

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos

**ESTUDO EXPERIMENTAL E MODELAGEM DO
CRESCIMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS
TERMORRESISTENTES EM SUCOS TROPICAIS**

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

VANESSA ALBRES BOTELHO DA CUNHA

Orientadora: Profa. Dra. Gláucia M. F. Aragão
Co-orientadora: Profa. Dra. Pilar Rodriguez de Massaguer

Florianópolis, 24 fevereiro de 2003.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos**

VANESSA ALBRES BOTELHO DA CUNHA

**ESTUDO EXPERIMENTAL E MODELAGEM DO
CRESCIMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS
TERMORRESISTENTES EM SUCOS TROPICAIS**

Florianópolis, 24 fevereiro de 2003.

“Ninguém é tão grande que não possa aprender, nem tão pequeno que não possa ensinar”

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço a Deus, por ter me dado saúde e serenidade para cumprir mais esta etapa da minha vida.

Ao longo deste trabalho aprendi que ao contrário do que o ser humano pensa, não temos controle total de nenhuma situação, e que os fungos mudam de comportamento quando “eles” querem.

Em especial gostaria de agradecer:

À professora Gláucia M. F. Aragão pela dedicação, amizade e demonstração diária de que o aprendizado é muito maior quando ensinado com amor;

À professora Pilar R. de Massaguer, que mesmo à distância, foi fundamental para a realização deste trabalho;

À Cláudia Alves Costa, pela amizade e responsabilidade com que desempenhou o seu trabalho;

Ao meu marido Daniel J. da Cunha pelo apoio ao longo do caminho para que eu pudesse chegar até aqui;

À minha família, que me alimenta de forças para seguir a diante;

Aos colegas do ENGEBIO;

Aos colegas do ENGEBIO que se tornaram amigos e

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

*Dedico este trabalho a minha mãe, Cléa Lima
Albres, que me ensina a cada dia uma lição que
não se aprende na escola: VIVER!*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	10
NOMENCLATURA	12
RESUMO.....	13
ABSTRACT	15
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	
1 INTRODUÇÃO	17
CAPÍTULO II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
1 MICROBIOLOGIA PREDITIVA	21
1.1 HISTÓRICO	21
1.2 OBJETIVOS E APLICAÇÕES	23
2 MODELOS PREDITIVOS	25
2.1 MODELOS PRIMÁRIOS.....	27
2.1.1 O Modelo de Gompertz	28
2.2 MODELOS SECUNDÁRIOS	29
2.3 MODELOS TERCIÁRIOS.....	31
3 DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO MICROBIANO.....	32
3.1 DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO DE FUNGOS	33
4 MICROBIOLOGIA PREDITIVA X FUNGOS	34
5 FUNGOS	36
5.1 FUNGOS TERMORRESISTENTES.....	37
5.1.1 Descrição dos Gêneros <i>Byssochlamys</i> e <i>Neosartorya</i>	38
5.1.2 Incidência.....	39
5.1.3 Alimentos Susceptíveis à Contaminação	40
5.1.4 Conseqüências do Crescimento em Alimentos	41
5.1.5 Controle do Crescimento	44
5.1.6 Ativação de Esporos de Fungos.....	46
CAPÍTULO III - MATERIAL E MÉTODOS	
1 FUNGOS TERMORRESISTENTES.....	49
1.1 PREPARO DA SUSPENSÃO DE ASCÓSPOROS DE <i>B. nivea</i>	49
1.2 QUANTIFICAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE ESPOROS	50
1.3 MEIO DE CRESCIMENTO	50
2 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS TERMORRESISTENTES	52
2.1 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS TERMORRESISTENTES POR CONTAGEM DE COLÔNIAS.....	52
2.2 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS TERMORRESISTENTES POR FILTRAÇÃO.....	53
3 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO DE <i>N. fischeri</i> e <i>B. nivea</i>	55
3.1 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO PELO MÉTODO GRÁFICO	55
3.2 ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO PELO MODELO DE GOMPERTZ	56

3.3 ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO PELO MODELO DE GOMPERTZ MODIFICADO	57
3.4 FÓRMULAS PARA CALCULAR O ERRO.....	57
CAPÍTULO IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO	
1 PADRONIZAÇÃO DOS SUCOS	60
2 QUANTIFICAÇÃO DA SUSPENSÃO DE ESPOROS	61
3 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO DE <i>N. fischeri</i>	62
3.1 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO DE <i>N. fischeri</i> EM SUCO DE ABACAXI, A 30°C	62
4 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO DE <i>B. nivea</i> EM SUCOS TROPICAIS	68
4.1 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO DE <i>B. nivea</i> EM SUCO DE ABACAXI A 20°C.....	68
4.2 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO DE <i>B. nivea</i> EM SUCO DE ABACAXI, A 30°C.....	73
4.3 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO DE <i>B. nivea</i> EM SUCO DE MARACUJÁ A 20°C.....	79
4.4 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO DE <i>B. nivea</i> EM SUCO DE MARACUJÁ A 30°C.....	83
4.5 EFEITO DE FATORES AMBIENTAIS NO CRESCIMENTO DE <i>B. nivea</i>	87
4.5.1 Efeito da Temperatura e do Meio de Crescimento na Duração da Fase lag.....	87
4.5.2 Efeito da Temperatura e do Meio de Crescimento na Velocidade Específica Máxima de Crescimento.....	88
4.5.3 Efeito da Temperatura e do Meio de Crescimento no Aumento Logarítmico da População.....	89
4.6 MÉTODO RÁPIDO PARA DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO DE <i>B. nivea</i>	90
4.6.1 Avaliação do Crescimento de <i>B. nivea</i> em Suco de Abacaxi a 30°C pelo Método de Filtração	90
4.6.2 Avaliação do Crescimento de <i>B. nivea</i> em Suco de Maracujá a 20°C pelo Método de Filtração	92
4.6.3 Avaliação do Crescimento de <i>B. nivea</i> em Suco de Maracujá a 30°C pelo Método de Filtração	93
4.6.4 Comparação entre os Parâmetros Biológicos de Crescimento de <i>B. nivea</i>	95
4.6.5 Determinação da Correlação entre os Métodos de Contagem e Filtração.....	96
CONCLUSÃO.....	102
SUGESTÕES	106
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
ANEXO I.....	106
ANEXO II.....	115
ANEXO III.....	11527
ANEXO IV.....	11531

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Esquema da Metodologia Utilizada para Avaliação do Crescimento de Fungos Filamentosos Termorresistentes.....	54
Figura 3.2 - Curva Típica de Crescimento Microbiano.....	55
Figura 4.1 - Determinação Gráfica dos Parâmetros de Crescimento de <i>N. fischeri</i> em Suco de Abacaxi a 30°C (A = Repetição 1, B = Repetição 2).....	63
Figura 4.2 - Modelo de Gompertz Modificado Ajustado às Curvas de Crescimento de <i>N. fischeri</i> em Suco de Abacaxi, a 30°C.....	63
Figura 4.3 - Determinação dos Parâmetros de Crescimento de <i>B. nivea</i> , em Suco de Abacaxi, a 20°C, pelo Método Gráfico (A = Repetição 1, B = Repetição 2).....	69
Figura 4.4 - Modelo de Gompertz Modificado Ajustado às Curvas de Crescimento de <i>B. nivea</i> em Suco de Abacaxi, a 20°C.....	70
Figura 4.5 - Determinação dos Parâmetros de Crescimento de <i>B. nivea</i> em Suco de Abacaxi a 30°C, pelo Método Gráfico (A - Repetição 1, B - Repetição 2, C - Repetição 3, D - Repetição 4)	75
Figura 4.6 - Modelo de Gompertz Modificado Ajustado às Curvas de Crescimento de <i>B. nivea</i> em Suco de Abacaxi a 30°C.....	77
Figura 4.7 – Determinação dos Parâmetros de Crescimento de <i>B. nivea</i> em Suco de Maracujá a 20°C, pelo Método Gráfico (A - Repetição 1, B - Repetição 2)	79
Figura 4.8 - Modelo de Gompertz Modificado Ajustado às Curvas de Crescimento de <i>B. nivea</i> em Suco de Maracujá a 20°C.....	80
Figura 4.9 - Determinação dos Parâmetros de Crescimento de <i>B. nivea</i> em Suco de Maracujá a 30°C pelo Método Gráfico (A - Repetição 1, B - Repetição 2)	83
Figura 4.10 - Modelo de Gompertz Modificado Ajustado às Curvas de Crescimento de <i>B. nivea</i> em Suco de Maracujá a 30°C.....	84
Figura 4.11 - Ajuste do Modelo de Gompertz às Curvas de Crescimento de <i>B. nivea</i> em Suco de Abacaxi a 30°C Obtidas por Filtração.....	91
Figura 4.12 - Ajuste do Modelo de Gompertz às Curvas de Crescimento de <i>B. nivea</i> em Suco de Maracujá a 20°C Obtidas por Filtração.....	93
Figura 4.13 - Ajuste do Modelo de Gompertz às Curvas de Crescimento de <i>B. nivea</i> em Suco de Maracuja a 30°C Obtidas por Filtração.....	94
Figura 4.14 - Ajuste do Modelo de Gompertz aos Dados de $\log(N/N_0) \times \log(B/B_0)$	97

Figura 4.15 - Comparação entre os Valores de $\log(N/N_0)$ Observados e Preditos, Contra o Tempo.....	98
Figura 4.16 - Ajuste do Modelo de Gompertz Modificado aos Novos Dados de Aumento da População.....	99
Figura 4.17 - Valores de $\log(N/N_0)$ Preditos <i>versu</i> Valores de $\log(N/N_0)$ Observados.....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Condições para Determinação dos Parâmetros de Crescimento de <i>N. fischeri</i> e <i>B. nivea</i>	51
Tabela 4.1 - Concentração das Suspensões de Esporos de <i>N. fischeri</i> e de <i>B. nivea</i> ...41	
Tabela 4.2 - Parâmetros da Curva de Crescimento de <i>N. fischeri</i> em Suco de Abacaxi a 30°C (obtidos graficamente).....	62
Tabela 4.3 - Parâmetros de Crescimento de <i>N. fischeri</i> , em Suco de Abacaxi, a 30°C, estimados pelo Modelo de Gompertz Modificado.....	64
Tabela 4.4 - Comparação entre os Valores de $\log(N/N_0)$ de <i>N. fischeri</i> , em Suco de Abacaxi a 30°C Preditos Pelo Modelo e os Observados Experimentalmente.....	65
Tabela 4.5 - Parâmetros de Crescimento de <i>N. fischeri</i> em Suco de Abacaxi, a 30°C, Obtidos Graficamente e Estimados pelo Modelo de Gompertz Modificado.....	66
Tabela 4.6 - Parâmetros de Crescimento de <i>B. nivea</i> em Suco de Abacaxi, a 20°C.....	69
Tabela 4.7 - Parâmetros de Crescimento de <i>B. nivea</i> em Suco de Abacaxi, a 20°C, Estimados pelo Modelo de Gompertz Modificado.....	71
Tabela 4.8 - Parâmetros de Crescimento de <i>B. nivea</i> , em Suco de Abacaxi, a 20°C, Obtidos Graficamente e Estimados pelo Modelo de Gompertz Modificado.....	71
Tabela 4.9 - Comparação entre os Valores de $\log(N/N_0)$ de <i>B. nivea</i> em Suco de Abacaxi a 20°C, Preditos pelo Modelo e os Observados Experimentalmente.....	72
Tabela 4.10 - Parâmetros de Crescimento de <i>B. nivea</i> em Suco de Abacaxi a 30°C Obtidos Graficamente.....	74
Tabela 4.11 - Parâmetros de Crescimento de <i>B. nivea</i> em Suco de Abacaxi a 30°C, Estimados pelo Modelo de Gompertz Modificado.....	77
Tabela 4.12 - Comparação entre os Valores de $\log(N/N_0)$ de <i>B. nivea</i> em Suco de Abacaxi a 30°C Preditos pelo Modelo e os Observados Experimentalmente.....	78
Tabela 4.13 - Parâmetros de Crescimento de <i>B. nivea</i> em Suco de Abacaxi a 30°C Obtidos Graficamente e Estimados pelo Modelo de Gompertz Modificado.....	79
Tabela 4.14 - Parâmetros de Crescimento de <i>B. nivea</i> em Suco de Maracujá a 20°C Obtidos Graficamente.....	80
Tabela 4.15 - Parâmetros de Crescimento de <i>B. nivea</i> em Suco de Maracujá a 20°C Estimados pelo Modelo de Gompertz Modificado.....	81
Tabela 4.16 - Parâmetros de Crescimento de <i>B. nivea</i> em Suco de Maracujá d 20°C Obtidos Graficamente e Estimados pelo Modelo de Gompertz Modificado.....	81

Tabela 4.17 - Comparação entre os Valores de $\log(N/N_0)$ de <i>B. nivea</i> em Suco De Maracujá a 20°C Preditos pelo Modelo e os Observados Experimentalmente.....	82
Tabela 4.18 - Parâmetros de Crescimento de <i>B. nivea</i> em Suco de Maracujá a 30°C Obtidos Graficamente.....	84
Tabela 4.19 - Parâmetros de Crescimento de <i>B. nivea</i> em Suco de Maracujá a 30°C Estimados pelo Modelo de Gompertz Modificado.....	85
Tabela 4.20 - Comparação entre os Valores de $\log(N/N_0)$ de <i>B. nivea</i> em Suco de Maracujá a 30°C Preditos pelo Modelo e os Observados Experimentalmente.....	86
Tabela 4.21 - Parâmetros de Crescimento de <i>B. nivea</i> , em Suco de Maracujá a 30°C, Obtidos Graficamente e Estimados pelo Modelo de Gompertz Modificado.....	87
Tabela 4.22 - Efeito da Temperatura e do Meio de Crescimento na Duração da Fase Lag, λ (h), de <i>B. nivea</i> em Sucos de Abacaxi e Maracujá.....	88
Tabela 4.23 - Efeito da Temperatura e do Meio de Crescimento na Velocidade Específica Máxima de Crescimento, μ (h^{-1}) de <i>B. nivea</i> nos Sucos de Abacaxi e Maracujá.....	89
Tabela 4.24 - Efeito da Temperatura e do Meio de Crescimento no Aumento Logarítmico da População de <i>B. nivea</i> nos Sucos de Abacaxi e Maracujá.....	89
Tabela 4.25 - Parâmetros de Crescimento de <i>B. nivea</i> em Suco de Abacaxi a 30°C Estimados pelo Modelo de Gompertz Ajustado às Curvas de Crescimento Obtidas por Filtração.....	92
Tabela 4.26 - Parâmetros de Crescimento de <i>B. nivea</i> em Suco de Maracujá a 20°C Estimados pelo Modelo de Gompertz Ajustado às Curvas de Crescimento Obtidas por Filtração.....	93
Tabela 4.27 - Parâmetros de Crescimento de <i>B. nivea</i> em Suco de Maracujá a 30°C Estimados pelo Modelo de Gompertz Ajustado às Curvas de Crescimento Obtidas por Filtração.....	94
Tabela 4.28 - Parâmetros Biológicos de Crescimento de <i>B. nivea</i> em Sucos Tropicais Obtidos por Dois Diferentes Métodos de Avaliação do Crescimento.....	95
Tabela 4.29 - Valores de $\log(B/B_0)$ Transformados em $\log(N/N_0)$	98
Tabela 4.30 - Comparação entre os Parâmetros Obtidos Experimentalmente pelo Método de Contagem e os Obtidos pela Correlação.....	100

NOMENCLATURA

UFC – Unidade formadora de colônia

MEA – Agar extrato de malte

CYA – Agar Czapek extrato de levedura

μ – Velocidade específica máxima de crescimento

λ – Duração da fase lag

A – Aumento logarítmico da população

D– tempo necessário para reduzir em 90% uma população inicial de microrganismos

z – intervalo de temperatura necessário para reduzir o valor de D em um décimo do valor inicial

N – Número de microrganismos no tempo t

N_0 – Número inicial de microrganismos

Std. Err. – Erro padrão

s^2 – Variância

n – Tamanho da amostra

\bar{x} – Média da amostra

x_m – Valor médio da variável x

σ – Desvio padrão

OBS – Valor do parâmetro microbiológico observado

PRED – Valor predito

RESUMO

A crescente preocupação da população com a qualidade de vida e com a saúde fez com que houvesse um aumento no consumo de sucos a base de frutas naturais e sem conservantes. Os fungos filamentosos termorresistentes são um dos principais contaminantes de sucos processados termicamente. Estudos sobre a incidência de fungos termorresistentes evidenciam que o solo é a principal fonte de contaminação das frutas por estes fungos. Conseqüentemente, frutas e vegetais que estiverem em contato ou próximos do solo são mais susceptíveis à contaminação por estes microrganismos que, além de produzirem enzimas que degradam as frutas e seus produtos derivados, podem produzir micotoxinas. A elaboração de produtos de frutas a partir de matéria-prima contaminada por esporos termorresistentes compromete a vida de prateleira do produto, uma vez que este será deteriorado antes do prazo de validade previsto, pois estes fungos sobrevivem às temperaturas normais de pasteurização e se desenvolvem no produto final. Neste contexto, a microbiologia preditiva se apresenta como uma ferramenta importante no estudo do crescimento de vários microrganismos, como os fungos filamentosos termorresistentes, sendo que um dos modelos mais utilizados é o Modelo de Gompertz Modificado. Este trabalho teve por objetivo avaliar o crescimento de *Byssochlamys fulva* e de *Neosartorya fischeri*, fungos de reconhecida resistência térmica, pelo método de diluição e plaqueamento, em sucos naturais de abacaxi e maracujá, às temperaturas de 20 e 30°C. Foi proposta ainda a avaliação do crescimento destes fungos pelo método de filtração, como um método alternativo. Uma comparação entre os parâmetros de crescimento velocidade específica máxima de crescimento (μ), duração da fase lag (λ) e aumento logarítmico da população (A) obtidos graficamente e estimados pelo Modelo de Gompertz Modificado, demonstrou que, em média, a diferença entre os valores obtidos para estes parâmetros foi de 36,6%, 15,9% e 8,08%, respectivamente. O Modelo de Gompertz Modificado ajustou-se bem aos dados experimentais, com coeficientes de correlação que variaram de 0,90 a 0,99. Durante a fase lag, foi observada uma diminuição da população, o que dificultou o ajuste do modelo, que não prevê este comportamento. Os valores de velocidade específica máxima de crescimento e duração da fase lag, estimados para

B. nivea, foram os mais afetados pela variação do meio e da temperatura de crescimento, praticamente não havendo diferença na população máxima atingida. Somente o crescimento de *B. nivea* foi avaliado pelo método de filtração. Neste método, foi observada uma dificuldade na caracterização da fase lag devido às pequenas quantidades de biomassa a serem medidas nesta fase do crescimento. Foi observado que o crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi ocorreu em 3 dias quando estocado a 20°C e em 1 dia e meio quando estocado a 30°C. O crescimento deste fungo em suco maracujá apresentou uma pequena variação crescendo em 4 dias quando estocado a 20°C e em apenas um dia quando estocado a 30°C. Os resultados evidenciam a importância da prevenção da contaminação da matéria-prima de sucos de frutas por fungos filamentosos termorresistentes, uma vez que a vida de prateleira destes sucos pode ser drasticamente diminuída.

ABSTRACT

The increasing concern of the population with quality of life and health increased the natural and without preservatives fruit juice consumption. The heat-resistant fungi are one of the most important heat processes fruit juices contaminants. Studies on the incidence of heat-resistant fungi show that the ground is the main source of contamination of the fruits by these moulds. Consequently, fruits and vegetables that will be in contact or next to the ground are supposed to be contaminated by these microorganisms that, besides producing enzymes that degrade fruits products, can produce micotoxinas. The use of contaminated raw material to elaborate fruit products compromises these products shelf life due to the survival of these fungi to normal temperatures of pasteurization. In this context, predictive microbiology is an important tool to study microorganism's growth as heat-resistant fungi and, the Modified Gompertz Model is one of the most used one. The objective of this work was evaluate two known heat-resistant fungi growth, *Byssoschlamys nivea* and *Neosartorya fischeri*, by viable counts in pineapple and passion fruit juices, at 20 and 30°C. It was proposed yet the fungal growth evaluation by filtration as an alternative method. A comparison between the biological parameters maximum specific growth rate (μ), lag phase (λ) and logarithmic increase of population (A) gotten graphically and estimated by the model demonstrated that, in average, the difference between these parameters values was 36,6%, 15.9% and 8.08%, respectively. Modified Gompertz Model presented a good fit, with correlation coefficients varying from 0,90 to 0,99. During lag phase was observed a model fit difficulty as a result of the population decrease occurred in this growth phase. *B. nivea* maximum specific growth rate and lag phase were the parameters more affected by medium and temperature growth variation. Practically was not observed any difference in the logarithmic increase of population. Only *B. nivea* growth was evaluated by filtration. In this method was observed a difficult to characterize the lag phase due to the low quantities of biomass to pound in this period of growth. It was observed that *B. nivea* took 3 days to growth in pineapple juice stored at 20°C and 1,5 days when stored at 30°C. This fungal growth in passion fruit juice showed a little variation, growing in 4 days when stored at 20°C and just in 1 days when stored at 30°C. The results demonstrate that its important to prevent fruit used in processed juice contamination by heat-resistant fungi because these products shelf life can be drastically decreased.

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A deterioração de derivados de frutas foi primeiramente atribuída aos fungos filamentosos no início dos anos 30, na Inglaterra, quando *Byssochlamys fulva* foi identificado como o agente deteriorante de morangos enlatados (OLLIVER & RENDLE, 1934). Neste mesmo período foi constatado que a principal fonte de contaminação era o solo (HULL, 1939).

A termorresistência é conferida a poucas espécies que produzem ascósporos que sobrevivem ao tratamento térmico de pasteurização (SPLITTSTOESSER, 1991). A pasteurização, normalmente aplicada a produtos vegetais ácidos, ativa os ascósporos dormentes, que germinam e crescem no produto deteriorando-o (BEUCHAT, 1986; ENIGL *et al.*, 1993) durante o período de estocagem, o que pode resultar em grandes perdas econômicas (VALIK & PIECKOVÁ, 2001).

Estudos mostram que os fungos filamentosos já foram encontrados, como contaminantes de sucos, em muitos países como Estados Unidos (MAUNDER, 1969; SPLITTSTOESSER *et al.*, 1971), Dinamarca (JENSEN, 1960), Austrália (SPURGIN, 1964; RICHARDSON, 1965), Holanda (PUT & KRUISWIJK, 1964), Canadá (YATES & MOONEY, 1968), Alemanha (ECKARDT & ARHENS, 1977), Suíça (LÜTHI & HOCHSTRASSER, 1952), Nigéria (UGWUANYI & OBETA, 1991), Iugoslávia (MICKOVSKI, 1962), Índia (RAJASHEKHARA *et al.*, 1996) e no Brasil (EIROA & ALMSTADEN, 1985; BAGLIONI, 1998; ARAGÃO, 1989; SALOMÃO, 2002).

Nos últimos anos, ocorreu um aumento no volume e na variedade de produtos à base de frutas disponíveis no mercado. Novos processos de fabricação, embalagens e tecnologias de preservação, bem como um aumento na demanda do consumo, têm causado um incremento na quantidade e na variedade de sucos de frutas e de outros produtos derivados de frutas. Os métodos mais freqüentes de preservação destes produtos são a pasteurização e os processos de ultra-alta temperatura (UHT), sendo pouco freqüente o uso de conservantes químicos (TOURNAS, 1994). Entretanto, o uso de altas temperaturas pode romper ascósporos

de fungos filamentosos termorresistentes que podem estar presentes e, demonstram uma resistência excepcionalmente alta ao calor. A resistência térmica varia de espécie para espécie e é dependente de vários fatores como, a natureza do meio de aquecimento, o tratamento térmico aplicado, a idade dos ascósporos, o meio de esporulação entre outros. As espécies comumente envolvidas na deterioração de alimentos são *Byssochlamys nivea* e *Byssochlamys fulva*, *Neosartorya fischeri*, *Talaromyces flavus*, *Talaromyces trachyspermus* (ENIGL *et al.*, 1993), e *Eupenicillium* (TOURNAS, 1994).

Desde 1996, o mercado de suco pronto para beber vem se destacando na área de bebidas. Comparando-se o ano de 2001 com o ano de 1996, este segmento cresceu 270%. No primeiro semestre de 2002, foram comercializados 26,3 milhões de litros de suco pronto para beber contra 16,4 nos primeiros seis meses de 2001 (CONSUMIDOR MODERNO, 2002).

Pela avaliação do crescimento destes fungos em diferentes produtos, é possível saber o quanto podem ou poderão interferir na vida de prateleira dos sucos e outros derivados de frutas. Esta avaliação pode ser feita através da microbiologia preditiva que utiliza os modelos matemáticos para descrever o comportamento dos microrganismos sob diferentes condições de temperatura, pH, atividade de água (WHITING, 1995; ZWIETERING *et al.*, 1991; CHEROUTRE-VIALETE *et al.*, 1998). Estes modelos podem prever a segurança microbiológica ou vida de prateleira dos produtos perecíveis sob condições comerciais, baseando-se na cinética do crescimento microbiano, para encontrar pontos críticos do processo (ZWIETERING *et al.*, 1991; CHEROUTRE-VIALETE *et al.*, 1998; LABUZA & FU, 1993; GIANNUZZI *et al.*, 1998; VAN IMPE *et al.*, 1992). O uso dos modelos preditivos pode reduzir a necessidade de análises laboratoriais dispendiosas e, em longo prazo, pode ser considerado um pré-requisito para o controle computacional de operações, bem como para a otimização de processos (DAVEY, 1994).

Este trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento de *Neosartorya fischeri* em suco de abacaxi a 30°C e o crescimento de *Byssochlamys nivea* em sucos de abacaxi e maracujá às temperaturas de 20 e 30°C, pelo método de contagem de colônias por diluição e plaqueamento. Foi proposta ainda a avaliação

do crescimento destes fungos pelo método da filtração, como um método alternativo mais rápido e simples que o método de contagem de colônias por diluição e plaqueamento. A viabilidade do uso de modelos preditivos na estimativa dos parâmetros de crescimento de fungos foi demonstrada comparando-se os valores de velocidade específica máxima de crescimento (μ), duração da fase lag (λ) e aumento logarítmico da população (A) de *N. fischeri* e *B. nivea* obtidos graficamente com os estimados pelo Modelo de Gompertz Modificado.

CAPÍTULO II
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 MICROBIOLOGIA PREDITIVA

1.1 HISTÓRICO

Considera-se que foi nos anos 20 que se iniciou o uso de modelos preditivos microbiológicos em alimentos, com o cálculo do tempo de morte térmica; onde os valores D (tempo necessário para reduzir em 90% a população inicial de microrganismos) e Z (intervalo de temperatura necessário para reduzir o valor de D em um décimo do valor inicial) foram usados satisfatoriamente para assegurar que os alimentos enlatados estavam livres do risco de envenenamento por *Clostridium botulinum* (McMEEKIN & ROSS, 2002; WHITING, 1995). ESTY & MEYER, em 1922, desenvolveram um modelo preditivo para descrever um processo térmico suficiente para destruir 10^{12} esporos de *C. botulinum* tipo A. A grande margem de segurança deste modelo faz com que ainda seja utilizado e talvez pouco reconhecido como um modelo microbiológico preditivo (McMEEKIN & ROSS, 2002).

ROSS & McMEEKIN (1994) ressaltam que o uso de modelos matemáticos na microbiologia de alimentos não é novidade, estando bem estabelecido o uso de modelos para a destruição térmica de microrganismos pelo calor, tanto na indústria quanto na literatura.

Segundo McMEEKIN & ROSS (2002) a origem da microbiologia preditiva moderna está entre os anos de 1960 e 1970, quando modelos cinéticos foram utilizados para tratar de problemas na deterioração de alimentos e os modelos probabilísticos utilizados para tratar de problemas de envenenamento alimentar, como o botulismo e outras intoxicações.

A partir da década de 80, as aplicações das técnicas de modelagem matemática, que até então não recebiam grande atenção, começaram a ser utilizadas. A utilização dos modelos ocorreu por duas razões. A primeira foi o aumento de casos importantes de envenenamento alimentar, o que levou ao aumento da conscientização do público da necessidade da oferta de alimentos saudáveis. A segunda razão foi a constatação, por muitos microbiologistas de alimentos, de que os métodos tradicionais para determinar qualidade e segurança, inclusive os

considerados rápidos, eram limitados pelo tempo na obtenção de resultados e tinham um pequeno valor preditivo (ROSS & McMEEKIN, 1994). Além disso, com o advento dos computadores pessoais (PCs), a modelagem microbiana se tornou uma área de interesse crescente, pois os modelos poderiam ser facilmente utilizados por microbiologistas e tecnólogos de alimentos (WHITING, 1995). Segundo ROSS & McMEEKIN (1994), a microbiologia preditiva surgiu como consequência de duas linhas de pesquisas diferentes. Uma delas era o controle da deterioração de pescados e a segunda a prevenção do botulismo e outras intoxicações microbiológicas.

