



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

**MORGANA ZIMMERMANN**

**MODELAGEM DE CRESCIMENTO DE *Byssochlamys nivea* E**  
***Neosartorya fischeri* EM SUCOS DE FRUTAS SOB**  
**INFLUÊNCIA DA ATIVIDADE DE ÁGUA E IDADE DE**  
**FORMAÇÃO DOS ESPOROS**

**FLORIANÓPOLIS**  
**2008**

MORGANA ZIMMERMANN

**MODELAGEM DE CRESCIMENTO DE *Byssochlamys nivea* E  
*Neosartorya fischeri* EM SUCOS DE FRUTAS SOB  
INFLUÊNCIA DA ATIVIDADE DE ÁGUA E IDADE DE  
FORMAÇÃO DOS ESPOROS**

Dissertação submetida ao curso  
de Pós-Graduação em  
Engenharia de Alimentos como  
requisito parcial para obtenção  
do Grau de Mestre em  
Engenharia de Alimentos.  
Área de Concentração:  
Desenvolvimento de Processos  
da Indústria de Alimentos.

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

**Co-orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Pilar Rodriguez de Massaguer

FLORIANÓPOLIS

2008

**“MODELAGEM DE CRESCIMENTO DE *Byssochlamys nivea* E  
*Neosartorya fischeri* EM SUCOS DE FRUTAS SOB  
INFLUÊNCIA DA ATIVIDADE DE ÁGUA E IDADE DE  
FORMAÇÃO DOS ESPOROS”**

Por

MORGANA ZIMMERMANN

Dissertação julgada para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos, área de concentração de Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

---

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

---

Prof<sup>º</sup>. Dr<sup>º</sup>. José Carlos Cunha Petrus  
**Coordenador do CPGEA**

**Banca Examinadora:**

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Pilar Rodriguez de Massaguer  
**Co-orientadora**

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cleonice Mendes Pereira Sarmiento

---

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Sandra Regina Salvador Ferreira

---

Prof<sup>º</sup>. Dr<sup>º</sup>. José Carlos Cunha Petrus

Florianópolis, 07 de março de 2008.

*Dedico este trabalho aos  
meus amados pais, Moacyr e  
Zenilde, que comigo sonharam  
e nunca deixaram de acreditar  
que seria possível; e ao meu  
querido avô Milton José, que  
através das maravilhosas  
lembranças, amarei  
eternamente.*

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar aqui o meu muito obrigado a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para que eu pudesse concluir mais este passo em minha vida.

Agradeço a Deus, por ter me dado saúde, serenidade e sabedoria para cumprir os meus sonhos.

À minha orientadora, Professora Gláucia Maria Falcão de Aragão, por ter acreditado em mim e por ter depositado sua confiança para a realização desta pesquisa, pelo incentivo, dedicação, paciência, carinho e por partilhar com generosidade sua sabedoria.

À minha co-orientadora, Professora Pilar Rodriguez de Massaguer, pelo carinho ao qual me “adotou” para o desenvolvimento deste trabalho, pela compreensão, dedicação, apoio e por seus ensinamentos.

Aos meus amados pais, pelo amor, confiança, carinho, apoio e incentivo e por me ensinarem a cada dia uma lição que não se aprende na escola: VIVER!

À minha querida e amada avó, que apesar da distância, nunca faltou com amor e apoio.

Aos meus irmãos e cunhados pelo afeto, compreensão e apoio dedicados, permitindo a realização deste trabalho.

Ao Luciano, pela compreensão, carinho, amor e incentivo para sempre lutar pelos meus sonhos.

Aos meus amados sobrinhos, que proporcionam tanta alegria à minha vida.

Aos membros da banca, por aceitarem o convite e pelas críticas e sugestões fundamentais para este trabalho.

Ao bolsista Felipe, que com suas gaiatices descontraía todo o ENGEPIO, mas que ao mesmo tempo desenvolveu seu trabalho com muita seriedade e responsabilidade.

À amiga Suzane, pelo apoio e dedicação na elaboração deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Engenharia Bioquímica, pela amizade conquistada, seja através de ajuda ou pelas risadas entre um experimento e outro, e que espero nunca perder contato. Em especial à “colega de trabalho” Chalana, a quem devo muita gratidão pelo apoio, dedicação, paciência e amizade e à Juliana pela grande amizade.

Às amigas-irmãs Patrícia e Gisele, grandes parceiras para a vida, com quem aprendi muito ao longo destes dois anos. Com quem pude

compartilhar alegrias e tristezas, lágrimas e sorrisos e que me incentivavam nos momentos que precisava prosseguir em minha caminhada.

À amiga Rita e Bruna, que com ternura e amor me acolheram quando precisei de colo.

Às amigas Ana Paula e Gláucia Cristina, pela compreensão, carinho e pelos ótimos momentos de descontração que passamos juntas.

À Amiga Margarete, pelo incentivo para cursar o Mestrado.

Ao projeto PRODETAB, Tetra Pak® e empresas processadoras de sucos, pelo apoio financeiro.

A todos que moram no meu coração e fazem desta vida muito mais que apenas uma passagem.

