazenamento. *Neosartorya fischeri* e *Byssochlamys fulva* são fungos termorresistentes, capazes de crescer em sucos de fruta, mesmo a baixas concentrações de oxigênio, além de serem produtores de micotoxinas e enzimas pectinolíticas. Neste estudo, a avaliação do crescimento ao longo do tempo foi realizada por medição do diâmetro das colônias e conteúdo de ergosterol em suco de maçã solidificado. As curvas de crescimento de *N. fischeri* e *B. fulva* foram descritas pelo modelo de Baranyi e Roberts, sem considerar a fase estacionária. Os modelos da raiz quadrada e da potência descrevem a dependência da velocidade específica máxima de crescimento e da duração da fase de adaptação em função da temperatura. A simulação do crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri*, em condições não isotérmicas, considerando-se os modelos secundários foi realizada utilizando o *software* Matlab 7.10, com quatro perfis diferentes de temperatura. No primeiro perfil de temperatura, a incubação das placas ocorreu na temperatura inicial de 10 °C, aumentando gradativamente (cerca de 1,27 °C a cada 24 h) até atingir a temperatura de 30 °C. No segundo perfil de temperatura, incubaram-se as placas na temperatura inicial de 30 °C, diminuindo gradativamente (cerca de 1,27 °C a cada 24 h) até atingir a temperatura de 10 °C, permanecendo nesta temperatura até que o crescimento do fungo atingisse toda a placa. O terceiro experimento foi realizado a partir de 20 °C, onde mudanças sucessivas entre 10 e 20 °C foram realizadas a cada 24 horas, até que a totalidade da placa foi alcançada. O quarto experimento foi realizado pela incubação das placas a 20 °C durante 170 horas, e, subsequentemente, mudando a temperatura para 30 °C até que toda a placa fosse atingida (cerca de 180 h). Os resultados mostraram que o modelo de crescimento não isotérmico foi capaz de prever o



crescimento *N. fischeri* e *B. fulva* para todos os perfis de temperatura testados, o que foi confirmado pelos índices estatísticos: fator bias, fator exatidão,  $R^2$  e RMSE. Dessa forma, foi obtido um modelo não isotérmico que pode ser usado para prever a influência das mudanças na temperatura durante o transporte/armazenamento sobre o crescimento avaliado pela medida do diâmetro da colônia e pelo conteúdo de ergosterol correspondente de *N. fischeri* e *B. fulva*, em suco de maçã solidificado.

**Palavras-chave:** crescimento radial de fungos, conteúdo de ergosterol, microbiologia preditiva, condições não isotérmicas.

## 1.Introdução

Algumas espécies de fungos apresentam características que os tornam mais resistentes ao calor devido à sua capacidade de produção de ascósporos. Espécies como *Byssochlamys* e *Neosartorya*, comumente encontrados em produtos de frutas, são descritos como produtores de micotoxinas (Sant'Ana, Rosenthal, e Massaguer, 2009).

Modelos matemáticos preditivos têm sido utilizados para quantificar e prever o comportamento microbiano em diferentes condições ambientais, ou seja, para prever o crescimento microbiano, em função de fatores intrínsecos e extrínsecos, tais como temperatura, pH, atividade da água, condições de embalagem, entre outros (Zwietering et al., 1990; Devlieghere et al., 2000; Brul et al., 2008).

Muitos modelos matemáticos são baseados em dados experimentais de crescimento microbiano em condições constantes. No entanto, condições tais como temperatura, atividade de água ou a composição da atmosfera gasosa não são sempre constantes durante o armazenamento. Por conseguinte, nos últimos anos, a literatura tem relatado trabalhos sobre modelos dinâmicos, isto é, modelos de predição que permitem o crescimento de microrganismos sob condições que variam ao longo do tempo de armazenamento, principalmente condições não isotérmicas (McMeekin et al., 2006; Peleg, 2006; Gospavic et al., 2008; Gougoli et al., 2011). A temperatura é um fator importante na deterioração de alimentos, especialmente deterioração microbiana, uma vez que a velocidade de crescimento específico e a fase de latência são altamente dependentes da temperatura (Giannuzzi et al., 1998; Longhi, 2012).

Estudos prévios sobre o efeito da temperatura no crescimento de fungos foram realizados em condições isotérmicas. No entanto,

flutuações de temperatura são frequentemente encontradas durante o processamento, distribuição e armazenamento (Giannakourou et al., 2005; Koutsoumanis, 2001; Laguerre et al., 2002). Embora vários modelos publicados façam a predição de crescimento bacteriano em condições de temperatura dinâmicas (Gougouli et al., 2008, Koutsoumanis, 2001, Koutsoumanis et al., 2006, Mellefont e Ross, 2003 e Zwietering et al., 1994), relatos sobre o comportamento de fungos sob variações de temperatura ainda são escassos.

Ao se desenvolver um modelo preditivo de crescimento não isotérmico, dois passos são necessários. Primeiramente, os parâmetros de crescimento são obtidos a partir do ajuste dos modelos primários aos dados experimentais, obtidos sob diferentes condições isotérmicas. Depois disso, a influência da temperatura sobre os parâmetros de crescimento é descrita pelos modelos secundários. Para predizer o crescimento microbiano sob condições de temperatura flutuante, a forma diferencial dos modelos de crescimento primários deve ser utilizada (Corradini e Peleg, 2005)

Alguns modelos dinâmicos de predição são baseadas em modelos primários, como modelo de Gompertz (Van Impe et al, 1995; Huang, 2003; Gospavic et al, 2008), Logístico modificado (Corradini e Peleg, 2005; Smith-Simpson et al, 2007) e Baranyi-Roberts (Baranyi e Roberts, 1994; Mataragas et al., 2006; Velugoti et al., 2010). Para o estabelecimento de um modelo de predição não isotérmico, as condições de temperatura são definidas de acordo com cada microrganismo e gêneros alimentícios (Dalcanton, 2010).

O objetivo do presente estudo foi estabelecer um modelo para predizer o crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri* em condições não isotérmicas através da medida do diâmetro da colônia e do conteúdo de ergosterol e comparar este modelo com os dados experimentais obtidos nos diferentes perfis de temperatura. Para atingir este objetivo, os modelos primários de crescimento e os modelos secundários foram utilizados para descrever a dependência da temperatura sobre os parâmetros de crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri* em suco de maçã solidificado. Foi também assumido que os dados de crescimento isotérmicos podem ser usados para predizer o desenvolvimento microbiano em condições não isotérmicas.

## 2. Material e métodos

### 2.1 *Microrganismos*

Neste estudo, foi analisado o crescimento de *Byssochlamys fulva* IOC 4518 isolado de suco concentrado de maçã (Salomão et al., 2008) e de *Neosartorya fischeri* isolado de amostras retiradas da linha de processamento de néctar de maçã (Salomão, 2002).

### 2.2 *Meios de Crescimento*

A elaboração dos meios de crescimento foi realizada de acordo com o Item 3.3 do Material e Métodos.

### 2.3 *Avaliação do Crescimento de B. fulva e N. fischeri e Análise do Conteúdo de Ergosterol*

A avaliação do crescimento dos fungos em estudo foi realizada de acordo com o Item 3.4 Avaliação do crescimento de *Byssochlamys fulva* e *Neosartorya fischeri* e 3.4.1 do Material e Métodos.

A avaliação do conteúdo de ergosterol foi realizada conforme descrito no item 3.4.2 descrito no Material e Métodos.

### 2.4 *Modelagem do Crescimento Microbiano em Armazenamento Não Isotérmico*

O modelo matemático não isotérmico utilizado neste estudo foi obtido utilizando a abordagem estabelecida por Baranyi e Roberts. De acordo com estes autores, os modelos primários e secundários, obtidos a partir de dados de crescimento sob condições isotérmicas, podem ser utilizados para prever os padrões de crescimento microbiano sob várias condições não isotérmicas. Estes modelos foram utilizados para gerar as curvas de predição de crescimento não isotérmicas. O modelo que mostrou o melhor ajuste às curvas de crescimento isotérmicas de *B. fulva* e *N. fischeri* em todas as temperaturas testadas foi o modelo de Baranyi e Roberts simplificado, apresentado na Equação 4.4.1, sendo este modelo utilizado para obter os parâmetros de crescimento primário (duração da fase de adaptação ( $\lambda$ ) e velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\max}$ )), em diferentes temperaturas isotérmicas (Garcia et al., 2009).

$$D(t) = \ln\left[1 + \exp(\mu_{\max}(t - \lambda)) - \exp(-\mu_{\max}\lambda)\right] \quad (4.4.1)$$

A primeira derivada da equação (4.4.1), gerou a equação diferencial (4.4.2).

$$\frac{dD(t)}{dt} = \frac{\mu_{\max}(T(t))}{[1 + \exp(\mu_{\max}(T(t))[\lambda(T(t)) - t]) - \exp(-\mu_{\max}(T(t))t)]} \quad (4.4.2)$$

A partir da equação do modelo não isotérmico (Equação 4.4.2) pode-se prever o comportamento dos microrganismos, dentro das faixas de temperatura estudadas, variando-se a temperatura de incubação.

Os quatro perfis de temperatura estudados representam a variação de temperatura em diferentes intervalos de tempo. No primeiro perfil de temperatura estudado, a incubação das placas ocorreu na temperatura inicial de 10 °C, aumentando gradativamente (cerca de 1,27 °C a cada 24 h) até atingir a temperatura de 30 °C, permanecendo nesta temperatura até que o crescimento atingisse toda a placa.

O perfil de temperatura nestas condições foi obtido através da Equação 4.4.3.

$$T(t) = 0,0531.t + 10 \quad (4.4.3)$$

onde:  $T$  é a temperatura em °C;  $t$  é o tempo (h). Sendo que, foi acrescentado à equação a condição: para  $T \geq 30$  °C,  $T = 30$  °C.

No segundo perfil de temperatura, incubou-se as placas na temperatura inicial de 30 °C, diminuindo gradativamente (cerca de 1,27 °C a cada 24 h) até atingir a temperatura de 10 °C, permanecendo nesta temperatura até que o crescimento atingisse toda a placa.

O perfil de temperatura nestas condições foi obtido através da Equação 4.4.4.

$$T(t) = 30 - 0,0531.t \quad (4.4.4)$$

onde:  $T$  é a temperatura em °C;  $t$  é o tempo (h). Foi acrescentado à equação a condição: para  $T \leq 10$  °C,  $T = 10$  °C.

Estes perfis de temperatura foram escolhidos para verificar se há influência no crescimento dos fungos quando a incubação inicia a temperaturas mais baixas.

Na terceira condição estudada, as placas permaneceram incubadas na temperatura de 20 °C por 24 h, em seguida ficaram a 10 °C

por mais 24 h e assim sucessivamente, até que a colônia atingisse toda a placa. O perfil de temperatura nestas condições foi obtido através da Equação 4.4.5.

$$T(t) = 15 + 5.\text{sen}\left(1,3 + \left(\frac{\pi.t}{23,6}\right)\right) \quad (4.4.5)$$

onde:  $T$  é a temperatura em °C;  $t$  é o tempo (h).

A equação foi acrescida da condição: para  $T > 15$  °C,  $T=20$  °C e quando  $T \leq 15$  °C,  $T=10$  °C. Com estas condições, as temperaturas ficaram dentro do perfil estudado (10-20 °C). Este perfil de temperatura simula a quebra da cadeia de frio.

No quarto perfil de temperatura estudado, as placas foram incubadas à temperatura de 20 °C por 170 h e posteriormente a 30 °C até o crescimento do fungo atingir toda a placa (aproximadamente 180 h). O perfil de temperatura nestas condições foi obtido através das condições: se  $t \leq 170$  min,  $T=20$  °C; se  $t > 170$  min,  $T=30$  °C. Neste perfil de temperatura é realizada a simulação de situações a que os sucos são submetidos durante o armazenamento ou transporte.

Em todos os perfis de temperatura, as colônias de *B. fulva* e *N. fischeri* foram retiradas inteiras, ainda contendo uma pequena porção de suco de maçã solidificado que ficava aderido às mesmas, quando atingiram os tamanhos de aproximadamente 30, 60, 90, 120 e 150 mm ao longo do tempo, depois procedeu-se a extração para quantificação do ergosterol.

As equações para obtenção da predição dos perfis não isotérmico foram obtidas utilizando-se o programa Matlab 7.10, tanto para o diâmetro da colônia quanto para o conteúdo do ergosterol. Estas equações foram resolvidas numericamente com auxílio do *software* Matlab 7.10, utilizando-se o procedimento ODE (função ode23). As curvas de crescimento preditas pelo modelo foram validadas com as curvas de crescimento obtidas experimentalmente.

A temperatura, durante todos os ensaios foi monitorada e registrada a cada 10 minutos por registradores de dados eletrônico (*data loggers*) (Testo 174, Lenzkirch, Alemanha). Gougoli et al. (2010), ao estudarem o crescimento dos fungos *P. expansum* e *A. niger* em condições de temperatura dinâmicas, monitoraram a temperatura da incubadora e das placas contendo ágar, utilizando sensores internos e externos durante experiências não isotérmicas, e não observaram diferenças significativas entre a temperatura da incubadora e a

temperatura do meio de crescimento de todos os perfis testados. Devido a isto, nos presentes experimentos, apenas a temperatura da incubadora foi monitorada.

## 2.5 Análise Estatística

Os índices estatísticos utilizados para comparar a capacidade de ajuste dos modelos de crescimento, bem como a capacidade preditiva do modelo não isotérmico foram: coeficiente de determinação ( $R^2$ ), a raiz do erro médio quadrado (RMSE), fator bias e fator de exatidão (Sutherland et al., 1994, Ross, 1996).

O coeficiente de correlação também chamado de coeficiente de determinação ou simplesmente  $R^2$  é uma medida da proporção da variação explicada pela equação de regressão em relação à variação total das respostas.

Os cálculos do RMSE, fator bias e fator exatidão foram realizados através das equações descritas na Tabela 4.4.1 (Sutherland et al., 1994; Ross, 1996).

Tabela 4.4.1 Índices estatísticos para validação dos modelos.

Índice Estatístico	Equação
RMSE	$\text{RMSE} = \sqrt{\frac{\sum (\text{Valor}_{\text{observado}} - \text{Valor}_{\text{predito}})^2}{n - p}}$
Fator bias	$\text{fator bias} = 10^{\left(\frac{\sum \log(\text{Valor}_{\text{predito}} / \text{Valor}_{\text{observado}})}{n}\right)}$
Fator exatidão	$\text{fator exatidão} = 10^{\left(\frac{\sum  \log(\text{Valor}_{\text{predito}} / \text{Valor}_{\text{observado}}) }{n}\right)}$

onde  $n$  é o número de dados experimentais e  $p$  é o número de parâmetros do modelo.

## 3. Resultados e discussão

### 3.1 Modelo Não Isotérmico Para Predição do Crescimento Avaliado Pela Medida do Diâmetro da Colônia

A partir dos ajustes de modelos primários e secundários para avaliar o crescimento pela medida do diâmetro da colônia (apresentados no Artigo 3), associados às equações dos perfis de temperatura foi possível estabelecer uma equação para o modelo não isotérmico para



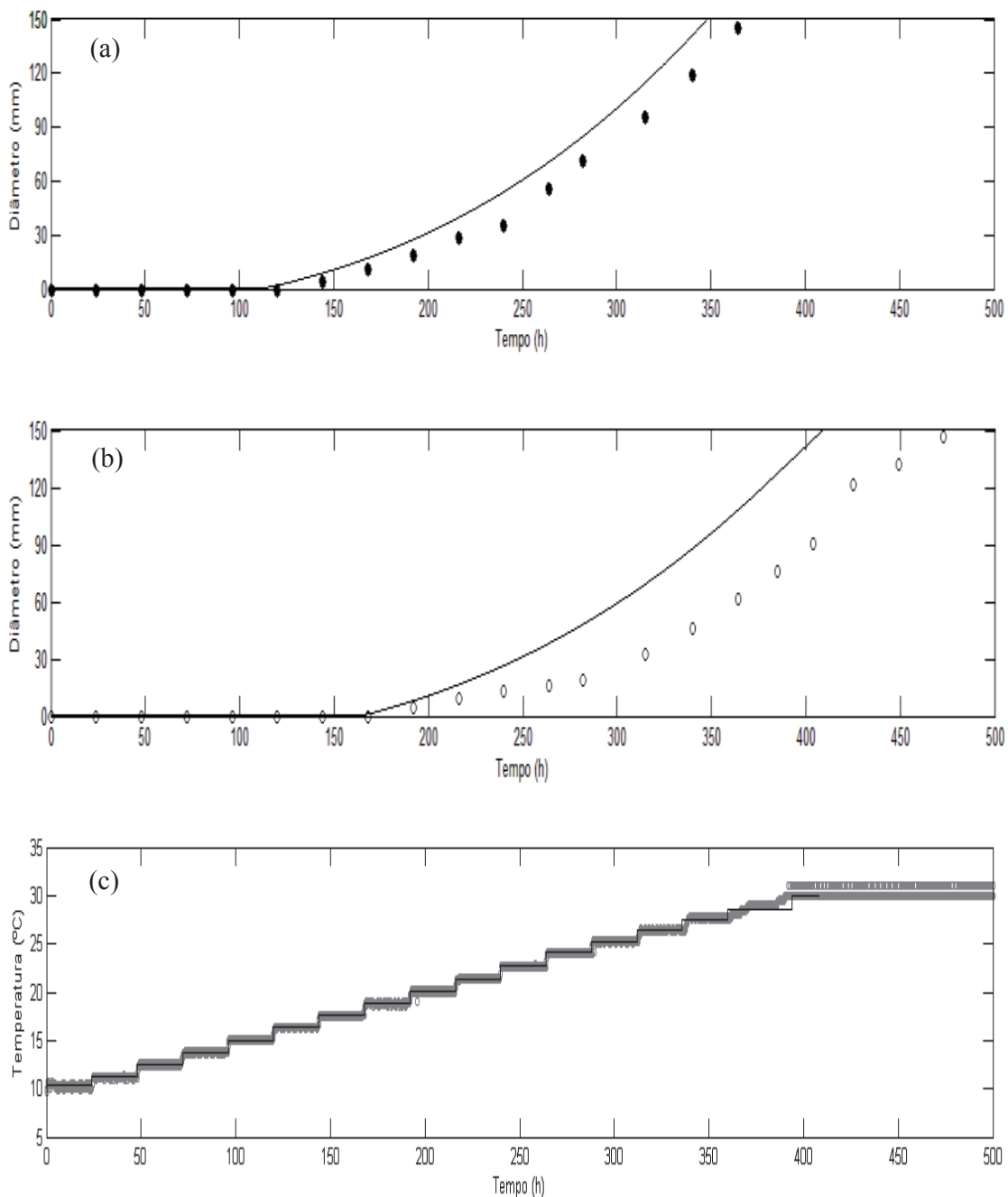
predizer o comportamento de *B. fulva* e *N. fischeri*, dentro da faixa de temperatura estudada (10 °C a 30 °C).