A partir de 1983, o potencial da microbiologia preditiva despertou o interesse de pesquisas e de financiamentos, particularmente nos Estados Unidos, Reino Unido, Austrália e Europa. No Reino Unido, este interesse fez surgir o *software*, patrocinado pelo governo, *Food Micromodel* (ROSS & McMEEKIN, 1994; McMEEKIN & ROSS, 2002). Na Europa surgiu um programa que reúne cerca de 30 laboratórios em dez países da Comunidade Econômica Européia (CEE), o FLAIR (*Food Linked Agricultural and Industrial Research*), que examina o crescimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes em uma grande gama de produtos naturais. Nos Estados Unidos, as pesquisas sobre microbiologia preditiva são feitas pela USDA, na Pensilvânia, no *Microbial Food Safety Research Unit* que preparou e licenciou um *software* chamado *Pathogen Modeling Program*, ou PMP (ROSS & McMEEKIN, 1994).

Nos últimos anos, a microbiologia preditiva se consolidou como uma disciplina com mérito próprio e sua utilização tem sido amplamente aceita (McCLURE *et al.*, 1994).

1.2 OBJETIVOS E APLICAÇÕES

Pode-se dizer que a microbiologia preditiva de alimentos é multidisciplinar, pois reúne conhecimentos de microbiologia de alimentos, engenharia e estatística para fornecer prognósticos convenientes sobre o comportamento microbiano em alimentos (SCHAFFNER & LABUZA, 1997).

O objetivo da microbiologia preditiva, segundo WHITING (1995), é descrever matematicamente o crescimento ou a diminuição de microrganismos presentes em alimentos sob condições ambientais específicas. O autor diz ainda que, com a habilidade de descrever, vem a habilidade de prever combinações de condições onde não existem dados experimentais, dentro de uma faixa apropriada de cada condição.

A estimativa exata dos parâmetros de crescimento, particularmente velocidade específica máxima de crescimento (μ) e duração da fase lag (λ), é essencial em muitas áreas da microbiologia, como por exemplo na caracterização de efeitos de anti-microbianos, otimização de meios microbiológicos e no desenvolvimento de modelos cinéticos utilizados nas tecnologias de alimentos e de fermentação (DALGAARD & KOUTSOUMANIS, 2001)

Os modelos matemáticos são utilizados para descrever o comportamento dos microrganismos sob diferentes condições de temperatura, pH e atividade de água (WHITING, 1995; ZWIETERING *et al.*, 1991; CHEROUTRE-VIALETE *et al.*, 1998). Estes modelos podem prever a segurança microbiológica ou vida de prateleira dos produtos perecíveis sob condições comerciais, baseando-se na cinética do crescimento microbiano, para encontrar pontos críticos do processo (ZWIETERING *et al.*, 1991; CHEROUTRE-VIALETE *et al.*, 1998; LABUZA & FU, 1993; GIANNUZZI *et al.*, 1998; VAN IMPE *et al.*, 1992).

De acordo com ROSS & McMEEKIN (1994), as respostas microbianas são medidas sob condições definidas e controladas e os resultados são então sumarizados na forma de equações matemáticas que, por interpolação, podem prever respostas para novas condições que não foram verdadeiramente testadas.

A microbiologia preditiva pode ser usada para prever a segurança de um produto que não apresente uma barreira contra o crescimento de um patógeno e avaliar o efeito de vários fatores de barreira, incluindo composição, processamento e embalagem, na estabilidade microbiológica dos alimentos (LABUZA & FU, 1993).

A microbiologia preditiva também ajuda na elaboração de planos de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), identificando perigos e pontos críticos de controle, especificando limites e ações corretivas (McMEEKIN & ROSS, 2002).

O uso dos modelos preditivos pode reduzir a necessidade de análises laboratoriais dispendiosas e, a longo prazo, pode ser considerado um pré-requisito para o controle computacional de operações, bem como para a otimização de processos (DAVEY, 1994).

McCLURE *et al.* (1994), consideram que as aproximações feitas pela microbiologia preditiva estão sendo largamente aceitas, e que, o verdadeiro poder destas aproximações é que, ao contrário do processo tradicional de estocagem, os modelos, uma vez validados, podem ser utilizados para prever rapidamente e com segurança a resposta dos microrganismos sob várias condições. Isto faz com que seja considerada uma ferramenta preciosa para os microbiologistas de alimentos na tomada de decisão diária.

2 MODELOS PREDITIVOS

Inicialmente, poder-se-ia pensar nos modelos utilizados há muitos anos na biotecnologia ou na engenharia química e aplicá-los à microbiologia preditiva. Entretanto, BARANYI & ROBERTS (1994) ressaltam que são muitas as razões para que a microbiologia preditiva de alimentos construa suas próprias ferramentas estatístico-matemáticas. Algumas destas razões são listadas abaixo:

- Ao contrário do que ocorre na biotecnologia, que visa a otimização, o objetivo dos microbiologistas de alimentos é minimizar ou prevenir o crescimento microbiano, o que faz com que os fatores inibitórios sejam investigados mais intensamente.
- A concentração de células de interesse é bem menor que na biotecnologia, que geralmente é maior que 10^6 ou 10^7 células/mL. Conseqüentemente, alguns métodos que são validados a altas concentrações celulares, como turbidimetria e medidas de condutância, não podem ser diretamente aplicados, sendo necessário estabelecer a relação entre o número de células e medida na menor concentração celular.
- A cinética da fase lag, que é pouco importante em um biorreator, é de grande importância na microbiologia de alimentos.
- Geralmente a quantidade de informações sob a composição físico-química do alimento é menor e menos exata quando comparada a de um biorreator, conseqüentemente, os métodos estatístico-matemáticos aplicados envolvem várias simplificações e elementos empíricos.

Segundo BARANYI & ROBERTS (1995), o termo modelo matemático se refere a uma série de hipóteses básicas de um processo estudado, algumas das quais, podem ser expressas por meio de funções ou de equações (diferenciais). Do ponto de vista mecanístico, os termos função e modelo não são equivalentes. Os

autores definem função como uma abstração matemática que facilita a descrição de um modelo particular.

O processo de modelagem depende de técnicas de regressão matemática, conseqüentemente, um critério padrão para a análise de regressão deve ser levado em consideração, incluindo distribuições normais e variâncias homogeneizadas. O procedimento para desenvolver um modelo deve incluir as seguintes considerações (WHITING, 1995):

- Exatidão do ajuste
- Habilidade de predizer combinações de fatores não testados
- Incorporação de todos os fatores relevantes
- Possuir um número mínimo de parâmetros para facilitar o uso
- Especificação do termo de erro
- Os parâmetros devem conter significado biológico e valores realísticos
- Reparametrização se isso melhorar as propriedades estatísticas

Os modelos preditivos são classificados de acordo com o comportamento da população que descrevem. Assim, existem modelos de crescimento, de inativação (WHITING, 1995; McMEEKIN & ROSS, 2002) e de limites ou interface de crescimento (modelos cresce-não cresce) (McMEEKIN & ROSS, 2002).

Os modelos podem ser chamados de cinéticos, quando são baseados no estudo do comportamento da população microbiana em função do tempo ou de probabilístico, quando examinam a probabilidade de que um microrganismo responda crescendo, morrendo ou produzindo um metabólito num dado período de tempo (McMEEKIN & ROSS, 2002; ROSS & McMEEKIN, 1994; WHITING, 1995).

McMEEKIN & ROSS (2002) classificam os modelos em mecanísticos ou empíricos, dependendo se apresentam ou não um embasamento teórico. Os modelos, geralmente utilizados na microbiologia preditiva, não são puramente mecanísticos e alguns, que inclusive devem ser evitados, são simplesmente ajuste de curvas e podem apresentar deficiências visíveis, como conter um número de

graus de liberdade igual ou maior que o número de observações. Modelos como esses podem até apresentar um bom ajuste quando são graficados contra um pequeno número de pontos experimentais

Uma outra classificação dos modelos matemáticos utilizados na microbiologia preditiva foi proposta por WHITING & BUCHANAN (1993), onde os modelos são considerados primários, secundários ou terciários. Segundo WHITING (1995), os modelos primários e secundários podem ser lineares ou não lineares; segregados, quando a população é definida por células heterogêneas, ou não segregados, quando a população é definida por células médias; estruturado, quando é composto por vários componentes ou não estruturado, quando é composto por um único componente.

2.1 MODELOS PRIMÁRIOS

Os modelos primários descrevem mudanças no número de microrganismos ou nas respostas microbianas (duração da fase lag, velocidade específica máxima de crescimento e aumento logarítmico da população) com o tempo, num ambiente específico. Estes modelos podem estimar a quantidade de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL), a formação de toxinas, os níveis de substratos e produtos metabólicos (que são medidas diretas da resposta). Uma equação ou função matemática descreve a mudança da resposta com o tempo, fornecendo um grupo característico de valores dos parâmetros.

Exemplos de modelos primários são o modelo de primeira ordem de Monod (LABUZA & FU, 1993), o modelo logístico, o modelo de Schunute (ZWIETERING *et al.*, 1990), o modelo de Boltzman (ERKMEN & ALBEN, 2002), o modelo de inativação térmica de primeira ordem (WHITING, 1995) e os modelos de Baranyi e de Gompertz, que são os mais utilizados (BUCHANAN *et al.*, 1997).

2.1.1 O Modelo de Gompertz

O Modelo de Gompertz, amplamente utilizado (MASSON *et al.*, 2002; WHITINHG, 1995; BUCHANAN *et al.*, 1997), foi introduzido na microbiologia de alimentos por GIBSON *et al.*, em 1987 (ROSS & McMEEKIN, 1994; GIANUZZI *et al.*, 1998; LABUZA & FU, 1993), que compararam a equação logística e a de Gompertz na parametrização de uma curva de crescimento de *Clostridium botulinum*. O Modelo de Gompertz, representada pela Equação 2.1 (ERKMEN & ALBEN, 2002), foi selecionado devido ao melhor ajuste.

$$y = a * \exp\{-\exp(b - c * t)\} \quad (2.1)$$

onde y é a densidade da população (logaritmo do número de unidades formadoras de colônias/mL) num dado tempo t (h). Os parâmetros a , b e c , são estimados pelo modelo. Estes parâmetros estão relacionados com os parâmetros microbiológicos de crescimento λ (duração da fase lag), μ_{\max} (velocidade específica máxima de crescimento) e A (aumento logarítmico da população) pelas seguintes equações:

$$a = A \quad (2.2)$$

$$b = 1 + \frac{\mu_{\max} * \lambda}{A} \quad (2.3)$$

$$c = \frac{\mu_{\max}}{A} \quad (2.4)$$

A função ou Modelo de Gompertz foi modificado por ZWIETERING *et al.* (1990). A reparametrização do modelo foi feita para que os parâmetros estimados pudessem ter um significado biológico. Assim, os parâmetros, velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}), duração da fase lag (λ) e aumento logarítmico da população (A) foram introduzidos no modelo, o que facilitou o encontro de valores

iniciais e o cálculo de intervalos de confiança durante o ajuste da curva (LABUZA & FU, 1993; VAN IMPE *et al.*, 1995). O Modelo de Gompertz Modificado é dado pela Equação 2.5

$$y = A * \exp\{-\exp\{(\frac{\mu * e}{A}) * (\lambda - t)\} + 1\} \quad (2.5)$$

Os valores dos parâmetros podem ser determinados ajustando-se os dados ao Modelo de Gompertz pelo método de Gauss-Newton ou outro método iterativo de estimação que determine o melhor ajuste de acordo com o critério dos mínimos quadrados (WHITING, 1995).

Segundo LABUZA & FU (1993), tanto o Modelo de Gompertz original quanto o Modificado têm sido testados em muitas espécies de microrganismos com bons ajustes. Entretanto, o ajuste do Modelo de Gompertz é fortemente afetado pelo número de observações utilizado na construção da curva, como foi observado por BRATCHELL *et al.* (1989), bem como pela qualidade estatística destas observações. Para um bom ajuste da função, é necessário pelo menos 15 pontos experimentais distribuídos uniformemente ao longo de toda curva de crescimento. Isto pode caracterizar um problema se o crescimento é muito rápido, se a duração da fase lag é muito curta ou se o experimento termina antes que se atinja a fase estacionária.

2.2 MODELOS SECUNDÁRIOS

Os modelos secundários indicam como os parâmetros dos modelos primários mudam com fatores ambientais como temperatura, pH e atividade de água, entre outros (WHITING, 1995). Muitos modelos secundários têm sido propostos na literatura, como os modelos polinomiais ou metodologia de superfície de resposta, equação de Arrhenius, modelo da raiz quadrada ou de Ratkowsky,

entre outros (SCHAFFNER & LABUZA, 1997; WHITING, 1995; McMEEKIN & ROSS, 2002; DAVEY & DAUGHTRY, 1995).

Sem dúvida, a temperatura é o fator mais importante nas reações de deterioração de alimentos, principalmente na deterioração microbiana, uma vez que a velocidade específica máxima de crescimento e a fase lag são altamente dependentes da temperatura (GIANNUZZI *et al.*, 1998). Mesmo estando diretamente ligada à estabilidade microbiológica dos alimentos, nem sempre a temperatura de refrigeração é mantida constante durante a manipulação. Assim, muitos pesquisadores estudaram, através de modelos computacionais baseados em transferência de calor e estimativas de crescimento microbiano, o efeito da temperatura na estabilidade microbiana (GIANNUZZI *et al.*, 1998). O modelo da raiz quadrada, proposto por RATKOWSKY *et al.* (1983), pode ser citado como exemplo de um modelo que descreve a influência da temperatura na taxa de crescimento específico. Em 1991, ZWIETERING *et al.* modificaram o modelo estendido de Ratkowsky para descrever o efeito da temperatura na fase lag. O efeito de flutuações da temperatura na fase lag e na taxa de crescimento específico, em meio líquido, também foi estudado por LI & TORRES (1993).

O pH e a_w também são incluídos em alguns modelos, sendo necessário expressá-los, algumas vezes, como concentração de íon hidrogênio ou conteúdo de sal. Os fatores inclusos nos modelos variam de acordo com a finalidade a que se propõem. Quando o modelo é desenvolvido para carnes curadas, por exemplo, é necessária a incorporação de um termo no modelo que descreva a influência do nitrito no crescimento microbiano. Embora seja raro, os modelos podem incluir outros fatores além de temperatura, pH, a_w e nitrito, como o potencial redox, a composição dos gases do *headspace* (oxigênio, dióxido de carbono, nitrogênio) e outros.

A influência de uma microbiota competitiva ainda não foi explorada por muitos modelos. Quando se tem uma mistura de microrganismos, a predominância de um ou de outro varia de acordo com a energia de ativação de cada um, sendo que, aqueles que possuem maior energia de ativação, são predominantes a altas temperaturas, enquanto que aqueles que possuem energias de ativação menores

deverão ser predominantes a temperaturas mais baixas. Além disso, pode ocorrer a produção de substâncias antimicrobianas por alguns contaminantes naturais, o que pode afetar o crescimento de outros microrganismos presentes nos alimentos (SCHAFFNER & LABUZA, 1997).

2.3 MODELOS TERCIÁRIOS

Os modelos terciários são ferramentas, onde as rotinas dos softwares computacionais transformam os modelos primários e secundários em programas amigáveis, como *softwares* e sistemas espertos. Estes programas podem calcular as respostas microbianas de acordo com as mudanças nas condições ambientais, comparar o efeito das diferentes condições ou contrastar o comportamento de vários microrganismos.

Alguns *softwares* comerciais, que podem ser adquiridos livres de encargos, fornecem predições do crescimento microbiano ou da taxa de crescimento ou da fase lag, sob condições definidas (McMEEKIN & ROSS, 2002) . Entre eles estão:

- *USDA's Pathogen Modeling Program* (BUCHANAN, 1993), disponível no site <http://www.arserrc.go/mfs/pathogen.htm>;
- *Food MicroModel* (McCLURE *et al.*, 1994; PANCIELLO & QUANTICK, 1998), software desenvolvido por um grupo de empresas em conjunto com o governo do Reino Unido, disponível no site <http://www.lfra.co.uk/micromodel/index.html>;
- *Seafood Spoilage Predictor* (DALGAARD *et al.*, 2002), desenvolvido para prever a vida de prateleira de alimentos de origem marinha estocados a temperatura constante ou sob flutuações de temperatura. O software disponível no site <http://dfu.min.dk/micro/ssp/>.
- *Food Spoilage Predictor* (NEUMEYER *et al.*, 1997), *software* comercial que modela o efeito da atividade de água e de flutuações de temperatura no crescimento de *Pseudomonas* psicrotolerantes.

3 DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO MICROBIANO

Quando o crescimento de um ou mais microrganismos é estudado, uma grande quantidade de dados é necessária, uma vez que os parâmetros de crescimento (duração da fase lag, velocidade específica máxima de crescimento e aumento logarítmico da população) são obtidos com boa exatidão quando um número suficiente de repetições é feito e, desde que, cada repetição contenha um número suficiente e bem distribuído de pontos experimentais. Este problema é ainda maior se o crescimento for estudado em função de diferentes condições, como temperatura, pH ou atividade de água (AUGUSTIN *et al.*, 1999; BEGOT *et al.*, 1996).

O desenvolvimento de modelos na microbiologia preditiva requer uma grande quantidade de dados. Estes dados são geralmente obtidos pelo método de contagem de colônias por diluição e plaqueamento (AUGUSTIN *et al.*, 1999). Este método, mesmo exigindo um grande consumo de tempo e não fornecendo resultados imediatos, tem sido utilizado como um método padrão para métodos alternativos que vêm sendo desenvolvidos como medidas de impedância, radiometria, determinação de ATP e citometria de fluxo.

O crescimento microbiano pode ser acompanhado, em tempo real, através da Densidade Ótica (DO), um método já estabelecido e chamado de turbidimetria (BEGOT *et al.*, 1996). A turbidimetria se tornou um método atrativo, devido ao advento de sistemas turbidimétricos automatizados (AUGUSTIN *et al.*, 1999; BEGOT *et al.*, 1996), e, recentemente, foi utilizado por alguns autores para estimar os parâmetros de crescimento através do Modelo de Gompertz Modificado (BEGOT *et al.*, 1996; CHORIN *et al.*, 1997; DALGAARD & KOUTSOUMANIS, 2001; CHEROUTRE-VIALETTE *et al.*, 1998). A estimativa dos parâmetros de crescimento por medidas de absorvância tem a vantagem de ser rápido, não destrutivo, barato e relativamente fácil de automatizar quando comparado com outras técnicas e, particularmente, quando comparado com a contagem de viáveis clássica (DALGAARD & KOUTSOUMANIS, 2001).

3.1 DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO DE FUNGOS

A avaliação do crescimento de fungos pela medida da taxa de extensão das hifas, normalmente chamada de taxa de crescimento radial, expressa em $\mu\text{m/h}$, é provavelmente, a medida mais simples e direta, mas não necessariamente representa a verdadeira natureza do crescimento do fungo. 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 (GIBSON & HOCKING, 1997). Entretanto, este método tem sido utilizado para quantificar o crescimento de fungos, como o relatado por MOLINA & GIANUZZI (1999), que estudaram o efeito da combinação de temperatura e de concentrações de ácido propiônico no crescimento de *Aspergillus parasiticus* através de medidas do diâmetro da colônia. O efeito da atividade de água no crescimento de fungos termorresistentes também foi avaliado por medidas do diâmetro da colônia (VALÍK & PIECKOVÁ, 2001).

Segundo LANGVAD (1999), o crescimento de fungos filamentosos em cultura líquida pode ser medido através do aumento do peso seco de culturas realizadas em frascos erlenmeyers de 500 mL estacionários ou agitados. O autor observou uma relação linear, entre a absorbância (lida a 630 nm) e o peso seco, similar para diferentes fungos com um coeficiente angular de 4,2 mg/mL de peso seco por unidade de absorbância.

AKPOMEDAYE & EJECHI (1998) estudaram o efeito de extratos de pimenta associados ao efeito do calor no crescimento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* e *Rhizopus stolonifer*. A inibição do crescimento foi medida pela quantificação da biomassa, que foi filtrada e seca até peso constante.

4 MICROBIOLOGIA PREDITIVA X FUNGOS

Segundo BARANYI *et al.* (1996), o uso dos modelos preditivos, amplamente aceito no estudo do crescimento bacteriano, também tem se mostrado como uma importante ferramenta no estudo do crescimento de fungos. Mas 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 seu crescimento.

ERKMEN & ALBEN (2002) utilizaram diferentes modelos não-lineares para estimar os parâmetros μ (g/L), λ (dias) e A (g/L), na produção de ácido cítrico e formação de biomassa, por *Aspergillus niger* em cultura submersa. A biomassa foi quantificada por filtração de uma amostra de 15 mL, retirada do fermentador a cada 15 dias. Depois de filtrado, o micélio foi seco a 105°C até peso constante. Os parâmetros biológicos foram estimados, com sucesso, pela equação de Gompertz modificada.

CUPPERS *et al.* (1997) desenvolveram um modelo com a taxa de crescimento em função da temperatura e da concentração de sal, para prever o tempo necessário para que a colônia atinja um tamanho visível (3 mm). A medida do diâmetro também foi utilizada por BARANYI *et al.* (1996) que modelaram o efeito da atividade de água na taxa de crescimento da colônia de quatro espécies de *Aspergillus*. MOLINA & GIANNUZZI (1999) utilizaram o modelo de Arrhenius para avaliar o efeito da temperatura e da concentração de ácido propiônico no crescimento de *Aspergillus parasiticus*. O crescimento foi medido através do incremento do diâmetro da colônia por unidade de tempo.

O efeito da a_w no crescimento de *Penicillium roqueforti* foi estudado através das técnicas de microbiologia preditiva por VALÍK *et al.* (1999). O crescimento da colônia, medido através do diâmetro da colônia, foi modelado por uma função quadrática ajustada aos valores de a_w transformados.

VALÍK & PIECKOVÁ (2001) consideraram que são poucos os trabalhos publicados sobre os efeitos de fatores ambientais como atividade de água (a_w), pH,

temperatura, tensão de oxigênio, luminosidade, conservantes e ácidos orgânicos, no crescimento de fungos termorresistentes, sendo que estes dados poderiam ser modelados matematicamente.

5 FUNGOS

Estima-se que existam cerca de um milhão e meio de espécies de fungos no mundo, mas apenas sessenta e nove e mil espécies, foram descritas. Devido à capacidade dos fungos em utilizar substratos muito diferentes, eles são capazes de atacar inúmeros produtos utilizados pelo homem, incluindo tecidos, couro, produtos derivados do petróleo como combustíveis e lubrificantes, além dos seres vivos. Assim, vários processos como secagem, salga, congelamento, aquecimento, enlatamento, uso de irradiação ou de aditivos químicos, são empregados para proteger os alimentos dos fungos e também das bactérias. Além de danificar os alimentos certas espécies de fungos podem produzir substâncias tóxicas, conhecidas como micotoxinas (ALEXOPOULOUS, 1996).

Os fungos são organismos eucarióticos, aclorofilados, imóveis, aeróbios e obtêm energia da oxidação de substâncias orgânicas (SCHLEGEL, 1993). A maioria dos fungos é aeróbia, apesar de que inúmeras espécies, incluindo as leveduras, serem anaeróbias facultativas (ALEXOPOULOUS, 1996). O corpo vegetativo, ou talo, consiste de filamentos chamados de hifas, que podem ser septadas ou não, e se estendem sobre o meio nutriente (SCHLEGEL, 1993).

A reprodução efetua-se por germinação de esporos. Os esporos maduros são liberados dos aparelhos esporíferos e disseminados. Um esporo germina e emite um filamento, ou hifa, que cresce, alonga-se e ramifica-se para dar um novo micélio. Os esporos assexuados nascem da amputação de pequenos fragmentos citoplasmáticos uni ou multinucleados que se separam na extremidade das hifas. Na reprodução sexuada, o zigoto ou uma célula vegetativa passa por uma divisão meiótica, seguida de uma ou várias divisões mitóticas, que permitem a formação de esporos sexuais haplóides (SCRIBAN, 1985).

Os fungos são subdivididos, de acordo com as características estruturais e reprodutivas, em vários grupos: Zygomycetos, Oomicetos, Ascomycetos, Deuteromicetos, Basidiomicetos (ALEXOPOULOUS, 1996)

Nos fungos pertencentes ao grupo dos Ascomicetos, a reprodução sexuada é efetuada por ascósporos. Os ascósporos são desenvolvidos dentro de uma estrutura em forma de saco, chamada asco. Cada asco contém de 4 a 8 ascósporos que são liberados quando há ruptura do asco (SCRIBAN, 1985).

5.1 FUNGOS TERMORRESISTENTES

A maioria dos fungos filamentosos possui limitada resistência térmica e são facilmente destruídos pela aplicação de calor. Entretanto, algumas espécies que apresentam a característica de produzir ascósporos (esporos da fase de reprodução sexuada) como *Byssochlamys*, *Neosartorya*, e *Talaromyces*, entre outras, demonstram uma alta resistência térmica (HOCKING & PITT, 1984; TOURNAS, 1994).

A pasteurização normalmente aplicada aos produtos de frutas ativa os ascósporos dormentes que germinam e permitem o crescimento dos fungos termorresistentes (BEUCHAT, 1986; SPLITTSTOESSER *et al.*, 1972). Por sobreviverem aos tratamentos térmicos utilizados no processamento de frutas, estes fungos podem crescer e deteriorar os produtos estocados à temperatura ambiente, o que pode resultar em grandes perdas econômicas (TOURNAS, 1994).

As espécies comumente envolvidas na deterioração de frutas e produtos de frutas são *Byssochlamys nivea* e *Byssochlamys fulva*, *Neosartorya fischeri*, *Talaromyces flavus*, *Talaromyces trachyspermus* (ENIGL *et al.*, 1993) e *Eupenicillium brefeldianum* (TOURNAS, 1994).

5.1.1 Descrição dos Gêneros *Byssochlamys* e *Neosartorya*

***Byssochlamys* sp**

Os fungos do gênero *Byssochlamys* (*B. nivea* e *B. fulva*) são caracterizados pela ausência de cleistotécio, gymnotécio ou qualquer outro corpo que envolva os ascos durante o desenvolvimento ou maturação. Os ascos são produzidos em cachos abertos, em associação com fragmentos de hifas, mas não envolvidos por estas. Os ascos são compostos por oito ascósporos, estruturas transparentes, habitualmente ovais e lisas, com dimensões que variam de 2,8-4,0 x 3,4-5,6 µm. As formas anamorfas ou imperfeitas de *B. nivea* e *B. fulva* são *Paecylomyces niveus* e *Paecylomyces fulvus*, respectivamente. As colônias de *B. nivea* geralmente são brancas em Agar Extrato de Malte (MEA) ou Agar Czapeck Extrato de Levedura (CYA) e apresentam ascos menores que de *B. fulva*, que apresentam colônias marrons amareladas, nos mesmos meios de crescimento (BEUCHAT & RICE, 1979)

***Neosartorya* sp**

Os fungos deste gênero apresentam cleistotécios, que envolvem os ascos dando às colônias uma aparência granular. *N. fischeri* é a única espécie significativa e reconhecida como deteriorante de alimentos, e possui três variedades: *N. fischeri* var. *fischeri*, *N. fischeri* var. *glabra* e *N. fischeri* var. *spinosa* que se diferenciam entre si pela ornamentação dos ascósporos, tipos de toxinas e outros metabólitos secundários. Os ascos são biconvexos com divisão equatorial (NIELSEN, 1991). A coloração das colônias varia entre branco e amarelo; o reverso varia de amarelo a rosa pálido ou marrom. O micélio é branco e há grande produção de cleistotécio. Os ascósporos são elipsoidais ou ovais, de 7 a 8 µm de comprimento e apresentam duas cristas longitudinais. A fase anamorfa é chamada *Aspergillus fischeri*, entretanto estado teleomórfico é o mais encontrado (TOURNAS, 1994).

5.1.2 Incidência

A primeira investigação extensiva sobre a incidência de *Byssochlamys* sp. em frutas e ambientes associados foi feita por OLLIVER & RENDLE (1934), que investigaram o amolecimento de frutas que eram embaladas em bom estado, mas, depois de algumas semanas de estocagem, uma pequena porcentagem dos produtos se desintegrava. Não havia produção de gás visível, alteração de odor ou *flavour* e nenhuma mudança evidente na coloração. As pesquisas demonstraram que o fungo filamentoso *Byssochlamys fulva* era o agente deteriorante e que o solo era a fonte de contaminação inicial.