*A mente humana é como um  
grande teatro, seu lugar não é  
na platéia, mas no palco,  
brilhando na sua inteligência,  
alegrando-se com suas vitórias,  
aprendendo com suas derrotas  
e treinando a cada dia para  
ser.....o autor da sua  
história! (Augusto Cury)*

## RESUMO

O aumento na preocupação da população com a saúde e com a qualidade de vida, fez com que houvesse um acréscimo no consumo de sucos à base de frutas naturais e sem adição de conservantes. Os fungos filamentosos termorresistentes, entre eles *Byssochlamys nivea* e *Neosartorya fischeri*, são um dos principais contaminantes de frutas e produtos de frutas processados termicamente. Os ascósporos destes fungos podem sobreviver à pasteurização comercial usualmente aplicada a produtos a base de frutas podendo deteriorar os mesmos pela germinação e conseqüente crescimento sob condições reduzidas de oxigênio, comprometendo a vida de prateleira do produto, gerando grandes perdas econômicas. Estes fungos são também produtores de enzimas e micotoxinas que degradam os alimentos e prejudicam a saúde humana. Este trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento de *Byssochlamys nivea* e *Neosartorya fischeri* em sucos de abacaxi e mamão, utilizando o método de medida do crescimento radial das colônias (mm/h). Foi analisado o crescimento em diferentes atividades de água ( $a_w$ ) (0,99, 0,96, 0,95, 0,93 e 0,90) e em diferentes idades de formação dos esporos (I) (30, 51, 60, 69 e 90 dias). A temperatura de incubação utilizada nos experimentos foi de 30°C, sendo esta a temperatura ótima de crescimento dos fungos estudados. A inoculação dos fungos foi na concentração de aproximadamente um esporo por mililitro de suco. O diâmetro das colônias foi acompanhado por medição com régua graduada e com auxílio de uma lanterna de uso doméstico a cada 12 horas ou em intervalos menores de tempo dependendo do crescimento do microrganismo. Desta forma foram geradas as curvas de crescimento dos fungos estudados expressas pela variação do diâmetro da colônia (mm) em função do tempo (h). Os parâmetros de crescimento, duração da fase de adaptação ( $\lambda$ ), velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{max}$ ) e diâmetro máximo atingido pela colônia (A), foram obtidos através do ajuste dos dados experimentais aos modelos primário de crescimento de Gompertz Modificado e Logístico. Um planejamento Polinomial completo foi selecionado para estudar os efeitos dos fatores (I e  $a_w$ ) nos parâmetros de crescimento ( $\lambda$ ,  $\mu_{max}$  e A). O desempenho dos modelos foi avaliado pela comparação dos índices estatísticos, coeficiente de regressão ( $R^2$ ), erro médio quadrático (MSE), Fator Bias e Fator de Exatidão, levando à escolha do modelo com melhor ajuste aos dados experimentais (Gompertz Modificado). As análises estatísticas foram feitas utilizando o *software*



*Statistica 6.0* com análise de variância de  $p < 0,1$  para o cálculo dos efeitos. O resultado mostrou que a idade não influencia o crescimento em praticamente nenhuma das condições testadas e que o fator  $a_w$  foi estatisticamente significativo na grande maioria dos casos. Nos resultados obtidos para *B. nivea* em suco de mamão, o maior  $\lambda$  foi de 263,5 (h) para  $a_w$  de 0,90 e idade de 60 dias, e o menor  $\lambda$  foi de 20,4 (h) para  $a_w$  de 0,99 e idade de 60 dias. Para *B. nivea* em suco de abacaxi, o maior  $\lambda$  foi de 322,5 (h) para  $a_w$  de 0,93 e idade de 69 dias, e o menor  $\lambda$  foi de 43,2 (h) para  $a_w$  de 0,96 e idade de 51 dias. Para *N. fischeri* em suco de mamão, o maior  $\lambda$  foi de 267,4 (h) para  $a_w$  de 0,90 e idade de 60 dias, e o menor  $\lambda$  foi de 18,1 (h) para  $a_w$  de 0,99 e idade de 60 dias. Para *N. fischeri* em suco de abacaxi, o maior  $\lambda$  foi de 184,3 (h) para  $a_w$  de 0,90 e idade de 60 dias e o menor  $\lambda$  foi de 68,2 (h) para  $a_w$  de 0,96 e idade de 69 dias. Estes dados mostraram que ao aumentar a  $a_w$  dos sucos de abacaxi e mamão de 0,90 para 0,99, o  $\lambda$  tende a diminuir para ambos os fungos. Estes dados são úteis para estabelecer a vida de prateleira de sucos prontos para beber, estocados a temperatura ambiente.

## ABSTRACT

The consumption of natural fruit juice without preservative addition has risen due to the concern with health and quality of life. Heat-resistant fungi, such as *Byssochlamys nivea* and *Neosartorya fischeri*, are responsible for spoilage and degradation of fruits and heat-processed fruit products. Ascospores of these species can survive the thermal process normally applied to fruit products. They also can germinate during the storage and growth under reduced oxygen conditions, decreasing the product shelf life and causing economic losses. These moulds are able to produce mycotoxines, what may be a public health concern. The aim of this work is to analyze the *Byssochlamys nivea* and *Neosartorya fischeri* growth in pineapple and papaya juice, measuring the radial growth of the colonies (mm/h). The growth was carried out under different conditions of water activity ( $a_w$ ) (0.99, 0.96, 0.95, 0.93 and 0.90) and ascospores age (I) (30, 51, 60, 69 and 90 days). The best growth temperature for these moulds was used (30°C). Juices were inoculated within a concentration of one spore per milliliter of juice. Colony diameter was measured with a graduated ruler and a flashlight, at a time interval of 12 hours or less, depending on the microorganism growth. Therefore, growth curves were plotted by variation of colony diameter (mm) versus time (h). Growth parameters: lag phase ( $\lambda$ ), maximum specific growth rate ( $\mu_{max}$ ) and maximum colony diameter (A), were obtained by the fit of Modified Gompertz model and Logistic model to experimental data. To compare the prediction of the models, the correlation coefficient ( $R^2$ ), the mean square error (MSE), Bias Factor and Accuracy Factor were calculated. The Modified Gompertz model presented a slightly better performance than Logistic model and it was used to determine the growth parameters. A Complete Polynomial Rotational Design (CPRD) was elaborated in order to study the effect of the factors (I and  $a_w$ ) in the growth parameters ( $\lambda$ ,  $\mu_{max}$  and A). The software *Statistica 6.0* was used for statistic analysis with significance level of  $p < 0.1$ . The results showed that the molds growth was affected more by water activity than by ascospores age in almost all situations. For the growth of *B. nivea* in papaya juice, the highest  $\lambda$  was 263.5 (h) for  $a_w$  of 0.90 and 60 days of ascospores age, and the lowest  $\lambda$  was 20.4 (h) for  $a_w$  of 0.99 and 60 days of ascospores age. For the *B. nivea* in pineapple juice, the highest  $\lambda$  was 322.5 (h) for  $a_w$  of 0.93 and 69 days of ascospores age, and the lowest  $\lambda$  was 43.2 (h) for  $a_w$  of 0.96 and 51 days of ascospores age. For the *N. fischeri* in papaya juice, the highest  $\lambda$