As Figuras 4.4.1, 4.4.2, 4.4.3 e 4.4.4 mostram as curvas de crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri* preditas pela equação do modelo não isotérmico, respectivamente, para cada um dos quatro perfis de temperatura estudados. Nas Figuras (a) e (b), as linhas contínuas representam as curvas não isotérmicas preditas (Equação 4.4.2), o perfil de temperatura estudado é apresentado na Figura (c), em que as linhas representam o ajuste do modelo do perfil de temperatura  $T(t)$  aos dados experimentais de temperatura e tempo, obtidos pelos registradores de dados (*data loggers*) e na Figura (d) são apresentados os gráficos dos resíduos.

Após a predição do crescimento dos fungos a diferentes perfis de temperatura, os experimentos não isotérmicos foram realizados para validação do modelo e os dados experimentais estão também representados nas Figuras 4.4.1, 4.4.2, 4.4.3 e 4.4.4.



Figura 4.4.1 Curvas de crescimento experimentais e previstas, sob condições não isotérmicas avaliadas pela medida do diâmetro da colônia com perfil de temperatura de 10-30 °C. As linhas (-) são as previsões do modelo não isotérmico e os símbolos são dados experimentais de (a) *B. fulva* (●) e (b) *N. fischeri* (○), (c) perfil de temperatura T (t), (d) resíduos.



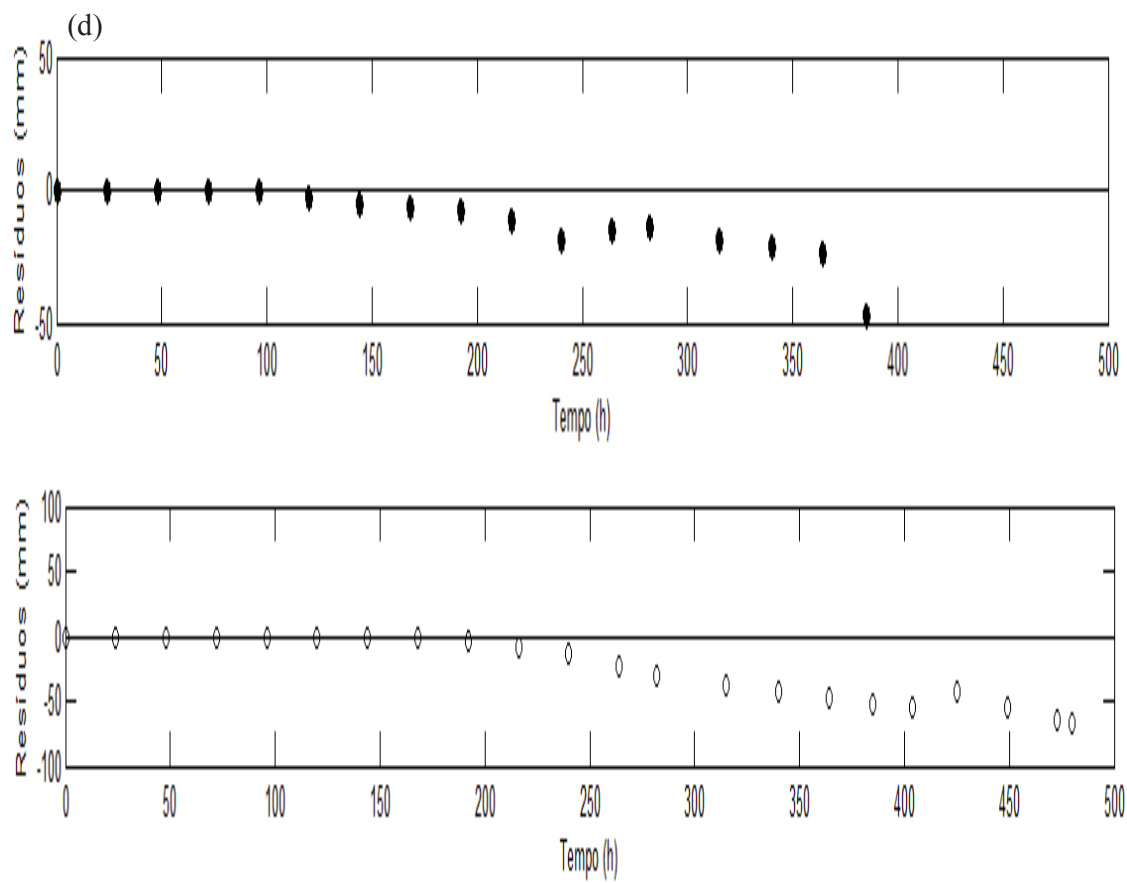
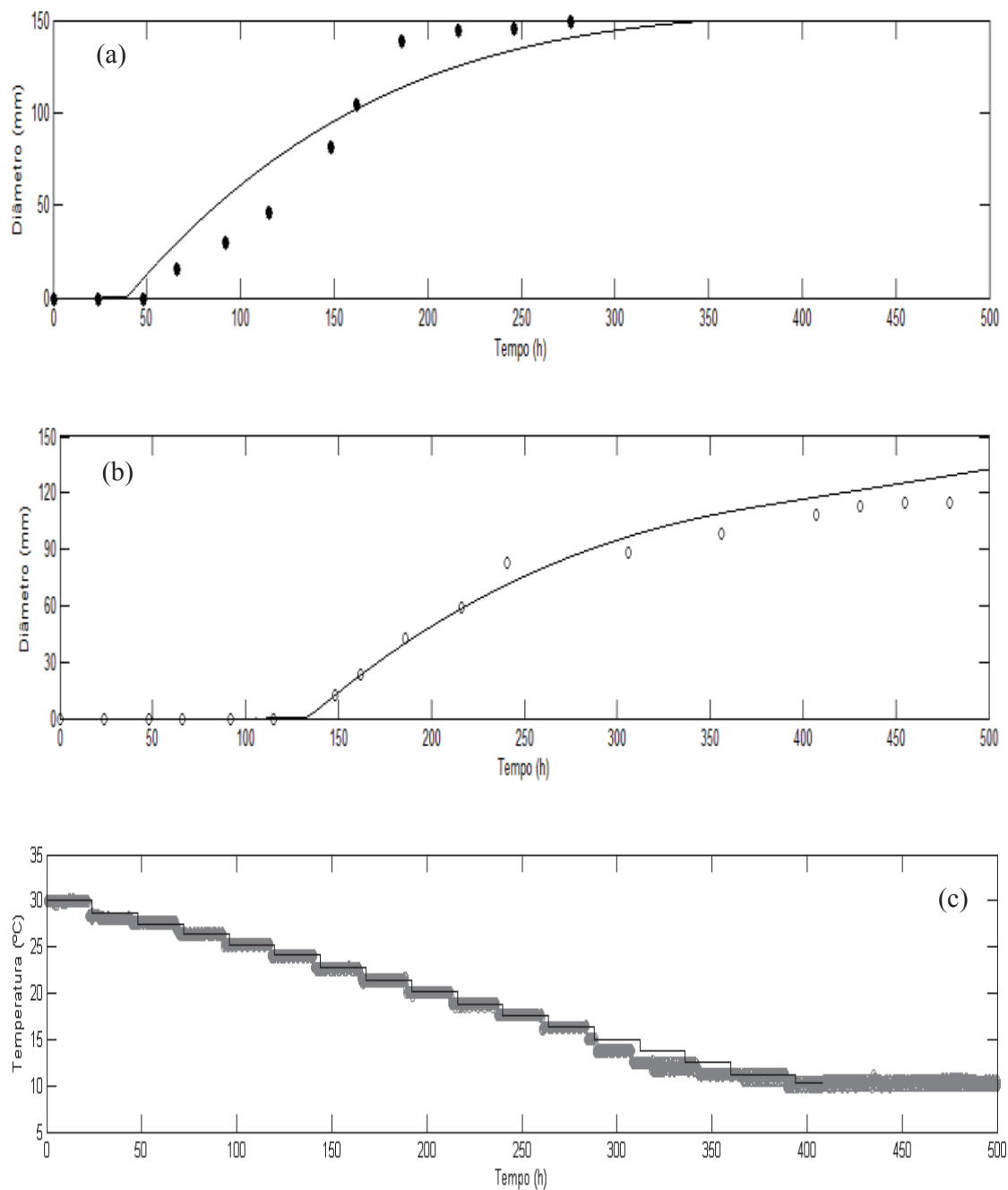


Figura 4.4.2 Curvas de crescimento experimentais e previstas, sob condições não isotérmicas avaliadas pela medida do diâmetro da colônia com perfil de temperatura de 30-10 °C. As linhas (-) são as previsões do modelo não isotérmico e os símbolos são dados experimentais de (a) *B. fulva* (●) e (b) *N. fischeri* (○), (c) perfil de temperatura T (t), (d) resíduos.



(d)

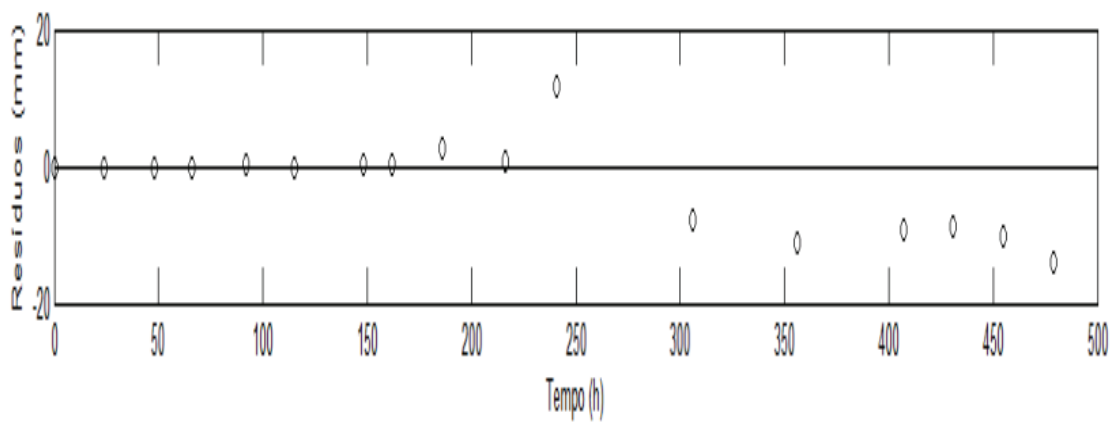
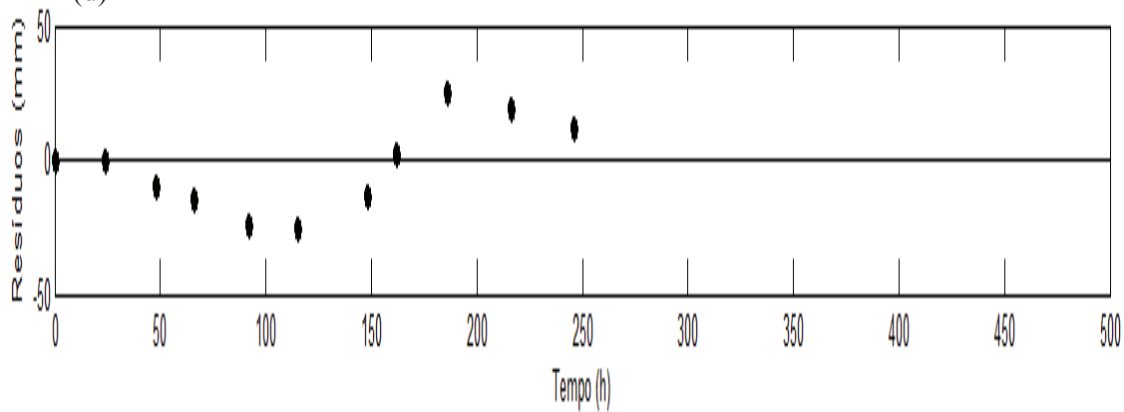
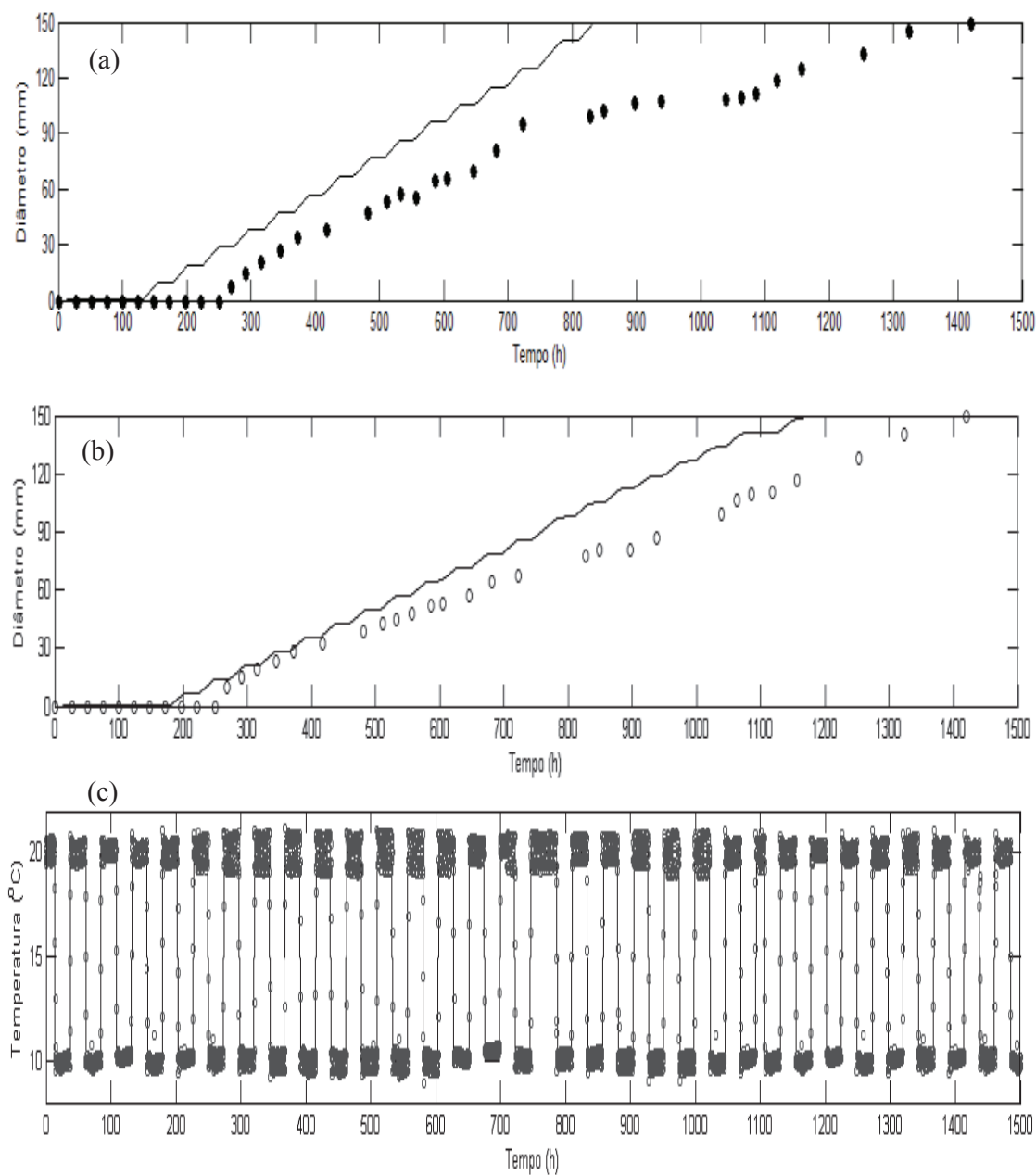


Figura 4.4.3 Curvas de crescimento experimentais e previstas, sob condições não isotérmicas avaliadas pela medida do diâmetro da colônia com perfil de temperatura de 20-10 °C. As linhas (-) são as previsões do modelo não isotérmico e os símbolos são dados experimentais de (a) *B. fulva* (●) e (b) *N. fischeri* (○), (c) perfil de temperatura T (t), (d) resíduos.