A incidência de *Byssochlamys* em solos de pomares e vinhedos da América do Norte foi estudada por YATES (1974), que demonstrou a ocorrência deste fungo em amostras de uvas retiradas de caminhões de transporte utilizados por uma vinícola. SPLITTSTOESSER *et al.* (1971) constataram, em estudo sobre a incidência de fungos termoresistentes em pomares e hortas de Nova York, que no solo, bem como nos materiais colhidos deste, se encontravam as maiores concentrações deste tipo de fungo.

Vários trabalhos sobre a incidência de fungos termoresistentes mostram que eles estão distribuídos por vários países como Estados Unidos (MAUNDER, 1969; SPLITTSTOESSER *et al.*, 1971), Dinamarca (JENSEN, 1960), Austrália (SPURGIN, 1964; RICHARDSON, 1965), Holanda (PUT E KRUISWIJK, 1964), Canadá (YATES & MOONEY, 1968), Alemanha (ECKARDT e ARHENS, 1977), Suíça (LÜTHI & HOCHSTRASSER, 1952), Nigéria (UGWUANYI & OBETA, 1991), Iugoslávia (MICKOVSKI, 1962) Índia (RAJASHEKHARA *et al.*, 1996) e no Brasil (EIROA & ALMSTADEN, 1985; BAGLIONI, 1998; ARAGÃO, 1989; SALOMÃO, 2002).

5.1.3 Alimentos Susceptíveis à Contaminação

Os alimentos susceptíveis à deterioração por fungos termorresistentes são frutas e produtos a base de frutas como sucos, polpas, concentrados e frutas enlatadas. Dentre os vários tipos de frutas, aquelas que são colhidas diretamente do solo ou que estão próximas dele, como morango, ameixa, maracujá, uva, abacaxi, pêssego e maçã são as mais afetadas pela deterioração por fungos termorresistentes (TOURNAS, 1994).

A presença de fungos termorresistentes em certas frutas é, sem dúvida, influenciada pela amplitude da exposição ao solo, bem como pela prevalência do fungo no solo onde as frutas crescem (BEUCHAT & RICE, 1979). Algumas linhagens de *Byssochlamys* e de *N. fischeri* têm se tornado um problema industrial, devido à deterioração dos produtos e a produção de micotoxinas (RICE *et al.*, 1977; PATTERSON *et al.*, 1981).

Vários trabalhos demonstram a contaminação de produtos comerciais por fungos termorresistentes. *N. fischeri* já foi isolado de morangos enlatados (McEVOY & STUART, 1970), *drinks* a base de frutas (SPLITTSTOESSER & SPLITTSTOESSER, 1977), de suco concentrado de abacaxi e de maracujá congelados (TOURNAS & TRAXLER, 1994) e *Byssochlamys* de *drink* de uva termicamente processado (SPLITTSTOESSER *et al.*, 1969), suco de maçã (VAN DER RIET & VAN DER WALT (1985), e suco de fruta concentrado (50°Brix) (PALOU *et al.*, 1998).

Os fungos filamentosos termorresistentes foram isolados de polpa de tomate com o objetivo de avaliar a eficiência da pasteurização aplicada a produtos enlatados comerciais. Foram isolados ascósporos de nove linhagens, sendo duas de *B. nivea*, três de *B. fulva* e quatro de *N. fischeri* (KOTZEKIDOU, 1997)

Na Austrália, a deterioração de alimentos por *Byssochlamys* foi reconhecida no início dos anos 60, em morangos enlatados. As matérias primas freqüentemente contaminadas por esporos de fungos termorresistentes são morangos e maracujás,

e, em menor grau abacaxi, e suco e polpa de manga. Sucos e produtos cítricos são raramente implicados (TOURNAS, 1994).

No Brasil, ARAGÃO (1989) isolou 58 culturas de fungos filamentosos termorresistentes a partir de 15 amostras de polpa de morango. Entre os gêneros isolados foram encontrados *B. nivea*, *N. fischeri*, *Talaromyces flavus* var. *flavus* e *Eupenicillium javanicum* var. *javanicum*. BAGLIONI (1998), em estudo sobre a ocorrência de fungos filamentosos durante o processamento asséptico de polpa de tomate, encontrou cinquenta linhagens, sendo que o isolado mais termorresistente, identificado como *N. fischeri* sobreviveu ao choque térmico a 100°C por 25 minutos. SALOMÃO (2002) isolou onze cepas de fungos termorresistentes de néctar de maçã, nove de polpas comerciais congeladas de morango e uva e uma, identificada como *B. fulva*, de suco comercial pasteurizado e preservado com benzoato de sódio e sorbato de potássio. As cepas isoladas foram identificadas *N. fischeri*, *B. fulva* e *Talaromyces* sp., *Eupenicillium* sp. e *Aspergillus* sp.

Poucos trabalhos relatam a presença de fungos termorresistentes em outros produtos além de frutas e derivados de frutas. YATES & FERGUSON (1963) isolaram *B. nivea* de pepinos em salmoura. Estes fungos também foram isolados de leite cru (FREVEL *et al.*, 1985), queijo fresco, leite cru e leite integral (ENGEL & TEUBER, 1991).

5.1.4 Conseqüências do Crescimento em Alimentos

O primeiro sinal da ação de um fungo termorresistente é um ligeiro amolecimento da fruta, sugerindo um supercozimento ou o uso de frutas muito maduras. Pode aparecer um mau cheiro e um gosto rançoso. Em seguida, há uma total desintegração da fruta. Em produtos solidificados, como géis de fruta, os fungos termorresistentes crescem na superfície, deteriorando o produto devido à solubilização do substrato por ação da pectina (HOCHING & PITT, 1984).

Os fungos termorresistentes secretam várias enzimas. Entre as mais comuns estão as pectinases, amilases e proteinases. As enzimas pectinolíticas

produzidas pelos fungos são responsáveis pela hidrólise da pectina, e conseqüentemente, pelo amolecimento da textura das frutas. Além de enzimas, os fungos do gênero *Byssochlamys* podem produzir metabólitos secundários tóxicos, como a patulina, ácido bissoclâmico, bissotoxina A, assimetrina e variotina, e os fungos do gênero *Neosartorya* podem produzir as micotoxinas: fumitremorginas A e C, verruculogena, fischerina e eupenifeldina (TOURNAS, 1994).

Algumas linhagens de *N. fischeri* são capazes de produzir terreina (MISAWA *et al.*, 1962), fumitremorginas A e B (HOIRE & YAHMAZAKI, 1981) e verruculogena (PATTERSON *et al.*, 1981). As últimas três micotoxinas são membros do grupo das fumitremorginas, que inclui ainda fumitremorginas C e TR-2 (COLE *et al.*, 1974). Estas toxinas agem no sistema nervoso central causando tremores, convulsões e a morte de animais (PERERA *et al.*, 1982; YAMAZAKI, *et al.*, 1971; YAMAZAKI, *et al.*, 1979). A verruculogena é a mais tóxica, causando tremores em suínos e ovelhas numa concentração de 5 a 10 mg/kg de peso corporal, administrado por meio intravenal (PERERA *et al.*, 1982).

As condições requeridas para a produção de enzimas pécticas por *B. nivea* foram estudadas por YATES & MOONEY (1968). A produção máxima das enzimas foi obtida em meio contendo glicose e pectina, após cinco dias de incubação a 35°C. UGWUANYI & OBETA (1999) verificaram a atividade de enzimas pectinolíticas e celulolíticas produzidas por *Neosartorya* spp., *B. nivea* e *Paecilomyces varioti* em dois meios artificiais, um contendo pectina e outro contendo tecido de manga. A desintegração do tecido de manga por estas enzimas também foi avaliada. Foram identificadas, para todos os isolados, em meio artificial, as atividades de hidrolases, liases e pectinases, e para *B. nivea* uma grande atividade de celulasas.

NIELSEN *et al.* (1988) demonstraram que as temperaturas ótimas para produção de verruculogena e fumitremorginas A e C, em Agar Czapek Extrato de Levedura (CYA) a pH 7,0, foram 25, 30 e 37°C, respectivamente. A produção de fumitremorgina foi retardada à temperatura de 15°C, mas uma extensão do período de incubação resultou numa concentração aproximadamente igual à observada a 25°C. O uso de luz aumentou a produção de fumitremorgina em CYA (pH 3,5, 25°C), mas não tão drasticamente como quando foi adicionada glicose, frutose ou sacarose

no meio de crescimento (CYA, pH 3,5, 25°C) . O crescimento e a produção de fumitremorgina foi maior à atividade de água de 0,98 em CYA suplementado com glicose ou frutose e à atividade de 0,99 em CYA suplementado com sacarose. O crescimento e a produção de fumitremorgina foram observados em atividades de água tão baixas quanto 0,925 em CYA suplementado com glicose, mas não em atividades de água menores que 0,97 em CYA suplementado com sacarose. Verruculogena foi produzida em grandes quantidades em todos os meios testados, seguido de fumitremorgina A e fumitremorgina C.

Segundo LEGGOTT & SHEPHARD (2001), o controle da patulina em sucos e derivados de frutas pode ser alcançado utilizando-se matéria-prima sadia, estocagem em atmosfera controlada, retirando-se frutas rompidas ou danificadas, retirando-se os tecidos rompidos, filtração com carvão ativado, fermentação do suco de maçã, adição de dióxido sulfúrico, adição de ácido ascórbico, irradiação e pasteurização.

A capacidade de dez linhagens de *B. fulva* e três de *B. nivea* quanto à produção de patulina, em meio sintético, foi avaliada por RICE *et al.* (1977). Duas, das três linhagens de *B. nivea*, e, as dez de *B. fulva*, produziram patulina. Uma das linhagens de *B. fulva* foi inoculada em treze sucos de frutas processados, que foram então incubados a 25°C por 14 dias, para posterior quantificação de patulina. A patulina foi encontrada em todos os sucos, com exceção do suco de ameixa seca e de tomate.

5.1.5 Controle do Crescimento

O crescimento dos microrganismos é influenciado por vários fatores normalmente divididos em intrínsecos (pH, atividade de água, potencial de oxido-redução, conteúdo de nutriente, compostos antimicrobianos e estrutura biológicas) e extrínsecos (temperatura de conservação, umidade relativa do ambiente, presença e concentração de gases no ambiente) (JAY, 1992).

Dentre os fatores extrínsecos, a temperatura é um dos mais importantes no controle do crescimento dos microrganismos. No entanto, a temperatura não pode ser utilizada no controle do crescimento de fungos filamentosos termorresistentes devido à resistência dos ascósporos. Para destruição dos ascósporos seria necessário um tratamento térmico severo que comprometeria a textura, as características organolépticas, nutricionais e a qualidade do produto, portanto, outros fatores devem ser manipulados para controle do crescimento de fungos termorresistentes (TOURNAS, 1994).

O efeito da temperatura no crescimento de fungos termorresistentes foi o primeiro parâmetro estudado na tentativa de prevenir a deterioração de frutas processadas. OLLIVER & RENDLE (1934) verificaram que a temperatura ótima para crescimento de *Byssochlamys* estava entre 30 e 37°C, e que estocando o produto de -12 a -7°C o crescimento era inibido, não significando no entanto, a morte do microrganismo. BEUCHAT e TOLEDO (1977) mostraram que não houve crescimento de *B. nivea* em sucos e néctares de frutas estocados a 7°C e que a estocagem de ascósporos a 7 e -30°C teve um efeito letal. Entretanto, adicionando-se açúcar nos produtos observou-se um efeito protetor.

NIELSEN *et al.* (1988) relataram que *N. fischeri* cresceu de 10 a 52°C, com uma temperatura ótima entre 26 e 45°C. Segundo TOURNAS (1989), o crescimento ótimo e a formação de ascósporos de *Neosartorya fischeri* ATCC 66781, em meio CYA, se deu entre as temperaturas de 30 e 36°C, e não foi observado o crescimento a 10°C e a temperaturas inferiores.

ECKARDT e ARHENS (1978) estudaram a sobrevivência de conídios e ascósporos de *B. fulva* em água destilada a -18°C, por um período de 34 semanas,

e observaram um declínio dos conídios viáveis, mas uma sobrevivência relativamente constante do número de ascósporos sobreviventes. Estes resultados indicam que, embora a inativação dos ascósporos não possa ser assegurada, o crescimento de *Byssochlamys* e *Neosartorya*, pode ser controlado estocando-os em temperaturas reduzidas (TOURNAS, 1994)

O efeito da atividade de água no crescimento de fungos termorresistentes também tem sido objetivo de muitos trabalhos. Segundo BEUCHAT & RICE (1979), embora a baixa atividade de água em concentrados de frutas pareça aumentar a preservação destes produtos, este fator não deve ser utilizado no controle da deterioração por fungos termorresistentes em latas de frutas processadas, pois as concentrações de sacarose se encontram em uma faixa que permite a germinação de ascósporos e crescimento de *Byssochlamys*. OBETA & UGWUANYI (1997) em estudos sobre o crescimento de *N. fischeri*, *N. fischeri* var. *spinosa* e *N. quadricincta*, em ágar contendo sucos de frutas, também observaram que, embora a adição de sacarose em concentrações da ordem de 30% resultou em uma diminuição do número de colônias formadas, a adição de sacarose em níveis de 10% resultou em um aumento destas.

Para *Byssochlamys* sp. a atividade de água mínima para que ocorra a germinação é 0,84, segundo BEUCHAT & TOLEDO (1977). TOURNAS (1989) demonstrou que espécies de *Byssochlamys* cresceram em substratos com pH entre 2,0 e 9,0, enquanto que o crescimento de *N. fischeri* foi observado entre os valores de pH de 3,0 e 7,95. Poucos trabalhos trazem informações sobre a faixa de pH ou o pH ótimo de crescimento de outros fungos termorresistentes, mas sabe-se que crescem muito bem em regiões de acidez. Deste modo, a manipulação do pH para restrição do crescimento seria impraticável, pois seriam necessários valores muito baixos de pHs, inadequados para produtos alimentícios (TOURNAS, 1994).

5.1.6 Ativação de Esporos de Fungos

TOURNAS (1994) diz que, de acordo com GOTTLIEB (1964), germinação é o processo pelo qual o esporo é transformado de um estágio de dormência para um estado de alta atividade metabólica. Esta alta atividade é refletida na ativação de processos produtores de energia necessária na síntese de proteínas e subsequente formação do microrganismo. A ativação do processo produtor de energia, caracterizado por altas taxas de respiração, pode ser iniciada por um choque térmico, por aplicações de compostos químicos, presença e ausência de luz e outros.

Segundo RAJASHEKHARA *et al.* (1996), a ativação de uma linhagem de *N. fischeri*, isolada de mamão papaia deteriorado, foi ótima a 80°C de 15 a 30 minutos.

SPLITTSTOESSER *et al.* (1972) mostrou que havia uma interação entre o meio de aquecimento e a temperatura do choque quando a temperatura de 60°C era utilizada, sendo que, em temperaturas mais altas (70 a 80°C), a influência do meio era menos pronunciada. Mais tarde, SPLITTSTOESSER & SPLITTSTOESSER (1977), ainda estudando a relação entre a taxa de ativação e o meio de aquecimento, verificaram que a ativação de *N. fischeri* era mais rápida em suco de uva a 5°Brix em relação a água destilada. KOTZEIKIDOU (1997) também estudando a ativação de *N. fischeri*, constatou que esta era maior em suco de tomate que em tampão fosfato.

Curvas de ativação, a 85°C, utilizando-se tampão fosfato (0,1M e pH 7,0) como meio de aquecimento para três linhagens de *N. fischeri* foram feitas por BEUCHAT (1986). Para as três linhagens, os ascósporos com 64 dias apresentaram um comportamento semelhante, com um tempo ótimo de 15 minutos. ARAGÃO (1989) obteve o tempo ótimo de 10 minutos, a 80°C, para ativação para ascósporos de *N. fischeri* em suco de morango (15°Brix e pH 3,0). BAGLIONI (1998) depois de selecionar o fungo filamentoso mais termorresistente, identificado como *N. fischeri*, verificou que os tempos onde se obteve maior recuperação de ascósporos, a 85°C, foram 10 e 20 minutos, para ascósporos com 1 e 3 meses de idade, respectivamente. Segundo SALOMÃO (2002), ascósporos de *N. fischeri* com 1 mês

de idade, ativados em suco de maçã (11,3°Brix) a diferentes valores de pH (2,5, 3,5 e 4,5), apresentaram o mesmo tempo de ativação ótima de 10 minutos a 85°C.

CAPÍTULO III
MATERIAL E MÉTODOS

1 FUNGOS TERMORRESISTENTES

Foram avaliados os crescimentos de dois fungos filamentosos termorresistentes: *Neosartorya fischeri* e *Byssochlamys nivea*.

Neosartorya fischeri

Uma suspensão de esporos de *Neosartorya fischeri*, isolada por BAGLIONI (1998), foi fornecida pelo Laboratório de Termobacteriologia da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP. A suspensão fornecida se encontrava pronta para uso e foi utilizada na avaliação do crescimento deste fungo.

Byssochlamys nivea

A partir de uma cepa de *Byssochlamys nivea*, isolada por ARAGÃO (1989) no Laboratório de Termobacteriologia da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, foi preparada uma suspensão de esporos.

1.1 PREPARO DA SUSPENSÃO DE ASCÓSPOROS DE *B. nivea*

A suspensão de *B. nivea* foi preparada em garrafas de Roux, seguindo a metodologia descrita por SALOMÃO (2002). Um fragmento da colônia do fungo foi transferido para 22 tubos com tampa rosqueável contendo 0,5 mL de solução 0,05% de Tween 80 cada, utilizada para dispersão do fragmento.

O conteúdo dos tubos foi utilizado para inocular, com auxílio de uma pipeta estéril, 22 garrafas de Roux (1L), contendo aproximadamente 200 mL de Agar Extrato de Malte (MEA), pH 5,4 (formulado conforme PITT & HOCKING, 1985), cada uma. As garrafas foram incubadas a 30°C, por um período de 30 dias para permitir a esporulação e o desenvolvimento das estruturas produtoras de ascos e ascósporos.

Após o período de incubação, os esporos de *B. nivea* foram recolhidos adicionando-se vinte e cinco mililitros de água destilada estéril em cada garrafa, e raspando-se levemente a superfície de cada uma, com o auxílio de pérolas de vidro e uma bagueta de vidro estéril. Para remoção de fragmentos de hifas, a suspensão

resultante foi filtrada através de camadas de gaze estéril e centrifugada a 4000 rpm por 30 minutos sob uma temperatura de 5°C. Posteriormente, foi realizada a lavagem do precipitado com mais uma centrifugação em água estéril. A ausência de hifas e a obtenção de ascósporos e ascos livres foram verificadas microscopicamente. A suspensão final foi preparada ressuspendendo-se o precipitado em um pequeno volume de água. A suspensão foi estocada sob refrigeração em um recipiente de vidro estéril.

1.2 QUANTIFICAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE ESPOROS

Para a determinação da concentração das suspensões de esporos de *N. fischeri* e *B. nivea*, estas foram ativadas a 80°C por 30 minutos (RAJASHEKHARA *et al.*, 1996). Após permanecer 30 minutos a 80°C, a suspensão foi imediatamente resfriada em um banho de gelo. A partir das suspensões ativadas foram feitas diluições decimais sucessivas, sendo cada diluição plaqueada por profundidade, em duplicata, utilizando o meio Ágar Extrato de Malte (MEA), formulado de acordo com PITT & HOCKING (1985). Após três dias de incubação a 30°C, foi feita a contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) de cada placa. A contagem foi confirmada no quinto dia.

1.3 MEIO DE CRESCIMENTO

Foram utilizados sucos comerciais de abacaxi e de maracujá, de um único fabricante. Para que as polpas dos sucos não interferissem na determinação da biomassa, estas foram removidas por centrifugação, a 4500 rpm durante 20 minutos. Os sucos foram centrifugados, em tubos de ensaio descartáveis à temperatura de 5°C.

Como os valores de pH dos sucos se encontravam próximos de 3,5 (WTW pH 330i/SET) após a centrifugação, o que favorece o crescimento de fungos, este valor foi selecionado para a padronização dos mesmos. O pH do suco de abacaxi foi ligeiramente diminuído utilizando-se uma solução 0,5 N de ácido clorídrico e o pH do

suco de maracujá aumentado utilizando-se uma solução de 0,1N de hidróxido de sódio.

O crescimento de *N. fischeri* foi avaliado apenas em suco de abacaxi, enquanto o crescimento de *B. nivea* foi avaliado em suco de abacaxi e de maracujá. Os meios de crescimento, as temperaturas de incubação e o número de repetições dos experimentos realizados para cada tipo de fungo estão na Tabela 3.1

Tabela 3.1 - Condições para Determinação dos Parâmetros de Crescimento de *N. fischeri* e *B. nivea*

Fungo Filamentoso	Meio de crescimento	Temperatura	Nº de repetições
<i>N. fischeri</i>	Suco de abacaxi	30°C	2
<i>B. nivea</i>	Suco de abacaxi	20°C	2
		30°C	7
	Suco de maracujá	20°C	2
		30°C	2

2 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS TERMORRESISTENTES

O crescimento dos fungos foi avaliado individualmente para cada tipo de suco. Foram adicionados 18 mL de suco em frascos erlenmeyers de 100 mL. Os frascos preenchidos foram aquecidos a 115°C por 2 minutos para pasteurização do suco. Após a pasteurização, a quantidade de sólidos solúveis foi medida por um refratômetro (Baush & Lomb). Os frascos foram inoculados com 2 mL da suspensão de esporos, previamente ativada (80°C/30 minutos). Depois de inoculados, os frascos contendo aproximadamente 10^3 UFC/mL foram incubados em estufa, na temperatura de interesse.

2.1 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS TERMORRESISTENTES POR CONTAGEM DE COLÔNIAS.

De acordo com a temperatura de incubação, foram estabelecidos dias de amostragem para construção da curva de crescimento. Nos dias pré-estabelecidos, um erlenmeyer foi retirado da estufa. A partir deste erlenmeyer, foram feitas diluições decimais sucessivas em tubos com tampa rosqueável contendo 9 mL água estéril. O conteúdo do erlenmeyer (suco + colônia) foi homogeneizado com auxílio de uma barra magnética estéril, em um agitador magnético durante 5 minutos (Fisaton mod. 752). As diluições a serem plaqueadas foram definidas segundo a fase de crescimento do fungo e o tipo de fungo. O plaqueamento foi feito por profundidade, em duplicata, com meio Agar Extrato de Malte (MEA). As placas foram incubadas em estufa a 30°C e as contagens feitas no terceiro e confirmadas no quinto dia.

2.2 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS TERMORRESISTENTES POR FILTRAÇÃO.

A avaliação do crescimento por filtração foi realizada paralelamente a avaliação por contagem de colônias. Nos mesmos dias de amostragem, um outro erlenmeyer foi retirado da estufa para avaliação do crescimento do fungo pelo método de filtração. O conteúdo de cada erlenmeyer foi filtrado, com o auxílio de uma bomba a vácuo, em papel filtro de Whatman n°1 (AKPOMEDAYE & EJECHI, 1998), previamente seco e pesado. O papel filtro contendo a biomassa foi seco em estufa a 90°C até peso constante.

A Figura 3.1 mostra um esquema da metodologia utilizada.

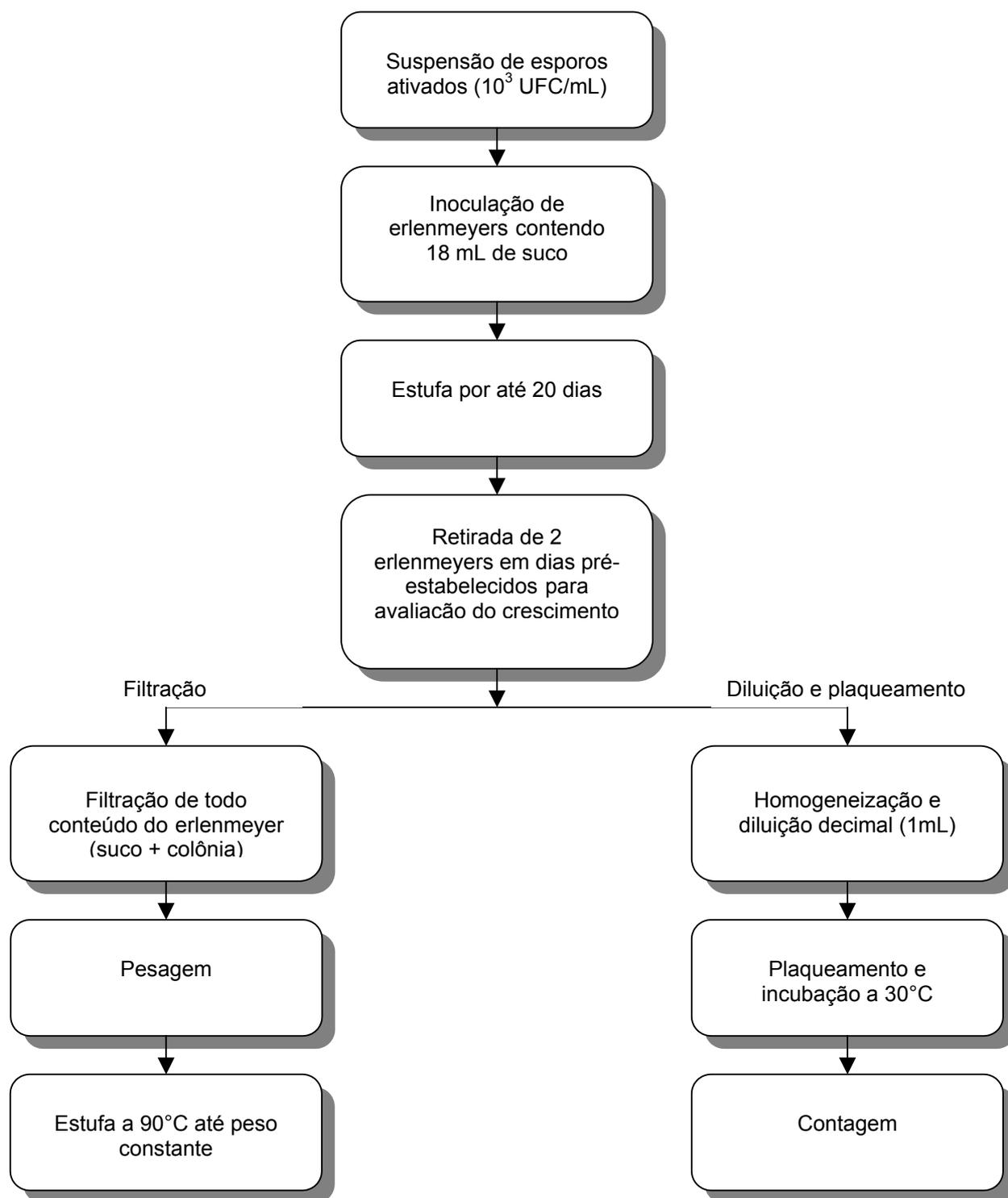


Figura 3. 1 – Esquema da Metodologia Utilizada para Avaliação do Crescimento de Fungos Filamentosos Termorresistentes

3 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO DE *N. fischeri* e *B. nivea*

3.1 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO PELO MÉTODO GRÁFICO

O crescimento de uma cultura microbiana pode ser representado pelo gráfico do logaritmo do número de células contra o tempo. A Figura 3.2 apresenta uma típica curva de crescimento, de onde os seguintes parâmetros podem ser obtidos: λ (h), que representa a duração da fase lag, ou fase de adaptação; μ (h^{-1}) que representa a taxa de crescimento exponencial, ou seja, a velocidade máxima do crescimento celular na fase exponencial e A, que é o aumento de ciclos logarítmicos atingido pela população no final da fase estacionária.