was 267.4 (h) for  $a_w$  of 0.90 and 60 days of ascospores age, and the lowest  $\lambda$  was 18.1 (h) for  $a_w$  of 0.99 and 60 days of ascospores age. For the *N. fischeri* in pineapple juice, the highest  $\lambda$  was 184.3 (h) for  $a_w$  of 0.90 and 60 days of ascospores age, and the lowest  $\lambda$  was 68.2 (h) for  $a_w$  of 0.96 and 69 days of ascospores age. These data have shown that by increasing the  $a_w$  of the pineapple and papaya juices from 0.90 to 0.99, the  $\lambda$  value tends to decrease for both moulds. The results are useful to establish the shelf life of the ready to drink juices stored at room temperature.

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I</b> .....	25
1. Introdução .....	26
<b>CAPÍTULO II</b> .....	28
1. Fungos filamentosos termorresistentes .....	29
1.1. Principais espécies.....	30
1.1.1. <i>Byssochlamys</i> .....	30
1.1.2. <i>Neosartorya fischeri</i> .....	30
1.2. Produção de enzimas e micotoxinas por fungos termorresistentes	31
1.3. Alimentos susceptíveis à contaminação.....	33
1.4. Produção dos ascósporos.....	34
1.5. Ativação dos ascósporos .....	35
1.6. Fatores que interferem no crescimento e na resistência de fungos filamentosos termorresistentes.....	36
1.6.1. Atividade de água ( $a_w$ ) .....	37
1.6.2. Temperatura de estocagem.....	37
1.6.3. Ph ou presença de ácidos orgânicos .....	38
1.6.4. Idade e temperatura de produção dos ascósporos.....	39
1.6.5. Atmosfera ( $O_2$ e $CO_2$ ) .....	39
1.7. Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC).....	40
2. Consumo de bebidas à base de frutas.....	40
3. Microbiologia Preditiva.....	41
3.1. Objetivos e aplicações.....	42
3.2. Modelos preditivos.....	43
3.2.1. Modelos primários.....	45
3.2.1.1. Modelo de Gompertz.....	46
3.2.1.2. Modelo de Gompertz Modificado .....	47
3.2.1.3. Modelo Logístico .....	48
3.2.2. Modelos Secundários .....	48
3.2.3. Modelos Computacionais .....	49
3.3. Determinação do crescimento microbiano .....	49
3.3.1. Determinação do crescimento de fungos.....	50
<b>CAPÍTULO III</b> .....	52
1. Fungos filamentosos termorresistentes .....	53
1.1. Pré-preparação das suspensões de ascósporos .....	53
1.2. Preparação das suspensões de ascósporos.....	53

1.3. Coleta dos ascósporos das garrafas de Roux.....	53
1.4. Quantificação da suspensão de esporos .....	54
2. Meios de crescimento.....	55
2.1. Padronização dos sucos - ajuste da $a_w$ .....	55
3. Avaliação do crescimento dos fungos.....	55
4. Efeito combinado da $a_w$ e da idade de formação dos esporos no crescimento de <i>n. fischeri</i> e <i>b. nivea</i> em suco de abacaxi e suco de mamão (delineamento composto central rotacional) .....	57
5. Determinação dos parâmetros de crescimento dos fungos.....	59
5.1. Estimativa dos parâmetros de crescimento .....	59
6. Análise estatística dos modelos.....	60
7. Análise estatística dos parâmetros de crescimento obtidos através de modelagem matemática.....	61
8. Modelagem secundária dos parâmetros de crescimento em função dos fatores de crescimento .....	61