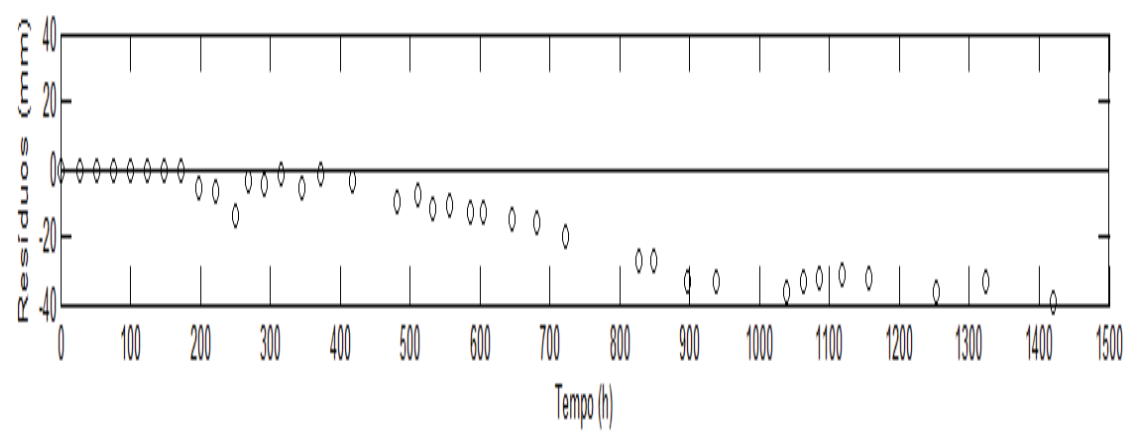
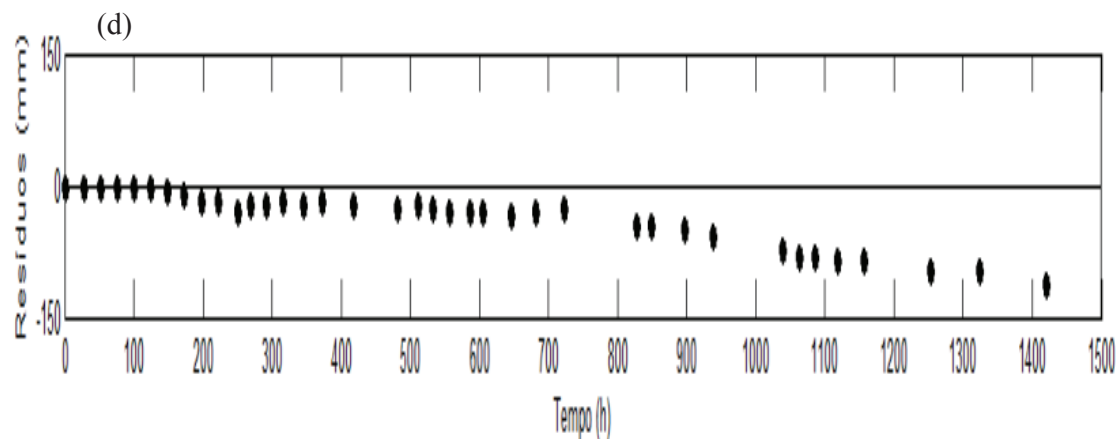
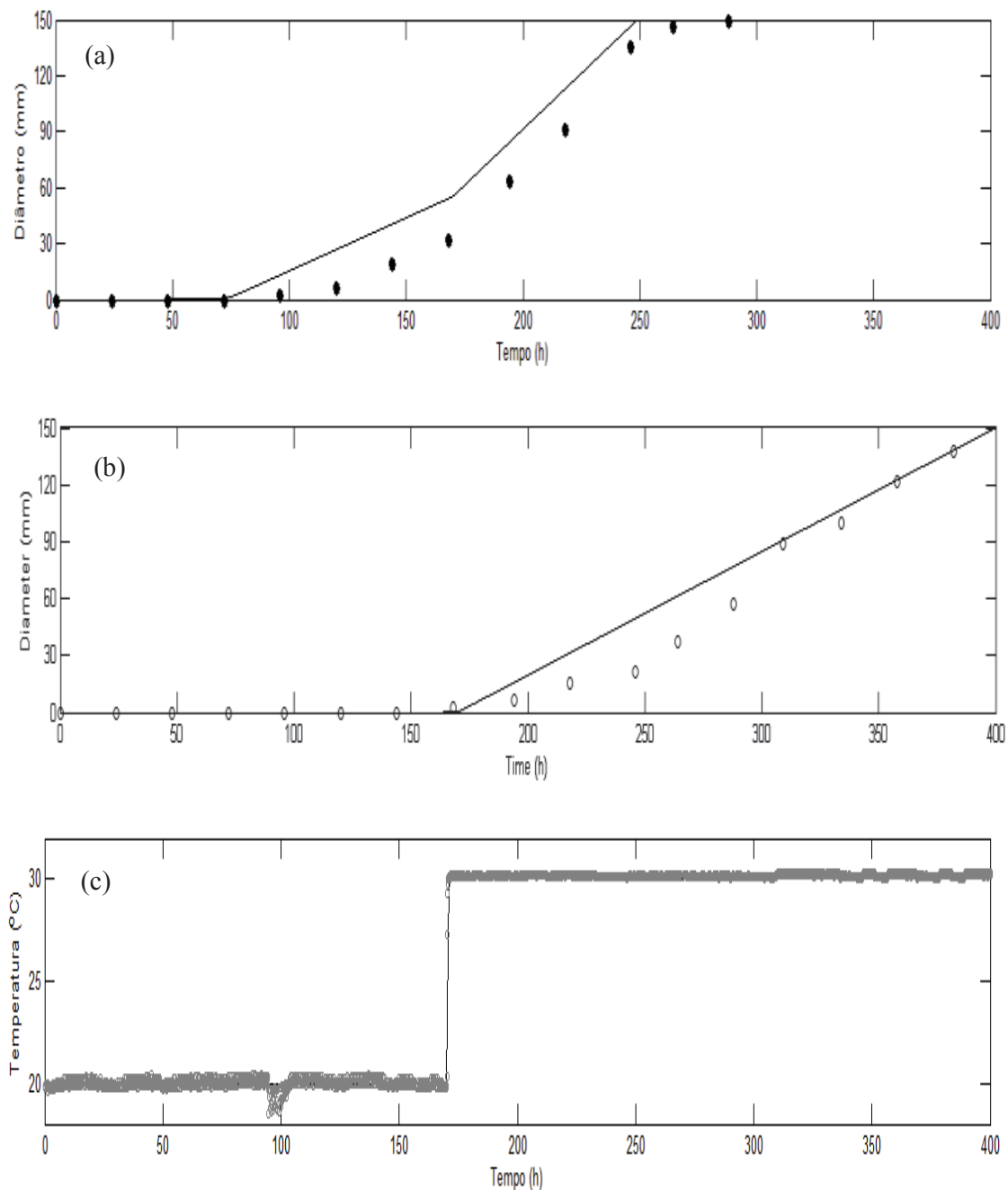
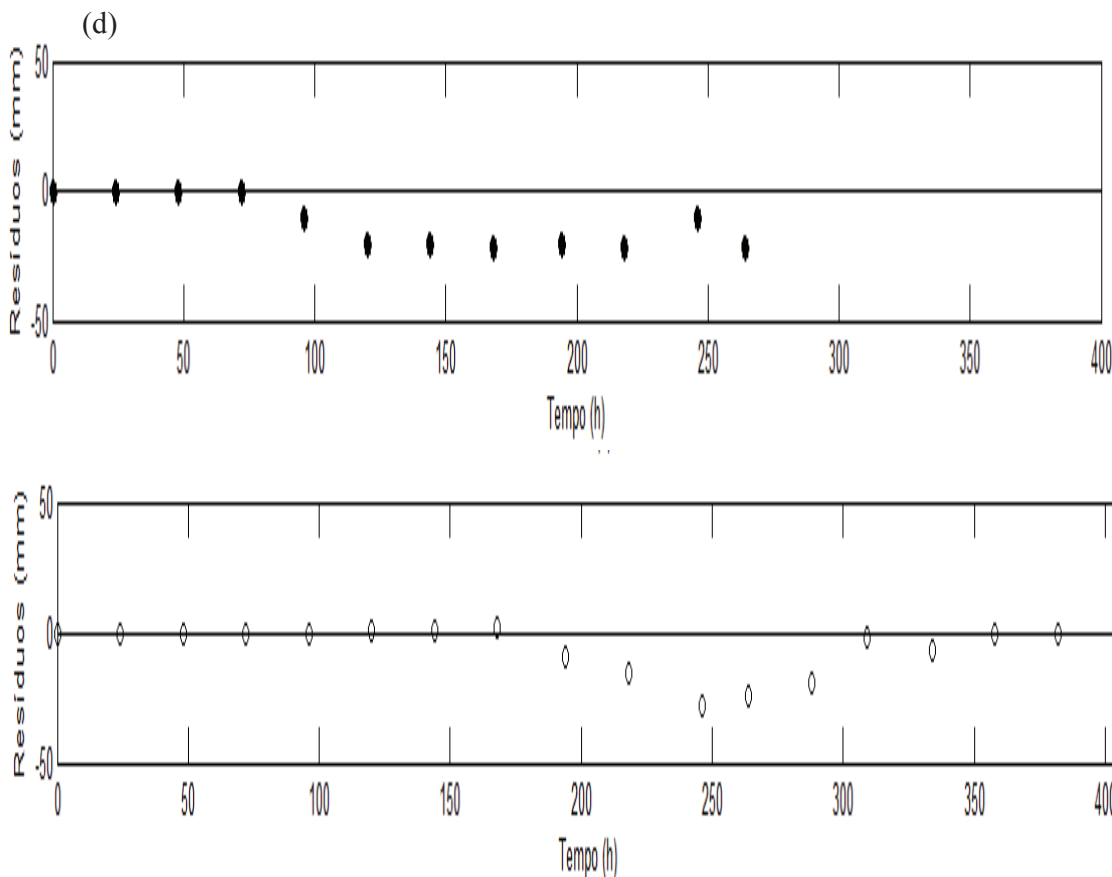


Figura 4.4.4 Curvas de crescimento experimentais e previstas, sob condições não isotérmicas avaliadas pela medida do diâmetro da colônia com perfil de temperatura de 20-30 °C. As linhas (-) são as previsões do modelo não isotérmico e os símbolos são dados experimentais de (a) *B. fulva* (●) e (b) *N. fischeri* (○), (c) perfil de temperatura T (t), (d) resíduos.







Após a predição do crescimento dos fungos a diferentes perfis de temperatura, os experimentos não isotérmicos foram realizados para validação do modelo e os dados experimentais estão também representados nas Figuras 4.4.1, 4.4.2, 4.4.3 e 4.4.4.

A predição do crescimento nas condições não isotérmicas estudadas representou bem o crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri*, em todos os perfis de temperatura estudados. Somente na condição de temperatura variando de 30 para 10 °C com *B. fulva* é que os dados experimentais ficaram levemente acima da curva predita. As demais predições foram no lado de falha seguro, ou seja, a predição de crescimento é maior que o crescimento real, e a tendência de crescimento foi descrita pelo modelo de forma satisfatória.

Pode-se verificar, analisando as Figuras 4.4.1, 4.4.2, 4.4.3 e 4.4.4 que, quando ocorrem variações mais acentuadas de temperatura, há uma maior dificuldade na predição de crescimento. No perfil em que a temperatura varia de 20 a 10 °C, a cada 24 horas (Figura 4.4.3), observa-se que a predição foi superestimada. Isto pode ocorrer pela dificuldade dos microrganismos de se adaptarem às mudanças bruscas de temperatura, o que não está previsto no modelo.

Comparando-se o perfil onde a temperatura aumenta gradativamente de 10 °C para 30 °C (Figura 4.4.1) com o perfil onde ocorre a diminuição gradativa da temperatura de 30 °C para 10 °C (Figura 4.4.2) observa-se que uma melhor predição foi obtida para o segundo perfil. Neste perfil, os microrganismos iniciam o crescimento próximo a uma faixa ótima de temperatura. Quando a temperatura fica mais baixa, o crescimento já está próximo da fase estacionária. No caso do perfil que inicia com temperaturas mais baixas, a dificuldade maior na predição pode ser devido à dificuldade do *B. fulva* e *N. fischeri* se adaptarem a estas condições de temperatura.

A Tabela 4.4.2 mostra a comparação entre os valores preditos pelo modelo não isotérmico e os dados observados experimentalmente, utilizando os índices estatísticos  $R^2$ , RMSE, fator bias e fator exatidão. A análise é realizada para os quatro perfis de temperatura mostrados nas Figuras 4.4.1, 4.4.2, 4.4.3 e 4.4.4.

Tabela 4.4.2 Índices estatísticos para a medida do diâmetro da colônia de *B. fulva* e *N. fischeri* para os diferentes perfis de temperatura.

	Perfis de Temperatura	Índices Estatísticos			
		$R^2$	RMSE	Bias	Exatidão
<i>B. fulva</i>	10-30 °C	0,987	8,885	0,779	1,287
	30-10 °C	0,942	17,889	1,132	1,231
	20-10 °C	0,974	48,573	1,413	1,413
	20-30 °C	0,974	10,289	0,943	1,312
<i>N. fischeri</i>	10-30 °C	0,984	36,064	1,443	1,443
	30-10 °C	0,989	11,424	1,045	1,071
	20-10 °C	0,994	20,506	1,181	1,181
	20-30 °C	0,971	11,638	1,206	1,206

Os valores do índice estatístico  $R^2$  foram superiores a 0,94, em todas as situações estudadas. Os valores de RMSE, fatores bias e exatidão indicaram que o modelo avaliado fornece boa predição do

crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri* nas condições não isotérmicas testadas. O mesmo pode ser confirmado pelos gráficos de resíduos.

De acordo com Corradini e Peleg (2005), a qualidade das estimativas do modelo não isotérmico depende da qualidade dos dados do crescimento isotérmicos originais e isso depende do número de temperaturas examinadas e dos intervalos entre essas temperaturas. Estes autores afirmam que, se os modelos secundários descrevem bem a dependência dos parâmetros de crescimento em relação à temperatura, o modelo não isotérmico é capaz de prever o desenvolvimento microbiano com bastante precisão.

Silva et al. (2013) estudaram os efeitos da velocidade da corrente do ar de refrigeração e a temperatura inicial do produto sobre o tempo necessário para deterioração da polpa de papaia por *Byssochlamys fulva*. Estes autores avaliaram o desempenho de um modelo não isotérmico baseado em Gompertz para prever o comportamento do crescimento de *B. fulva* em condições de flutuação de temperatura, utilizando três perfis de temperatura, variando de 15 a 35 °C e obtiveram resultados satisfatórios da capacidade do modelo para prever o comportamento de crescimento dos fungos quando ocorre mudança suave de temperatura.

Resultados semelhantes também foram relatados em estudo realizado por Gougouli e Koutsoumanis (2010) com *Penicillium expansum* e *Aspergillus niger*. O modelo linear de duas fases utilizado por estes autores também sobrestimou o crescimento destes fungos quando houve flutuação da temperatura. Assim como observado no presente trabalho, estes autores observaram que condições de choque de frio podem induzir uma tensão durante o crescimento de fungos de modo a interferir no comportamento de crescimento, gerando uma dificuldade de predição.