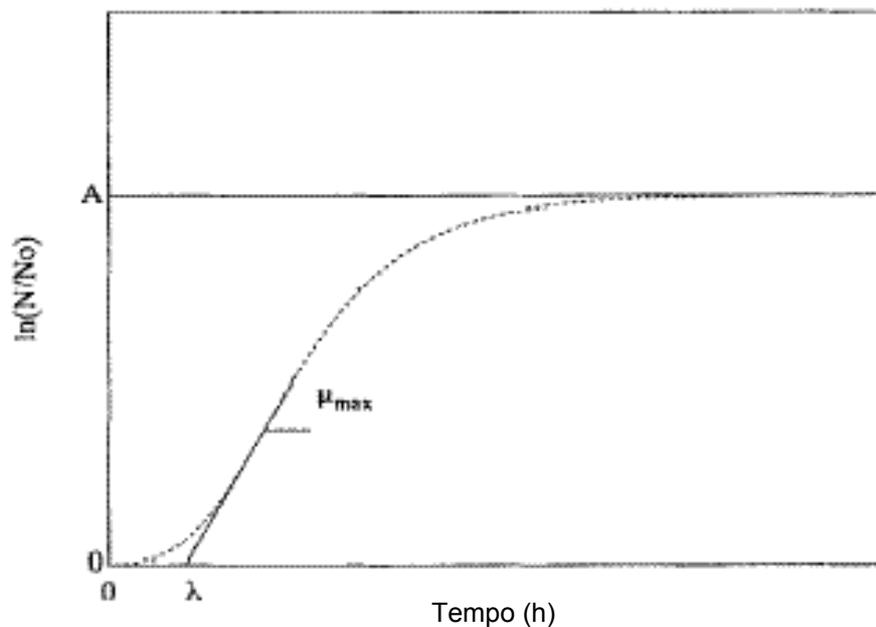


Figura 3.2– Curva Típica de Crescimento Microbiano

A velocidade específica de crescimento (μ) pode ser calculada a partir do modelo de Monod (SCHAFFNER & LABUZA, 1997)

$$\ln (N/N_0) = \mu t \quad (3.1)$$

onde N é o número de microrganismos no tempo t e N_0 é o número inicial de microrganismos.

Para cada repetição, a partir dos dados obtidos por contagem de colônias, foi construído um gráfico com o logaritmo natural da concentração celular ($\ln N/N_0$) x tempo. O valor de μ (h^{-1}) foi encontrado traçando-se uma reta na fase de crescimento exponencial da curva, considerando-se que μ é o valor do coeficiente angular desta reta. A duração da fase lag, λ (h), foi obtida prolongando-se a reta que representa a fase de crescimento exponencial até o eixo das abscissas. A reta da assíntota superior foi prolongada até o eixo das ordenadas e a quantidade de ciclos logarítmicos aumentada foi encontrada pela equação 3.2

$$A = \frac{\log (N/N_0)}{e} \quad (3.2)$$

3.2 ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO PELO MODELO DE GOMPERTZ

A função ou Modelo de Gompertz, apresentada pela Equação 2.1, foi ajustado aos valores da variação do peso da biomassa ($\log B/B_0$) ao longo do tempo (h), através do software STATISTICA 5.11. Os parâmetros da equação λ (h^{-1}), μ (h), e A, foram calculados pelas Equações 2.2; 2.3 e 2.4.

3.3 ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO PELO MODELO DE GOMPERTZ MODIFICADO

O Modelo de Gompertz foi modificado (ZWIETERING *et al.*, 1990), ou reparametrizado, para que os parâmetros fornecidos por este, tivessem um significado biológico. A função de Gompertz Modificada, apresentada pela Equação 2.5, foi ajustada aos dados obtidos experimentalmente, através do software STATISTICA 5.11. Foram fornecidos os valores de $\log(N/N_0)$ x tempo e os parâmetros da equação λ (h^{-1}), μ (h), e A foram estimados pelo *software* com os respectivos valores de erro padrão.

3.4 FÓRMULAS PARA CALCULAR O ERRO

A fórmula utilizada pelo software STATISTICA 5.11 para o cálculo do erro padrão (Std. Err.) é a seguinte:

$$\text{Std.Err} = \sqrt{(s^2/n)} \quad (3.3)$$

onde:

s^2 = variância.

n = tamanho da amostra.

A variância foi calculada pela Equação 3.4

$$s^2 = \left(\sum \frac{(x_i - \bar{x})^2}{n-1} \right) \quad (3.4)$$

onde:

\bar{x} = média da amostra

n = tamanho da amostra

Como os parâmetros de crescimento foram calculados para cada curva separadamente, e o resultado final dado como a média destes dois valores, o intervalo de confiança foi calculado pela Equação 3.5

$$x_m \pm 1,96 \left(\frac{\sigma}{\sqrt{n}} \right) \quad (3.5)$$

onde

x_m = valor médio

σ = desvio padrão

Os valores de $\log(N/N_0)$ calculados pelo Modelo de Gompertz Modificado foram comparados aos valores obtidos experimentalmente através do erro percentual (Equação 3.6). A mesma comparação foi feita entre os parâmetros de crescimento obtidos graficamente e estimados pelo Modelo de Gompertz Modificado. Comparações semelhantes entre os valores de parâmetros preditos e observados têm sido encontradas na literatura (DAVEY, 1994; DAVEY & DAUGHTRY, 1995).

$$\text{Erro percentual} = \left(\frac{|\text{OBS} - \text{PRED}|}{\text{OBS}} \right) * 100 \quad (3.6)$$

onde:

OBS = valor observado

PRED = valor predito

CAPÍTULO IV
RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 PADRONIZAÇÃO DOS SUCOS

Os sucos de abacaxi e maracujá, de um único fabricante, foram adquiridos no comércio local. Para que a polpa, presente nos dois tipos de sucos, não interferisse na quantificação da biomassa pela medida do peso (método de filtração), os sucos foram centrifugados. Após a centrifugação, o pH dos sucos foi padronizado para 3,5. O suco foi pasteurizado a 115°C/2 min e a quantidade de sólidos solúveis medida. Os valores médios de sólidos solúveis medidos, para os sucos de abacaxi e maracujá foram, respectivamente, de 12 e 10°Brix.

2 QUANTIFICAÇÃO DA SUSPENSÃO DE ESPOROS

As suspensões de esporos foram ativadas a 80°C/30 min e quantificadas por diluição e plaqueamento e os resultados obtidos estão na Tabela 4.1.

TABELA 4.1 – Concentração das Suspensões de Esporos de *N. fischeri* e de *B. nivea*

MICROORGANISMO	CONCENTRAÇÃO (UFC/mL)
<i>N. fischeri</i>	$3,80 \times 10^7$
<i>B. nivea</i>	$1,95 \times 10^7$

3 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO DE *N. fischeri*

3.1 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO DE *N. fischeri* EM SUCO DE ABACAXI, A 30°C

Um dos modelos preditivos mais utilizados para descrever o comportamento microbiano é o Modelo de Gompertz Modificado, que fornece os seguintes parâmetros de crescimento: velocidade específica de crescimento, μ (h^{-1}), duração da fase lag, λ (h), e aumento logarítmico da população (A) (MASSON, *et al.*, 2002).

O crescimento de *N. fischeri* foi avaliado apenas pelo método de contagem de colônias e os parâmetros de crescimento foram determinados pelo método gráfico e pelo Modelo de Gompertz Modificado.

Foram realizadas duas repetições das curvas de crescimento e as contagens obtidas para cada curva encontram-se no Anexo I. Os parâmetros de crescimento determinados pelo método gráfico foram calculados para cada repetição, separadamente, como pode ser visto na Figura 4.1. Abaixo de cada curva é apresentada a equação da reta que representa a fase exponencial de crescimento.

Os valores dos parâmetros microbiológicos de crescimento obtidos são apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Parâmetros da Curva de Crescimento de *N. fischeri* em Suco de Abacaxi a 30°C (obtidos graficamente)

	PARÂMETROS		
	λ (h)	μ (h^{-1})	A
Repetição 1	77,50	0,04	1,74
Repetição 2	50,00	0,06	1,95
Valor médio	63,75 (\pm 26,95) ¹	0,05 (\pm 0,02)	1,85 (\pm 0,21)

¹Intervalo de confiança.

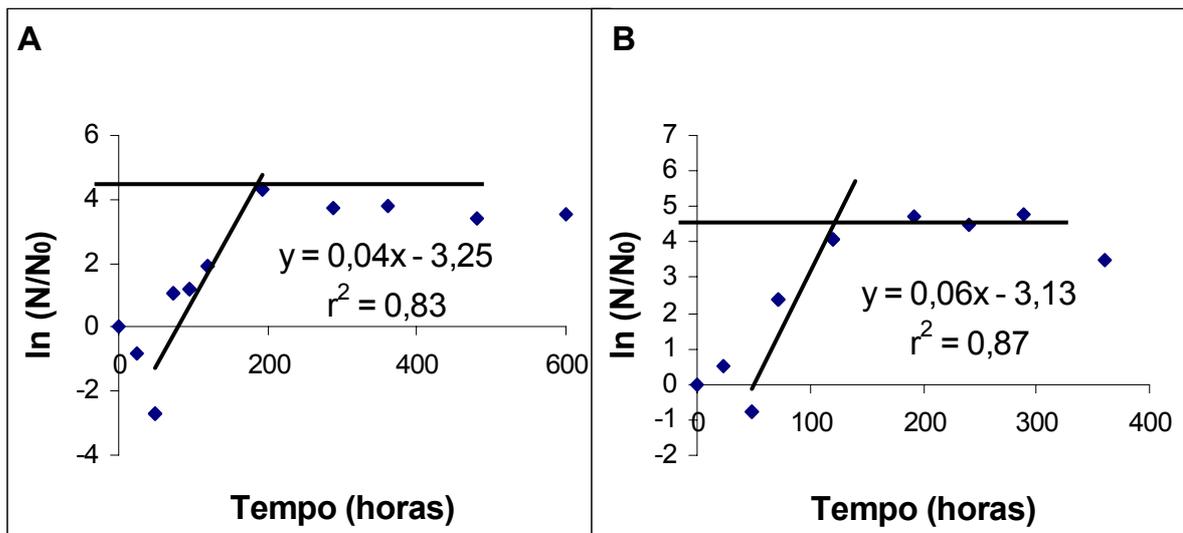


Figura 4.1 – Determinação Gráfica dos Parâmetros de Crescimento de *N. fischeri* em Suco de Abacaxi a 30°C (A = Repetição 1, B = Repetição 2)

O ajuste do Modelo de Gompertz Modificado aos dados experimentais é mostrado na Figura 4.2.

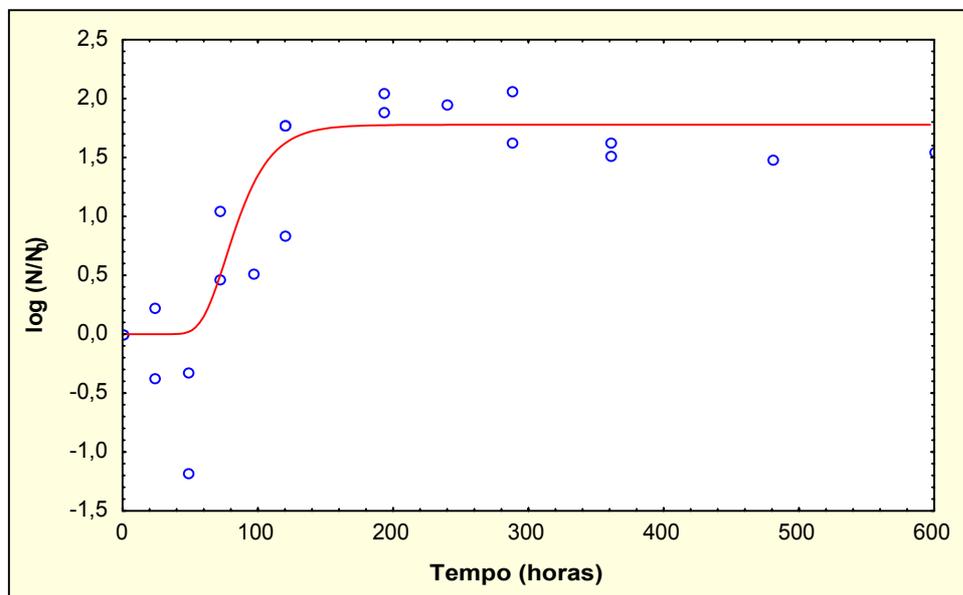


Figura 4.2 - Modelo de Gompertz Modificado Ajustado às Curvas de Crescimento de *N. fischeri* em Suco de Abacaxi, a 30°C

A equação resultante do ajuste do Modelo de Gompertz Modificado com o respectivo valor do coeficiente de correlação (r^2) é apresentada pela Equação 4.1

$$\log(N/N_0) = (1,78) * \exp\left(-\exp\left(\frac{0,04 \exp(1)}{1,78}\right) * (58,24 - t) + 1\right) \quad (4.1)$$

$$r^2 = 0,90$$

Os valores dos parâmetros de crescimento estimados pelo Modelo de Gompertz Modificado são apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Parâmetros de Crescimento de *N. fischeri*, em Suco de Abacaxi, a 30°C, estimados pelo Modelo de Gompertz Modificado

	PARÂMETROS		
	λ (h)	μ (h ⁻¹)	A
Valor estimado	58,24	0,04	1,78
Erro padrão	7,20	0,01	0,12

A Figura 4.2 mostra que o crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi se caracterizou por uma diminuição da população durante a fase lag, o que não é previsto pelo modelo. É bem possível que este decréscimo coincida com a fase de germinação do esporo, já que os sucos foram inoculados com suspensões de esporos com posterior crescimento vegetativo. O Modelo de Gompertz não descreve esta diminuição, seguida da germinação dos esporos. Entretanto, a duração desta fase coincidiu com a duração observada experimentalmente.

A Tabela 4.4 fornece os valores de $\log(N/N_0)$ observados, os valores preditos pelo Modelo de Gompertz Modificado e o erro percentual entre eles.

Tabela 4.4 – Comparação entre os Valores de $\log (N/N_0)$ de *N. fischeri*, em Suco de Abacaxi a 30°C Preditos pelo Modelo e Observados Experimentalmente

TEMPO (h)	log (N/N ₀)		
	OBSERVADOS	PREDITOS	ERRO (%)
0,00	0,00	0,00	0,00
0,00	0,00	0,00	0,00
24,00	-0,36	0,00	100,00
24,00	0,22	0,00	100,00
48,00	-0,33	0,02	104,60
48,00	-1,18	0,02	101,30
72,00	1,04	0,49	52,60
72,00	0,47	0,49	5,60
96,00	0,52	1,26	142,80
120,00	1,78	1,62	9,10
120,00	0,83	1,62	94,00
192,00	1,88	1,77	5,90
192,00	2,05	1,77	13,60
240,00	1,95	1,78	9,10
288,00	1,62	1,78	9,50
288,00	2,07	1,78	14,00
360,00	1,52	1,78	16,70
360,00	1,64	1,78	8,50
480,00	1,48	1,78	20,30
600,00	1,54	1,78	15,10

Analisando-se a Tabela 4.4 pode-se perceber que os erros permaneceram altos até 48 horas, período em que o fungo se encontra na fase de adaptação e/ou germinação. Estes dados confirmam que, como houve uma diminuição da população neste período, o modelo não se ajustou bem nesta fase. O distanciamento dos pontos, observados neste período de crescimento, certamente contribuiu para a

diminuição do coeficiente de correlação (r^2) do modelo, mesmo que a diferença entre os pontos preditos e os observados nas demais fases da curva seja pequena.

De acordo com LABUZA & FU (1993), a composição do alimento, as condições ambientais, a idade e o estado (injurado ou não) das células no momento da inoculação podem afetar o crescimento dos microrganismos, fazendo-o desviar-se do comportamento típico, apresentando por exemplo, uma diminuição da população na fase lag, como foi aqui observado. Segundo estes autores, o grau desta diminuição depende do estado da microbiota ao ser transferida e das mudanças nas condições ambientais.

Uma comparação entre os parâmetros de crescimento obtidos graficamente e os estimados pelo Modelo de Gompertz Modificado é apresentada na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 – Parâmetros de Crescimento de *N. fischeri* em Suco de Abacaxi, a 30°C, Obtidos Graficamente e Estimados pelo Modelo de Gompertz Modificado

PARÂMETRO	MÉTODO GRÁFICO	MODELO GOMPERTZ MOD.	ERRO (%)
λ (h)	63,75	58,24	8,60
μ (h^{-1})	0,05	0,04	20,00
A	1,85	1,78	3,80

Embora a Tabela 4.4 mostre que os maiores erros pontuais entre os valores de $\log(N/N_0)$ preditos e os observados encontra-se fase lag, na Tabela 4.5, verifica-se que o valor de λ (h) correspondente à duração da fase lag, não difere mais que 8,64% entre o predito e o observado. O maior erro percentual na comparação dos parâmetros de crescimento foi observado entre os valores da taxa de crescimento exponencial, com uma diferença de 20%.

Na Figura 4.2, observa-se que os pontos pertencentes à fase exponencial estão mais dispersos quando comparados com os pontos pertencentes à fase lag e à fase estacionária. Portanto, é natural que o erro na estimativa do valor de μ seja maior que nos demais parâmetros de crescimento.

Devido a uma contaminação da suspensão de esporos de *N. fischeri*, o estudo do crescimento deste fungo não pôde prosseguir. Na seqüência dos experimentos, apenas o crescimento do fungo *B. nivea* foi estudado.

Cabe ressaltar que os parâmetros de crescimento obtidos para *N. fischeri* indicam a possibilidade do rápido crescimento deste fungo, se presente no suco de abacaxi, após, aproximadamente, três dias de armazenamento a 30°C, o que tornaria inviável a comercialização do suco contaminado. Estudos posteriores devem ser realizados para a confirmação dos parâmetros obtidos e a obtenção de parâmetros de crescimento a outras temperaturas.

4 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO DE *B. nivea* EM SUCOS TROPICAIS

Várias pesquisas na literatura mostram a incidência de fungos, pertencentes ao gênero *Byssochlamys*, em sucos e outros derivados de frutas, causando sua deterioração e possível produção de micotoxinas (SPLITTSTOESSER *et al*, 1969; VAN DER RIET & VAN DER WALT, 1985; ENGEL & TEUBER, 1991; PALOU *et al*, 1998; SALOMÃO, 2002).

Foram determinados os parâmetros de crescimento μ (h^{-1}), λ (h) e A de *B. nivea* nos sucos tropicais de abacaxi e maracujá, às temperaturas de 20 e 30°C. Os parâmetros foram estimados pelo Modelo de Gompertz Modificado e comparados aos valores experimentais determinados graficamente. Nos Anexos II e III estão os dados experimentais utilizados para construção das curvas de crescimento.

4.1 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO DE *B. nivea* EM SUCO DE ABACAXI A 20°C

O crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi a 20°C foi avaliado em duas repetições da curva de crescimento. Os parâmetros de crescimento foram determinados pelo método gráfico para cada repetição, separadamente, e o valor médio foi considerado o resultado deste método. Para o ajuste do Modelo de Gompertz todos os dados experimentais foram colocados em um único gráfico.

A Figura 4.3 apresenta as curvas de crescimento de *B. nivea* utilizadas para a determinação dos parâmetros de crescimento pelo método gráfico. A figura apresenta ainda a equação da reta que representa a fase exponencial de crescimento. Os valores dos parâmetros microbiológicos de crescimento obtidos são apresentados na Tabela 4.6.

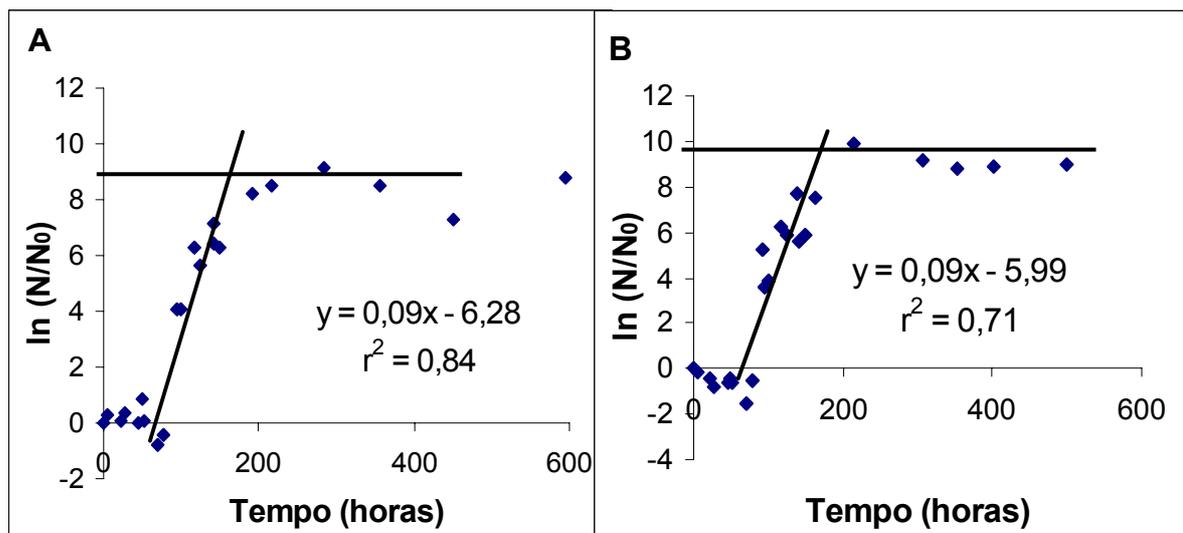


Figura 4.3 – Determinação Gráfica dos Parâmetros de Crescimento de *B. nivea* em Suco de Abacaxi a 20°C (A = Repetição 1, B = Repetição 2)

Tabela 4.6 – Parâmetros de Crescimento de *B. nivea* em Suco de Abacaxi, a 20°C

	PARÂMETROS		
	λ (h)	μ (h ⁻¹)	A
Repetição 1	65,00	0,09	3,90
Repetição 2	66,00	0,09	4,34
Valor médio	65,50 ($\pm 0,98$) ¹	0,09	4,12 ($\pm 0,43$)

¹Intervalo de confiança

A Figura 4.4 mostra o Modelo de Gompertz Modificado ajustado às curvas de crescimento de *B. nivea* obtidas em suco de abacaxi a 20°C.

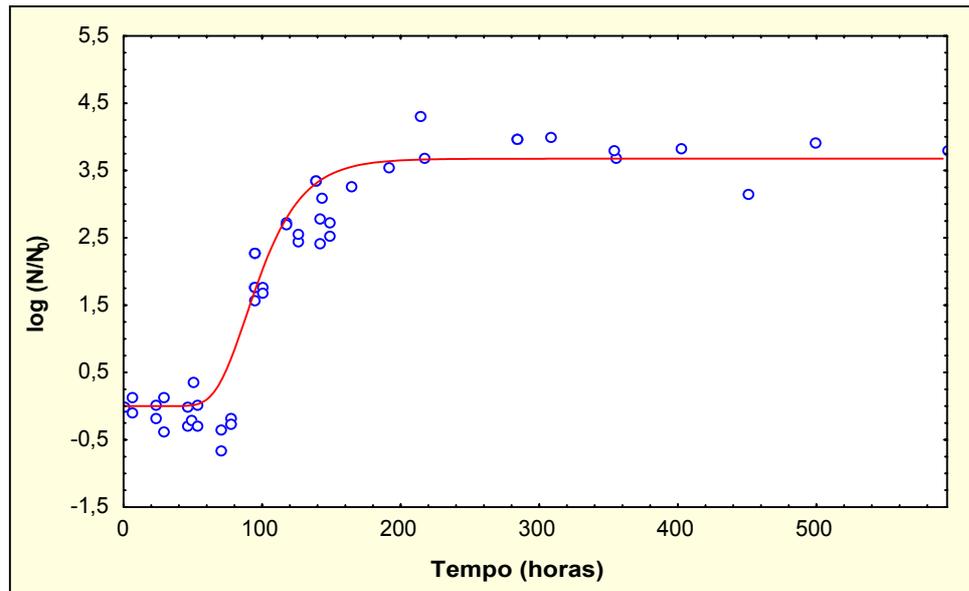


Figura 4.4 – Modelo de Gompertz Modificado Ajustado às Curvas de Crescimento de *B. nivea* em Suco de Abacaxi, a 20°C

A equação 4.2 representa o ajuste do Modelo de Gompertz aos dados experimentais.

$$\log (N/N_0) = (3,67) * \exp\left(-\exp\left(\frac{0,06 * \exp(1)}{3,67}\right) * (66,46 - t) + 1\right) \quad (4.2)$$

$$r^2 = 0,96$$

Pela Figura 4.4, pode-se observar que o modelo se ajustou bem aos dados experimentais, apresentando um coeficiente de correlação de 0,96. A Tabela 4.7 apresenta os valores dos parâmetros de crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi a 20°C preditos pelo Modelo de Gompertz Modificado.

Tabela 4.7 - Parâmetros de Crescimento de *B. nivea* em Suco de Abacaxi, a 20°C, Estimados pelo Modelo de Gompertz Modificado

	PARÂMETROS		
	λ (h)	μ (h ⁻¹)	A
Valor estimado	66,46	0,06	3,67
Erro padrão	4,74	0,01	0,13

A comparação entre os valores dos parâmetros de crescimento obtidos graficamente e os estimados pelo Modelo de Gompertz Modificado é apresentada na Tabela 4.8. Observa-se uma pequena diferença entre os valores observados e preditos para a fase lag, indicando um bom ajuste do modelo para esta fase. Por outro lado, na estimativa da velocidade específica máxima de crescimento, observou-se uma diferença de 33,33 % .

Tabela 4.8 – Parâmetros de Crescimento de *B. nivea*, em Suco de Abacaxi, a 20°C, Obtidos Graficamente e Estimados pelo Modelo de Gompertz Modificado

PARÂMETRO	MÉTODO GRÁFICO	MODELO GOMPERTZ MOD.	ERRO (%)
λ (h)	65,50	66,46	1,47
μ (h ⁻¹)	0,09	0,06	33,33
A	4,12	3,67	10,92

Os valores de log (N/N₀) observados experimentalmente e os preditos pelo Modelo de Gompertz Modificado são apresentados na Tabela 4.9. Como já havia sido observado para *N. fischeri*, na curva de crescimento de *B. nivea* há um distanciamento maior entre os valores pontuais preditos e observados na fase lag, devido à diminuição da população. Apesar desta diferença, o valor predito difere do observado apenas em 1,47%, como foi discutido anteriormente.

Tabela 4.9 – Comparação entre os Valores de $\log (N/N_0)$ de *B. nivea* em Suco de Abacaxi a 20°C, Preditos pelo Modelo e os Observados Experimentalmente

TEMPO (h)	$\log (N/N_0)$		
	OBSERVADOS	PREDITOS	ERRO (%)
0,00	0,00	0,00	0,00
6,00	0,12	0,00	100,00
22,30	-0,19	0,00	100,00
28,00	0,15	0,00	100,00
45,50	0,00	0,00	0,00
49,20	-0,19	0,01	105,26
52,40	0,03	0,02	21,87
77,50	-0,25	0,70	382,19
93,40	2,29	1,63	28,57
94,00	1,77	1,67	5,53
100,00	1,68	2,01	19,75
117,40	2,74	2,79	1,68
125,30	2,46	3,03	23,24
138,10	3,35	3,30	1,61
142,90	3,11	3,37	8,27
148,40	2,54	3,43	35,02
163,60	3,26	3,55	8,86
190,70	3,55	3,64	2,38
216,70	3,70	3,66	0,97
283,70	3,97	3,67	7,40
355,00	3,70	3,67	0,65
402,60	3,85	3,67	4,52
450,30	3,15	3,67	16,48
594,30	3,81	3,67	3,50

4.2 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO DE *B. nivea* EM SUÇO DE ABACAXI, A 30°C.

Para a determinação dos parâmetros biológicos de *B. nivea*, a 30°C, em suco de abacaxi, foram realizadas sete repetições da curva de crescimento. A estimativa dos parâmetros de crescimento, pelo método gráfico, foi feita para cada repetição da curva de crescimento, separadamente. Já o ajuste do Modelo de Gompertz Modificado foi feito em uma única curva de crescimento, contendo todos os pontos observados nos sete experimentos.

Na Tabela 4.10 estão os parâmetros de crescimento obtidos para cada repetição e o valor médio calculado, juntamente com os intervalos de confiança, apresentados entre parênteses. A Figura 4.5 apresenta as sete curvas com as equações de reta obtidas na fase de crescimento exponencial para o cálculo da velocidade específica de crescimento, μ (h^{-1}), com seus respectivos valores do coeficiente de correlação (r^2).