#### **CAPÍTULO IV** .....

1. Influência da variação da atividade de água ( $a_w$ ) e da idade dos esporos no crescimento de <i>byssochlamys nivea</i> e <i>neosartorya fischeri</i> em sucos de frutas – análise completa .....	62
1.1. Crescimento de <i>Byssochlamys nivea</i> em suco de mamão.....	63
1.1.1. Variação da idade nas diferentes $a_w$ analisadas de <i>Byssochlamys nivea</i> em suco de mamão.....	63
1.1.2. Variação da $a_w$ nas diferentes idades analisadas de <i>Byssochlamys nivea</i> em suco de mamão.....	65
1.2. Crescimento de <i>Byssochlamys nivea</i> em suco de abacaxi.....	68
1.2.1. Variação da idade nas diferentes $a_w$ analisadas de <i>Byssochlamys nivea</i> em suco de abacaxi .....	68
1.2.2. Variação da $a_w$ nas diferentes idades analisadas de <i>Byssochlamys nivea</i> em suco de abacaxi .....	70
1.3. Crescimento de <i>Neosartorya fischeri</i> em suco de mamão.....	72
1.3.1. Variação da idade nas diferentes $a_w$ analisadas de <i>Neosartorya fischeri</i> em suco de mamão.....	72
1.3.2. Variação da $a_w$ nas diferentes idades analisadas de <i>Neosartorya fischeri</i> em suco de mamão.....	74
1.4. Crescimento de <i>Neosartorya fischeri</i> em suco de abacaxi.....	76
1.4.1. Variação da idade nas diferentes $a_w$ analisadas de <i>Neosartorya fischeri</i> em suco de abacaxi .....	76
1.4.2. Variação da $a_w$ nas diferentes idades analisadas de <i>Neosartorya fischeri</i> em suco de abacaxi .....	78

2. Influência da variação da atividade de água ( $a_w$ ) e da idade dos esporos no crescimento de <i>byssochlamys nivea</i> e <i>neosartorya fischeri</i> em sucos de frutas – planejamento experimental .....	80
2.1. Modelagem de crescimento de <i>Byssochlamys nivea</i> em suco de mamão.....	80
2.1.1. Análise de variância e estimativa dos efeitos calculados para o parâmetro $\lambda$ no crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de mamão .....	84
2.1.2. Análise de variância e estimativa dos efeitos calculados para o parâmetro $\mu_{max}$ no crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de mamão .....	86
2.1.3. Análise de variância e estimativa dos efeitos calculados para o parâmetro $a$ no crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de mamão .....	87
2.2. Modelagem de crescimento de <i>Byssochlamys nivea</i> em suco de abacaxi.....	89
2.2.1. Análise de variância e estimativa dos efeitos calculados para o parâmetro $\lambda$ no crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi ....	93
2.2.2. Análise de variância e estimativa dos efeitos calculados para o parâmetro $\mu_{max}$ no crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi .....	95
2.2.3. Análise de variância e estimativa dos efeitos calculados para o parâmetro $A$ no crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi....	96
2.3. Modelagem de crescimento de <i>Neosartorya fischeri</i> em suco de mamão.....	98
2.3.1. Análise de variância e estimativa dos efeitos calculados para o parâmetro $\lambda$ no crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de mamão	103
2.3.2. Análise de variância e estimativa dos efeitos calculados para o parâmetro $\mu_{max}$ no crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de mamão.....	105
2.3.3. Análise de variância e estimativa dos efeitos calculados para o parâmetro $a$ no crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de mamão	106
2.4. Modelagem de crescimento de <i>Neosartorya fischeri</i> em suco de abacaxi.....	107
2.4.1. Análise de variância e estimativa dos efeitos calculados para o parâmetro $\lambda$ no crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi	111
2.4.2. Análise de variância e estimativa dos efeitos para o parâmetro $\mu_{max}$ no crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi .....	111
2.4.3. Análise de variância e estimativa dos efeitos calculados para o parâmetro $a$ no crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi	112
3. Discussões sobre a influência da variação da atividade de água ( $a_w$ ) e da idade dos esporos no crescimento de <i>byssochlamys nivea</i> e <i>neosartorya fischeri</i> em sucos de frutas .....	114

4. Análise da variação da atividade de água ( $a_w$ ) no tempo de adaptação do crescimento de <i>byssochlamys nivea</i> e <i>neosartorya fischeri</i> em sucos de frutas .....	115
4.1. <i>Byssochlamys nivea</i> em suco de mamão .....	116
4.2. <i>Byssochlamys nivea</i> em suco de abacaxi .....	117
4.3. <i>Neosartorya fischeri</i> em suco de mamão .....	117
4.4. <i>Neosartorya fischeri</i> em suco de abacaxi.....	118
<b>CAPÍTULO V</b> .....	120
1. Conclusões .....	121
Sugestões .....	123
Referências bibliográficas.....	124
Apêndice I.....	138

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1.** Curva típica de crescimento microbiano (Van Impe et al. 1995; Swinnen et al. 2004)..... 45
- Figura 3.1.** Medida de diâmetro da colônia com auxílio de uma lanterna de uso doméstico. ....56
- Figura 3.2.** Garrafas de PET contendo suco de abacaxi, em suporte inclinado a 45° .....57
- Figura 4.1.** Curvas de crescimento de *B. nivea* em suco de mamão para todas as  $a_w$  estudadas na idade de 30 dias. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais..... 64
- Figura 4.2.** Curvas de crescimento de *B. nivea* em suco de mamão para todas as  $a_w$  estudadas na idade de 60 dias. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais..... 64
- Figura 4.3.** Curvas de crescimento de *B. nivea* em suco de mamão para todas as  $a_w$  estudadas na idade de 90 dias. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais..... 65
- Figura 4.4.** Curvas de crescimento de *B. nivea* em suco de mamão para todas as idades estudadas na  $a_w$  de 0,95. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais..... 66
- Figura 4.5.** Curvas de crescimento de *B. nivea* em suco de mamão para todas as idades estudadas na  $a_w$  de 0,99. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais..... 67
- Figura 4.6.** Curvas de crescimento de *B. nivea* em suco de mamão para todas as idades estudadas na  $a_w$  de 0,90. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais..... 67
- Figura 4.7.** Curvas de crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi para todas as  $a_w$  estudadas na idade de 30 dias. A linha contínua



representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais. .... 68

**Figura 4.8.** Curvas de crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi para todas as  $a_w$  estudadas na idade de 60 dias. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais. .... 69