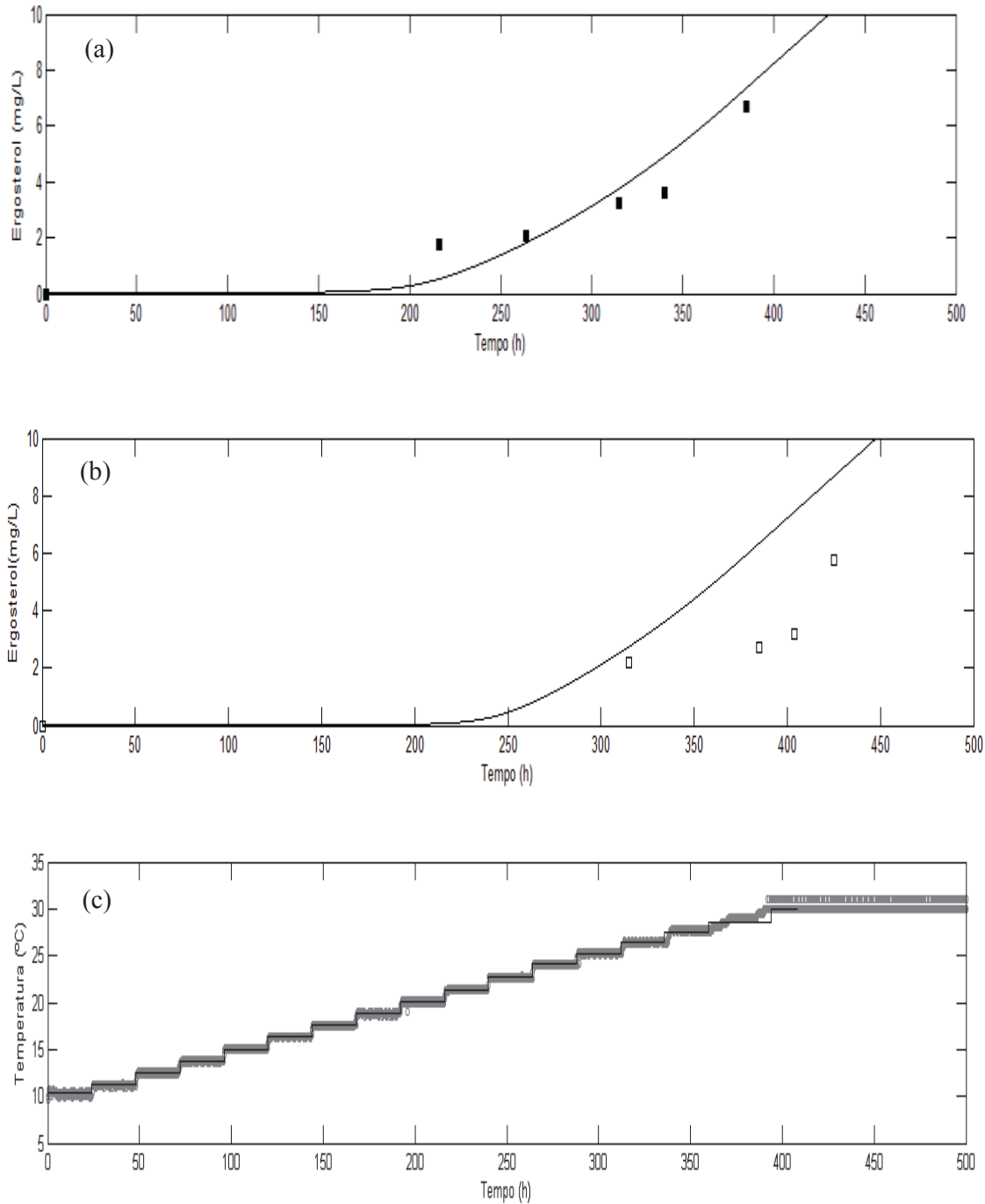
Neste trabalho, as curvas de crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri* foram avaliadas em suco de maçã solidificado. Em alguns casos descritos na literatura, os resultados obtidos em meio de cultura podem ser eficazmente utilizados para compreender o comportamento do microrganismo em produtos alimentares (Gougoli et al., 2010).

### ***3.2 Modelo Não Isotérmico Para Predição do Crescimento Avaliado Pelo Conteúdo do Ergosterol***

Baseando-se nos ajustes dos modelos primários e secundários pela avaliação do crescimento baseado no conteúdo de ergosterol (apresentados no Artigo 3), associados às equações dos perfis de temperatura, foi possível estabelecer uma equação do modelo não isotérmico para prever o comportamento de *B. fulva* e *N. fischeri*, dentro da faixa de temperatura estudada (10 °C a 30 °C).

As Figuras 4.4.5 e 4.4.6 mostram as curvas de crescimento preditas pelo modelo não isotérmico para dois perfis de temperatura e as curvas de crescimento experimentais, baseadas na avaliação do conteúdo de ergosterol, para *B. fulva* e *N. fischeri*, respectivamente. Na parte superior, as linhas representam as curvas não isotérmicas preditas (Equação 4.4.2) e os símbolos representam os dados experimentais, sob condições não isotérmicas. Os perfis de temperatura são apresentados na parte inferior da figura, em que as linhas representam o ajuste do modelo do perfil de temperatura  $T(t)$ , e os símbolos representam os dados experimentais de temperatura e tempo, obtidos pelos registradores de dados (*data loggers*). Os perfis de temperatura apresentados em cada uma das figuras foram representados por diferentes equações, onde cada experimento tem sua própria história térmica.

Figura 4.4.5 Curvas de crescimento experimentais e previstas, sob condições não isotérmicas avaliadas pela medida do conteúdo de ergosterol com perfil de temperatura de 10-30 °C. As linhas (-) são as previsões do modelo não isotérmico e os símbolos são dados experimentais de (a) *B. fulva* (■) e (b) *N. fischeri* (□), (c) perfil de temperatura T (t).



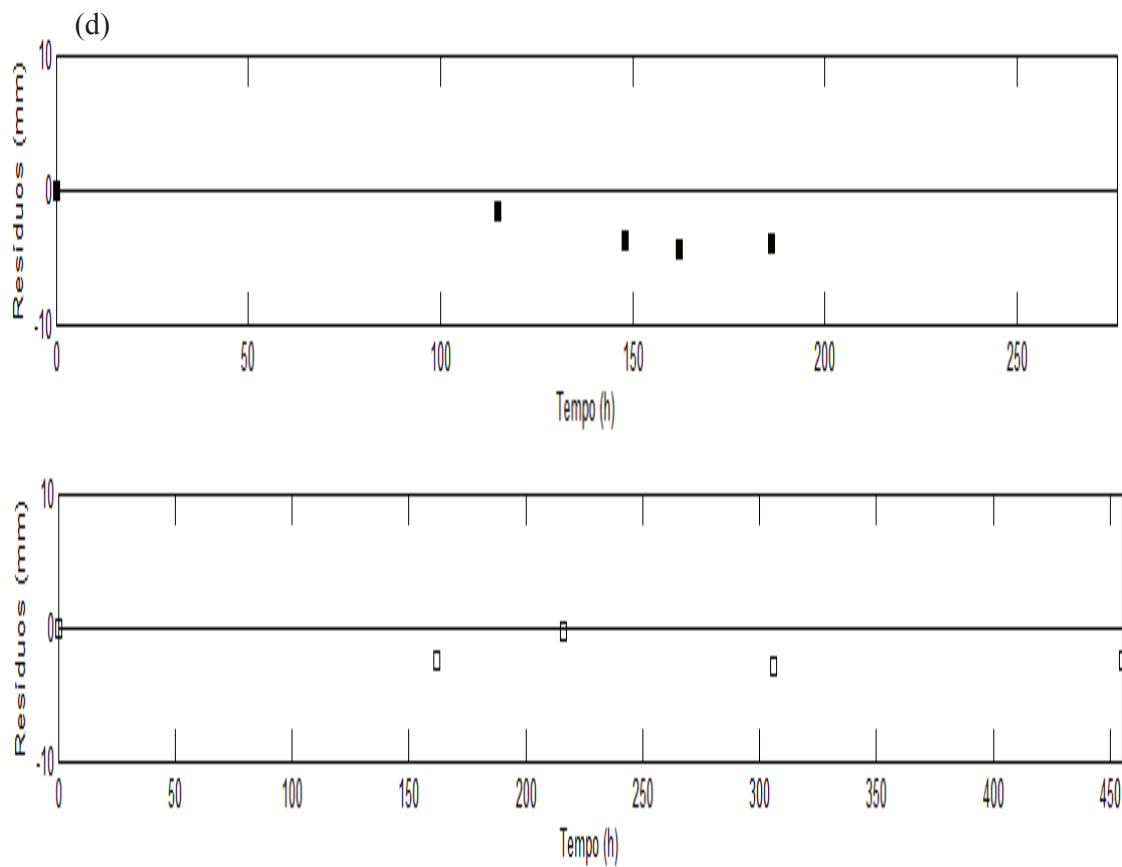
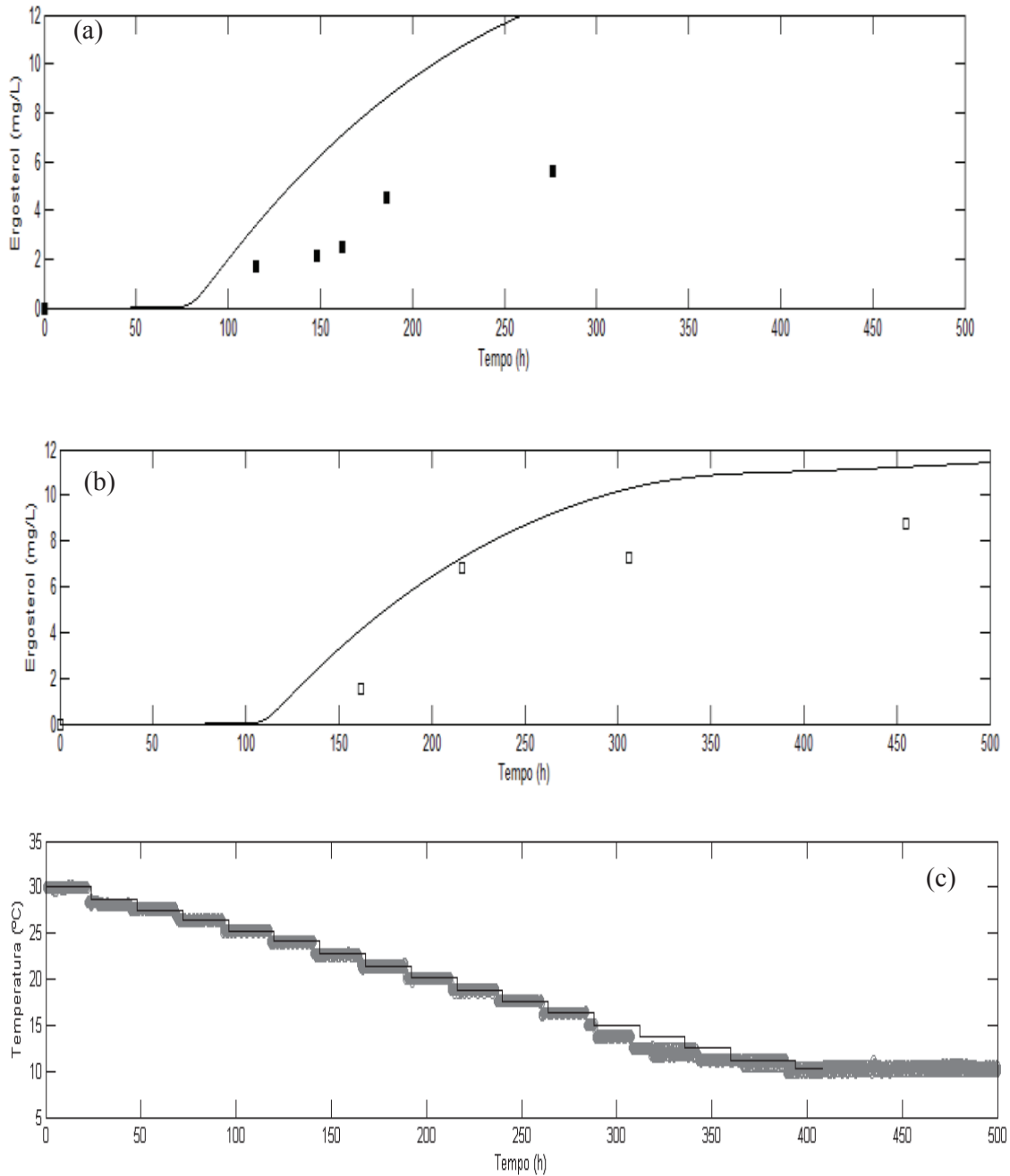
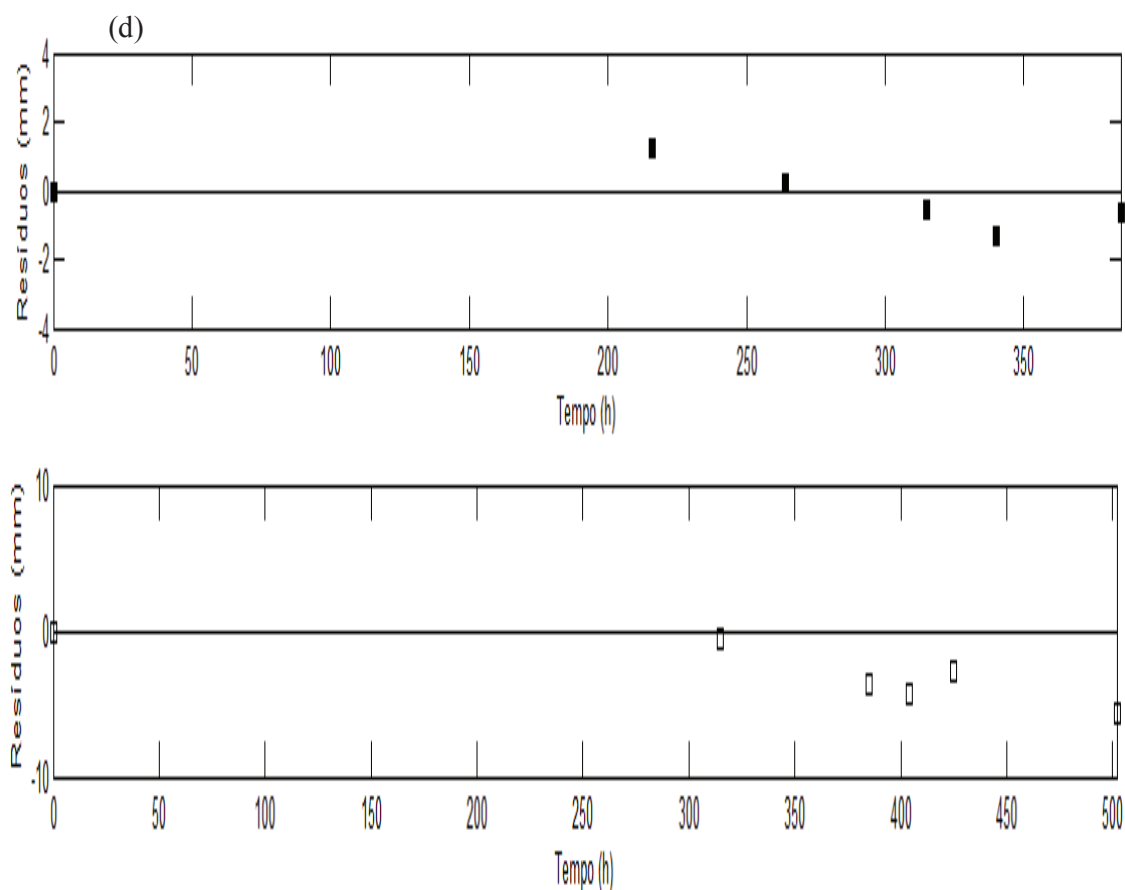


Figura 4.4.6 Curvas de crescimento experimentais e previstas, sob condições não isotérmicas avaliadas pela medida do conteúdo de ergosterol com perfil de temperatura de perfil 30-10 °C. As linhas (-) são as previsões do modelo não isotérmico e os símbolos são dados experimentais de (a) *B. fulva* (■) e (b) *N. fischeri* (□), (c) perfil de temperatura T (t).





Nas Figuras 4.4.5 e 4.4.6 são apresentadas as predições de crescimento em condições não isotérmicas pelo modelo não isotérmico de Baranyi e Roberts Simplificado para o conteúdo de ergosterol, onde se pode observar uma capacidade preditiva relevante do modelo para de *B. fulva* e *N. fischeri*, nos dois perfis de temperatura estudados.

Apesar dos mesmos perfis de temperatura terem sido utilizados para predição do crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri* pela medida do diâmetro da colônia e para o conteúdo de ergosterol, a predição para o conteúdo de ergosterol não ocorreu de forma tão satisfatória quanto para a medida do diâmetro da colônia.

Os perfis de temperatura estudados para o conteúdo de ergosterol apresentaram predições do crescimento próximas aos dados experimentais, sendo validados pelos índices estatísticos  $R^2$ , RMSE, fatores bias e exatidão apresentados na Tabela 4.4.3 e pelos gráficos de resíduos, obtidos para os dois fungos avaliados. A análise é realizada para os dois perfis de temperatura mostrados nas Figuras 4.4.5 e 4.4.6.



Tabela 4.4.3 Índices estatísticos para o conteúdo de ergosterol de *B. fulva* e *N. fischeri* para os diferentes perfis de temperatura.