O Modelo de Gompertz Modificado, ajustado às curvas de crescimento, é mostrado na Figura 4.6. Observa-se uma diminuição na contagem da população durante a fase lag, como já observado para *N. fischeri*. Apesar de haver uma grande quantidade de pontos experimentais, estes não estão bem distribuídos ao longo da curva de crescimento, estando mais concentrados durante as fases lag e estacionária. Entretanto, analisando-se o coeficiente de correlação do ajuste, fornecido pela Equação 4.3, verifica-se que o modelo apresentou um bom ajuste ($r^2 = 0,92$)

Tabela 4.10 – Parâmetros de Crescimento de *B. nivea* em Suco de Abacaxi a 30°C Obtidos Graficamente

	PARÂMETROS DE CRESCIMENTO		
	λ (h)	μ (h ⁻¹)	A
Repetição 1	25,00	0,23	4,99
Repetição 2	29,50	0,26	5,21
Repetição 3	34,00	0,34	3,26
Repetição 4	35,00	0,21	3,82
Repetição 5	34,00	0,26	3,91
Repetição 6	20,00	0,23	4,21
Repetição 7	35,00	0,29	3,65
Valor Médio	30,36 (±4,34)	0,26 (±0,03)	4,15 (±0,53)

²Intervalo de confiança.

A equação resultante do ajuste do Modelo de Gomperz Modificado é a seguinte:

$$\log (N/N_0) = (3,9) * \exp\left(-\exp\left(\frac{0,25 * \exp(1)}{3,9}\right) * (36,4 - t) + 1\right) \quad (4.3)$$

$$r^2 = 0,92$$

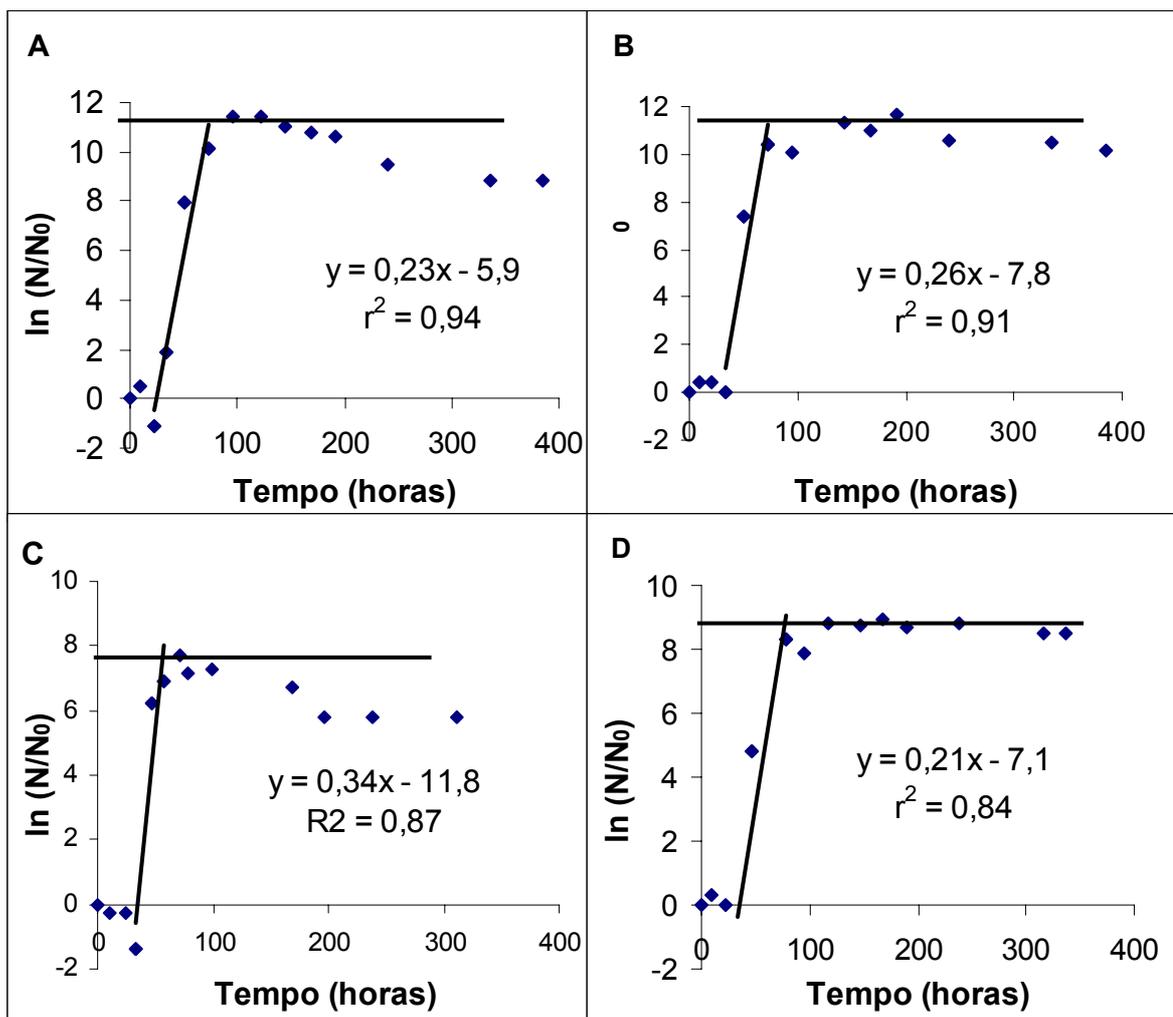


Figura 4.5 – Determinação dos Parâmetros de Crescimento de *B. nivea* em Suco de Abacaxi a 30°C, pelo Método Gráfico (A - Repetição 1, B - Repetição 2, C - Repetição 3, D - Repetição 4) (Continua)

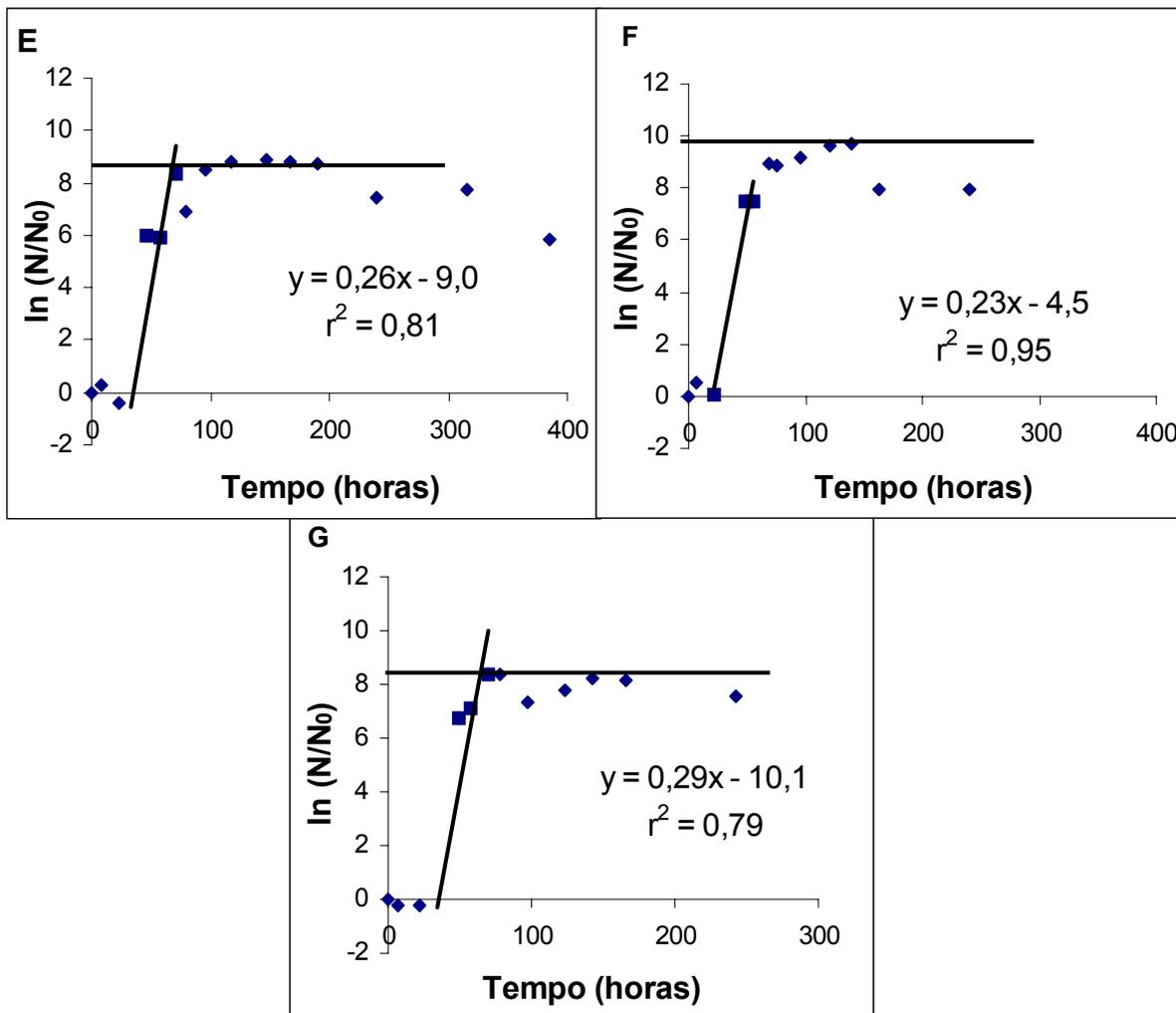


Figura 4.5 – (Continuação) Determinação dos Parâmetros de Crescimento de *B. nivea* em Suco de Abacaxi a 30°C, pelo Método Gráfico (E - Repetição 5, F - Repetição 6, G - Repetição 7)

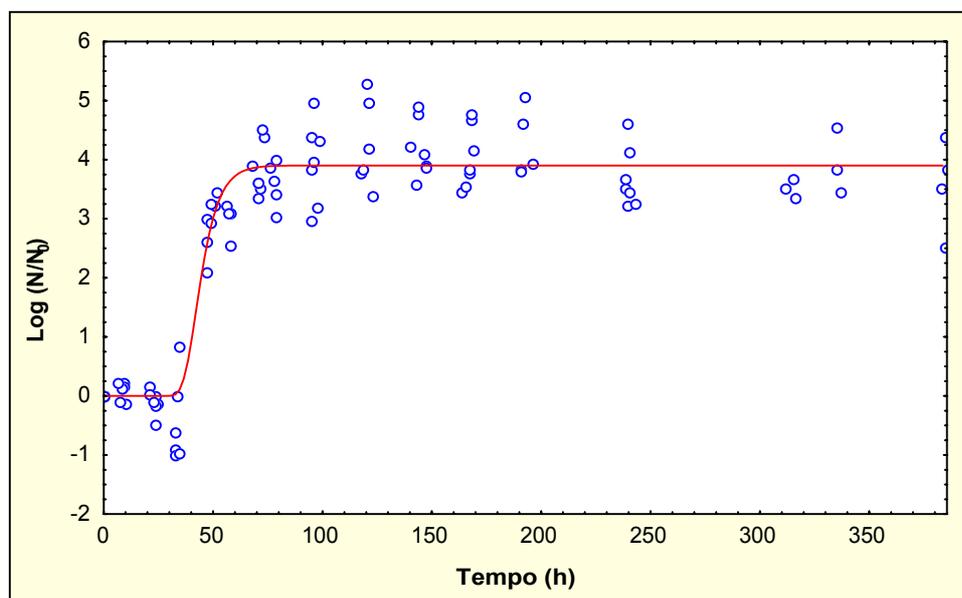


Figura 4.6 - Modelo de Gompertz Modificado Ajustado às Curvas de Crescimento de *B. nivea* em Suco de Abacaxi a 30°C

Na Tabela 4.11 estão os parâmetros de crescimento estimados pelo Modelo de Gompertz Modificado.

Tabela 4.11 - Parâmetros de Crescimento de *B. nivea* em Suco de Abacaxi a 30°C, Estimados pelo Modelo de Gompertz Modificado

	PARÂMETROS		
	λ (h)	μ (h ⁻¹)	A
Valor estimado	36,40	0,25	3,90
Erro padrão	1,80	0,05	0,07

Os valores de $\log (N/N_0)$ observados e preditos pelo Modelo de Gompertz Modificado, bem como o erro calculado entre eles, são fornecidos pela Tabela 4.12. Nota-se que, durante a fase lag, como já observado anteriormente, os erros calculados entre os valores preditos e observados são maiores do que nas demais fases de crescimento, devido à diminuição da contagem microbiana observada. Nas demais fases, um bom ajuste do modelo aos dados experimentais é observado.

Tabela 4.12 - Comparação entre os Valores de $\log(N/N_0)$ de *B. nivea* em Suco de Abacaxi a 30°C Preditos pelo Modelo e Observados Experimentalmente

TEMPO (horas)	$\log(N/N_0)$		ERRO (%)
	OBSERVADOS	PREDITOS	
0,00	0,00	0,00	0,00
9,40	0,22	0,00	100,00
20,50	0,18	0,00	100,00
34,50	0,82	0,22	73,14
46,70	2,10	2,49	18,39
50,70	3,22	3,03	5,78
68,10	3,89	3,76	3,42
73,00	4,39	3,79	13,62
78,30	3,10	3,80	22,84
95,20	3,41	3,82	11,83
117,90	3,82	3,82	0,20
123,10	3,37	3,82	13,10
140,20	4,22	3,82	9,60
147,10	3,87	3,82	1,27
163,50	3,44	3,82	10,82
166,90	3,82	3,82	0,20
192,00	5,06	3,82	24,59
239,30	4,60	3,82	17,07
311,80	2,52	3,82	51,27
335,30	3,82	3,82	0,20
385,50	3,82	3,82	0,20

A Tabela 4.13 apresenta uma comparação entre os valores dos parâmetros de crescimento de *B. nivea* obtidos pelo método gráfico e pelo Modelo de Gompertz Modificado, bem como o erro percentual calculado entre eles. Verifica-se que praticamente não houve diferença entre os valores da velocidade específica máxima de crescimento, μ (h^{-1}) e que a diferença no aumento logarítmico da população foi pequena. A duração da fase lag foi o parâmetro estimado com maior erro percentual (19,89%).

Tabela 4.13 – Parâmetros de Crescimento de *B. nivea* em Suco de Abacaxi a 30°C Obtidos Graficamente e Estimados pelo Modelo de Gompertz Modificado

PARÂMETRO	MÉTODO GRÁFICO	MODELO GOMPERTZ MOD.	ERRO (%)
λ (h)	30,36	36,40	19,89
μ (h^{-1})	0,26	0,25	3,85
A	4,15	3,90	6,02

4.3 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO DE *B. nivea* EM SUCO DE MARACUJÁ A 20°C

Para a determinação dos parâmetros biológicos de *B. nivea*, a 20°C, em suco de maracujá, foram realizadas duas repetições da curva de crescimento. A estimativa dos parâmetros de crescimento, como nos casos anteriores, realizada pelo método gráfico foi feita para cada repetição da curva de crescimento, separadamente. Já o ajuste do Modelo de Gompertz Modificado foi feito em uma única curva de crescimento contendo todos os pontos observados nos dois experimentos. A Figura 4.7 apresenta as duas repetições da curva de crescimento, juntamente com a equação da reta que representa a fase de crescimento exponencial.

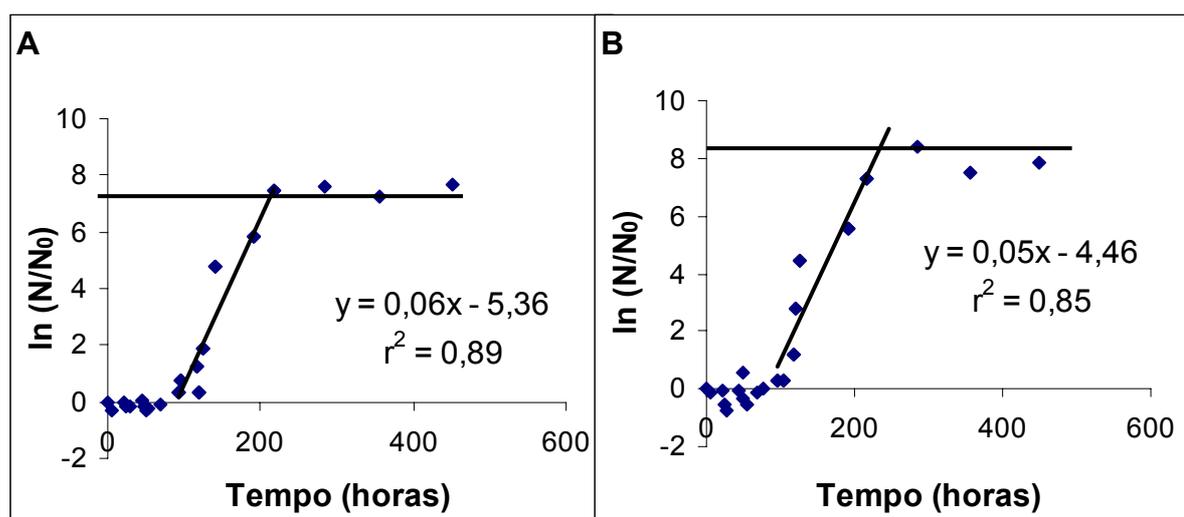


Figura 4.7 – Determinação dos Parâmetros de Crescimento de *B. nivea* em Suco de Maracujá a 20°C, pelo Método Gráfico (A - Repetição 1, B - Repetição 2)

Os parâmetros obtidos graficamente são apresentados na Tabela 4.14, juntamente com os seus valores médios e os respectivos intervalos de confiança.

Tabela 4.14- Parâmetros de Crescimento de *B. nivea* em Suco de Maracujá a 20°C Obtidos Graficamente

	PARÂMETROS		
	λ (h)	μ (h ⁻¹)	A
Repetição 1	90,00	0,06	3,26
Repetição 2	80,00	0,05	3,47
Valor médio	85,0 (\pm 9,80)	0,06 (\pm 0,01)	3,37 (\pm 0,21)

²Intervalo de confiança

A Figura 4.8 mostra o ajuste do Modelo de Gompertz Modificado às curvas de crescimento de *B. nivea* em suco de maracujá a 20°C.

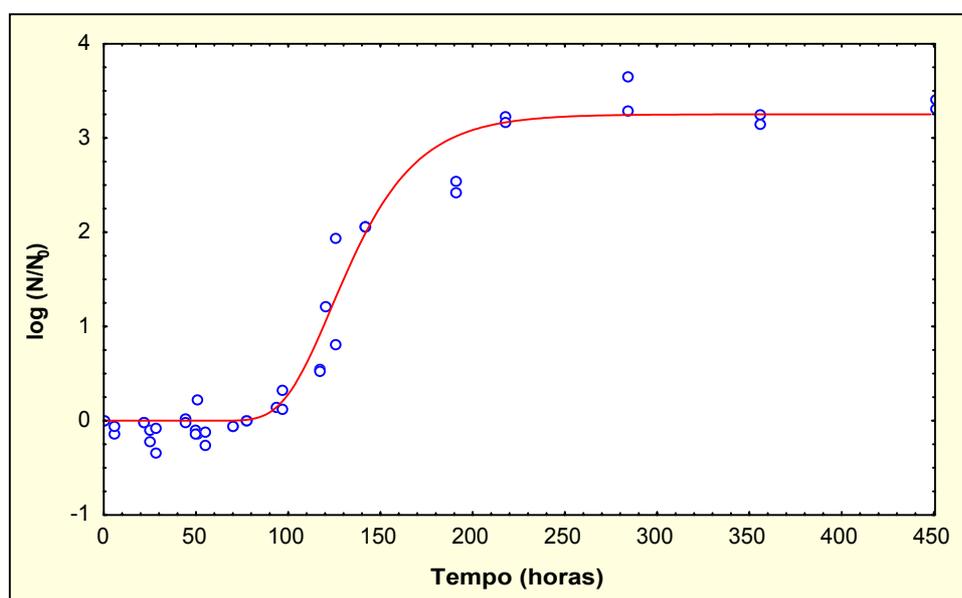


Figura 4.8 - Modelo de Gompertz Modificado Ajustado às Curvas de Crescimento de *B. nivea* em Suco de Maracujá a 20°C

Observa-se uma boa reprodutibilidade dos pontos experimentais, entre as duas curvas de crescimento realizadas, bem como um bom ajuste do modelo em todas as fases de crescimento do fungo.

Os valores dos parâmetros de crescimento estimados pelo Modelo de Gompertz Modificado e os respectivos valores de erro padrão, são apresentados na Tabela 4.15. Observa-se que os valores dos erros são baixos.

A Equação 4.4 representa o ajuste do Modelo de Gompertz Modificado aos dados experimentais. O coeficiente de correlação (r^2) obtido foi de 0,99.

$$\log(N/N_0) = (3,25) * \exp(-\exp(\frac{0,05 * \exp(1)}{3,25}) * (97,33 - t) + 1) \quad (4.4)$$

Tabela 4.15 – Parâmetros de Crescimento de *B. nivea* em Suco de Maracujá a 20°C Estimados pelo Modelo de Gompertz Modificado

	PARÂMETROS		
	λ (h)	μ (h ⁻¹)	A
Valor estimado	97,33	0,05	3,25
Erro padrão	4,46	0,01	0,08

A comparação entre os valores observados e os preditos pelo Modelo de Gompertz Modificado se encontra na Tabela 4.16. Verifica-se uma pequena diferença entre os valores de λ (h) e μ (h⁻¹) observados e estimados pelo modelo.

Tabela 4.16 – Parâmetros de Crescimento de *B. nivea* em Suco de Maracujá a 20°C Obtidos Graficamente e Estimados pelo Modelo de Gompertz Modificado

PARÂMETRO	MÉTODO GRÁFICO	MODELO GOMPERTZ MOD.	ERRO %
λ (h)	85,00	97,33	14,51
μ (h ⁻¹)	0,06	0,05	16,67
A	3,37	3,25	3,56

A Tabela 4.17 mostra a comparação entre os valores de $\log(N/N_0)$ experimentais e os preditos pelo Modelo de Gompertz Modificado, através do cálculo do erro percentual, para cada tempo. Nota-se, apesar do bom ajuste do modelo ($r^2 = 0,99$), o mesmo comportamento observado no estudo do crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi, onde os erros percentuais entre os valores de $\log(N/N_0)$ observados e preditos pelo modelo permanecem altos (100%) até o final da fase lag; nas demais fases as diferenças são menores, sendo em alguns pontos desprezíveis.

Tabela 4.17 – Comparação entre os Valores de $\log(N/N_0)$ de *B. nivea* em Suco De Maracujá a 20°C Preditos pelo Modelo e Observados Experimentalmente

TEMPO (horas)	$\log(N/N_0)$		
	OBSERVADOS	PREDITOS	ERRO (%)
0,00	0,00	0,00	0,00
5,50	-0,12	0,00	100,00
21,10	-0,02	0,00	100,00
24,50	-0,22	0,00	100,00
49,10	-0,09	0,00	100,00
50,30	0,24	0,00	100,00
69,10	-0,05	0,00	102,10
93,00	0,15	0,13	15,30
96,10	0,12	0,19	50,20
117,10	0,55	0,91	64,90
120,20	1,22	1,05	13,90
125,30	0,81	1,29	59,10
125,30	1,94	1,29	33,60
141,20	2,07	1,96	5,10
216,80	3,24	3,16	2,40
216,90	3,17	3,16	0,10
283,90	3,30	3,24	1,70
355,10	3,16	3,25	2,90
355,20	3,26	3,25	0,10
450,60	3,32	3,25	2,10
450,70	3,41	3,25	4,80

4.4 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO DE *B. nivea* EM SUÇO DE MARACUJÁ A 30°C

A avaliação do crescimento de *B. nivea* através dos parâmetros biológicos, μ (h^{-1}), λ (h) e A, em suco de maracujá a 30°C, foi feita realizando-se duas repetições da curva de crescimento. A estimativa dos parâmetros de crescimento, pelo método gráfico foi feita para cada repetição da curva de crescimento, separadamente. Já o ajuste do Modelo de Gompertz Modificado foi feito em uma única curva de crescimento contendo todos os pontos observados nas duas repetições.

A Figura 4.9 mostra a determinação gráfica dos parâmetros de crescimento de *B. nivea* em suco de maracujá a 30°C.

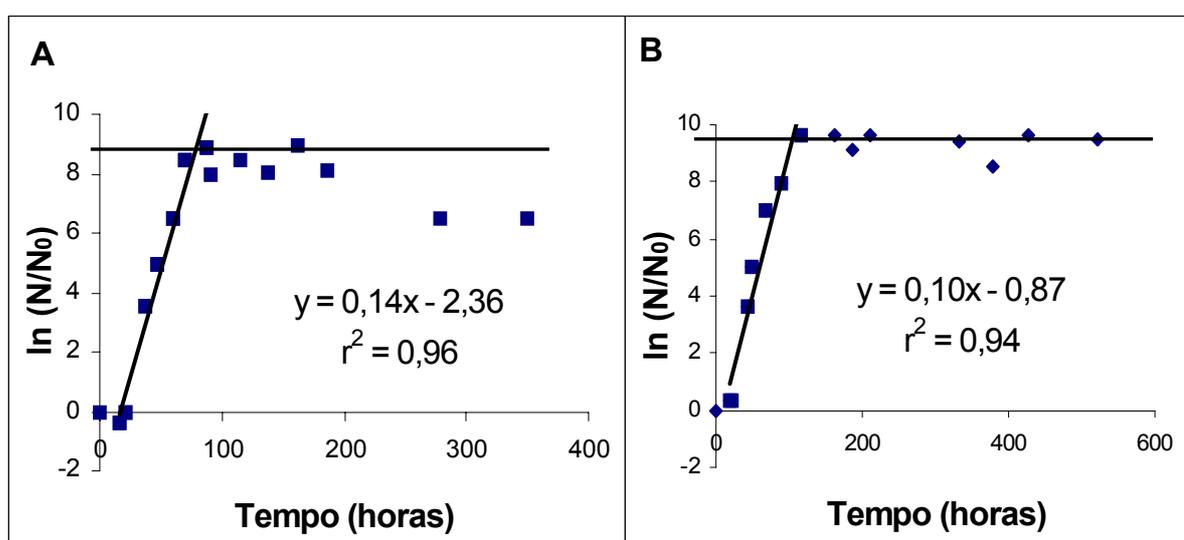


Figura 4.9 – Determinação dos Parâmetros de Crescimento de *B. nivea* em Suco de Maracujá a 30°C pelo Método Gráfico (A - Repetição 1, B - Repetição 2)

Os parâmetros de crescimento obtidos graficamente, com seus respectivos valores médios e intervalos de confiança, estão na Tabela 4.18, que mostra que os valores obtidos para o aumento logarítmico da população, para cada repetição, estão muito próximos, e os valores obtidos para a velocidade específica de crescimento são idênticos.

Tabela 4.18 - Parâmetros de Crescimento de *B. nivea* em Suco de Maracujá a 30°C Obtidos Graficamente

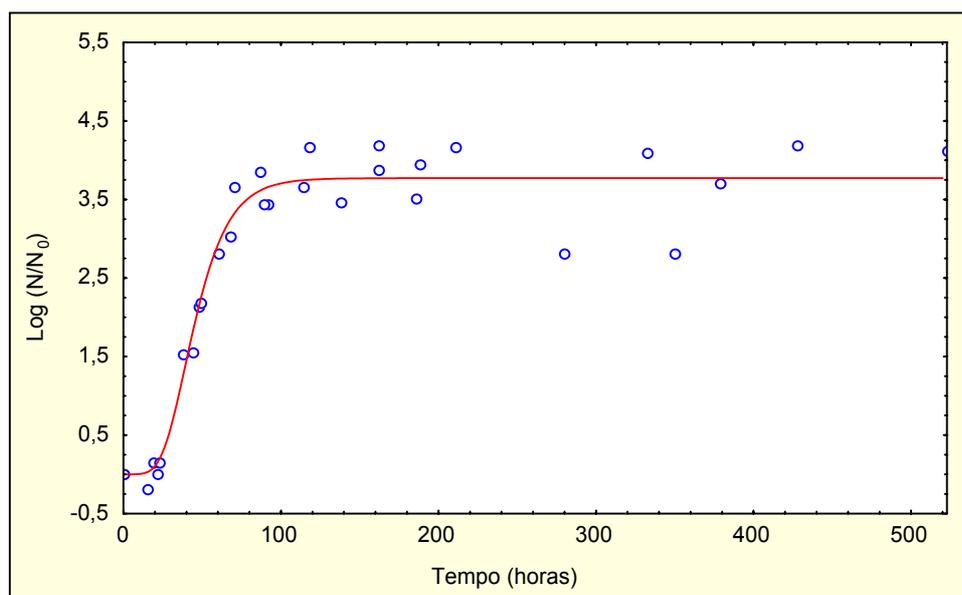
	PARÂMETROS		
	λ (h)	μ (h ⁻¹)	A
Repetição 1	15,00	0,10	3,37
Repetição 2	8,00	0,10	4,13
Valor médio	11,5 (\pm 6,9) ¹	0,1 (\pm 0,0)	3,37 (\pm 0,5)

¹Intervalo de Confiança

O ajuste do Modelo de Gompertz Modificado pode ser visto na Figura 4.10. Observa-se um bom ajuste nas fases lag e exponencial. Entretanto, a partir do final da fase exponencial, verifica-se uma dispersão dos pontos experimentais, o que pode comprometer o valor do coeficiente de correlação. A fase de crescimento exponencial foi bem caracterizada, apresentando uma grande quantidade de pontos experimentais. A equação resultante do ajuste do modelo aos dados experimentais é a seguinte:

$$\log(N/N_0) = (3,77) * \exp\left(-\exp\left(\frac{0,09 * \exp(1)}{3,8}\right) * (24,24 - t) + 1\right) \quad (4.5)$$

$$r^2 = 0,97$$

**Figura 4.10 - Modelo de Gompertz Modificado Ajustado às Curvas de Crescimento de *B. nivea* em Suco de Maracujá a 30°C**

Os parâmetros estimados pelo Modelo de Gompertz Modificado estão na Tabela 4.19.