**Figura 4.9.** Curvas de crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi para todas as  $a_w$  estudadas na idade de 90 dias. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais. .... 69

**Figura 4.10.** Curvas de crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi para todas as idades estudadas na  $a_w$  de 0,99. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais. .... 70

**Figura 4.11.** Curvas de crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi para todas as idades estudadas na  $a_w$  de 0,95. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais. .... 71

**Figura 4.12.** Curvas de crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi para todas as idades estudadas na  $a_w$  de 0,90. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais. .... 71

**Figura 4.13.** Curvas de crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão para todas as  $a_w$  estudadas na idade de 30 dias. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais..... 72

**Figura 4.14.** Curvas de crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão para todas as  $a_w$  estudadas na idade de 60 dias. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais..... 73

**Figura 4.15.** Curvas de crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão para todas as  $a_w$  estudadas na idade de 90 dias. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais..... 73

**Figura 4.16.** Curvas de crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão para todas as idades estudadas na  $a_w$  de 0,99. A linha

contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais..... 74

**Figura 4.17.** Curvas de crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão para todas as idades estudadas na  $a_w$  de 0,95. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais..... 75

**Figura 4.18.** Curvas de crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão para todas as idades estudadas na  $a_w$  de 0,90. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais..... 75

**Figura 4.19.** Curvas de crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi para todas as  $a_w$  estudadas na idade de 30 dias. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais..... 76

**Figura 4.20.** Curvas de crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi para todas as  $a_w$  estudadas na idade de 60 dias. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais..... 77

**Figura 4.21.** Curvas de crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi para todas as  $a_w$  estudadas na idade de 90 dias. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais..... 77

**Figura 4.22.** Curvas de crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi para todas as idades estudadas na  $a_w$  de 0,99. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais..... 78

**Figura 4.23.** Curvas de crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi para todas as idades estudadas na  $a_w$  de 0,95. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais..... 79

**Figura 4.24.** Curvas de crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi para todas as idades estudadas na  $a_w$  de 0,90. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais..... 79

<b>Figura 4.25.</b> Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) à média das duplicatas dos dados de crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de mamão para idade (I) de 60 dias e $a_w$ de 0,99.....	81
<b>Figura 4.26.</b> Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) à média das duplicatas dos dados de crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de mamão para idade (I) de 51 dias e $a_w$ de 0,93. As barras representam o desvio padrão das duplicatas em cada ponto. ....	81
<b>Figura 4.27.</b> Curva de nível e superfície de resposta dos fatores $a_w$ versus idade sobre o parâmetro de crescimento $\lambda$ de <i>B. nivea</i> em suco de mamão. ....	85
<b>Figura 4.28.</b> Curva de nível e superfície de resposta dos fatores $a_w$ versus idade sobre o parâmetro de crescimento $\mu_{max}$ de <i>B. nivea</i> em suco de mamão.....	87
<b>Figura 4.29.</b> Curva de nível e superfície de resposta dos fatores $a_w$ versus idade sobre o parâmetro de crescimento A de <i>B. nivea</i> em suco de mamão.....	88
<b>Figura 4.30.</b> Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) à média das duplicatas dos dados de crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi para idade (I) de 60 dias e $a_w$ de 0,95. As barras representam o desvio padrão das duplicatas em cada ponto. ....	90
<b>Figura 4.31.</b> Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) à média das duplicatas dos dados de crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi para idade (I) de 60 dias e $a_w$ de 0,99. As barras representam o desvio padrão das duplicatas em cada ponto. ....	90
<b>Figura 4.32.</b> Curva de nível e superfície de resposta dos fatores $a_w$ versus idade sobre o parâmetro de crescimento $\lambda$ de <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi. ....	94
<b>Figura 4.33.</b> Curva de nível e superfície de resposta dos fatores $a_w$ versus idade sobre o parâmetro de crescimento $\mu_{max}$ para <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi. ....	96
<b>Figura 4.34.</b> Curva de nível e superfície de resposta dos fatores $a_w$ versus idade sobre o parâmetro de crescimento A para <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi. ....	98
<b>Figura 4.35.</b> Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) à média das duplicatas dos dados de crescimento de <i>N</i>	

*fischeri* em suco de mamão na idade (I) de 60 dias e  $a_w$  de 0,99. As barras representam o desvio padrão das duplicatas em cada ponto..... 99

**Figura 4.36.** Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) à média das duplicatas dos dados de crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão na idade (I) de 60 dias e  $a_w$  de 0,90. As barras representam o desvio padrão das duplicatas em cada ponto..... 99

**Figura 4.37.** Curva de nível e superfície de resposta dos fatores  $a_w$  versus idade sobre o parâmetro de crescimento  $\lambda$  para *N. fischeri* em suco de mamão. .... 104

**Figura 4.38.** Curva de nível e superfície de resposta dos fatores  $a_w$  versus idade sobre o parâmetro de crescimento  $\mu_{max}$  para *N. fischeri* em suco de mamão. .... 106

**Figura 4.39.** Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) à média das duplicatas dos dados de crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi na idade (I) de 60 dias e  $a_w$  de 0,95. As barras representam o desvio padrão das duplicatas em cada ponto..... 108