	Temperatura Perfis	Índices Estatísticos			
		R <sup>2</sup>	RMSE	Bias	Exatidão
<i>B. fulva</i>	10-30 °C	0,930	0,997	0,973	1,373
	30-10 °C	0,828	2,858	1,341	1,341
<i>N. fischeri</i>	10-30 °C	0,916	4,227	1,613	1,613
	30-10 °C	0,926	2,708	1,391	1,391

É importante ressaltar que não foram encontrados relatos de estudos que utilizam o conteúdo de ergosterol como medida para quantificação de contaminação fúngica, em condições não isotérmicas.

#### 4. Conclusões

A partir do modelo primário de Baranyi e Roberts simplificado e dos modelos secundários, modelo de raiz quadrada para  $\mu_{\max}$  e equação de potência para  $\lambda$ , foi estabelecido um modelo matemático não isotérmico que foi validado, para prever o crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri* em suco de maçã solidificado, tanto para o crescimento avaliado pela medida do diâmetro da colônia quanto para o crescimento fúngico avaliado pelo conteúdo de ergosterol

Os resultados indicam que as respostas microbianas às variações bruscas de temperatura são de difícil predição, onde a incorporação dos complexos mecanismos de adaptação microbiana aos modelos preditivos é um desafio a ser enfrentado pelos pesquisadores.

O modelo não isotérmico proposto neste estudo pode ser útil para prever o crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri*, na faixa estudada.

## Referências

BARANYI, J., ROBERTS, T.A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 277-294.

BRUL, S., MENSONIDES, F.I.C., HELLINGWERF, K.J., MATTOS, M.J.T. (2008). Microbial systems biology: new frontiers open to predictive microbiology. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 16-21.

CORRADINI, M.; PELEG, M. (2005). Estimating non-isothermal bacterial growth in foods from isothermal experimental data. *Journal of Applied Microbiology*, v. 99, n. 1, p. 187-200.

DALCANTON, F. (2010). Modelagem matemática do crescimento de bactérias ácido lácticas em condições isotérmicas e não isotérmicas. Florianópolis, p.190.

DEVLIEGHERE, F., GEERAERD, A.H., VERSYCK, K.J., BERNAERT, H., VAN IMPE, J.F., DEBEVERE, J.(2000). Shelf life of modified atmosphere packed cooked meat products: addition of Na-lactate as a fourth shelf life determinative factor in a model and product validation. *International Journal of Food Microbiology*, 58, 93–106.

GIANNUZZI, L., PINOTTI, A., ZARITZKY, N. (1998). Mathematical modeling of microbial growth in packaged refrigerated beef at different temperature. *International Journal of Food Microbiology*, v.39, p.101-110.

GIANNAKOUROU, M. C., KOUTSOUMANIS, K., NYCHAS, G. J. E., TAOUKIS, P. S. (2005). Field evaluation of the application of time temperature integrators for monitoring fish quality in the chill chain. *International Journal of Food Microbiology*, 102:323-336.

GOSPAVIC, R., KREYENSHIMIDT, J., BRUCKNER, S., POPOV, V., HAQUE, N. (2008) Mathematical modeling for predicting the growth of *Pseudomonas* spp. in poultry under variable temperature conditions. *International Journal of Food Microbiology*, v.127, p.290-297.

GOUGOULI, M., ANGELIDIS, A. S., KOUTSOUMANIS, K. (2008). A study on the kinetic behavior of *Listeria monocytogenes* in ice cream stored under static and dynamic chilling and freezing conditions. *Journal of Dairy Science* 91, 523–530.

GOUGOULI, M.; KOUTSOUMANIS, K. (2010). Modelling growth of *Penicillium expansum* and *Aspergillus niger* at constant and fluctuating temperature conditions. *International Journal of Food Microbiology*, v. 140, n. 2-3, p. 254-262.

HUANG, L. (2003). Estimation of growth of *Clostridium perfringens* in cooked beef under fluctuating temperature conditions. *Food Microbiology*, v. 20, p. 549-559.

KOUTSOUMANIS, K. (2001). Predictive modeling of the shelf life of fish under non-isothermal conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 4, p. 1821-1829.

KOUTSOUMANIS, K., A. STAMATIOU, P. SKANDAMIS, G.J. (2006). Development of the microbial model for the combined effect of temperature and pH on spoilage of ground meat, and validation of the model under dynamic temperature conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 124-134.

LAGUERRE, O., DERENS, E., PALAGOS, B. (2002). Study of domestic refrigerator temperature and analysis of factors affecting temperature: a French survey. *International Journal of Refrigeration* 25, 653–659.

LONGHI, D. A. (2012) Avaliação da capacidade preditiva de diferentes modelos matemáticos para o crescimento microbiano em condições não-isotérmicas. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis.

MATARAGAS, M., DROSINOS, E. H., VAIDANIS, A., METAXOPOULOS, I. (2006). Development of a predictive model for spoilage of cooked cured meat products and its validation under constant and dynamic temperature storage conditions. *Journal of Food Science*, v.71, p.157-167.

McMEEKIN, T. A., BARANYI, J., BOWMAN, J., DALGAARD, P., KIRK, M., ROSS, T.; SCHMID, S., ZWIETERING, M. H. (2006). Information systems in food safety management. *International Journal of Food Microbiology*, v.112, p.181–194.

MELLEFONT, L. A., ROSS, T. (2003). The effect of abrupt shifts in temperature on the lag phase duration of *Escherichia coli* and *Klebsiella oxytoca*. *International Journal of Food Microbiology*, 83, 295-305.

PELEG, M. Advanced Quantitative Microbiology for Foods and Biosystems. Models for Predicting Growth and Inactivation. CRS Series in Contemporary Food Science. Taylor & Francis Group. New York, USA, 2006.

ROSS, T. (1996). Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *Journal of Applied Bacteriology*, v.81, p.501-508.

SALOMÃO, B. C. M.; MASSAGUER, P. R.; ARAGÃO, G. M. F (2008). Isolamento e seleção de fungos filamentosos termorresistentes do processo produtivo de néctar de maçã. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28, 116-121.

SALOMÃO, B. C. M. Isolamento, identificação e estudo da resistência térmica de fungos filamentosos termorresistentes em produtos de frutas. (2002). Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis

SANT'ANA, A. S., ROSENTHAL, A., MASSAGUER, P.R. (2009). Heat resistance and effects of continuous pasteurization on the inactivation of *Byssochlamys fulva* ascospores in clarified apple juice. *Journal of Applied Microbiology* 107, 197–209.

SILVA, P. R. S., MARCZAK, L. D. F., TESSARO, I. C. (2013). Integrating a kinetic microbial model with a heat transfer model to predict *B. fulva* growth in refrigerated papaya pulp. *Journal of Food Engineering*. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.04.014>

SMITH-SIMPSON, S., CORRADINI, M. G., NORMAND, M. D., PELEG, M., SCHAFFNER, D. W.(2007). Estimating microbial growth

parameters from non-isothermal data: A case study with *Clostridium perfringens*. *International Journal of Food Microbiology*, v.118, p.294-303.

SUTHERLAND, J. P., BAYLISS, A. J., ROBERTS, T.A. (1994). Predictive modeling of growth of *Staphylococcus aureus*: the effects of temperature, pH and sodium chloride. *International Journal of Food Microbiology*, v.21 (3), p.217-236.

VAN IMPE, J.F., BART, M.N., SCHELLEKENS, M.; MARTENS, T., BAERDEMAEKER, J.A. (1995). Predictive microbiology in a dynamic environment: a system theory approach. *International Journal of Food Microbiology*, v.25, p.227-249.

VELUGOTI, P. R., BOHRA, L.K., JUNEJA, V. K., HUANG, L., WESSELING, A. L., SUBBIAH, J., THIPPAREDDI, H. (2010). Dynamic model for predicting growth of *Salmonella* spp. in ground sterile pork. *Food Microbiology in press*, p.1-8.

ZWIETERING, M. H., JONGEBURGER, I., ROMBOUTS, F. M., RIET, K. V. (1990). Modeling of bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, v.56, p.1875-1881.

ZWIETERING, M. H.; DE WIT, J.C.; CUPPERS, H.G.A.M.; VAN'T RIET, K., (1994). Modeling of bacterial-growth with shifts in temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 60, n. 1, p. 204-213.

#### 4.4.2 Informações Complementares

Para que os perfis de temperatura propostos sejam melhor compreendidos e visualizados, as curvas não isotérmicas são apresentadas no mesmo gráfico que as curvas de crescimento isotérmicas referentes ao intervalo de temperatura dos perfis estudados.

Figura 4.4.7 Curvas de crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri* sob condições isotérmicas e não isotérmicas. As linhas (-) são as previsões dos modelos e os símbolos são dados experimentais de (a) *B. fulva* (\*) e (b) *N. fischeri* (x), (c) perfil de temperatura T (t) na condição 20-10 °C. Onde 10 °C (▲) e 20 °C (●).

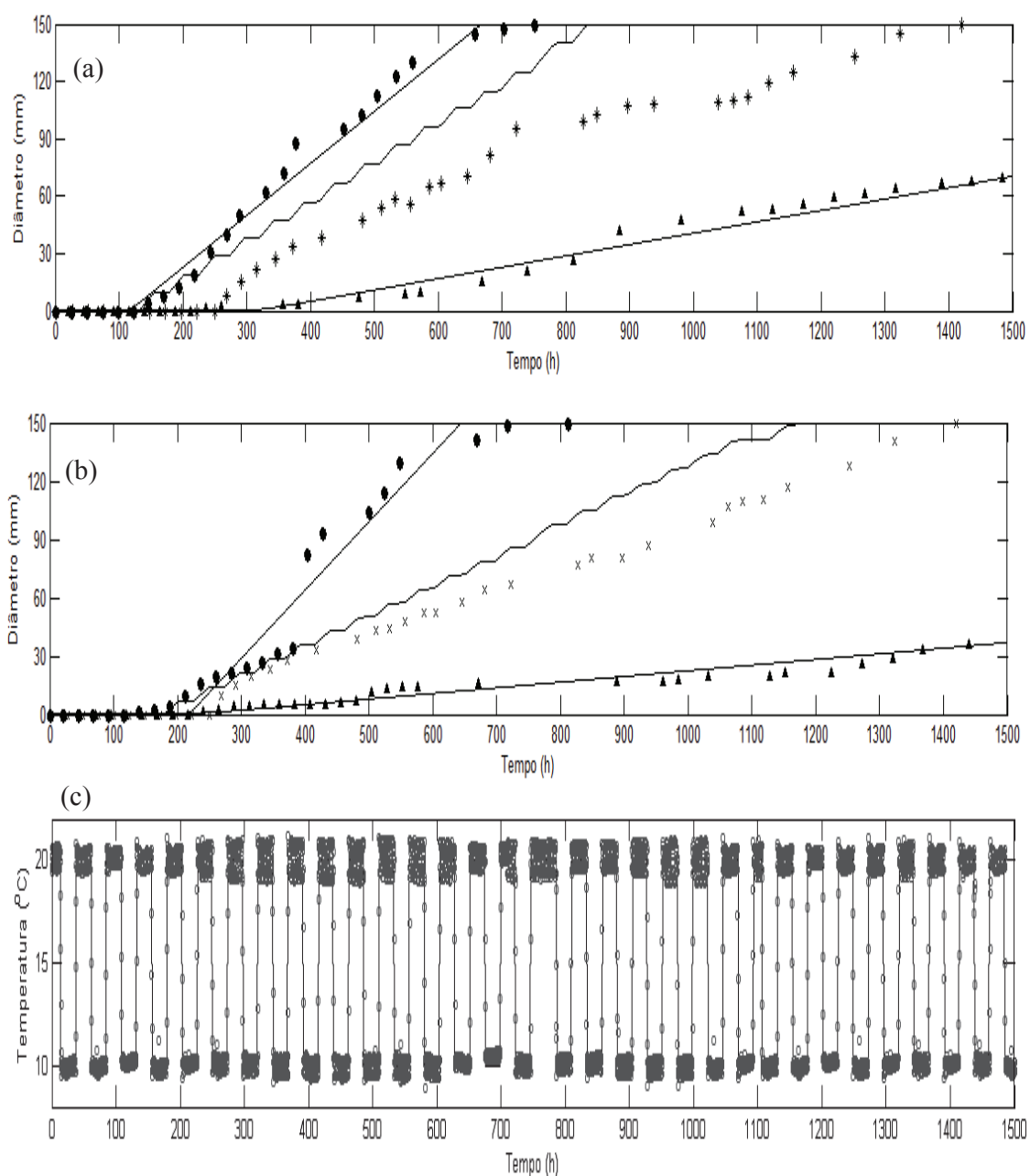


Figura 4.4.8 Curvas de crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri* sob condições isotérmicas e não isotérmicas. As linhas (-) são as previsões dos modelos e os símbolos são dados experimentais de (a) *B. fulva* (\*) e (b) *N. fischeri* (×), (c) perfil de temperatura T (t) na condição 20-30 °C. Onde 20 °C (●) e 30 °C (○).

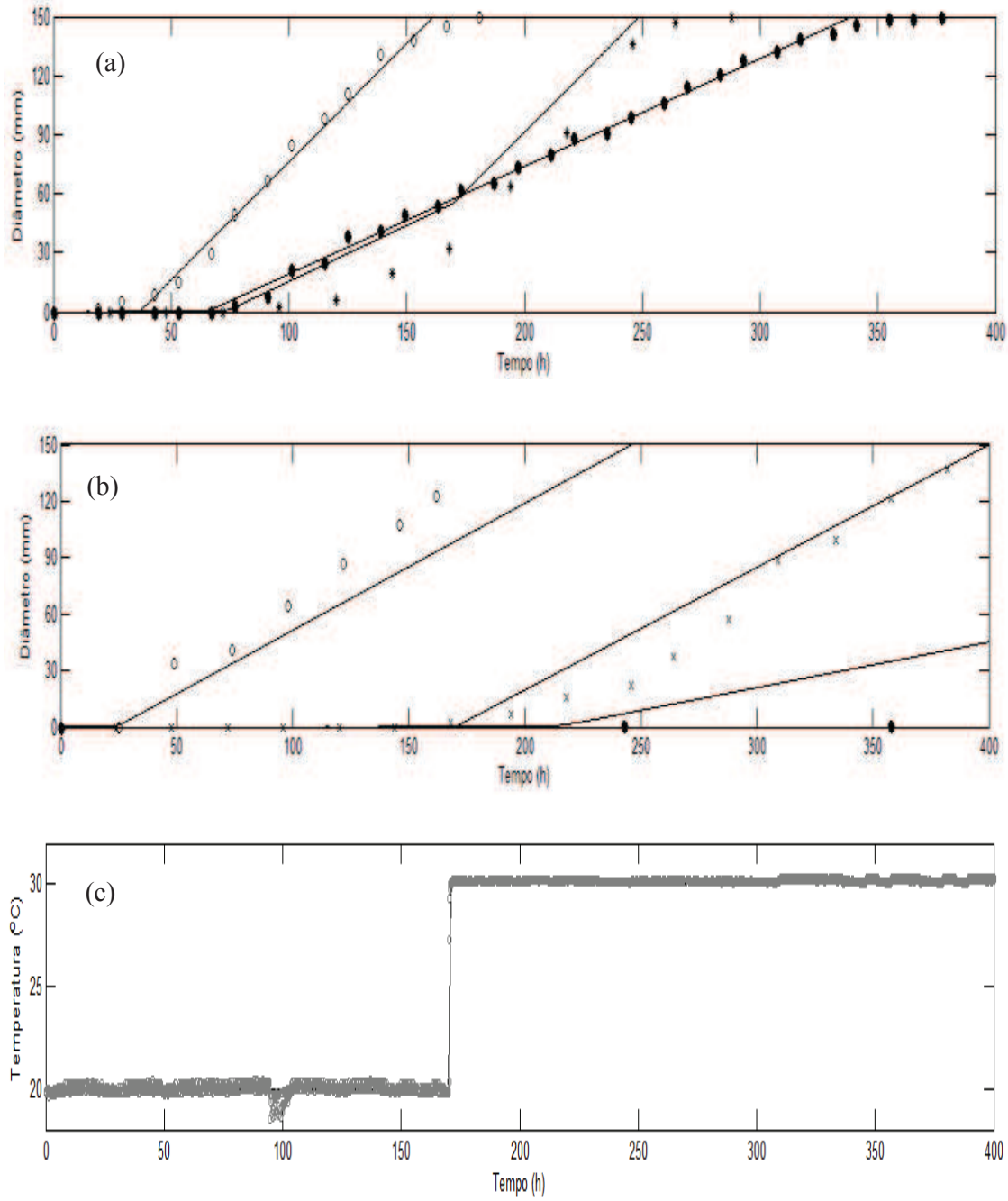




Figura 4.4.9 Curvas de crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri* sob condições isotérmicas e não isotérmicas. As linhas (-) são as previsões dos modelos e os símbolos são dados experimentais de (a) *B. fulva* (\*) e (b) *N. fischeri* (×), (c) perfil de temperatura T (t) na condição 10-30 °C. Onde 10 °C (▲) e 30 °C (○).