Tabela 4.19 – Parâmetros de Crescimento de *B. nivea* em Suco de Maracujá a 30°C Estimados pelo Modelo de Gompertz Modificado

	PARÂMETROS		
	λ (h)	μ (h ⁻¹)	A
Valor estimado	24,24	0,09	3,77
Erro padrão	3,75	0,02	0,09

A Tabela 4.20 mostra a comparação entre os valores de $\log(N/N_0)$ observados experimentalmente e os preditos pelo modelo, através dos erros percentuais, calculados para cada ponto. Apenas dois pontos, pertencentes à fase lag, apresentaram erros da ordem de 100%. Os valores de $\log(N/N_0)$ estimados durante a fase de crescimento exponencial, apresentaram erros percentuais bastante baixos, indicando que o valor da velocidade específica de crescimento, μ (h⁻¹), deve estar muito próximo do valor observado experimentalmente.

Tabela 4.20 - Comparação entre os Valores de $\log(N/N_0)$ de *B. nivea* em Suco de Maracujá a 30°C Preditos pelo Modelo e Observados Experimentalmente

TEMPO (horas)	log (N/N ₀)		ERRO (%)
	OBSERVADOS	PREDITOS	
0,00	0,00	0,00	0,00
15,60	-0,20	0,03	115,00
18,30	0,10	0,10	0,00
22,40	0,10	0,20	100,00
37,80	1,50	1,20	20,00
49,10	2,20	2,20	0,00
60,00	2,80	2,90	3,60
86,90	3,90	3,60	7,70
89,20	3,40	3,60	5,90
91,10	3,40	3,60	5,90
114,20	3,70	3,70	0,00
138,00	3,50	3,80	8,60
161,50	3,90	3,80	2,60
186,10	3,50	3,80	8,60
187,60	4,00	3,80	5,00
211,10	4,20	3,80	9,50
279,00	2,80	3,80	35,70
331,70	4,10	3,80	7,30
350,30	2,80	3,80	35,70
378,00	3,70	3,80	2,70
427,00	4,20	3,80	9,50
522,70	4,10	3,80	7,30

A comparação entre os valores dos parâmetros estimados graficamente, e os preditos pelo Modelo de Gompertz Modificado encontra-se na Tabela 4.21, que confirma as expectativas que surgiram na análise da Tabela 4.20. O valor da velocidade específica de crescimento estimado está próximo do valor observado (10% menor). O aumento logarítmico da população também foi bem estimado, com uma diferença de 11,86%. Entretanto, na estimativa da duração da fase lag houve

uma diferença de praticamente 111%. Isto significa que o modelo está estimando mais que o dobro da duração da fase lag, apesar da boa distribuição dos pontos em todas as fases de crescimento.

Tabela 4.21 – Parâmetros de Crescimento de *B. nivea* em Suco de Maracujá a 30°C Obtidos Graficamente e Estimados pelo Modelo de Gompertz Modificado

PARÂMETRO	MÉTODO GRÁFICO	MODELO GOMPERTZ MOD.	ERRO %
λ (h)	11,50	24,24	110,78
μ (h ⁻¹)	0,10	0,09	10,00
A	3,37	3,77	11,86

4.5 EFEITO DE FATORES AMBIENTAIS NO CRESCIMENTO DE *B. nivea*

4.5.1 Efeito da Temperatura e do Meio de Crescimento na Duração da Fase lag

A Tabela 4.22 apresenta o efeito da temperatura e do meio de crescimento na duração da fase lag.

Tabela 4.22 - Efeito da Temperatura e do Meio de Crescimento na Duração da Fase lag, λ (h), de *B. nivea* em Sucos de Abacaxi e Maracujá

	SUCO DE ABACAXI		SUCO DE MARACUJÁ		Diferença valores obtidos graficamente (%)	Diferença valores preditos pelo modelo (%)
	λ (h)		λ (h)			
TEMPERATURA	GRÁFICO	MODELO	GRÁFICO	MODELO		
20°C	65,50	66,46	85,00	97,33	28,70	46,40
30°C	30,36	36,4	11,50	24,24	62,12	33,40
DIFERENÇA (%)	53,65	45,23	86,47	75,09		

O aumento da temperatura de 20°C para 30°C resultou na diminuição da fase lag nos dois tipos de suco, entretanto, esta diminuição foi mais acentuada no suco de maracujá. MOLINA & GIANUZZI (1999), estudando o crescimento de *Aspergillus parasiticus* em um meio basal contendo extrato de malte, extrato de levedura e ágar, verificaram que a duração da fase lag passou de $13 \pm 2,01$ h, à temperatura de 25°C, para $8,10 \pm 3,12$ h, à temperatura de 30°C.

A 20°C, o crescimento de *B. nivea* apresentou uma duração da fase lag maior no suco de maracujá, entretanto quando este crescimento foi avaliado a 30°C a duração da fase foi menor, para o mesmo suco. Este comportamento indica que há uma interação entre os efeitos do tipo de suco e da temperatura nos parâmetros de crescimento.

A influência do meio no crescimento de fungos, foi observada por OBETA & UGWUANYI (1997), que demonstraram que o número médio de dias necessários para o aparecimento de colônias de *N. fischeri* variou de acordo com o tipo de suco (adicionado de ágar) utilizado como meio de crescimento. Em sucos de abacaxi e laranja foram necessários dois dias para as colônias se tornarem distintas e contáveis, já em suco de manga foram necessários seis dias. No presente estudo, observou-se a turvação do suco a partir de dois de incubação, em todas as condições estudadas. À temperatura de 20°C, a formação da colônia na superfície do suco não foi bem definida.

4.5.2 Efeito da Temperatura e do Meio de Crescimento na Velocidade Específica Máxima de Crescimento

Os efeitos da temperatura e do meio de crescimento na velocidade específica máxima de crescimento de *B. nivea* são apresentados na Tabela 4.23.

Quando o crescimento foi avaliado em suco de abacaxi, observou-se um aumento de até 300% no valor da velocidade específica de crescimento, para uma variação da temperatura de 20 para 30°C. Para os dois tipos de sucos foi observado que a 30°C, onde a velocidade de crescimento de fungo é maior, os erros no ajuste do Modelo de Gompertz Modificado também foram maiores.

Tabela 4.23 - Efeito da Temperatura e do Meio de Crescimento na Velocidade Específica Máxima de Crescimento, μ (h^{-1}) de *B. nivea* nos Sucos de Abacaxi e Maracujá

TEMPERATURA	SUCO DE ABACAXI		SUCO DE MARACUJÁ		Diferença valores obtidos graficamente (%)	Diferença valores preditos pelo modelo (%)
	μ (h^{-1})		μ (h^{-1})			
	GRÁFICO	MODELO	GRÁFICO	MODELO		
20°C	0,09	0,06	0,06	0,05	33,30	16,60
30°C	0,26	0,25	0,1	0,09	61,50	64,00
DIFERENÇA (%)	188,90	316,60	66,70	80,00		

Os resultados apresentados nas Tabelas 4.22 e 4.23, demonstram que o aumento da temperatura de crescimento ocasionou uma maior aceleração do crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi, mas a maior diminuição da fase lag foi observada em suco de maracujá.

4.5.3 Efeito da Temperatura e do Meio de Crescimento no Aumento Logarítmico da População

A Tabela 4.24 apresenta o efeito da temperatura e do meio de crescimento no aumento logarítmico da população. Os dados apresentados mostram que contrariamente ao ocorrido nos outros parâmetros, o aumento da temperatura não alterou significativamente (máximo 18,90%) a população máxima atingida (A).

Tabela 4.24 - Efeito da Temperatura e do Meio de Crescimento no Aumento Logarítmico da População (A) de *B. nivea* nos Sucos de Abacaxi e Maracujá

TEMPERATURA	SUCO DE ABACAXI		SUCO DE MARACUJÁ		Diferença valores obtidos graficamente (%)	Diferença Valores preditos pelo modelo (%)
	A		A			
	GRÁFICO	MODELO	GRÁFICO	MODELO		
20°C	4,12	3,67	3,37	3,25	18,2	11,4
30°C	4,15	3,90	3,37	3,77	18,90	3,30
DIFERENÇA (%)	7,30	6,30	0,00	16,00		

4.6 MÉTODO RÁPIDO PARA DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *B. nivea*

O método de determinação das curvas de crescimento por diluição e plaqueamento é bastante dispendioso, demorado e laborioso. No caso de bactérias, o método de medida de absorvância é bastante utilizado para a avaliação do crescimento. Entretanto, este método não pode ser utilizado para fungos filamentosos que apresentam crescimento micelial.

Com o objetivo de propor um método mais simples, rápido e barato para a quantificação do crescimento do que método usual de diluição e plaqueamento, foram determinadas curvas de crescimento pelo método de filtração. Foram realizadas duas curvas de crescimento pelo método de filtração (Anexo IV) e, paralelamente a estas, duas curvas de crescimento pelo método de diluição e plaqueamento, para que os parâmetros obtidos em cada método pudessem ser comparados.

O Modelo de Gompertz Modificado proposto por ZWIETERING *et al.* (1990), uma reparametrização do Modelo de Gompertz, apresenta a vantagem de fornecer diretamente os parâmetros microbiológicos de crescimento: duração da fase lag (λ), velocidade específica de crescimento (μ) e aumento logaritmico da população (A). Apesar de ter se ajustado bem às curvas de crescimento obtidas pelo método de diluição e plaqueamento, como foi observado nos itens anteriores, este modelo não se ajustou aos dados experimentais obtidos pelo método de filtração. Um bom ajuste para estas curvas foi obtido com o Modelo de Gompertz (GIBSON *et al.*, 1987), e os parâmetros biológicos calculados pelas Equações 2.2, 2.3 e 2.4.

4.6.1 Avaliação do Crescimento de *B. nivea* em Suco de Abacaxi a 30°C pelo Método de Filtração

A Figura 4.11 mostra o ajuste do Modelo de Gompertz aos dados experimentais obtidos para o crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi a 30°C. Novamente, observa-se que o modelo não se ajusta bem à fase lag, devido à diminuição da concentração de biomassa, já as demais fases foram bem estimadas.

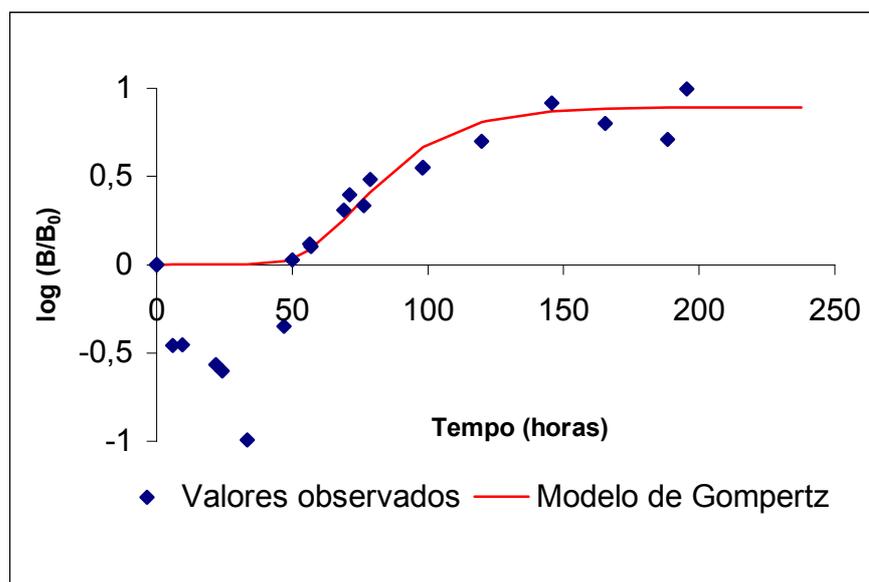


Figura 4.11 - Ajuste do Modelo de Gompertz às Curvas de Crescimento de *B. nivea* em Suco de Abacaxi a 30°C Obtidas por Filtração

Durante a fase lag, foi observada uma diminuição na quantidade de biomassa. Uma possível explicação para este fato é que as quantidades de biomassa a serem medidas nesta fase são muito pequenas, de forma que uma pequena variação pode causar erros muito grandes e, conseqüentemente, uma imprecisão na medida.

A dissolução de alguns componentes celulares, que são perdidos no filtrado poderia ser uma outra explicação para a diminuição da biomassa.

A Equação 4.6 representa o modelo de Gompertz, com um coeficiente de correlação (r^2) de 0,83. Os parâmetros de crescimento calculados são apresentados na Tabela 4.25.

$$y=(0,89)*\exp(-\exp((3,66)-(0,05)*x)) \quad (4.6)$$

Tabela 4.25 – Parâmetros de Crescimento de *B. nivea* em Suco de Abacaxi a 30°C Estimados pelo Modelo de Gompertz Ajustado às Curvas de Crescimento Obtidas por Filtração

	PARÂMETROS		
	λ (h)		A
Valor estimado	53,46	0,04	0,89

4.6.2 Avaliação do Crescimento de *B. nivea* em Suco de Maracujá a 20°C pelo Método de Filtração

O ajuste do Modelo de Gompertz aos dados experimentais do crescimento de *B. nivea* em suco de maracujá a 20°C, obtidos por filtração, é mostrado na Figura 4.12. A variação do comportamento da biomassa durante a fase lag, não permitiu que o modelo fosse ajustado nesta fase, talvez pelos mesmos motivos apresentados anteriormente para o crescimento em suco de abacaxi. A partir de aproximadamente 150 horas, com o comportamento da curva corresponde às curvas típicas de crescimento microbiano, um bom ajuste do modelo foi observado. Esta variação da biomassa durante a fase lag, confirma a dificuldade de se quantificar pequenas quantidades da mesma, como foi observado no item 4.6.1.

A Equação 4.7 representa o ajuste do Modelo de Gompertz aos dados experimentais, que obteve um coeficiente de correlação de 0,96.

$$y=(1,20)*\exp(-\exp((1,97)-(0,01)*x)) \quad (4.7)$$

Os parâmetros de crescimento calculados pela, que são apresentados na Tabela 4.26.

Tabela 4.26 – Parâmetros de Crescimento de *B. nivea* em Suco de Maracujá a 20°C Estimados pelo Modelo de Gompertz Ajustado às Curvas de Crescimento Obtidas por Filtração

	PARÂMETROS		
	λ (h)	μ (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)	A
Valor estimado	84,26	0,01	1,21

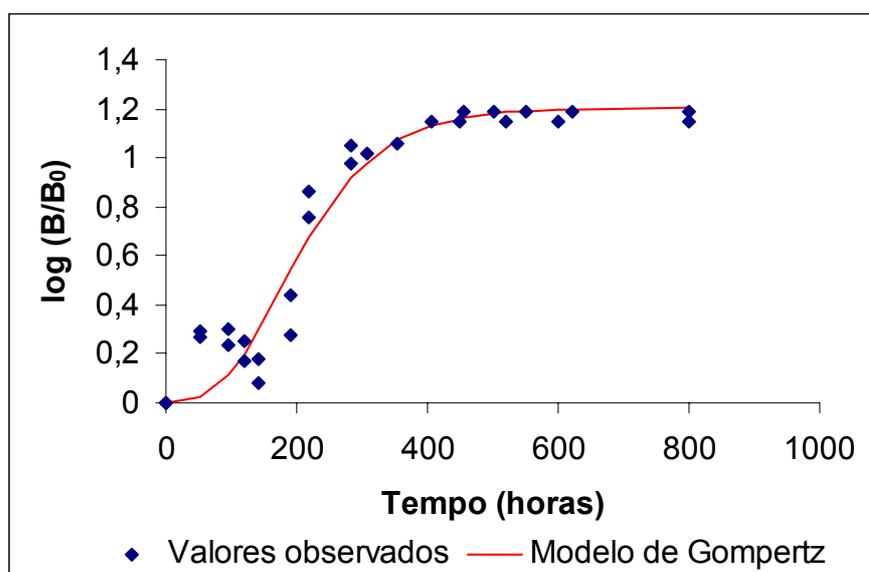


Figura 4.12 - Ajuste do Modelo de Gompertz às Curvas de Crescimento de *B. nivea* em Suco de Maracujá a 20°C Obtidas por Filtração

4.6.3 Avaliação do Crescimento de *B. nivea* em Suco de Maracujá a 30°C pelo Método de Filtração

A Figura 4.13 apresenta o ajuste do Modelo de Gompertz às curvas de crescimento de *B. nivea*, obtidas pelo método de filtração. Como observado anteriormente houve uma variação da biomassa durante a fase lag. O restante da curva apresenta um comportamento típico de uma curva de crescimento microbiano, o que permitiu um bom ajuste do modelo (Equação 4.8), com um coeficiente de correlação de 0,94

$$y=(0,98)*\exp(-\exp((2,77)-(0,03)*x)) \quad (4.8)$$

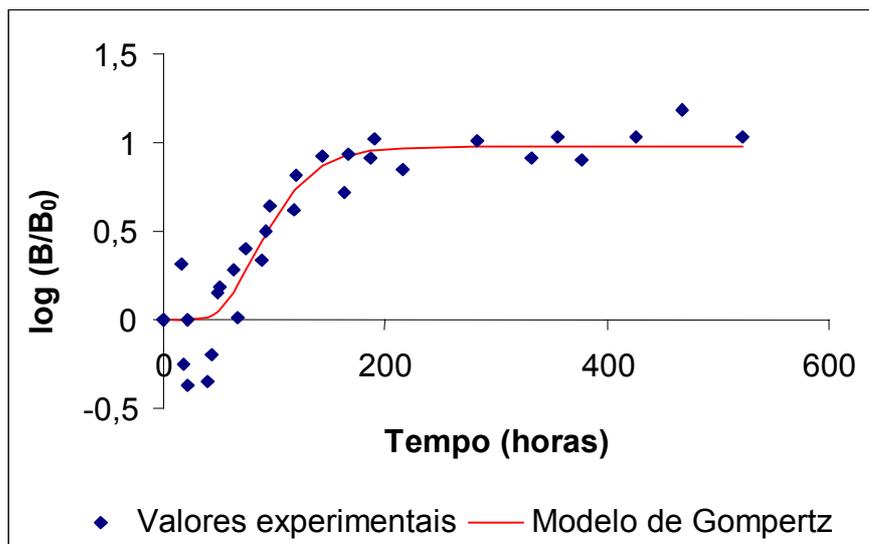


Figura 4.13 - Ajuste do Modelo de Gompertz às Curvas de Crescimento de *B. nivea* em Suco de Maracuja a 30°C Obtidas por Filtração

Os parâmetros de crescimento calculados são apresentados na Tabela 4.27

Tabela 4.27 – Parâmetros de Crescimento de *B. nivea* em Suco de Maracujá a 30°C Estimados pelo Modelo de Gompertz Ajustado às Curvas de Crescimento Obtidas por Filtração

	Parâmetros		
	λ (h)	μ (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)	A
Valor estimado	52,24	0,03	0,98

4.6.4 Comparação entre os Parâmetros Biológicos de Crescimento de *B. nivea*

A Tabela 4.28 apresenta os valores dos parâmetros biológicos de crescimento de *B. nivea*, obtidos pelos dois métodos de avaliação.

Tabela 4.28 – Parâmetros Biológicos de Crescimento de *B. nivea* em Sucos Tropicais Obtidos por Dois Diferentes Métodos de Avaliação do Crescimento

	CONTAGEM			FILTRAÇÃO		
	λ_c^1 (h)	μ_c^2	A_c^3	λ_f^4 (h)	μ_f^5	A_f^6
Suco de abacaxi a 30°C	36,40	0,25	3,90	53,46	0,04	0,89
Suco de maracujá a 20°C	97,33	0,05	3,25	84,26	0,01	1,21
Suco de maracujá a 30°	24,24	0,09	3,77	52,24	0,03	0,98

¹ λ_c = fase lag para o método de contagem

² μ_c = velocidade de crescimento exponencial para o método de contagem [ufc.ufc⁻¹.h⁻¹]

³ A_c = aumento logaritmico da população para o método de contagem

⁴ λ_f = fase lag para o método de filtração

⁵ μ_f = velocidade de crescimento exponencial para o método de filtração [g.g⁻¹.h⁻¹]

⁶ A_f = aumento logaritmico da população para o método de filtração

As unidades de medida de μ e A , demonstram que estes parâmetros não podem ser comparados. Estudos posteriores devem ser conduzidos para obtenção de uma relação entre a concentração e o peso da biomassa.

Analisando-se os parâmetros de crescimento de *B. nivea* em suco de maracujá obtidos pelo método de filtração, observa-se que apesar de não poderem ser comparados aos obtidos pelo método de contagem, apresentam o comportamento esperado, ou seja, quando a temperatura é menor, observa-se que a duração da fase lag é maior e a velocidade específica máxima menor.

A literatura fornece valores de μ determinados por outros métodos que não o de contagem, como fez VALÍK & PIECKOVÁ (2001), que estudaram o efeito da atividade de água no crescimento de *Byssochlamys fulva*, *Neosartorya fischeri* e *Taloromyces avellaneus*, através de medidas de diâmetro da colônia. Os valores de

μ (mm.d^{-1}), estimados pelo modelo de Baranyi (BARANYI & ROBERTS, 1994), foram 12,6 (a_w 0,986), 13,2 (a_w 0,985) e 20,2 (a_w 0,99), respectivamente.

O único parâmetro que pode ser comparado é a fase lag. Com exceção do valor estimado em suco de maracujá a 20°C, os valores obtidos pelo método de filtração são maiores que os obtidos pelo método de contagem. Estes resultados indicam que o método de filtração não pode ser utilizado para prever a vida de prateleira de sucos de abacaxi e maracujá contaminados por fungos termorresistentes, nas temperaturas estudadas, a menos que uma correlação entre os resultados obtidos nos métodos de diluição e plaqueamento e filtração seja encontrada.

ERKMEN & ALBEN (2002) estimaram os parâmetros de crescimento μ , λ e A de *Aspergillus niger*, pelo método de filtração, utilizando o Modelo de Gompertz Modificado. Entretanto, nenhuma correlação com os parâmetros obtidos pelo método de contagem por diluição e plaqueamento foi proposta.

4.6.5 Determinação da Correlação entre os Métodos de Contagem e Filtração

Como o crescimento de *B. nivea* foi avaliado paralelamente por filtração e por contagem, foi investigada a existência de uma correlação entre estes métodos, ou seja a existência de uma equação que transformasse os dados de aumento de peso em valores de aumento de população.

Para esta investigação foram selecionadas as curvas de crescimento de *B. nivea* em suco de maracujá a 30°C. Devido as variações existentes durante a fase lag, foram utilizados apenas os dados da fase de crescimento exponencial. Inicialmente foram testados modelos lineares e na sequência modelos logarítmicos, que apresentaram um bom ajuste. Foi também investigado o ajuste do Modelo não linear de Gompertz., que por também apresentar um bom ajuste, foi selecionado.

A Figura 4.14 apresenta o ajuste do Modelo de Gompertz ao dados de $\log(N/N_0) \times \log(B/B_0)$, que resultou em um coeficiente de correlação de 0,89.

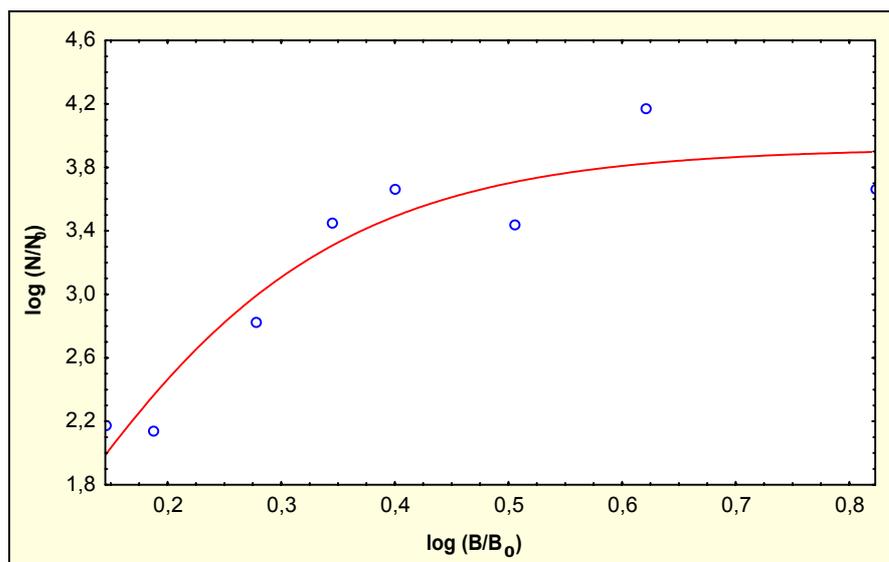


Figura 4.14 - Ajuste do Modelo de Gompertz aos Dados de log(N/N₀) X log(B/B₀)

A relação existente entre o aumento da população e o aumento da biomassa é representada pela Equação 4.9

$$\log(N/N_0) = (3,92) * \exp(-\exp((0,62) - (6,93) * \log(B/B_0))) \quad (4.9)$$

A Equação 4.9 foi utilizada para converter os valores de log(B/B₀) observados, ao longo de toda a curva de crescimento, em log(N/N₀) correspondentes. O resultado obtido é apresentado na Tabela 4.29.

A Figura 4.15 apresenta uma comparação entre os valores de log(N/N₀) obtidos experimentalmente, pelo método contagem de colônias por diluição e plaqueamento, com os valores de log(N/N₀) obtidos pela conversão, ou seja calculados, ao longo do tempo. Pode-se perceber que os valores obtidos na correlação apresentaram a mesma tendência dos valores experimentais, estando mais dispersos somente durante a fase de crescimento exponencial.

Tabela 4.29 – Valores de $\log (B/B_0)$ Transformados em $\log(N/N_0)$

$\log (B/B_0)$	$\log (N/N_0)$	$\log (B/B_0)$	$\log (N/N_0)$
0,00	1,36	0,62	3,83
0,31	2,99	0,82	4,07
-0,25	0,23	0,92	4,14
0,00	1,39	0,72	3,97
-0,37	0,05	0,93	4,14
-0,35	0,06	0,91	4,13
-0,20	0,37	1,02	4,19
0,15	2,19	0,85	4,09
0,28	2,84	1,01	4,18
0,01	1,40	0,91	4,13
0,40	3,30	0,90	4,12
0,34	3,11	1,19	4,24
0,50	3,60	1,03	4,19

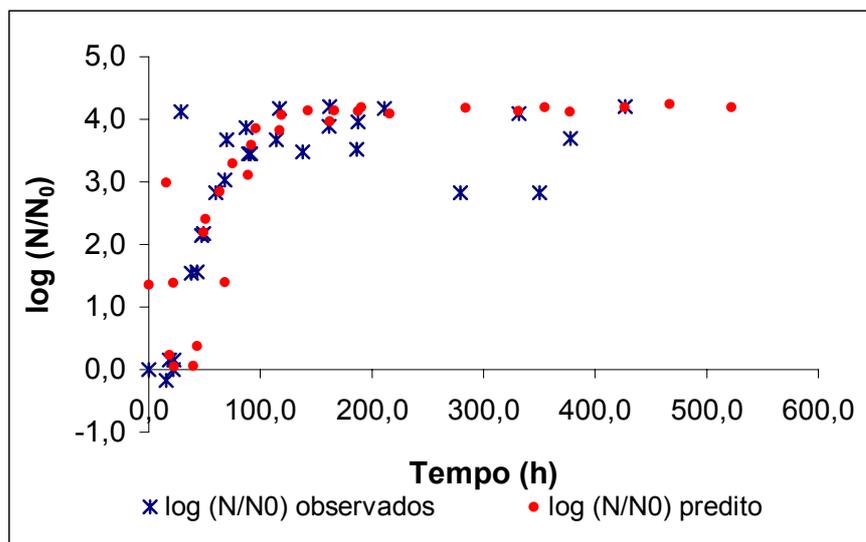


Figura 4.15 – Comparação entre os Valores de $\log (N/N_0)$ Observados e Preditos, Contra o Tempo

Os valores obtidos pela correlação foram então utilizados para descrever uma nova curva de crescimento de $\log (N/N_0)$ preditos contra o tempo. O Modelo de Gompertz Modificado foi utilizado mais uma vez para que os parâmetros de crescimento fossem estimados. A Equação 4.10 ($r^2 = 0,75$) é resultante do ajuste do modelo

$$y = (4,00) * \exp(-\exp(((0,05) * \exp(1) / (4,00)) * ((15,98) - x) + 1)) \quad (4.10)$$

A Tabela 4.30 apresenta os parâmetros estimados e os valores obtidos pelo método de contagem de colônias, bem como o erro entre eles, considerando-se o método de contagem como o padrão. Observou-se um erro relativamente grande na estimativa dos parâmetros pelos dados convertidos, entretanto pode-se ter uma idéia do valor aproximado destes.