**Figura 4.40.** Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) à média das duplicatas dos dados de crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi na idade (I) de 60 dias e  $a_w$  de 0,99. As barras representam o desvio padrão das duplicatas em cada ponto..... 108

**Figura 4.41.** Curva de nível e superfície de resposta dos fatores  $a_w$  versus idade sobre o parâmetro de crescimento  $A$  para *N. fischeri* em suco de abacaxi. .... 113

**Figura 4.42.** Influência da  $a_w$  sobre a média dos valores de  $\lambda$  de *B. nivea* em suco de mamão, nas diferentes idades estudadas. A linha contínua mostra o ajuste de um modelo secundário empírico (potência) aos dados obtidos. .... 116

**Figura 4.43.** Influência da  $a_w$  sobre a média dos valores de  $\lambda$  de *B. nivea* em suco de abacaxi, nas diferentes idades estudadas. A linha contínua mostra o ajuste de um modelo secundário empírico (potência) aos dados obtidos. .... 117

**Figura 4.44.** Influência da  $a_w$  sobre a média dos valores de  $\lambda$  de *N. fischeri* em suco de mamão, nas diferentes idades estudadas. A linha contínua mostra o ajuste de um modelo secundário empírico (potência) aos dados obtidos. .... 118

**Figura 4.45.** Influência da  $a_w$  sobre a média dos valores de  $\lambda$  de *N. fischeri* em suco de abacaxi, nas diferentes idades estudadas. A linha contínua mostra o ajuste de um modelo secundário empírico (potência) aos dados obtidos. .... 119

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1.</b> Níveis do DCCR para os sucos de abacaxi e mamão. ....	58
<b>Tabela 3.2.</b> DCCR para avaliação da influência dos fatores: idade de formação dos esporos (I) e atividade de água ( $a_w$ ), sendo $x_1$ os valores codificados para I e $x_2$ os valores codificados para $a_w$ .....	58
<b>Tabela 4.1.</b> Parâmetros estatísticos para validar o emprego dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) no crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de mamão. ....	82
<b>Tabela 4.2.</b> Parâmetros de crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de mamão obtidos pelo ajuste do modelo de Gompertz Modificado, no DCCR.....	83
<b>Tabela 4.3.</b> Efeitos dos fatores estimados sobre o parâmetro $\lambda$ no crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de mamão. ....	84
<b>Tabela 4.4.</b> ANOVA dos efeitos dos fatores sobre a variável $\lambda$ de <i>B. nivea</i> em suco de mamão. ....	85
<b>Tabela 4.5.</b> Efeitos dos fatores estimados sobre o parâmetro $\mu_{\max}$ no crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de mamão. ....	86
<b>Tabela 4.6.</b> ANOVA dos efeitos dos fatores sobre a variável $\mu_{\max}$ de <i>B. nivea</i> em suco de mamão. ....	86
<b>Tabela 4.7.</b> Efeitos dos fatores estimados sobre o parâmetro A no crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de mamão. ....	87
<b>Tabela 4.8.</b> ANOVA dos efeitos dos fatores sobre a variável A de <i>B. nivea</i> em suco de mamão. ....	88
<b>Tabela 4.9.</b> Parâmetros estatísticos para validar o emprego dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) na modelagem do crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi. ....	91
<b>Tabela 4.10.</b> Parâmetros de crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi obtidos pelo ajuste do modelo de Gompertz Modificado, no DCCR.....	92
<b>Tabela 4.11.</b> Efeitos dos fatores estimados sobre o parâmetro $\lambda$ no crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi.....	93

<b>Tabela 4.12.</b> ANOVA dos efeitos dos fatores sobre a variável $\lambda$ de <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi. ....	94
<b>Tabela 4.13.</b> Efeitos dos fatores estimados sobre o parâmetro $\mu_{\max}$ no crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi. ....	95
<b>Tabela 4.14.</b> ANOVA dos efeitos dos fatores sobre a variável $\mu_{\max}$ de <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi. ....	95
<b>Tabela 4.15.</b> Efeitos dos fatores estimados sobre o parâmetro A no crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi. ....	97
<b>Tabela 4.16.</b> ANOVA dos efeitos dos fatores sobre a variável A de <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi. ....	97
<b>Tabela 4.17.</b> Parâmetros estatísticos para validar o emprego dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) no crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de mamão. ....	101
<b>Tabela 4.18.</b> Parâmetros de crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de mamão obtidos pelo ajuste do modelo de Gompertz Modificado, no DCCR. ....	102
<b>Tabela 4.19.</b> Efeitos dos fatores estimados sobre o parâmetro $\lambda$ no crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de mamão. ....	103
<b>Tabela 4.20.</b> ANOVA dos efeitos dos fatores sobre a variável $\lambda$ de <i>N. fischeri</i> em suco de mamão. ....	104
<b>Tabela 4.21.</b> Efeitos dos fatores estimados sobre o parâmetro $\mu_{\max}$ no crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de mamão. ....	105
<b>Tabela 4.22.</b> ANOVA dos efeitos dos fatores sobre a variável $\mu_{\max}$ de <i>N. fischeri</i> em suco de mamão. ....	105
<b>Tabela 4.23.</b> Efeitos dos fatores estimados sobre o parâmetro A no crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de mamão. ....	107
<b>Tabela 4.24.</b> Parâmetros estatísticos para validar o emprego dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) no crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi. ....	109
<b>Tabela 4.25.</b> Parâmetros de crescimento <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi obtidos pelo ajuste do modelo de Gompertz Modificado, no DCCR. ....	110
<b>Tabela 4.26.</b> Efeitos dos fatores estimados sobre o parâmetro $\lambda$ no crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi. ....	111