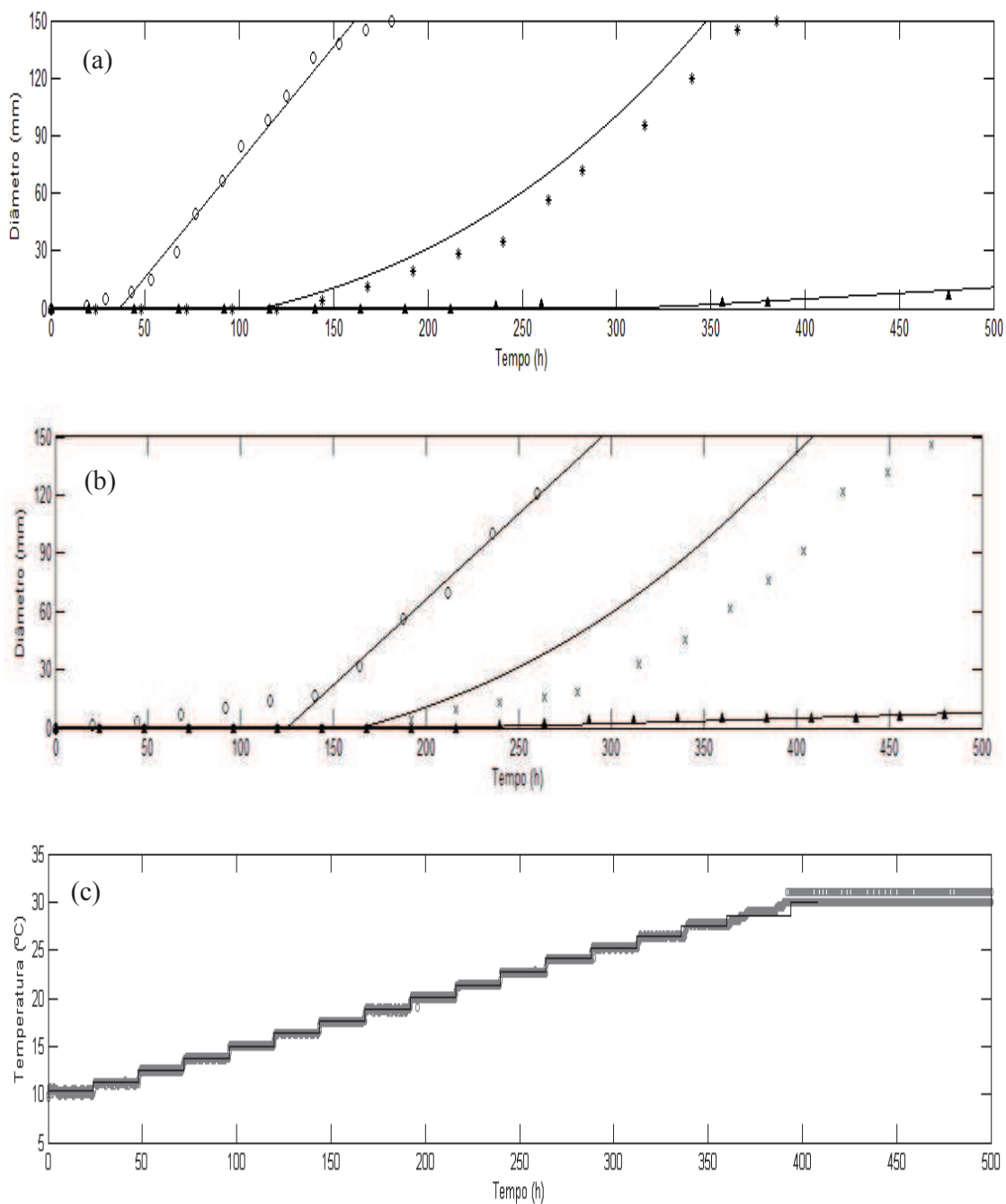
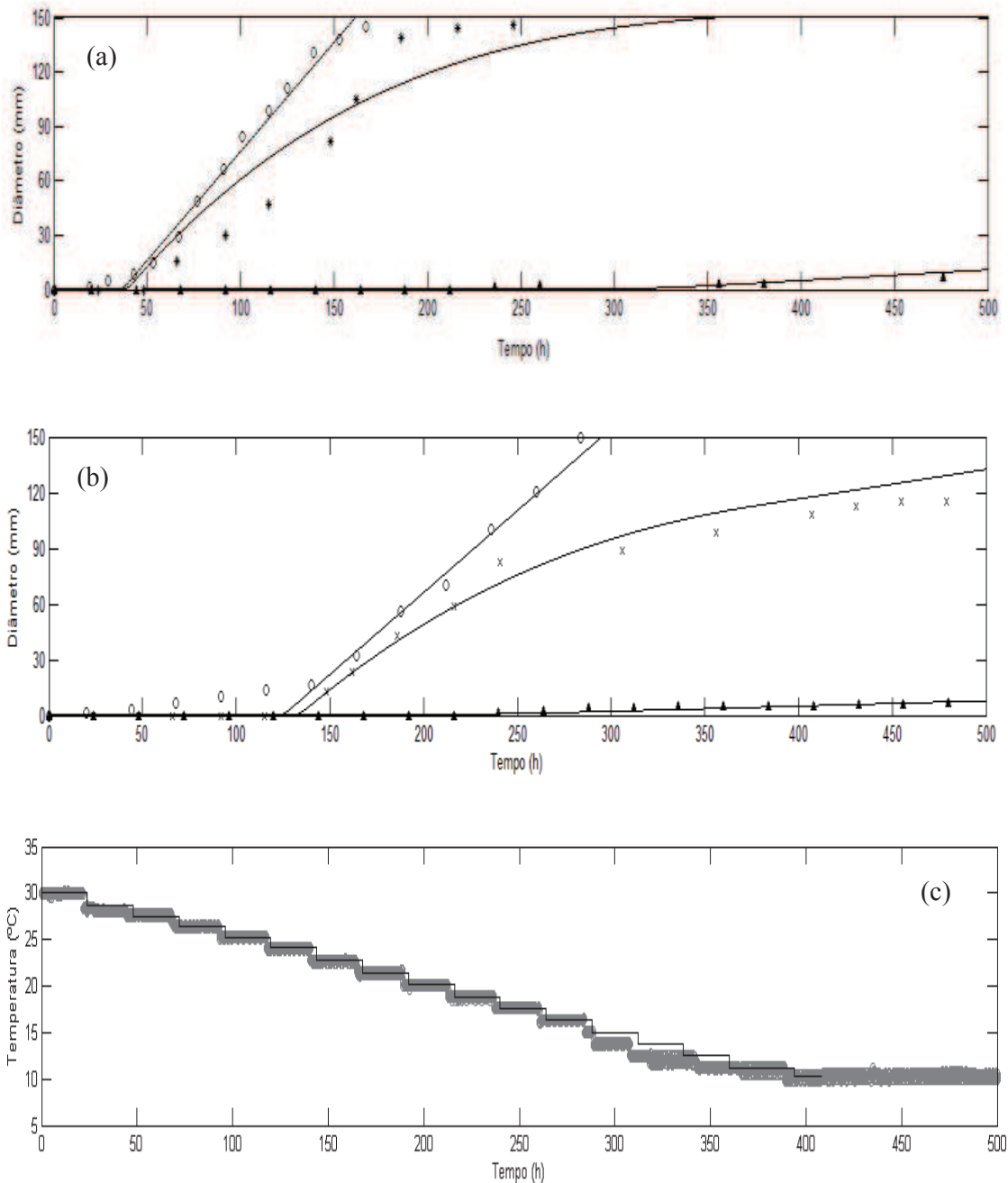




Figura 4.4.10 Curvas de crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri* sob condições isotérmicas e não isotérmicas. As linhas (-) são as previsões dos modelos e os símbolos são dados experimentais de (a) *B. fulva* (\*) e (b) *N. fischeri* (×), (c) perfil de temperatura T (t) na condição 30-10 °C. Onde 10 °C (▲) e 30 °C (○).



Pelas Figuras 4.4.7, 4.4.8, 4.4.9 e 4.4.10 é possível visualizar que as curvas de crescimento não isotérmicas estão localizadas entre as curvas isotérmicas para cada perfil. Estes resultados estão de acordo com a literatura, onde as simulações de crescimento sob variação de temperatura estão dentro dos limites isotérmicos utilizados para o estabelecimento do modelo não isotérmico

## CAPÍTULO 5

### 5. CONCLUSÕES

A partir dos estudos da influência da temperatura (10, 15, 20, 25 e 30 °C) e da concentração de sólidos solúveis (12, 20, 25, 35, 45, 55 e 70 °Brix), no crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri* em suco de maçã solidificado, sob condições isotérmicas, foi possível estabelecer um Modelo Global que incluiu o efeito da temperatura e da concentração de sólidos solúveis no crescimento destes fungos. O modelo Global obtido pode prever melhor o crescimento de *B. fulva* do que de *N. fischeri*, dentro da faixa estudada. *N. fischeri* apresenta colônias com bordas menos uniformes do que o *B. fulva*, o que pode ter levado à menor capacidade preditiva do modelo secundário, influenciando diretamente a capacidade preditiva do Modelo Global para este fungo.

Como a maioria das curvas de crescimento obtidas não apresentou fase estacionária devido à limitação do tamanho da placa, o modelo de Baranyi e Roberts simplificado (sem considerar a fase estacionária de crescimento) foi o que melhor se ajustou às curvas de crescimento nas diferentes condições testadas de temperatura e teor de sólidos solúveis. Foi possível obter modelos secundários que descreveram bem a influência da temperatura e do teor de sólidos solúveis sobre os parâmetros de crescimento ( $\lambda$  e  $\mu_{\max}$ ) de *B. fulva* e *N. fischeri* em suco de maçã solidificado.

O modelo de Baranyi e Roberts simplificado se ajustou bem às curvas de crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri* quando foi utilizada a medida do crescimento radial das colônias e também a evolução do conteúdo de ergosterol. Obteve-se uma correlação linear ao se comparar os parâmetros de crescimento pela medida do diâmetro da colônia e conteúdo de ergosterol. Portanto, este trabalho pode trazer uma contribuição notável para a indústria de processamento de sucos, visto que o método de medida do crescimento radial é difícil de ser aplicado a substratos alimentares reais e o conteúdo de ergosterol descreveu com sucesso a quantificação de contaminação por fungos em suco de maçã solidificado.

A partir do modelo primário de Baranyi e Roberts simplificado e dos modelos secundários, foi estabelecido um modelo matemático não

isotérmico e validado para prever o crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri* em suco de maçã solidificado. O modelo não isotérmico de Baranyi Roberts simplificado pode prever bem o crescimento de *B. fulva* e *N. fischeri* sob diferentes perfis de temperatura, quando o crescimento destes fungos foi avaliado tanto pela medida do diâmetro da colônia quanto pela evolução do conteúdo de ergosterol. Como os fungos *B. fulva* e *N. fischeri* são os principais responsáveis pela deterioração de suco de maçã, esses modelos podem ser aplicados para o estabelecimento da vida útil de sucos. É importante ressaltar que o crescimento de fungos considerando a flutuação de temperatura é pouco estudado e não foram encontrados relatos de estudos que utilizam o conteúdo de ergosterol como medida para quantificação de contaminação fúngica, em condições não isotérmicas.

A presença de fungos termorresistentes, que sobrevivem aos processos térmicos, combinado com uma temperatura de estocagem que favoreça o seu desenvolvimento, causam uma drástica diminuição na vida útil dos sucos. Portanto, este trabalho pode trazer inúmeras contribuições para a indústria processadora de sucos, uma vez que, a partir dos dados obtidos, podem ser estabelecidas condições que evitam o crescimento de microrganismos incidentes em suco de maçã.

## CAPÍTULO 6

### 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACNIELSEN DO BRASIL. **TecnoBebidas 2006**. Disponível em: [http://br.acnielsen.com/events/documents/TECNOBEBIDAS\\_2006.pdf](http://br.acnielsen.com/events/documents/TECNOBEBIDAS_2006.pdf)  
Acesso em: 21 jun. 2011.

ANTWI, M.; THEYS, T.E.; BERNAERTS, K.; VAN IMPE, J.F.; GEERAERD, A.H. Validation of a model for growth of *Lactococcus lactis* and *Listeria innocua* in a structured gel system: Effect of monopotassium phosphate. **International Journal of Food Microbiology**, v.125, p.320–329, 2008.

BAERT, K.; VALERO, A.; DE MEULENAER, B.; SAMAPUNDO, S.; AHMED, M.M., LI, B.; DEBEVERE, J.; DEVLIEGHERE, F. Modelling the effect of temperature on the growth rate and lag phase of *Penicillium expansum* in apples. **International Journal of Food Microbiology**, v.118, p.139-150, 2007.

BAGLIONI, F. **Estudo da ocorrência de fungos filamentosos termoresistentes em polpa de tomate envasada assepticamente**. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1998.

BAHÇEÇI, K.S.; ACAR, J. Modeling the combined effects of pH, temperature and ascorbic acid concentration on the heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, n. 3, p. 266-273, 2007.

BARANYI, J.; ROBERTS, T.A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. **International Journal of Food Microbiology**, v.23, p.277-294, 1994.

BARANYI, J.; ROBINSON, T.A.; KALOTI, A.; MACKEY, B.M. Predicting growth of *Brochothrix thermosphacta* at changing temperature. **Food Microbiology**, v. 27, p.61–75, 1995.

BARANYI, J.; GIBSON, A.M.; PITT, J.I.; EYLES, M.J.; ROBERTS, T.A. Predictive models as means of measuring the relatedness of some *Aspergillus* species. **Food Microbiology**, v.14, p.347-351, 1996.

BELLARA, S.R.; McFARLANE, C.M.; THOMAS, C.R.; FRYER, P.J. The growth of *Escherichia coli* in a food simulant during conduction cooling: combining engineering and microbiological modelling. **Chemical Engineering Science**, v.55, p.6085-6095, 2000.

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

BOEKEL VAN, M.A.J.S.; ZWIETERING, M.H. Experimental design, data processing and model fitting in predictive microbiology. **Modelling the Microorganisms in Food**, p.22-43, 2007.

BORZANI, W.; AQUARONE, E.; SCHMIDELL, W. **Biotechnologia Industrial**: Engenharia Bioquímica. 1 ed. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, v. 2, 2001.

BRANCATO, F.P.; GOLDING, N.S. The diameter of the mould colony as a reliable measure of growth. **Mycologia**, v.45, p.848-864, 1953.

BRASIL. Instrução Normativa N°1, de 07 de Janeiro de 2000. Aprova regulamento técnico geral para fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Polpa de Fruta. **Diário Oficial da União**, Seção 1, p.54, 2000.

BRDE - BANCO REGIONAL DE DESENVOLVIMENTO DO EXTREMO SUL. Cadeia Produtiva da Maçã no Brasil: Limitações e Potencialidades. **Cadeia Produtiva Maçã**, 2011.

BRUL, S.; MENSONIDES, F.I.C.; HELLINGWERF, K.J.; MATTOS, M.J.T. Microbial systems biology: New frontiers open to predictive microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v.128, p.16-21, 2008.

BUCHANAN, R. L. Developing and distributing user-friendly application software. **Journal of Industrial Microbiology**, v.12, p.251-255, 1993.

BUCHANAN, R.L., WHITING, R.C., DAMERT, W.C. When is simple good enough: A comparison of the Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves. **Food Microbiology**, v.14, p.313-326, 1997.

CARRASCO, E.; GARCÍA-GIMENO, R.; SESELOVSKY, R.; VALERO, A.; PÉREZ, F.; ZURERA-COSANO, G.; TODD, E. Predictive model of *Listeria monocytogenes* growth rate under different temperatures and acids. **Food Science and Technology International**, v.12, p.47-56, 2006.

CARVALHO, J. C. **Desenvolvimento de bioprocesso para a produção de pigmentos a partir de *Monascus* por fermentação em substrato sólido**. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

CAYRÉ, M.E.; VIGNOLO, G.; GARRO, O. Modeling lactic acid bacteria growth in vacuum-packaged cooked meat emulsion stored at three temperatures. **Food Microbiology**, v.20, p.561-566, 2003.

CEPA. Centro de Socioeconomia e Planejamento Agrícola. **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina, 2011-2012**. Disponível em: <[http://cepa.epagri.sc.gov.br:8080/cepa/Publicacoes/sintese\\_2011/maca.pdf](http://cepa.epagri.sc.gov.br:8080/cepa/Publicacoes/sintese_2011/maca.pdf)> Acesso em: 05 fev. 2013.

CHAPMAN, B.; WINLEY, E.; FONG, A.S.W.; HOCKING, A.D.; STEWART, C.M.; BUCKLE, K.A. Ascospore inactivation and germination by high pressure processing is affected by ascospore age. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.8, p.531-534, 2007.

CHOWDHURY, B.R., CHAKRABORTY, R., CHAUDHURI, U.R. Validity of modified Gompertz and Logistic models in predicting cell growth of *Pediococcus acidilactici* H during the production of bacteriocin pediocin AcH. **Journal of Food Engineering**, v.80(4), p.1171-1175, 2007.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION – CODEX. **Codex General Standard for Fruit Juices and Nectars**. Codex Stan 247, p.1-15, 2005.