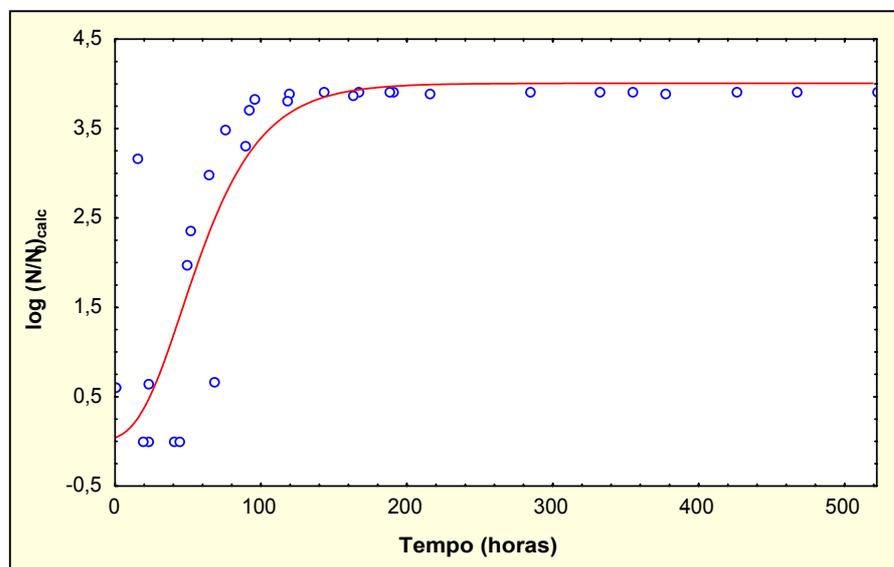
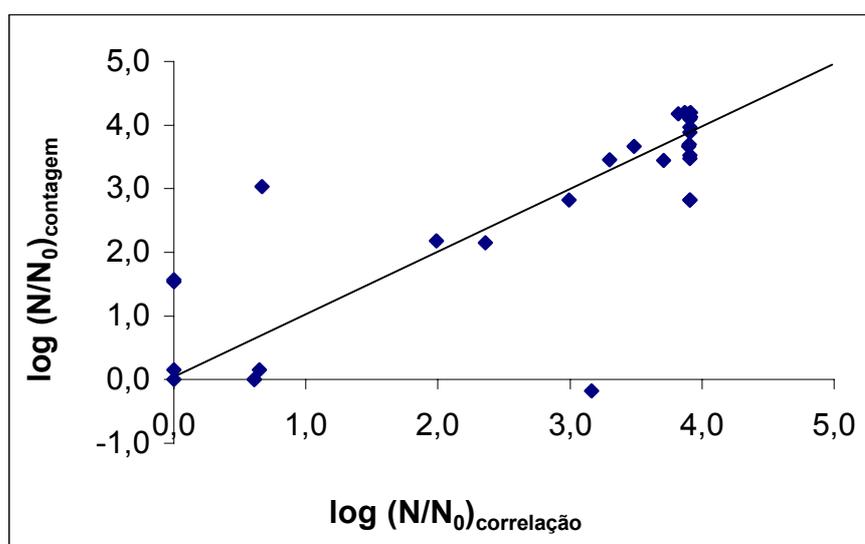


Figura 4.16 – Ajuste do Modelo de Gompertz Modificado aos Novos Dados de Aumento da População

Tabela 4.30 – Comparação entre os Parâmetros Obtidos Experimentalmente pelo Método de Contagem e os Obtidos pela Correlação

Parâmetros	Contagem	Correlação	Erro (%)
λ (h)	24,24	15,98	34,08
μ (h ⁻¹)	0,09	0,05	44,44
A	3,37	4,00	18,69

O gráfico de $\log(N/N_0)$ calculados pela correlação contra $\log(N/N_0)$ obtidos por contagem (Figura 4.17) revela que os pontos estão próximos da linha de 45° somente a partir de um aumento de dois ciclos logarítmicos, ou seja, quando o crescimento já se aproxima do final da fase lag. Isto descartaria a possibilidade de utilização destes valores para assegurar qualquer tempo de vida de prateleira de alimentos.

**Figura 4.17 – Valores de $\log(N/N_0)$ Preditos *versu* Valores de $\log(N/N_0)$ Observados**

Estes resultados entretanto, permitem que se tenha uma idéia do comportamento da curva de crescimento bem como dos valores dos parâmetros biológicos. Estudos posteriores serão realizados para a determinação da correlação entre os métodos de diluição e plaqueamento com o método de filtração para as demais situações estudadas.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

O Modelo de Gompertz Modificado, amplamente aceito na estimativa dos parâmetros de crescimento de bactérias, foi utilizado com sucesso na avaliação do crescimento dos fungos filamentosos termorresistentes *N. fischeri* e *B. nivea* em sucos de frutas tropicais, a diferentes temperaturas. Os altos valores dos coeficientes de correlação, r^2 , obtidos no ajuste do modelo às curvas de crescimento (obtidas por diluição e plaqueamento) demonstram a eficiência do modelo.

A dispersão dos pontos experimentais obtidos na avaliação do crescimento de *N. fischeri* fez com o ajuste do Modelo de Gompertz Modificado estimasse a velocidade específica máxima de crescimento com um erro de 20% em relação ao método gráfico, apesar de ter apresentado um coeficiente de correlação de 0,90.

O crescimento de *N. fischeri*, em suco de abacaxi a 30°C, apresentou o menor aumento logarítmico da população (2,0) quando comparada à curva de crescimento de *B. nivea* (3,9), nas mesmas condições.

As curvas de crescimento de *N. fischeri* e *B. nivea*, apresentaram uma diminuição da população durante a fase lag, ou fase de adaptação. Este comportamento dificulta o ajuste do Modelo de Gompertz Modificado que, como todos os outros modelos primários, não prevê esta diminuição da população durante a fase lag. Em suco de abacaxi, a diminuição da população durante esta fase foi bem mais acentuada do que em suco de maracujá.

Na avaliação do crescimento de *B. nivea*, a duração da fase lag foi estimada com maiores erros percentuais em relação aos valores obtidos graficamente a 30°C, para os dois tipos de suco, enquanto que a velocidade específica máxima de crescimento apresentou maiores erros percentuais a 20°C.

A velocidade específica máxima de crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi foi estimada com um erro de 33,33%, a 20°C, enquanto que a duração da fase lag apresentou um erro de apenas 1,47%. Quando o crescimento foi avaliado a 30°C, com um maior número de experimentos, o erro na estimativa do valor de μ foi

de apenas 3,85%, enquanto que o erro na estimativa no valor da duração da fase lag aumentou para aproximadamente 20%. Estes resultados demonstram que o comportamento do fungo apresentou uma variação durante a fase lag para os vários experimentos realizados, dificultando a caracterização desta fase.

Quando o crescimento de *B. nivea* foi avaliado em suco de maracujá a 30°C, os erros na estimativa da velocidade específica máxima de crescimento foram baixos nas duas temperaturas estudadas, enquanto que a duração da fase lag foi estimada com um erro de 110,78%, apesar do modelo ter apresentado um coeficiente de correlação (r^2) de 0,97.

Apesar do alto valor do coeficiente de correlação, verificou-se que este não deve utilizado como um único critério de ajuste do modelo, uma vez que um dos parâmetros pode apresentar erros muito grandes. Este comportamento justificaria o uso de um modelo matemático diferente para cada parâmetro a ser estimado.

O aumento logarítmico da população de *B. nivea* foi o parâmetro de crescimento menos afetado pela variação da temperatura e do meio de crescimento.

Para que os parâmetros de microbiológicos μ e λ possam ser estimados com uma maior precisão, é necessário que a curva de crescimento contenha um número de pontos experimentais suficientemente grande para que cada fase seja bem caracterizada.

Quando o crescimento de *B. nivea* foi avaliado pelo método de filtração, verificou-se uma grande dispersão dos pontos experimentais no início da curva, o que compromete a estimativa da duração da fase lag. Esta variação, no início da curva de crescimento, pode ser devido às pequenas quantidades de biomassa a serem medidas neste período, ou devido à fase de germinação, onde há a dissolução de alguns componentes celulares.

A duração da fase lag é o único parâmetro microbiológico que pode ser comparado entre os dois métodos de avaliação do crescimento, pois os valores de velocidade específica máxima de crescimento e de aumento logarítmico da população são estimados em unidades diferentes.

O Modelo de Gompertz também foi utilizado para a obtenção de uma correlação entre os métodos de filtração e de contagem por diluição e plaqueamento. Novos valores de $\log(N/N_0)$ foram calculados com a correlação encontrada, e o Modelo de Gompertz Modificado foi então ajustado para estimar os parâmetros de crescimento. Nestas condições, a velocidade específica máxima de crescimento foi o parâmetro que apresentou maior erro percentual.

Verificou-se que se sucos tropicais como os de abacaxi e maracujá estiverem contaminados com *N. fischeri* e *B. nivea*, a deterioração dos mesmos será iniciada em, no máximo, um dia e meio se a temperatura de estocagem for 30°C. Se a temperatura de estocagem for diminuída para 20°C, a vida de prateleira poderá ser estendida para aproximadamente 3 dias para suco de abacaxi ou para 4 dias se o suco for de maracujá.

Os resultados evidenciam a importância da prevenção da contaminação da matéria-prima de sucos de frutas por fungos filamentosos termorresistentes, uma vez que estes sobrevivem ao processo de pasteurização. O uso da refrigeração ou de outra forma de controle é essencial para manter os sucos de frutas pasteurizados estáveis durante o armazenamento, pois, a vida de prateleira destes produtos pode ser drasticamente diminuída se estiverem contaminados por esporos termorresistentes.

SUGESTÕES

SUGESTÕES

- Aumentar a população do inóculo e testar outros tipos de membranas na avaliação do crescimento de fungos filamentosos termorresistentes pelo método de filtração, já que este é um método mais simples e rápido que o de contagem de colônias por diluição e plaqueamento;
- Avaliar o crescimento de fungos filamentosos termorresistentes pelo acompanhamento do aumento radial da colônia, uma vez que este método também tem sido descrito na literatura para avaliação do crescimento de fungos;
- Estimar os parâmetros microbiológicos de crescimento utilizando outros modelos matemáticos e testar a eficiência destes modelos na estimativa de cada parâmetro separadamente;
- Verificar se há interação entre os efeitos da temperatura e do meio de crescimento nos parâmetros de crescimento de fungos filamentosos termorresistentes através da realização de um planejamento experimental.

*REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKPOMEDAYE, D. E & EJECHI, B. O. The hurdle effect of mild heat and two tropical spice extracts on the growth of three fungi in fruit juices. **Food Research International**, v.31,n.5, p 339-341,1998.

ALEXPOULOUS, C. J. Introductory Micology. 4th ed.,New York: John Willey, 1996.

ARAGÃO, G. M. F. Identificação e determinação da resistência térmica de fungos filamentosos termorresistentes isolados da polpa de morango. Campinas, 1989, 139p. Tese de Mestrado - Faculdade de Engenharia de Alimentos. UNICAMP.

AUGUSTIN, J. C; ROSSO, L. & CARLIER, V. Estimation of temperature dependent growth rate and lag time of *Listeria monocytogenes* byoptical density measurements. **Journal of Microbiological Methods**, v.38, p.137-146, 1999.

BAGLIONI, F. Estudo da ocorrência de fungos filamentosos temorresistentes em polpa de tomate envasada assepticamente. Campinas, 1998, 94p. Tese de Mestrado - Faculdade de Engenharia de Alimentos. UNICAMP.

BALLESTRA, P. & CUQ, J. Influence of pressurized carbon dioxide on the thermal inactivation of bacterial and fungal spores. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.31, p.84-88, 1998.

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.

_____ & ROBERTS, T. A. Review Paper. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. **International Journal of Food Microbiology**, v.23, p. 277-294, 1994.

_____. Mathematics of predictive food microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v.26, p.199-218, 1995.

BEGOT, C.; DESNIER, I.; DAUDIN, J. D.; LABADIE, J. C & LEBERT, A. Recommendations for calculating growth parameters by optical density measurements. **Journal of Microbiological Methods**, v. 25, p. 225-232, 1996.

BEUCHAT, L. R. Extraordinary heat resistance of *Talaromyces flavus* and *Neosartorya fischeri* ascospores in fruit products. **Journal of Food Science**, n.51, n.6, p.1506-1510, 1986.

_____ & RICE, S. L. *Byssochlamys* spp. and their importance in processed fruits. **Advances in Food Research**, v. 25, 1979.

_____ & TOLEDO, R. T. Behavior of *Byssochlamys nivea* ascospores in fruit syrups. **Transactions of British Mycological Society**, v. 68, n. 1, p. 65-71, 1977.

BRATCHELL, N.; GIBSON, A. M.; TRUMAN, M.; KELLY, T. M. & ROBERTS, T. A. Predicting microbial growth: the consequences of quality data. **International Journal of Food Microbiology**, v.8, p.47, 1989.

BUCHANAN, R. L. Developing and distributing user-friendly application software. **Journal of Industrial Microbiology**, v.12, p.251-255, 1993.

_____ ; 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.

CHEROUTRE-VIALETE, M.; LEBERT, I.; HEBRAUD, M.; LABADIE, J. C. & LEBERT, A. Effects of pH or a_w stress on growth of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, p.71-77, 1998.

CHORIN, E, THUAULT, D., CLERET, J., BOURGEOIS, C., Modelling *Bacillus cereus* growth. **International Journal of Food Microbiology**, v.38, p.229-234, 1997.

COLE, R. J.; KIRKSEY, J. W.; COX, R. H. & CLARDY, J. Structure of tremor-producing indole, TR-2. **J. Agric. Food Chem.**,v. 23, p. 1015-1018, 1974.

CONSUMIDOR MODERNO. Cresce mercado de sucos prontos para beber. Quinta-feira, 29 de agosto de 2002. <http://www.consumidormoderno.com.br>

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, N.10, 1997.

DALGAARD, P. & KOUTSOUMANIS, K. Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models. **Journal of Microbiological Methods**, v.43, p.183-196, 2001.

_____ ; BUSH, P. & SILBERG, S. Seafood Spoilage Predictor – development and application of product specific application software. **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, p. 343-349, 2002.

DAVEY, K. R. Review Paper. Modelling the combined effect of temperature and pH on the rate coefficient for bacterial growth. **International Journal of Food Microbiology**, v.23, p.295-303, 1994.

_____ & DAUGHTRY, B. J. Validation of a model for predicting the combined effect of three environmental factors on both exponential and lag phases of bacterial growth: temp., salt concentration and pH. **Food Research International**, v.28, n3, p.233-237, 1995.

ECKARDT, C. & AHRENS, E. Investigations about *Byssochlamys fulva* Olliver & Smith as a potential spoilage agent in canned strawberries. Part A. Occurrence and growth of *Byssochlamys fulva*. **Chemical Microbiologie and Technologie Lebensmittel**, v. 5, p. 71-75, 1977.

_____. The resistance of *Byssochlamys fulva* Olliver & Smith during freezing and pasteurization processes. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.7, p.137, 1978.

EIROA, M. N. U, AMSTALDEN, V. C. Ocorrência de espécies de *Byssochlamys* em hortas, pomares e vinhedos da região de Campinas. **Col.ITAL**, v.15, p.61-70, 1985.

ENGEL, G & TEUBER, M. Heat resistance of ascospores of *Byssochlamys nivea* in milk and cream. **International Journal of Food Microbiology**, 12, p.225-234, 1991.

ENIGL, D. C, KING, A.D (Jr), TÖRÖK, T. *Talaromyces trachyspermus*, a heat-resistant mold isolated from fruit juice. **Journal of Food Protection**, v.56, n12, p.1039-1042, Dez, 1993.

ERKMEN, O. & ALBEN, E. Mathematical modeling of citric acid production and biomass formation by *Aspergillus niger* in undersized semolina. **Journal of Food Engineering**, v.52, p.161-166, 2002.

ESTY, J. R. & MEYER, K. F. The heat resistance of the spore of *Clostridium botulinum* and allied anaerobes XI. **Journal of Infectious Diseases**, v.31, p.650-663, 1922. Apud 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.

FREVEL, H. J.; ENGEL, G. & TEUBER, M. Schimmelpilze in Silage und Rohmilch. *Milchwissenschaft*, v. 40, p. 129-132, 1985. Apud ENGEL, G, TEUBER, M. Heat resistance of ascospores of *Byssoschlamys nivea* in milk and cream. **International Journal of Food Microbiology**, 12, p.225-234, 1991.

FUJIKAWA, H., ITOH, T. Characteristics of a multicomponent first-order model for thermal inactivation of microorganisms and enzymes. **International Journal of Food Microbiology**, v.31,p.263-271, 1996.

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

GIBSON, A. M.; BRATCHELL, N. & ROBERTS, T.A. The effect of sodium chloride and temperature on the rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry. **Journal of Applied Bacteriology**, v.62, p.479-490, 1987.

_____ & HOCKING, A. D. Advances in the predictive modeling of fungal growth in food. **Trends in Food Science e Technology**, v.8,p. 353-358, 1997.

GOTLIEB, D. Germination of fungus spores, *Endeanour*, v.23, p.85, 1964. TOURNAS, V. Heat-resistant fungi of importance to the food and beverage industry. **Critical reviews in Microbiology**, v.20,n.4, p.243-263, 1994.

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

HOIRE, Y. & YAMAZAKI, M. Productivity of tremorgenic mycotoxins, fumitremorgins A e B in *Aspergillus fumigatus* and allied species. **Nippon Kingakkai Kaiko**, v. 22, p. 113-119, 1981. Apud NIELSEN, P. V.; BEUCHAT, L.R.; FRISVAD, J.C. Growth of 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.

HULL, R. Studies of *Byssochlamys* and control measures in processed fruits. **Ann. Applied Biology**, v. 26, p. 800-822, 1939. Apud Beuchat & Rice, 1979.

JAY, J. M. **Microbiología moderna de los alimentos**. Zaragoza: Editorial Acribia S. A., 804p. 1992

JENSEN, M. Experiments of the inhibition of some thermoresistant molds in fruit juices. **Ann. Inst. Pasteur Lille**, v. 11, p.179-182, 1960. Apud BEUCHAT, L. R.; RICE, S. L. *Byssochlamys* spp. and their importance in processed fruits. *Advances in Food Research*, v. 25, 1979.

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

LABUZA, T. P & FU, B. Growth Kinetics for shelf-life prediction: theory and practice. **Journal of Industrial Microbiology**, v.12, p. 309-323, 1993.

LANGVAD, F. A rapid and eficiente method for growth measurement of filamentous fungi. **Journal of Microbiological Methods**, 37, p.97-100, 1999.

LEGGOT, N. L. & SHEPHARD, G. S. Patulin in South African commercial apple products. **Food Control**, v. 12, p. 73-76, 2001.

LI, K. Y & TORRES, J. A. Microbial growth estimation in liquid media exposed to temperature fluctuations. **Journal of Food Science**, v. 58, p. 644-648, 1993.

LÜTHI, H. & HOCHSTRASSER, R. Über zwei neue, gegenwartig häufigei auftretend pilzinfektionen in der bauerlichen sussmosterei. **Schweiz. Z. Obst.-Weinbau**, n,61, p.301-359, 1952. BEUCHAT, L. R.; RICE, S. L. *Byssochlamys* spp. and their importance in processed fruits. **Advances in Food Research**, v. 25, 1979.

MASSON, Y., AINSWORTH, P., FULLER, D., BOZKURT, H., IBANOGLU, S. Growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Candida sake* in homogenized mushrooms under modifiede atmosphere. **Journal of Food Engineering**, v.54, p.125-131, 2002.

MAUNDER, D. T. Summary of work on spoilage problens caused by molds of *Byssochlamys-Paecilomyces* group, in *Byssochlamys Seminar Abstract*, Res. Circ. 20, 12, 1969. Apud TOURNAS, V. Heat-resistant fungi of importance to the food and beverage industry. **Critical reviews in Microbiology**, v.20,n.4, p.243-263, 1994.

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.

McEVOY, I. J. & STUART, M. R. Temperature tolerance of *Aspergillus fischeri* var *glaber* in canned strawberries. **Irish Agric. Res.**, v. 9, p. 59,1970. TOURNAS, V. Heat-resistant fungi of importance to the food and beverage industry. **Critical reviews in Microbiology**, v.20,n.4, p.243-263, 1994.

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

MICKOVSKI, M. The fungus-flora under the Pinus maritima and the influence of the process on the humus formation over the same. **Annuaire de la Faculté d'Agriculture et de Sylviculture de l'Université de Skopje, Yugoslavia**, 1961-1962. Apud YATES, A. R.; SEAMAN, A. & WOODBINE, M. Ascospore germination in *Byssochlamys nivea*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 14, p.319, 1968.

MISAWA, M., NARA, T. NAKAYAMA, K. & KINOSHITA, S. Formation of terrein by *Aspergillus fischeri* Wehmer. **Nippon Nogeikagaku Kaishi**, v. 36, p. 699-703, 1962. Apud NIELSEN, P. V.; BEUCHAT, L.R.; FRISVAD, J.C. Growth of and fumitremorgin production by *Neosartoya fischeri* as affected by temperature, light, and water activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, n°6, p.1504-1510, 1988.

MOLINA, M., GIANNUZZI, L. Combined effect of temperature and propionic acid concentration on the growth of *Aspergillus parasiticus*. **Food Research International**, v.32, p.677-682, 1999.

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 pseudomonads. **International Journal of Food Microbiology**, v.38, p.45-54, 1997.

NIELSEN, P. V. Preservative and Temperature effect on growth of three varieties of the heat-resistant mold, *Neosartoya fischeri*, as measured by an impedimetric method. **Journal of Food Science**, v.56, n.6, p. 1735-1740, 1991.

_____.; BEUCHAT, L. R. & FRISVAD, J. C. Growth of and fumitremorgin production by *Neosartoya fischeri* as affected by temperature, light, and water activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, n°6, p.1504-1510, 1988.

OBETA, J. A. N., UGWUANYI, J. O. Evaluation of growth of *Neosartorya* spp. on some Nigerian fruit products. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.51,p.311-320, 1997.

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 Society Chem. Ind.**, v. 53, p. 166T, 1934. Apud BEUCHAT, L. R.; RICE, S. L. *Byssochlamys* spp. And their importance in processed fruits. **Advances in Food Reaserch**, v. 25, 1979.

PALOU, E., LOPEZ-MALO, A., BARBOSA-CANOVAS, G. V, WELTI-CHANES, J, DAVIDSON, P. M. and SWANSON, B. G. Effect of oscillatory high hydrostatic pressure treatments on *Byssochlamys nivea* ascospores suspended in fruit juices concentrates. **Letters in Applied Microbiology**, n.27, p.375-378, 1998.

PANCIELLO, P. J. & QUANTICK, P. C. Application of food micro-model predictive software in the development of hazard analysis critical control point (HACCP) systems. **Food Microbiology**, v. 15, p.425-439, 1998.

PATTERSON, D. S. P.; SHREEVE, B. J.; ROBERTS, B. B. & McDONALD, S. M. Verruculogen produced by soil fungi in England and Wales. **Appl. Environ. Microbial.**, v. 42, p. 916-917, 1981.

PERERA, K. P. W. C.; DAY, J. B; MANTLE, P. G. & RODRIGUES, L. Metabolism of verruculogen in rats. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 43, p. 503-508, 1982.

PIT, J. I & HOCKING, A. D. Fungi and Food Spoilage. Sidney: Academic Press, 1985, 413p.

PUT, H. M. C. & KRUISWIJK, J. T. Disintegration and organoleptic deterioration of processed strawberries caused by the mold *Byssochlamys nivea*. **Journal Applied Bacteriology**, v.27:53, 1964.

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

RATKOWSKY, D. A.; LOWRY, R. K.;McMEEKIN, T. A.; STOKES, A. N & CHANDLER, R. E. Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. **Journal of Bacteriology.**, v.154, p. 1222-1226, 1983.

RICE, S. L.; BEUCHAT, L. R. & HEATON, E. K. Changes in the composition and texture of canned peach halves infected with *Byssochlamys fulva*. **Journal of Food Science**, v. 42, p. 1562-1565, 1977.

RICHARDSON, K. C. Incidence of *Byssochlamys fulva* in Queensland-grown canned strawberries. **Queensl. J. Agric. Anim. Sci.**, v.22, p. 347-350, 1965. Apud BEUCHAT, L. R.; RICE, S. L. *Byssochlamys* spp. and their importance in processed fruits. *Advances in Food Research*, v. 25, 1979.

ROSS, T. & McMEEKIN, T. A. Review Paper. Predictive microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v.23, p.241-264, 1994.

SALOMÃO, B. C. M. Isolamento, identificação e estudo da resistência térmica de fungos filamentosos termorresistentes em produtos de frutas. Florianópolis, 2002, 99p. Tese de Mestrado. UFSC.

SCHAFFNER, D. W. & LABUZA, T. P. Predictive Microbiology: where are we and where are we going? In: Overview-Outstanding symposia in food science & technology). **Food Technology**, v.51, n.4, p.95-99, 1997.

SCHLEGEL, H.G. General microbiology. Cambridge: University Press, 1993, 655p.

SCRIBAN, R. Biotecnologia. São Paulo: Editora Manole, 1985, 489p

SPLITTSTOESSER, D. F. Fungi of importance in processed fruit. In: ARORA, D. K.; MUKERERJI, K. G. & MARTH, E. H. (Eds.) **Handbook of Applied Mycology - Foods and Feeds**. New York: Marcel Dekker Inc., 1991. V.3, Cap. 7, p.201-219. Apud BAGLIONI, F. Estudo da ocorrência de fungos filamentosos termorresistentes em polpa de tomate envasada assepticamente. Campinas, 1998, 94p. Tese de Mestrado - Faculdade de Engenharia de Alimentos. UNICAMP.

_____ ; CADWELL, M. C. & MARTIN, M. Ascospore production by *Byssochlamys fulva*. **Journal of Food Science**, v. 34, p. 248-250, 1969

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

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

_____ ; WILKISON, M. & HARRISON, V. Heat activation of *Byssochlamys fulva* ascospores. **Milk Food Technology**, v. 35, n.7, p. 399-401, 1972.

SPURGIN, M. M. Suspected occurrence of *Byssochlamys fulva* in Queensland grown canned strawberries. Queensl. **Journal of Agricultural Anim. Science**, v. 21, p.247-250, 1964. Apud BEUCHAT, L. R.; RICE, S. L. *Byssochlamys* spp. And their importance in processed fruits. **Advances in Food Reaserch**, v. 25, 1979

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

_____ & TRAXLER, R. W. Heat resistance of a *Neosartorya fischeri* strain isolated from pineapple juice frozen concentrate. **Journal of Food Protection**, v.57, p.814-816, 1994.

UGWUANYI, J. O. & OBETA, J. A. N. Incidence of heat resistant fungi in Nsukka, Southern Nigeria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 13, p. 157-164, 1991.

_____. 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, p. 1054-1059, 1999.

VALÍK, L., BARANYI, GORNER, F. Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Penicillium roqueforti*. **International Journal of Food Microbiology**, v.47, p. 141-146, 1999.

_____ & PIECKOVÁ, E. Growth modeling of heat-resistant fungi: the effect of water activity. **International Journal of Food Microbiology**, v.63, p.11-17,2001

VAN DER RIET, W. B. & VAN DER WALT, W. H. Effect of ionizing radiation on ascospores of three strains of *Byssochlamys fulva* in apple juice. **Journal of Food Protection**, v.48, n.12, p. 1016-1018, 1985.

VAN IMPE, J. F.; NICOLAI, B. M; MARTENS, T.; BAERDEMAEKER, J. & VANDEWALLE, J. Dynamic Mathematical Model to predict microbial growth and Inativation during food processing. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, n.9, p.2901-2909, 1992.