<b>Tabela 4.27.</b> Efeitos dos fatores estimados sobre o parâmetro $\mu_{\max}$ no crescimento de <i>fischeri</i> em suco de abacaxi.....	112
<b>Tabela 4.28.</b> Efeitos dos fatores estimados sobre o parâmetro A no crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi. ....	112
<b>Tabela 4.29.</b> ANOVA dos efeitos dos fatores sobre a variável A de <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi. ....	113
<b>Tabela 4.30:</b> Estimativa dos efeitos e valores de p que representam a influência da variação dos fatores $a_w$ e I sobre os parâmetros de crescimento $\lambda$ , $\mu_{\max}$ e A de <i>Byssochlamys nivea</i> e <i>Neosartorya fischeri</i> em sucos de mamão e abacaxi.....	114



## NOMENCLATURA

MEA - Ágar Extrato de Malte

CYA - Czapeck Ágar Extrato de Levedura

PDA - Ágar Extrato de Batata

$a_w$  - Atividade de Água

I - Idade de formação dos esporos (Idade) (dia)

PET – Polietileno tereftalato

Rpm - Rotação por minuto

UFC - Unidade Formadora de Colônia

$\mu_{\max}$  - Velocidade específica máxima de crescimento (mm/h)

$\lambda$  - Duração da fase de adaptação (fase lag) (horas)

A - Diâmetro máximo atingido pela colônia (mm)

$v_{\text{observado}}$  - Valores observados experimentalmente

$v_{\text{predito}}$  - Valores preditos pelo modelo

**CAPÍTULO I**  
**INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

É crescente, nos últimos anos, a demanda por produtos a base de frutas com características mais próximas possíveis dos produtos *in natura*, e de melhor qualidade nutricional, sendo os sucos de frutas os produtos mais comercializados.

Ocupando um papel importante na indústria agrícola, a produção de sucos de frutas é um dos mais promissores negócios do mundo se tratando de comércio internacional, com grande participação dos países em desenvolvimento. De acordo com a Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e Bebidas Não-Alcoólicas (ABIR), no ano de 2006, o volume de sucos prontos produzidos no país foi de 388,4 milhões de litros, o que representou um crescimento de 16,5% em relação ao ano anterior.

O aumento da demanda por consumo de produtos a base de frutas e a preocupação cada vez maior com a segurança alimentar, têm levado as indústrias a buscarem processos capazes de preservar os produtos contra agentes deteriorantes como bactérias e fungos, sem ocasionar grandes perdas na qualidade do produto final.

Os métodos de preservação destes produtos mais frequentemente utilizados são a pasteurização e o processo UHT, sendo pouco frequente o uso de conservantes químicos.

Os fungos filamentosos, na sua maioria, apresentam limitada resistência ao calor. Entretanto, os fungos filamentosos termorresistentes são capazes de sobreviver à temperatura de pasteurização devido à sua característica de produzir ascósporos. O uso de altas temperaturas ativa os ascósporos dormentes, que germinam e crescem no produto final, ocasionando a sua deterioração durante o período de estocagem e, conseqüentemente, resultando em grandes perdas econômicas.

As espécies reportadas como deteriorantes de produtos a base de frutas são: *Byssochlamys nivea* e *Byssochlamys fulva*, *Neosartorya fischeri*, *Talaromyces* sp. e *Eupenicillium* sp.. Os gêneros *Byssochlamys* sp. e *Neosartorya fischeri* são ainda relatados como produtores de micotoxinas.

A distribuição mundial de fungos filamentosos termorresistentes é reconhecida atualmente e sua ocorrência tem sido frequentemente detectada em linhas de processamento de sucos. Muitos trabalhos vêm sendo realizados com o objetivo de esclarecer suas fontes de contaminação, ocorrência, crescimento, deterioração, inativação e produção de toxinas.

A microbiologia preditiva se apresenta como uma ferramenta importante para avaliação do crescimento de fungos termorresistentes em diferentes produtos a base de frutas, sendo possível saber o quanto poderão interferir na vida de prateleira dos mesmos. Esta análise pode ser feita através de modelos matemáticos que descrevem o comportamento dos microrganismos sob diferentes condições de temperatura, pH, atividade de água, entre outros fatores. Estes modelos podem prever a segurança microbiológica ou a vida de prateleira dos produtos sob condições comerciais, fundamentando-se na cinética de crescimento microbiano. O uso destes modelos preditivos pode reduzir a necessidade de análises laboratoriais dispendiosas.

Este trabalho, que faz parte do Projeto Prodetab em parceria com EMBRAPA, UNICAMP e UFSC “Melhoria da qualidade de sucos mediante o uso de alta pressão e controle microbiológico”, teve como objetivo estudar a influência da idade de formação dos esporos (I) de *Byssochlamys nivea* e *Neosartorya fischeri*, e a influência da atividade de água ( $a_w$ ) no crescimento dos mesmos em sucos de abacaxi e mamão. Já se sabe que a idade de formação dos esporos influencia na resistência térmica de *N. fischeri* (SLONGO, 2004), mas não se encontram estudos que esclarecem se este fator influencia no crescimento dos fungos. Os modelos de Gompertz Modificado e Logístico foram ajustados às curvas de crescimento e permitiram o cálculo dos parâmetros de crescimento: duração da fase de adaptação ( $\lambda$ ), velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{max}$ ) e diâmetro máximo atingido pela colônia (A). A influência dos fatores I e  $a_w$  sobre os parâmetros de crescimento foi analisada utilizando-se um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com triplicata no ponto central. O efeito dos fatores foi avaliado por análise de variância ( $p < 0,1$ ).