CORRADINI, M.G.; PELEG, M. Estimating non-isothermal bacterial growth in foods from isothermal experiments data. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 187-200, 2005.

CORRADINI, M.G., AMÉZQUITA, A., NORMAND, M.D., PELEG, M. Modeling and predicting non-isothermal microbial growth using general purpose software. **International Journal of Food Microbiology**, v.106, p.223-228, 2006.

CUNHA, V.A.B. **Estudo experimental e modelagem do crescimento de fungos filamentosos termorresistentes em sucos tropicais**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 134p, 2003.

CUPPERS, H.G.A.M.; OOMES, S.; BRUL, S. A model for the combined effects of temperature and salt concentration on growth rate of food spoilage molds. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.3764-3769, 1997.

DALCANTON, F. **Modelagem matemática do crescimento de bactérias ácido lácticas em condições isotérmicas e não isotérmicas**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

DANTIGNY, P.; GUILMART, A.; BENSOUSSAN, M. Basis of predictive mycology. **International Journal of Food Microbiology**, v.100, p.187–196, 2005.

DANTIGNY, P., **Predictive mycology**. In: McKellar, R.C., Lu, X. (Eds.), *Modelling Microbial Responses in Food*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 313–320, 2004.

DANTIGNY, P.; BENSOUSSAN, M.; VASSEUR, V.; LEBRIHI, A.; BUCHET, C.; ISMAILI-ALAOUI, M.; DEVLIEGHIERE, F.; ROUSSOS, S., Standardisation of methods for assessing mould germination: a workshop report. **International Journal of Food Microbiology**, v.108, p.286–291, 2006.



DAVEY, K. Applicability of the davey (linear arrhenius) predictive model to the lag phase of microbial-growth. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 70, p. 253-257, 1991.

DERLINDEN, E. V., MERTENS L., VAN IMPE , J. F. The impact of experiment design on the parameter estimation of cardinal parameter models in predictive microbiology. **Food Control**, v. 29, p. 300-308, 2013.

DEVLIEGHERE, F., GEERAERD, A.H., VERSYCK, K.J., BERNAERT, H., VAN IMPE, J.F., DEBEVERE, J. Shelf life of modified atmosphere packed cooked meat products: addition of Na-lactate as a fourth shelf life determinative factor in a model and product validation. **International Journal of Food Microbiology**, v.58, p.93–106, 2000.

DHINGRA, O.D., JHAM, G.N., RODRIGUES, F.A., SILVA, G.J., COSTA, M.L.N. Fumigation with essential oil of mustard retards fungal growth and accumulation of ergosterol and free fatty acid in stored shelled groundnuts. **Journal of Stored Products Research**, v. 45, p. 24–31, 2009.

ERKMEN, O. Predictive modelling of *Listeria monocytogenes* inactivation under high pressure carbon dioxide. **Food Science and Technology**, v. 33, p. 514-519, 2000.

FERRAZ, M. L. **Influência de citocinas e células do sistema imune na atividade do inibidor da biossíntese de ergosterol (posaconazol) na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi***. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, Belo Horizonte, 2005.

FREIRE, M.M. **Composição e atividade antifúngica do óleo essencial de hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.)**. Tese (Doutorado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

FIORAVANÇO, J. C.; LAZZAROTTO, J. J. **A cultura da macieira no Brasil: reflexões sobre produção, mercado e fatores determinantes**



**da competitividade futura.** Informações Econômicas, São Paulo, v. 42, n. 4, p. 42-54, jul./ago. 2012.

FORCELINI, C. A.; GOELLNER, C. I.; MAY-DE MIO, L. L. Resistência de fungos a fungicidas. in: Revisão Anual de Patologia de Plantas, 9: **Anais.** p.339-381, 2001.

FU, B.; LABUZA, T. P. Considerations for the Application of Time-Temperature Integrators in Food Distribution. **Journal of Food Distribution Research**, v. 23, p. 9-18, 1992.

FUJIKAWA, H., KAI, A., MOROZUMI, S., A new logistic model for *Escherichia coli* growth at constant and dynamic temperatures. **Food Microbiology**, v.21, p.501-509, 2004.

GARCIA, D., RAMOS, A.J., SANCHIS, V., MARÍN, S. Predicting mycotoxins in foods: a review. **Food Microbiology**, v.26, p.757-769, 2009.

GARCIA, D., RAMOS, A.J., SANCHIS, V., MARÍN, S. Modelling the effect of temperature and water activity in the growth boundaries of *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus parasiticus*. **Food Microbiology**, v.28, p.406-417, 2011.

GARCIA, D., RAMOS, A.J., SANCHIS, V., MARÍN, S. Modeling kinetics of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in maize-based medium and maize grain. **International Journal of Food Microbiology**, v.163, p.182-189, 2013.

GAWRYSIAK-WITULSKA, M.; WAWRZYNIAK, J., RYNIĘCKI, A., PERKOWSKI, J. Relationship of ergosterol content and fungal contamination and assessment of technological quality of malting barley preserved in a metal silo using the near-ambient method. **Journal of Stored Products Research**, v.44, p. 360–365, 2008.

GIANNUZZI, L.; PINOTTI, A.; ZARITZKY, N. Mathematical modeling of microbial growth in packaged refrigerated beef at different temperature. **International Journal of Food Microbiology**, v.39, p. 101-110, 1998.

GIBSON, A. M., BARANYI, J., PITT, J. I., EYLES, M. J., & ROBERTS, T. A. Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. **International Journal of Food Microbiology**, v.23, p.419-431, 1994.

GIBSON, A.M., BRATCHELL, N., ROBERTS, T.A. The effect of sodium chloride and temperature on rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry. **Journal of Applied Bacteriology**, v.62, p.479–490, 1987.

GIBSON, A.M.; HOCKING, A.D. Advances in the predictive modeling of fungal growth in food. **Trends in Food Science and Technology**, v.8, p.353-358, 1997.

GIFFEL, M.C., ZWIETERING, M.H. Validation of predictive models describing the growth of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v.46, p.135–149, 1999.

GIL, M.M., BRANDÃO, T.R.S., SILVA, C.L.M. A modified Gompertz model to predict microbial inactivation under time-varying temperature conditions. **Journal of Food Engineering**, v.76, p.89-94, 2006.

GOSPAVIC, R., KREYENSHIMIDT, J., BRUCKNER, S., POPOV, V., HAQUE, N. Mathematical modeling for predicting the growth of *Pseudomonas* spp. in poultry under variable temperature conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.127, p.290-297, 2008.

GOUGOULI, M.; KOUTSOUMANIS, K. Modelling growth of *Penicillium expansum* and *Aspergillus niger* at constant and fluctuating temperature conditions. *International Journal of Food Microbiology*, v. 140, n. 2-3, p. 254-262, 2010. Gougoli et al., 2011

GOUGOULI, M., KOUTSOUMANIS, K.P., Modelling growth of *Penicillium expansum* and *Aspergillus niger* at constant and fluctuating temperature conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.140, p.254–262, 2010.

GOUGOULI, M., KOUTSOUMANIS, K.P. Modeling germination of fungal spores at constant and fluctuating temperature conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.152, p.153–161, 2012.

GOURAMA, H., BULLERMAN, L.B. Relationship between aflatoxin production and mold growth as measured by ergosterol and plate count. **LWT-Food Science and Technology**, v.28, p.185–189, 1995.

HARTOG, B. J., NOTEMANS, S. The detection and quantification of fungi in food. In: Samson, R. A., van Reenen-Hoekstra, E. S., eds. **Introduction to Food-Borne Fungi**. Baarn, Netherlands: Centraalbureau voor Schimmnelcultures, p. 222-230, 1988.

HOCKING, A. D.; PITT, J. I. Food spoilage fungi. II. Heat Resistant Fungi. **CSIRO Food Research Quarterly**, v. 44, n. 4, p. 73-82, 1984.

HOCKING, A.D.; PITT, J.I. Moulds. In: MOIR, C.J.; ANDREW KABILAFKAS, C.; ARNOLD, G.; COX, B.M.; HOCKING, A.D., JENSON, I. Spoilage of processed foods: causes and diagnosis. **Waterloo DC: Southwood Press Pty**. p.361-381, 2001.

HOIRE, Y.; YAMAZAKI, M. Productive of tremorgenic mycotoxins, fumitremorgins A e B in *Aspergillus fumigattus* and valled species. **Nippon Kingakkai Kaiko**, v.22, p.113-119, 1981.

HUANG, L. Growth kinetics of *Listeria monocytogenes* in broth and beef frankfurters e determination of lag phase duration and exponential growth rate under isothermal conditions. **Journal Food Science**, v.73, p.235-242, 2008.

HUNG, B. H.; YUNG, K. H.; CHANG, S. T. The sterol composition of *Volvariella volvacea* and other edible mushrooms. **Mycologia**, v. 77, p. 959-963, 1985

IBRAF – Instituto Brasileiro de Frutas. Disponível em: [www.ibraf.org.br](http://www.ibraf.org.br) Acesso em: 05 jun. 2011.

IBRAHIM, G.E.; HASSAN, I.M.; ABD-ELRASHID, A.M.; EL-MASSRY, K.F.; EH-GHORAB, A.H.; RAMADAN MANAL, M.; OSMAN, F. Effect of clouding agents on the quality of apple juice during storage. **Food Hydrocolloids**, v.25, p.91-97, 2011.

JUNEJA, V.K., MARKS, H.M. Proteolytic *Clostridium botulinum* growth at 12–48 °C simulating the cooling of cooked meat: development of a predictive model. **Food Microbiology**, v.16, p.583–592, 1999.

KADAKAL, C.; NAS, S.; EKINCI, R. Ergosterol as a new quality parameter together with patulin in raw apple juice produced from decayed apples. **Food Chemistry**, v.90, p.95-100, 2005.

KAVANAGH, J.; LARCHET, N.; STUART, M. Occurrence of heat resistance specie of *Aspergillus* in canned strawberries. **Nature**, v.198, p.1322, 1963.

KOTZEKIDOU, P. Heat resistance of *Byssochlamys nivea*, *Byssochlamys fulva* and *Neosartorya fischeri* isolated from canned tomato paste. **Journal of Food Science**, v.62, n.2, p.410-437, 1997.

KUHN, P. J.; TRINICI, A. P. J.; JUNG, M. J.; GOOSEY, M. W.; COPPING, L. G. (Ed.). **Biochemistry of cell walls and membranes in fungi**. Berlin: Springer-Verlag, 1990.

LEA, A.G.H. Apple juice. In: HICKS, D. (Ed.). **Production and packaging of non-carbonated fruit juices and fruit beverages**. Blackie and Son, Glasgow, p.182-225, 1990.

LEAL, P. A. **Modelagem preditiva de crescimento de *Neosartorya fischeri* e *Byssochlamys nivea* em sucos de frutas**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

LEBERT, I., LEBERT, A. Quantitative prediction of microbial behavior during food processing using an integrated modeling approach: a review. **International Journal of Refrigeration**, v.29, p.968-984, 2006.

LEE, D. et al. Model on the microbial quality change of seasoned soybean sprouts for on-line shelf life prediction. **International Journal of Food Microbiology**, v. 118, n. 3, p. 285-293, 2007.

LEPORQ, B., MEMBRE, J.M., DERVIN, C., BUCHE, P., GUYONNET, J.P. The “Sym’Previus” software, a tool to support decisions to the foodstuff safety, **International Journal of Food Microbiology**, v.100, p.231-237, 2005.

LOBACZ, A. e BARANYI, J. A predictive model for *Listeria monocytogenes* in dairy products. **5th International Conference Predictive Modelling in Foods**, pg.111, 2007.

LONGHI, D. A. **Avaliação da capacidade preditiva de diferentes modelos matemáticos para o crescimento microbiano em condições não isotérmicas**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

LU, Y.; FOO, L.Y. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. **Food Chemistry**, v.68, n.1, p.81-85, 2000.

MARÍN, S., COLOM, C., SANCHIS, V., RAMOS, A.J.,. Modelling of growth of aflatoxigenic *A. flavus* isolates from red chilli powder as a function of water availability. **International Journal of Food Microbiology**, v.128, p. 491–496, 2009.

MARÍN, S., MORALES, H., RAMOS, A.J. SANCHIS, V., 2006. Fitting of colony diameter and ergosterol as indicators of food borne mould growth to known growth models in solid medium. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, p.139-149, 2008.

MARÍN, S., BELLÍ, N., LASRAM, S., CHEBIL, S., RAMOS, A.J., GHORBEL, A., SANCHIS, V. Kinetics of ochratoxin A production and accumulation by *Aspergillus carbonarius* on synthetic grape medium at different temperature levels. **Journal Food Science**, v.71, p.196-200, 2006.

MARÍN, S., RAMOS, A.J., SANCHIS, V. Comparison of methods for the assessment of growth of food spoilage moulds in solid substrates. **International Journal of Food Microbiology**, v.99, p.329-341, 2005.

McCLURE, P. J., BLACKBURN, C. de W, COLE, M., B., CURTIS, P. S, JONES, J. E, LEGAN, J. D, OGDEN, I. D, PECK, M. W, ROBERTS, T. A, SUTHERLAND, J. P, WALKER, S. J. Review Paper. Modelling the growth, survival and death of microorganisms in foods: the UK Food Micromodel approach. **International Journal of Food Microbiology**, v.23, p.265-275, 1994.

McDONALD, K., SUN, D.W. Predictive food microbiology for the meat industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.52, p.1–27, 1999.

McKELLAR, R. C., LU, X. **Modeling Microbial Response in Food**. CRC series in contemporary food science. CRC PRESS Boca Raton, London, New York, Washington, D.C., 2004.

McMEEKIN, T.A.; MELLEFONT, L.A.; ROSS T. Predictive microbiology: past, present and future. **Modelling Microorganisms in Food**, p.320, 2007.

McMEEKIN, T.A., BARANYI, J., BOWMAN, J., DALGAARD, P., KIRK, M., ROSS, T.; SCHMID, S., ZWIETERING, M.H. Information systems in food safety management. **International Journal of Food Microbiology**, v.112, p.181–194, 2006.

McMEEKIN, T.A., ROSS, T. Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management. **International Journal of Food Microbiology**, v.78, p.133-153, 2002.

McMEEKIN, T.A., OLLEY, J.N., ROSS, T., RATKOWSKY, D.A. In: **Predictive Microbiology: theory and Application**. Research Studies Press Ltd., John Wiley and Sons, New York, 1993.

MEDINA, A.; MAGAN, N. Comparisons of water activity and temperature impacts on growth of *Fusarium langsethiae* strains from northern Europe on oat-based media. **International Journal of Food Microbiology**, v.142, p.365–369, 2010.



MILLER, J.D.; YOUNG, J.C. The Use of Ergosterol to Measure Exposure to Fungal Propagules in Indoor Air. **American Industrial Hygiene Association Journal**, v.58, p. 39-43, 1997.

MIORELLI, S. **Determinação dos parâmetros de resistência térmica de microrganismos contaminantes de alimentos ácidos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

MISAWA, M., NARA, T., NAKAYAMA, K. & KINOSHITA, S. Formation of terrein by *Aspergillus fischeri* Wehmer. **Nippon Nogeikagaku Kaishi**, v.36, p.699-703, 1962.

MOAKE, M. M.; PADILLA-ZAKOUR, O. I.; WOROBO, R. W. Comprehensive review of patulin control methods in foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 4, n. 1, p. 8-21, 2005.

MONTGOMERY, H.H., MONREAL, C.M., YOUNG, J.C., SEIFERT, K.A. Determination of soil fungal biomass from soil ergosterol analyses. **Soil Biol. Biochem.** v.32, p.1207-1217, 2000.

MOUSA, W.; GHAZALI, F.M.; JINAP, S.; GHAZALI, H.M.; RADU S. Modelling the effect of water activity and temperature on growth rate and aflatoxin production by two isolates of *Aspergillus flavus* on paddy. **Journal of Applied Microbiology**, v.111, p.1262–1274, 2013.

MOROZUMI, S., FUJIKAWA, H., KAI, A., A new logistic model for *Escherichia coli* growth at constant and dynamic temperatures. **Food Microbiology**, v.21, p.501-509, 2004.

NAKASHIMA, S.M.K., ANDRÉ, C.D.S., FRANCO, B.D.G.M. Revisão: Aspectos Básicos da Microbiologia Preditiva. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.3, p.41-51, 2000.

NEUMEYER, K., ROSS, T., MCMEEKIN, T.A. Development of a predictive model to describe the effects of temperature and water activity on the growth of spoilage *Pseudomonas*. **International Journal of Food Microbiology**, v.38, p.45–54, 1997.

NEVAREZ, L.; VASSEUR, V.; LE MADEC, A.; LE BRAS; M.A.; COROLLER, L.; LEGUÉRINEL, I.; BARBIER, G. Physiological traits

of *Penicillium glabrum* strain LCP 08.5568, a filamentous fungus isolated from bottled aromatised mineral water. **International Journal of Food Microbiology**, v.130, p. 166-171. 2009.