_____.; SCHELLEKENS, M.; MARTENS, T. & BAERDEMAEKER, J. Predictive microbiology in a dynamic environment: a system theory approach. **International Journal of Food Microbiology**, v.25, p.227-249, 1995.

WHITING, R. C. Microbial Modeling in Foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.35, p.467,494, 1995.

_____. & BUCHANAN, R. L. A classification of models for predictive microbiology. **Food Microbiology**, v.10, p. 175, 1993.

YATES, A. R. The occurrence of *Byssochlamys* sp. Moulds in Ontario. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, v. 7, n.2, p.148-150, 1974.

_____. & FERGUSON, W. E. Observations on *Byssochlamys nivea* isolated from cucumber brine. **Canadian Journal Botany.**, v.41: 1963.

_____. & MOONEY, D.B. Production of pectic enzymes by *Byssochlamys nivea*. **Journal Institute Canadian Technology and Aliment**, v.1, n.3, p. 106-109, 1968.

YAMAZAKI, M.; SUZUKI, S. & MIYAKI, K. Tremorgenic toxins from *Aspergillus fumigatus*. **Fres.Chem. Pharm. Bull.**, v.19, 1739-1740, 1971. Apud NIELSEN, P.V., BEUCHAT, L.R., FRISVAD, J.C. Growth of and fumitremorgin production by *Neosartoya fischeri* as affected by temperature, light, and water activity. **Applied and Environmental microbiology**, v.54, n°6, p.1504-1510, 1988.

_____. Neurotoxic studies on fumitremorgin A, a tremorgenic mycotoxin, on mice. **Journal Pharmacobiodyn**, v.2, p.119-125, 1979. Apud NIELSEN, P.V., BEUCHAT, L.R., FRISVAD, J.C. Growth of and fumitremorgin production by *Neosartoya fischeri* as affected by temperature, light, and water activity. **Applied and Environmental microbiology**, v.54, n°6, p.1504-1510, 1988.

ZWIETERING, M. H. ;JONGENBURGER, I.; ROMBOUTS, F. M. & VAN'T RIET, K. Modeling of bacterial growth curve. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.1875-1881, 1990.

ZWIETRING, M. H; KOOS, J. T.; HASENACK, B. E; WIT, J. C., RIET, VAN'T RIET,K. Modeling of bacterial growth as a function of temperature. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, n.4, p. 1094-1101, 1991.

ANEXO I

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Neosartorya fischeri*,
PELO MÉTODO DE CONTAGEM, EM SUCO DE ABACAXI**

Tabela I.1 – Contagens Obtidas para *N. fischeri* Inoculado em Suco de Abacaxi (30°C, 12°Brix, pH 3,5) (Repetição 1)

REPETIÇÃO 1			
Tempo (h)	N	N/N ₀	log (N/N ₀)
0,00	1500	1,00	0,00
24,00	650	0,40	-0,40
48,00	100	0,10	-1,20
72,00	4400	2,90	0,50
96,00	4950	3,30	0,50
120,00	10250	6,80	0,80
192,00	115000	76,70	1,90
288,00	63000	42,00	1,60
360,00	65000	43,30	1,60
480,00	45000	30,00	1,50
600,00	52500	35,00	1,50

N = Número de unidades formadoras de colônias (UFC)/mL

N₀ = Número de unidades formadoras de colônias (UFC)/mL

Tabela I.2 – Contagens Obtidas para *N. fischeri* Inoculado em Suco de Abacaxi (30°C, 12°Brix, pH 3,5) (Repetição 2)

REPETIÇÃO 2			
Tempo (h)	N	N/N ₀	log (N/N ₀)
0,00	1500	1,00	0,00
24,00	2500	1,70	0,20
48,00	700	0,50	-0,30
72,00	16500	11,00	1,00
120,00	91000	60,70	1,80
192,00	170000	113,30	2,10
240,00	135000	90,00	2,00
288,00	175000	116,70	2,10
360,00	50000	33,3	1,50

N = Número de unidades formadoras de colônias (UFC)/mL

N₀ = Número de unidades formadoras de colônias (UFC)/mL

ANEXO II

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Byssochlamys nivea*,
PELO MÉTODO DE CONTAGEM, EM SUCO DE ABACAXI**

Tabela II.1 – Contagens Obtidas para *B. nivea* Inoculado em Suco de Abacaxi (20°C, 12°Brix, pH 3,5) (Repetição 1)

Tempo (h)	REPETIÇÃO 1		
	N	N/N ₀	log (N/N ₀)
0,00	7,50E+02	1,00	0,00
6,00	1,00E+03	1,33	0,12
22,30	8,00E+02	1,07	0,03
28,00	1,05E+03	1,40	0,15
45,45	7,50E+02	1,00	0,00
50,25	1,65E+03	2,36	0,37
52,35	8,00E+02	1,07	0,03
70,15	3,50E+02	0,47	-0,33
77,45	5,00E+02	0,67	-0,18
94,02	4,40E+04	58,67	1,77
100,00	4,45E+04	59,33	1,77
117,40	4,15E+05	553,33	2,74
125,30	2,15E+05	286,67	2,46
141,00	4,60E+05	613,33	2,79
142,90	9,00E+05	1285,71	3,11
148,40	3,95E+05	526,67	2,72
190,66	2,50E+06	3571,43	3,55
216,66	3,50E+06	5000,00	3,70
283,74	6,50E+06	9285,71	3,97
354,98	3,50E+06	5000,00	3,70
450,31	1,00E+06	1428,57	3,15
594,31	4,50E+06	6428,57	3,81

N = Número de unidades formadoras de colônias (UFC)/mL

N₀ = Número de unidades formadoras de colônias (UFC)/mL

Tabela II.2 – Contagens Obtidas para *B. nivea* Inoculado em Suco de Abacaxi (20°C, 12°Brix, pH 3,5) (Repetição 2)

Tempo (h)	REPETIÇÃO 2		
	N	N/N ₀	log (N/N ₀)
0,00	1,15E+03	1,00	0,00
6,00	9,50E+02	0,83	-0,08
22,30	7,50E+02	0,65	-0,19
28,00	5,00E+02	0,43	-0,36
45,45	6,00E+02	0,52	-0,28
49,16	5,50E+02	0,65	-0,19
52,35	6,00E+02	0,52	-0,28
70,15	2,50E+02	0,22	-0,66
77,45	6,50E+02	0,57	-0,25
93,41	1,65E+05	194,12	2,29
94,02	4,25E+04	36,96	1,57
100,00	5,50E+04	47,83	1,68
117,40	5,75E+05	500,00	2,70
125,30	4,25E+05	369,57	2,57
138,07	1,90E+06	2235,29	3,35
141,00	3,15E+05	273,91	2,44
148,40	4,00E+05	347,83	2,54
163,57	1,55E+06	1823,53	3,26
213,49	1,70E+07	20000,00	4,30
307,49	8,50E+06	10000,00	4,00
353,60	5,50E+06	6470,59	3,81
402,60	6,00E+06	7058,82	3,85
498,43	7,00E+06	8235,29	3,92

N = Número de unidades formadoras de colônias (UFC)/mL

N₀ = Número de unidades formadoras de colônias (UFC)/mL

Tabela II.3 – Contagens Obtidas para *B. nivea* Inoculado em Suco de Abacaxi (30°C, 12°Brix, pH 3,5) (Repetição 1)

Tempo (h)	REPETIÇÃO 1		
	N	N/N ₀	log (N/N ₀)
0,00	1,5E+02	1,00	0,00
9,40	2,5E+02	1,67	0,22
23,25	5,0E+01	0,33	-0,48
34,48	1,0E+03	6,67	0,82
51,44	4,2E+05	2800,00	3,45
73,00	3,7E+06	24333,33	4,39
95,50	1,4E+07	93333,33	4,97
121,17	1,4E+07	93333,33	4,97
143,84	9,0E+06	60000,00	4,78
168,19	7,0E+06	46666,67	4,67
191,62	6,0E+06	40000,00	4,60
239,92	2,0E+06	13333,33	4,12
335,34	1,0E+06	6666,67	3,82
385,50	1,0E+06	6666,67	3,82

N = Número de unidades formadoras de colônias (UFC)/mL

N₀ = Número de unidades formadoras de colônias (UFC)/mL

Tabela II.4 – Contagens Obtidas Para *B. nivea* Inoculado em Suco de Abacaxi (30°C, 12°Brix, pH 3,5) (Repetição 2)

Tempo (h)	REPETIÇÃO 2		
	N	N/N ₀	log (N/N ₀)
0,00	1,0E+02	1,00	0,00
9,42	1,5E+02	1,50	0,18
20,51	1,5E+02	1,50	0,18
33,71	1,0E+02	1,00	0,00
50,71	1,7E+05	1650,00	3,22
72,37	3,3E+06	32500,00	4,51
94,87	2,5E+06	24500,00	4,39
120,35	1,9E+07	190000,00	5,28
143,28	8,0E+06	80000,00	4,90
167,7	6,0E+06	60000,00	4,78
192,03	1,2E+07	115000,00	5,06
239,28	4,0E+06	40000,00	4,60
334,69	3,5E+06	35000,00	4,54
384,86	2,5E+06	25000,00	4,40

N = Número de unidades formadoras de colônias (UFC)/mL

N₀ = Número de unidades formadoras de colônias (UFC)/mL

Tabela II.5 – Contagens Obtidas para *B. nivea* Inoculado em Suco de Abacaxi (30°C, 12°Brix, pH 3,5) (Repetição 3)

REPETIÇÃO 3			
Tempo (h)	N	N/N ₀	log (N/N ₀)
0,00	6,0E+02	1,00	0,00
9,93	4,5E+02	0,75	-0,12
24,19	4,5E+02	0,75	-0,12
32,715	1,5E+02	0,25	-0,60
46,78	3,1E+05	508,33	2,71
57,53	6,0E+05	1000,00	3,00
71,43	1,3E+06	2166,67	3,34
78,28	7,5E+05	1250,00	3,10
98,58	8,5E+05	1416,67	3,15
168,86	5,0E+05	833,33	2,92
195,66	2,0E+05	333,33	2,52
238,01	2,0E+05	333,33	2,52
311,78	2,0E+05	333,33	2,52

N = Número de unidades formadoras de colônias (UFC)/mL

N₀ = Número de unidades formadoras de colônias (UFC)/mL

Tabela II.6 – Contagens Obtidas para *B. nivea* Inoculado em Suco de Abacaxi (30°C, 12°Brix, pH 3,5) (Repetição 4)

REPETIÇÃO 4			
Tempo (h)	N	N/N ₀	log (N/N ₀)
0,00	1,6E+03	1,00	0,00
8,55	2,1E+03	1,35	0,13
23,08	1,6E+03	1,00	0,00
32,76	2,0E+02	0,13	-0,89
46,69	2,0E+05	125,81	2,10
78,74	6,5E+06	4193,55	3,62
95,16	4,0E+06	2580,65	3,41
117,79	1,1E+07	6774,19	3,83
146,83	9,5E+06	6129,03	3,79
166,71	1,2E+07	7741,94	3,89
190,57	9,0E+06	5806,45	3,76
238,66	1,1E+07	6774,19	3,83
315,49	7,5E+06	4838,71	3,68
336,99	7,5E+06	4838,71	3,68

N = Número de unidades formadoras de colônias (UFC)/mL

N₀ = Número de unidades formadoras de colônias (UFC)/mL

Tabela II.7 – Contagens Obtidas para *B. nivea* Inoculado em Suco de Abacaxi (12°Brix, pH 3,5) Incubado a 30°C (Repetição 5)

REPETIÇÃO 5			
Tempo (h)	N	N/N ₀	log (N/N ₀)
0,00	1,5E+03	1,00	0,00
8,52	2,1E+03	1,37	0,14
23,20	1,0E+03	0,67	-0,18
32,76	1,5E+02	0,10	-1,00
46,86	6,0E+05	400,00	2,60
57,78	5,5E+05	366,67	2,56
70,86	6,5E+06	4333,33	3,64
78,75	1,5E+06	1000,00	3,00
95,23	7,5E+06	5000,00	3,70
117,85	1,0E+07	6666,67	3,82
147,05	1,1E+07	7333,33	3,87
166,88	1,0E+07	6666,67	3,82
190,71	9,5E+06	6333,33	3,80
238,87	2,5E+06	1666,67	3,22
315,70	3,5E+06	2333,33	3,37
385,03	5,0E+05	333,33	2,52

N = Número de unidades formadoras de colônias (UFC)/mL

N₀ = Número de unidades formadoras de colônias (UFC)/mL

Tabela II.8 – Contagens Obtidas para *B. nivea* Inoculado em Suco de Abacaxi (12°Brix, Ph 3,5) Incubado a 30°C (Repetição 6)

REPETIÇÃO 6			
Tempo (h)	N	N/N ₀	log (N/N ₀)
0,00	9,0E+02	1,00	0,00
6,00	1,5E+03	1,67	0,22
21,08	9,5E+02	1,06	0,02
48,33	1,6E+06	1777,78	3,25
56,12	1,6E+06	1722,22	3,24
68,12	7,0E+06	7777,78	3,89
75,95	6,5E+06	7222,22	3,86
95,53	8,5E+06	9444,44	3,98
121,03	1,4E+07	15555,56	4,19
140,16	1,5E+07	16666,67	4,22
163,53	2,5E+06	2777,78	3,44
240,53	2,5E+06	2777,78	3,44

N = Número de unidades formadoras de colônias (UFC)/mL

N₀ = Número de unidades formadoras de colônias (UFC)/mL

Tabela II.9 – Contagens Obtidas para *B. nivea* Inoculado em Suco de Abacaxi (30°C, 12°Brix, pH 3,5) (Repetição 7)

REPETIÇÃO 7			
Tempo (h)	N	N/N ₀	log (N/N ₀)
0,00	1,9E+03	1,00	0,00
7,00	1,5E+03	0,79	-0,10
22,16	1,6E+03	0,82	-0,09
34,16	2,0E+02	0,11	-0,98
49,16	1,7E+06	868,42	2,94
57,23	2,4E+06	1236,84	3,09
70,23	8,0E+06	4210,53	3,62
77,98	8,5E+06	4473,68	3,65
97,73	3,0E+06	1578,95	3,20
123,06	4,5E+06	2368,42	3,37
142,23	7,0E+06	3684,21	3,57
165,64	6,5E+06	3421,05	3,53
242,64	3,5E+06	1842,11	3,27

N = Número de unidades formadoras de colônias (UFC)/mL

N₀ = Número de unidades formadoras de colônias (UFC)/mL

ANEXO III

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Byssochlamys nivea*,
PELO MÉTODO DE CONTAGEM, EM SUCO DE MARACUJÁ**

Tabela III.1 – Contagens Obtidas para *B. nivea* Inoculado em Suco de Maracujá (20°C, 10°Brix, pH 3,5) (Repetição 1)

Tempo (horas)	REPETIÇÃO 1		
	N	N/N ₀	log (N/N ₀)
0,00	1,40E+03	1,00	0,00
5,50	1,05E+03	0,75	-0,12
21,10	1,35E+03	0,96	-0,02
24,45	1,15E+03	0,82	-0,09
28,10	1,20E+03	0,86	-0,07
44,37	1,50E+03	1,07	0,03
49,05	1,15E+03	0,82	-0,09
50,25	8,50E+02	0,74	-0,13
54,25	1,10E+03	0,79	-0,10
69,05	1,25E+03	0,89	-0,05
93,00	2,00E+03	1,43	0,15
96,08	2,50E+03	2,17	0,34
117,10	5,00E+03	3,57	0,55
120,20	2,00E+03	1,43	0,15
125,30	9,00E+03	6,43	0,81
141,20	1,65E+05	117,86	2,07
190,91	4,00E+05	347,83	2,54
216,81	2,00E+06	1739,13	3,24
283,86	2,30E+06	2000,00	3,30
355,08	1,65E+06	1434,78	3,16
450,58	2,40E+06	2086,96	3,32

N = Número de unidades formadoras de colônias (UFC)/mL

N₀ = Número de unidades formadoras de colônias (UFC)/mL

Tabela III.2 – Contagens Obtidas para *B. nivea* Inoculado em Suco de Maracujá (20°C, 10°Brix, pH 3,5) (Repetição 2)

Tempo (horas)	REPETIÇÃO 2		
	N	N/N ₀	log (N/N ₀)
0,00	1,50E+03	1,00	0,00
5,50	1,35E+03	0,90	-0,05
21,10	1,45E+03	0,97	-0,01
24,45	9,00E+02	0,60	-0,22
28,10	7,00E+02	0,47	-0,33
44,37	1,45E+03	0,97	-0,01
49,05	1,10E+03	0,73	-0,13
50,25	1,30E+03	1,73	0,24
54,25	8,50E+02	0,57	-0,25
69,05	1,30E+03	0,87	-0,06
77,50	1,50E+03	1,00	0,00
96,08	1,00E+03	1,33	0,12
104,50	2,00E+03	1,33	0,12
117,10	5,00E+03	3,33	0,52
120,20	2,50E+04	16,67	1,22
125,30	1,30E+05	86,67	1,94
191,00	2,00E+05	266,67	2,43
216,90	1,10E+06	1466,67	3,17
283,92	3,35E+06	4466,67	3,65
355,16	1,35E+06	1800,00	3,26
450,66	1,95E+06	2600,00	3,41

N = Número de unidades formadoras de colônias (UFC)/mL

N₀ = Número de unidades formadoras de colônias (UFC)/mL

Tabela III.3 – Contagens Obtidas para *B. nivea* Inoculado em Suco de Maracujá (30°C, 10°Brix, pH 3,5) (Repetição 1)

REPETIÇÃO 1			
Tempo (h)	N	N/N ₀	log (N/N ₀)
0,00	1,50E+03	1,00	0,00
15,60	1,00E+03	0,67	-0,18
21,80	1,50E+03	1,00	0,00
37,80	5,20E+04	34,67	1,54
47,30	2,10E+05	140,00	2,15
60,00	1,00E+06	666,67	2,82
69,90	7,00E+06	4666,67	3,67
86,90	1,10E+07	7333,33	3,87
91,10	4,20E+06	2800,00	3,45
114,20	7,00E+06	4666,67	3,67
138,00	4,50E+06	3000,00	3,48
161,50	1,15E+07	7666,67	3,88
186,10	5,00E+06	3333,33	3,52
279,00	1,00E+06	666,67	2,82
350,30	1,00E+06	666,67	2,82

N = Número de unidades formadoras de colônias (UFC)/mL

N₀ = Número de unidades formadoras de colônias (UFC)/mL

Tabela III.4 – Contagens Obtidas para *B. nivea* Inoculado em Suco de Maracujá (30°C, 10°Brix, pH 3,5) (Repetição 2)

REPETIÇÃO 2			
Tempo (h)	N	N/N ₀	log (N/N ₀)
0,00	6,00E+02	1,00	0,00
18,30	8,50E+02	1,42	0,15
22,40	8,50E+02	1,42	0,15
43,50	2,20E+04	36,67	1,56
49,10	9,00E+04	150,00	2,18
68,00	6,50E+05	1083,33	3,03
89,20	1,70E+06	2833,33	3,45
117,30	9,00E+06	15000,00	4,18
162,00	9,50E+06	15833,33	4,20
187,60	5,50E+06	9166,67	3,96
211,10	9,00E+06	15000,00	4,18
331,70	7,50E+06	12500,00	4,10
378,00	3,00E+06	5000,00	3,70
427,00	9,50E+06	15833,33	4,20
522,70	8,00E+06	13333,33	4,12

N = Número de unidades formadoras de colônias (UFC)/mL

N₀ = Número de unidades formadoras de colônias (UFC)/mL

ANEXO IV

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Byssochlamys nivea*,
PELO MÉTODO DE FILTRAÇÃO, EM SUCO DE ABACAXI e DE
MARACUJÁ**

Tabela IV.1 – Peso da Biomassa de *B. nivea* Inoculado em Suco de Abacaxi (30°C, 12°Brix, pH 3,5) (Repetição 1)

REPETIÇÃO 1						
Tempo (h)	PF (g)	PF + PB (g)	PB (g/20mL)	PB (g/L)	PB/PB ₀	log(PB/PB ₀)
0,00	0,1555	0,1790	0,0235	1,175	1,00	0,00
6,00	0,1548	0,1630	0,0082	0,410	0,35	-0,45
21,73	0,1556	0,1620	0,0064	0,320	0,27	-0,56
33,53	0,1546	0,1570	0,0024	0,120	0,10	-0,99
49,95	0,156	0,1810	0,025	1,250	1,06	0,02
56,5	0,1571	0,1880	0,0309	1,545	1,31	0,12
69,03	0,1500	0,1980	0,048	2,400	2,04	0,31
76,26	0,1553	0,2060	0,0507	2,535	2,15	0,33
97,88	0,1527	0,2360	0,0833	4,165	3,54	0,55
121,85	0,1500	0,4084	0,2584	12,920	10,99	1,04
165,35	0,1500	0,2991	0,1491	7,455	6,34	0,80
188,35	0,1438	0,2650	0,1212	6,060	5,15	0,71

PF = peso do filtro

PB = peso biomassa

PB₀ = peso inicial biomassa

Tabela IV.2 - Peso da Biomassa de *B. nivea* Inoculado em Suco de Abacaxi (30°C, 12°Brix, pH 3,5) (Repetição 2)

REPETIÇÃO 2						
Tempo (h)	PF (g)	PF + PB (g)	PB (g/20mL)	PB (g/L)	PB/PB ₀	log(PB/PB ₀)
0	11,6537	11,6685	0,0148	0,740	1,000	0,000
9,483	9,143	9,1482	0,0052	0,260	0,351	-0,454
24,249	11,6823	11,686	0,0037	0,185	0,250	-0,602
46,949	9,741	9,7476	0,0066	0,330	0,446	-0,351
57,032	11,5666	11,5854	0,0188	0,940	1,270	0,104
71,165	11,5777	11,6146	0,0369	1,845	2,493	0,397
78,648	11,5806	11,6257	0,0451	2,255	3,047	0,484
98,264	11,6415	11,694	0,0525	2,625	3,547	0,550
119,664	10,4275	10,5015	0,074	3,700	5,000	0,699
145,697	11,6316	11,7537	0,1221	6,105	8,250	0,916
195,496	11,6586	11,8048	0,1462	7,310	9,878	0,995
237,729	10,886	11,035	0,149	7,450	10,068	1,003

PF = peso do filtro

PB = peso biomassa

PB₀ = peso inicial biomassa

Tabela V.3 – Peso da Biomassa de *B. nivea* Inoculado em Suco de Maracujá (20°C, 10°Brix, pH 3,5) (Repetição 1)

REPETIÇÃO 1						
Tempo (h)	PF (g)	PF + PB (g)	PB (g/20mL)	PB (g/L)	PB/PB ₀	log(PB/PB ₀)
0,0	11,6427	11,65	0,0073	0,37	1,00	0,00
50,8	0,1468	0,1609	0,0141	0,70	1,93	0,29
95,6	0,1483	0,1627	0,0144	0,72	1,97	0,30
118,8	0,1440	0,1570	0,013	0,65	1,78	0,25
142,5	0,1474	0,1562	0,0088	0,44	1,21	0,08
190,5	0,1420	0,1558	0,0138	0,69	1,89	0,28
217,2	0,1460	0,1884	0,0424	2,12	5,81	0,76
283,5	0,1507	0,2334	0,0827	4,14	11,33	1,05
306,7	0,1448	0,2211	0,0763	3,82	10,45	1,02
407,3	0,1500	0,2524	0,1024	5,12	14,03	1,15
450,0	0,1500	0,2524	0,1024	5,12	14,03	1,15
520,0	0,1500	0,2524	0,1024	5,12	14,03	1,15
600,0	0,1500	0,2524	0,1024	5,12	14,03	1,15
800,0	0,1500	0,2524	0,1024	5,12	14,03	1,15

PF = peso do filtro

PB = peso biomassa

PB₀ = peso inicial biomassa

Tabela V.4 – Peso da Biomassa de *B. nivea* Inoculado em Suco de Maracujá (20°C, 10°Brix, pH 3,5) (Repetição 2)

REPETIÇÃO 2						
Tempo (h)	PF (g)	PF + PB (g)	PB (g/20mL)	PB (g/L)	PB/PB ₀	log(PB/PB ₀)
0,0	11,6632	11,6710	0,0078	0,43	1,00	0,00
50,8	0,1500	0,1646	0,0146	0,81	1,87	0,27
95,7	0,1473	0,1610	0,0137	0,76	1,76	0,24
118,8	0,1485	0,1600	0,0115	0,64	1,47	0,17
142,6	0,1525	0,1643	0,0118	0,66	1,51	0,18
190,6	0,1543	0,1757	0,0214	1,19	2,74	0,44
217,2	0,1506	0,2072	0,0566	3,14	7,26	0,86
283,5	0,1543	0,2284	0,0741	4,12	9,50	0,98
354,7	0,1455	0,2357	0,0902	5,01	11,56	1,06
454,9	0,1466	0,2676	0,1210	6,72	15,51	1,19
500,0	0,1466	0,2676	0,1210	6,72	15,51	1,19
550,0	0,1466	0,2676	0,1210	6,72	15,51	1,19
620,0	0,1466	0,2676	0,1210	6,72	15,51	1,19
800,0	0,1466	0,2676	0,1210	6,72	15,51	1,19

PF = peso do filtro

PB = peso biomassa

PB₀ = peso inicial biomassa

Tabela V.5 – Peso da Biomassa de *B. nivea* Inoculado em Suco de Maracujá (30°C, 10°Brix, pH 3,5) (Repetição 1)

REPETIÇÃO 1						
Tempo (h)	PF (g)	PF + PB (g)	PB (g/20mL)	PB (g/L)	PB/PB ₀	log(PB/PB ₀)
0	11,5783	11,5900	0,0117	0,585	1,00	0,00
15,5	11,6071	11,6311	0,0240	1,2	2,05	0,31
22,4	0,1522	0,1572	0,0050	0,25	0,43	-0,37
39,6	0,1476	0,1528	0,0052	0,26	0,44	-0,35
50,7	0,1444	0,1624	0,0180	0,9	1,54	0,19
63,7	0,1512	0,1734	0,0222	1,11	1,90	0,28
75,2	0,1480	0,1773	0,0293	1,465	2,50	0,40
91,7	0,1435	0,1809	0,0374	1,87	3,20	0,50
95,7	0,1509	0,2020	0,0511	2,555	4,37	0,64
118,9	0,1460	0,2238	0,0778	3,89	6,65	0,82
142,5	0,1437	0,2410	0,0973	4,865	8,32	0,92
166,1	0,1526	0,2520	0,0994	4,97	8,50	0,93
190,6	0,1520	0,2747	0,1227	6,135	10,49	1,02
283,6	0,1527	0,2722	0,1195	5,975	10,21	1,01
354,8	0,1500	0,2765	0,1265	6,325	10,81	1,03
466,8	0,1436	0,3230	0,1794	8,97	15,33	1,19

PF = peso do filtro

PB = peso biomassa

PB₀ = peso inicial biomassa

Tabela V.6 – Peso Da Biomassa de *B. nivea* Inoculado em Suco de Maracujá (30°C, 10°Brix, pH 3,5) (Repetição 2)

REPETIÇÃO 2						
Tempo (h)	PF (g)	PF + PB (g)	PB (g/20mL)	PB (g/L)	PB/PB ₀	log(PB/PB ₀)
0	0,1452	0,1636	0,018	0,92	1,00	0,00
18,3	0,1435	0,1538	0,0103	0,515	0,56	-0,25
22,0	0,1462	0,1648	0,0186	0,93	1,01	0,00
43,3	0,1418	0,1533	0,0115	0,575	0,62	-0,20
49,0	0,1455	0,1712	0,0257	1,285	1,40	0,15
67,8	0,1513	0,1700	0,0187	0,935	1,02	0,01
89,1	0,1463	0,1869	0,0406	2,03	2,21	0,34
117,1	0,1478	0,2245	0,0767	3,835	4,17	0,62
162,3	0,1460	0,2426	0,0966	4,83	5,25	0,72
187,3	0,1514	0,3013	0,1499	7,495	8,15	0,91
215,9	0,1440	0,2750	0,1310	6,55	7,12	0,85
331,4	0,1440	0,2935	0,1495	7,475	8,13	0,91
377,4	0,1460	0,2911	0,1451	7,255	7,89	0,90
426,3	0,1440	0,3400	0,1960	9,8	10,65	1,03
522,1	0,1448	0,3422	0,1974	9,87	10,73	1,03

PF = peso do filtro

PB = peso biomassa

PB₀ = peso inicial biomassa