NEWELL, S.Y. **Estimating fungal biomass and productivity in decomposing litter**. In: Carroll, G.C., Wicklow, D.T. (Eds.), *The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem*. Marcel Dekker, New York, p. 521–561, 1992.

NEWELL, S.Y., MILLER, J.D., FALLON, R.D. Ergosterol content of salt-marsh fungi: effect of growth conditions and mycelial age. **Mycologia**, v.79, p.688– 695, 1987.

NIELSEN, P.V.; BEUCHAT, L.R.; FRISVAD, J.C. Growth and fumitremorgin production by *Neosartorya fischeri* as affected by temperature, light and water activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, n.6, p.1504-1510, 1988.

NIELSEN, P.V. Preservative and temperature effect on growth of tree varieties of the heat resistant mold, *Neosartorya fischeri*, as measured by an impedimetric method. **Journal of Food Science**, v.56, n.6, p.1735, 1991.

NOGUEIRA, A.; TEIXEIRA, S. H.; DEMIATE, I. M.; WOSIACKI, G. Influência do processamento no teor de minerais em sucos de maçãs. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 259-264, 2007.

OLLIVER, M.; RENDLE, T. A new problem in fruit preservation. Studies on *Byssochlamys fulva* and its effect on the tissues of processed fruit. **Journal of the Society of Chemical Industry**, v.53, p.166T-172T, 1934.

PANAGOUE, E.Z.; CHELONAS S.; CHATZIPAVLIDIS, I.; NYCHAS, G.J.E. Modelling the effect of temperature and water activity on the growth rate and growth/no growth interface of *Byssochlamys fulva* and *Byssochlamys nivea*. **Food Microbiology**, v.27, p.618-627, 2010.

PANAGOUE, E. Z.; SKANDAMIS, P. N.; NYCHAS, G. J. E. Modelling the combined effect of temperature, pH and aw on the growth rate of



*Monascus ruber*, a heat-resistant fungus isolated from green table olives. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 146-156, 2003.

PARDO, E., MALET, M., MARÍN, S., SANCHIS, V., RAMOS, A.J. Effects of water activity and temperature on germination and growth profiles of ochratoxigenic *Penicillium verrucosum* isolates on barley meal extract agar. **International Journal of Food Microbiology**, v.106, p.25–31, 2006.

PATTERSON, D.S.P., SHREEVE, B.J., ROBERTS, B.B.; McDONALD, S.M. Verruculogen produced by soil fungi in England and Wales. **Applied and Environmental Microbiology**, v.42, p.916-917, 1981.

PELEG, M. **Advanced Quantitative Microbiology for Foods and Biosystems**. Models for Predicting Growth and Inactivation. CRS Series in Contemporary Food Science. Taylor & Francis Group. New York, USA, 2006

PERERA, K.P.W.C; DAY, J.B.; MANTLE, P.G.; RODRIGUES, L. Metabolism of verruculogen in rats. **Applied an Environmental Microbiology**, v.43, p.503-508, 1982.

PIECKOVÁ, E.; BERNÁT, D.; JESENSKÁ, Z. Heat resistant fungi isolated from soil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 297-299, 1994.

PITT, J.I. The significance of potentially toxigenic fungi in foods. **Food Technology**, v.36, n.5, p.218-219, 1984.

PITT, J.I., HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**, 2nd ed. Blackie Academic and Professional, London, 1997.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**, 2<sup>a</sup> ed. Gaithersburg: Aspen Publishers Inc., 1999.

PITT, J.I.; B.F. MISCAMBLE. Water relations of *Aspergillus flavus* and closely related species. **Jour-nal of Food Protection**, v.58, p.86-90, 1995.

PITT, J.I. e HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. 3<sup>a</sup> ed. Springer, USA., ISBN-10: 0387922067, p. 519, 2009.

PRONYK, C., ABRAMSON, D.D., MUIR, W.E., WHITE, N.D.G., Correlation of total ergosterol levels in stored canola with fungal deterioration. **Journal of Stored Products Research**, v.2, p.162–172, 2006.

RATKOWSKY, D.A., OLLEY, J., MCMEEKIN, T.A., BALL, A. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures, **Journal of Bacteriology**, v.149, p.1-5, 1982.

RICHARDS, F. A flexible growth function for empirical use. **Journal of Experimental Botany**, v. 10, n. 29, p. 290-300, 1959.

ROLAND, J.O.; BEUCHAT, L.R. Biomass and patulin production by *Byssochlamys nivea* in apple juice as affected by sorbate, benzoate, SO<sub>2</sub> and temperature. **Journal of Food Science**, v.49, n.2, p.402-406, 1984.

ROOT, W.H.; BARRET, D.M. Apples and apple processing. In: BARRET, D.M.; SOMOGYI, L.; RAMASWAMY, H. (Ed.). **Processing Fruits: Science and technology**. Boca Raton. CRC Press. 2005.

ROSS, T.; McMEEKIN, T. A. Predictive Microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v.23, p.41-264, 1994.

ROSS, T. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. **Journal Applied Bacteriology**, v.81, p.501–508, 1996.

RUITER DE P. C., MOORE J. C., ZWART K. B., BOUWMAN L. A., HASSINK J., BLOEM J., DE VOS J. A., MARINISSEN J. C. Y., DIDDEN W. A. M., LEBBINK G. AND BRUSSAARD L. Simulation of N mineralization in the below-ground food webs of two winter wheat fields. **Journal of Applied Ecology**, v.30, p.95-106, 1993.

RUTLEDGE, P. Production of non-fermented fruit products. In: ARTHEY, D.; ASHURST, P.R. (Ed.). **Fruit Processing**. Chapman & Hall: Cambridge. 1996. p.70-94.

SALOMÃO, B.C.M. **Detecção de patulina e desinfecção de maçãs destinadas à produção de suco.** Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

SALOMÃO, B. C. M.; MASSAGUER, P. R.; ARAGÃO, G. M. Isolamento e seleção de fungos filamentosos termorresistentes do processo produtivo de néctar de maçã. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 1, n. 28, p. 116-121, 2008.

SALOMÃO, B. C. M.; SLONGO, A. P.; ARAGÃO, G. M. F. Heat resistance of *Neosartorya fischeri* in various juices. **LWT-Food Science and Technology**, v. 40, n. 4, p. 676-689, 2007.

SALOMÃO, B. C. M.; MASSAGUER, P. R.; COSTA, C. A.; ARAGÃO, G. M. F. influência de diferentes pH do meio de aquecimento na resistência térmica de *Neosartorya fischeri* isolado do processo produtivo de néctar de maçã. **Revista Alimentos & Nutrição**, v.15, n.1, p.7-10, 2004.

SALOMÃO, B. C. M. **Isolamento, identificação e estudo da resistência térmica de fungos filamentosos termorresistentes em produtos de frutas.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002,

SAMSON, R.A.; HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O. **Introduction to food- and airborne fungi.** Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2000.

SAMAPUNDO, S., DEVLIEGHERE, F., GEERAERD, A.H., DE MEULENAER, B., VAN IMPE, J.F., DEBEVERE, J. Modelling of the individual and combined effects of water activity and temperature on the radial growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* on corn. **Food Microbiology**, v.24, p.517-529, 2007.

SAMAPUNDO, S.; DEVLIEGHERE, F.; De MEULENAER, B.; GEERAERD, A.H.; VAN IMPE, J.F.; DEBEVERE, J.M. Predictive modelling of the individual and combined effect of water activity and temperature on the radial growth of *Fusarium verticillioides* and *F.*

*proliferatum* on corn. **International Journal of Food Microbiology**, v.105, p.35-52, 2005.

SANT'ANA, A. S. **Avaliação quantitativa do risco da patulina em suco de maçã**. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

SANT'ANA, A. S.; DANTIGNY, P.; TAHARA, A. C.; ROSENTHAL, A.; MASSAGUER, P. R. Use of a logistic model to assess spoilage by *Byssochlamys fulva* in clarified apple juice. **International Journal of Food Microbiology**, v.137, p. 299-302, 2010a.

SANT'ANA, A.S., SIMAS, R.C., ALMEIDA, C.A.A., CABRAL, E.C., RAUBER, R.H.; MALLMANN, C.A., EBERLIN, M.N., ROSENTHAL, A., MASSAGUER, P.R. Influence of package, type of apple juice and temperature on the production of patulin by *Byssochlamys nivea* and *Byssochlamys fulva*. **International Journal of Food Microbiology**, 142, 156-163, 2010b.

SAUCEDO-REYES, D., MARCO-CELDRÁN, A., PINA-PÉREZ, M.C., RODRIGO, D., MARTÍNEZ-LÓPEZ, A. Modeling survival of high hydrostatic pressure treated stationary- and exponential-phase *Listeria innocua* cells. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.10, p.135–141, 2009.

SAXENA, J., MUNIMBAZI, C., BULLERMAN, L.B. Relationship of mould count ergosterol and ochratoxin A production. **International Journal of Food Microbiology**, v.71, p.29–34, 2001.

SCHWADORF, K. e MÜLLER, H.M. Determination of ergosterol in cereals, mixed feed components, and mixed feeds by liquid chromatography. **Journal Association Analytical Chemists**, v.72, n.3, p.457-462, 1989.

SEITZ, L. M.; MOHR, H. E.; BURROUGHS, R. Ergosterol as an indicator of fungal invasion in grains. **Cereal Chemists**, v.54, n.6, p.1207-1217, 1977.

SEITZ, L.M., SAUER, D.B., BURROUGHS, R., MOHR, H.E., HUBBARD, J.D. Ergosterol as a measure of fungal growth. **Phytopathology**, v.69, p.1202–1203, 1979.

SILVA, A.R., SANT'ANA, A.S., MASSAGUER, P.R. Modelling the lag time and growth rate of *Aspergillus* section *Nigri* IOC 4573 in mango nectar as a function of temperature and pH. **Journal of Applied Microbiology**, v.109, p.1105–1116, 2010.

SKINNER, G.; LARKIN, J.; RHODEHAMEL, E. Mathematical modeling of microbial-growth - a review. **Journal of Food Safety**, v. 14, n. 3, p. 175-217, 1994.

SLONGO, A.P., ROSENTHAL, A., CAMARGO, L.M.Q., DELIZA, R., MATHIAS, S.P., ARAGÃO, G.M.F. Modeling the growth of lactic acid bacteria in sliced ham processed by high hydrostatic pressure. **LWT-Food Science and Technology**, v.42, p.303-306, 2009.

SMITH-SIMPSON, S.; CORRADINI, M.G.; NORMAND, M.D.; PELEG, M., SCHAFFNER, D.W. Estimating microbial growth parameters from non-isothermal data: A case study with *Clostridium perfringens*. **International Journal of Food Microbiology**, v.118, p.294–303, 2007.

SPLITTSTOESSER, D. F. Fungi of importance in processed fruits. In: **Handbook of Applied Mycology**, v. 3: Foods and Feeds. ARORA, D. K.; MUKERJI, K. G.; MARTH, E. H. (Ed.). New York: Marcel Dekker, p. 201-219, 1991.

STAHL, P.D., PARKIN, P.D. Relationship of soil ergosterol concentration and fungal biomass. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 28, p. 847–855, 1996

SUTHERLAND, J.P., BAYLISS, A.J., ROBERTS, T.A. Predictive modeling of growth of *Staphylococcus aureus*: the effects of temperature, pH and sodium chloride. **International Journal of Food Microbiology**, v.21 (3), p.217-236, 1994.

SWINNEN, I.A.M.; BERNAERTS, E.J.J.; DENS, A.H.; GEERAED, J.F. VAN IMPE, J.F. Predictive modelling of the microbial lag phase: a

review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p.137-159, 2004.

TANIWAKI, M.H.; HOCKING, A.D.; PITT, J.I.; FLEET, G.H. Growth and mycotoxin production by fungi in atmospheres containing 80% carbon dioxide and 20% oxygen. **International Journal of Food Microbiology**, v.143, p.218–225, 2010.

TANIWAKI, M.H., HOCKING, A.D., PITT, J.I., FLEET, G.H. Growth and mycotoxin production by food spoilage fungi under high carbon dioxide and low oxygen atmospheres. **International Journal of Food Microbiology**, v.132, p.100–108, 2009.

TANIWAKI, M.H., PITT, J.I., HOCKING, A.D., FLEET, G.H. Comparison of hyphal length, ergosterol, mycelium dry weight and colony diameter for quantifying growth of fungi from foods. In: Hocking, A.D., Pitt, J.I., Samson, R.A., Thrane, U. (Eds.), **Advances in Food Mycology**. Springer, New York, p.49–67, 2006.

TANIWAKI, M.H., HOCKING, A.D., PITT, J.I., FLEET, G.H. Growth of fungi and mycotoxin production on cheese under modified atmospheres. **International Journal of Food Microbiology**, v.68, p.125–133, 2001

TOGNON, J.; CABRAL, L. **Maçã: décimo produto alvo da Hortifruti/Cepea. HORTIFRUTI BRASIL**. Março de 2008. Disponível em: <<http://www.cepea.esalq.usp.br/hfbrasil/edicoes/66/maca.pdf>>. Acesso em: 06 jul. 2011.

TOURNAS, V. Heat Resistant Fungi of importance to the food and beverage industry. **Critical Review Microbiology**, v. 20, n. 4, p. 243-263, 1994.

UGWUANYI, J.O.; OBETA, J.A.N. Incidence of heat fungi in Nsukka, Southern Nigeria. **International Journal of Food Microbiology**, v.13, p.157-164, 1991.



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

VALÍK, L., PIECKOVA, E. Growth modelling of heat-resistant fungi: the effect of water activity. **International Journal Food Microbiology**, v.63, p.11-17, 2001.

VALIK, L.; BARANYI, J.; GORNER, F. Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Penicillium roqueforti*. **International Journal of Food Microbiology**, 47, 141-146, 1999.

VAN IMPE, J. F.; BART, M. N.; SCHELLEKENS, M.; MARTENS, T.; BAERDEMAEKER, J.A. Predictive microbiology in a dynamic environment: a system theory approach. **International Journal of Food Microbiology**, v. 25, p.227-249, 1995.

VAN IMPE, J. F., NICOLAI, B. M., MARTENS, T., BAERDEMAEKER, J., VANDEWALLE, J. Dynamic mathematical model to predict microbial growth and inactivation during food processing. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, n.9, p.2901-2909, 1992.

VAN IMPE, J. F. et al. Towards a novel class of predictive microbial growth models. **International Journal of Food Microbiology**, v. 100, v. 1-3, p. 97-105, 2005.

VELUGOTI, P.R., BOHRA, L.K., JUNEJA, V.K., HUANG, L., WESSELING, A.L., SUBBIAH, J., THIPPAREDDI, H. Dynamic model for predicting growth of *Salmonella* spp. in ground sterile pork. **Food Microbiology in press**, p.1-8, 2010.

WEETE, J. D. **Fungal lipid biochemistry: distribution and metabolism**. New York: Plenum Press, 1974.

WEETE, J.D. Structure and function of sterols in fungi. **Adv. Lipid Res**, v.23, p.115–167, 1989.

WHITING, R.C.; BUCHANAN, R. L. A. Classification of models for predictive microbiology. **Food Microbiology**, v.10, p. 175-177, 1993.



WHITING, R.C. Microbial modelling in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.35, p.467-494, 1995.

XANTHIAKOS, K. et al. Dynamic modeling of *Listeria monocytogenes* growth in pasteurized milk. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, p. 1289-1298, 2006.

YAMAZAKI, M., SUZUKI, S.; MIYAKI, K. Neurotoxic studies on fumitremorgins A, a tremorgenic mycotoxin, on mice. **Journal Pharmacobiodyn**, v.2, p.119-125, 1979.

YAMAZAKI, M., SUZUKI, S.; MIYAKI, K. Tremorgenic toxins from *Aspergillus fumigatus*. **Chemical; Pharmaceutical Bulletin**, v.19, p.1739-1740, 1971.

ZHAO, X.R.; LIN, Q.; BROOKES, P.C. Does soil ergosterol concentration provide a reliable estimate of soil fungal biomass? **Soil Biology & Biochemistry**, v. 37, p. 311–317, 2005.

ZHOU, K., CUI, T.T., LI, P.L., LIANG, N.J., LIU, S.C., MA, C.W., PENG, Z.H. Modelling and predicting the effect of temperature, water activity and pH on growth of *Streptococcus iniae* in Tilapia. **Journal of Applied Microbiology**, v.105, p.1956-1965, 2008.

ZIMMERMANN, M., MIORELLI, S., MASSAGUER, P.R., ARAGÃO, G.M.F. Modeling the influence of water activity and ascospore age on the growth of *Neosartorya fischeri* in pineapple juice. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44 p. 239-243, 2011.

ZWIETERING, M.H.; KOOS, J.T.; HASENACK, B.E.; WIT, J.C.; RIET, K.V. Modeling of bacterial growth as a function of temperature. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 1094-1101, 1991.