**CAPÍTULO II**  
**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 1. FUNGOS FILAMENTOSOS TERMORRESISTENTES

Os fungos filamentosos, na sua maioria, possuem limitada resistência térmica, sendo seus conídios e hifas destruídos facilmente pelo calor. A fase assexuada (conidial) dos gêneros mais comuns como *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, entre outros, são destruídos, em média, após 5 minutos a 60°C (TOURNAS, 1994).

Entretanto, algumas espécies que produzem ascósporos são capazes de resistir a altas temperaturas (HOCKING & PITT, 1985). Estes ascósporos são esporos produzidos pelos representantes do sub-reino Ascomyceto. O tamanho, a forma e a ornamentação destes ascósporos variam com o tipo, espécie e linhagem de microrganismos, bem como as condições dos meios nos quais os esporos são formados (PITT & HOCKING, 1985).

Outra característica destes fungos é a formação do asco, que é uma estrutura em forma de saco ou bolsa. Quando amadurecem, os ascos sofrem uma ruptura por onde são liberados os ascósporos. Estes possuem parede e geralmente são ornamentados e refrateis. Os ascos de alguns destes fungos são recobertos por um grande corpo de frutificação, o ascocarpo (PITT & HOCKING, 1985).

Os fungos filamentosos termorresistentes mais comumente estudados pertencem aos gêneros *Byssochlamys*, *Neosartorya*, *Talaromyces* e *Eupenicillium*. Eles têm sido reportados devido às suas habilidades em sobreviver às temperaturas normalmente empregadas nos tratamentos de pasteurização de alimentos ácidos como frutas e seus derivados (HOCKING & PITT, 1985; SPLITTSTOESSER et al., 1970; TOURNAS, 1994). Devido a esta resistência, podem crescer e contaminar produtos durante a estocagem à temperatura ambiente, o que decorre em grandes perdas econômicas (TOURNAS, 1994).

Segundo CHAPMAN et al. (2007) e VALÍK & PIECKOVÁ (2001), o solo é a principal fonte de contaminação por fungos termorresistentes, sendo as frutas que estão em contato direto com o solo as mais susceptíveis por estes microrganismos. As demais frutas são contaminadas por respingos de chuva ou pelo transporte de esporos através do vento.

Os primeiros sinais da presença de fungos termorresistentes nas frutas é um ligeiro amolecimento das mesmas, podendo aparecer um odor desagradável e um sabor rançoso, e em seguida, há uma total desintegração da fruta (PITT & HOCKING, 1999).

## 1.1. PRINCIPAIS ESPÉCIES

Os gêneros mais termorresistentes reportados na literatura são o *Byssochlamys* e o *Neosartorya* (KOTZEKIDOU, 1997; SLOGO & ARAGÃO, 2006; TOURNAS & TRAXLER, 1994).

### 1.1.1. *Byssochlamys*

Os fungos do gênero *Byssochlamys* (*B. nivea* e *B. fulva*) são caracterizados pela ausência de ascocarpo (cleistotécio, gymnotécio ou qualquer outro corpo que envolva os ascos) durante o desenvolvimento ou maturação. Os ascos são produzidos em cachos abertos, irregulares, contendo oito ascósporos em associação com fragmentos de hifas, mas não envolvidos por elas (BEUCHAT & RICE, 1979; PITT & HOCKING, 1999). Os ascos permanecem inalterados a menos que sejam submetidos a um tratamento mecânico (SPLITTSTOESSER, 1991).

Os ascósporos são estruturas transparentes, habitualmente ovais e lisas, com dimensões que variam de 2,8-4,0 x 3,4-5,6 µm. As fases anamorfias ou imperfeitas do *B. fulva* e *B. nivea* são *Paecilomyces fulvus* e *Paecilomyces niveus*, respectivamente. As colônias de *B. nivea* geralmente são brancas em Ágar Extrato de Malte (MEA) ou Czapeck Ágar Extrato de Levedura (CYA), sendo seus ascos de dimensões maiores que os de *B. fulva*. As colônias deste último são marrons amareladas nestes mesmos meios (BEUCHAT & RICE, 1979).

A temperatura ótima de crescimento de *B. nivea* está entre 30°C e 37°C (TOURNAS, 1994; PITT & HOCKING, 1999); sendo que nenhum crescimento foi observado a 8°C (HULL, 1939; PITT & HOCKING, 1999). A mínima atividade de água ( $a_w$ ) para o crescimento de *B. nivea* foi 0,89 a 30°C e 0,87 a 37°C (ROLAND & BEUCHAT, 1984).

### 1.1.2. *Neosartorya fischeri*

Os fungos desta espécie apresentam ascos recobertos por cleistotécio, dando a colônia uma aparência granular. Estes ascos podem sofrer ruptura instantânea de modo que só os ascósporos livres são observados. A única espécie deteriorante de alimentos reportada é *Neosartorya fischeri*, que possui três variedades: *N. fischeri* var. *fischeri*, *N. fischeri* var. *glabra* e *N. fischeri* var. *spinosa*, sendo cada uma distinta na ornamentação de seus ascósporos, tipos de toxinas e

metabólitos secundários produzidos. Somente as variedades *glabra* e *spinosa* têm sido isoladas de produtos processados a base de frutas, enquanto que a *fischeri* é predominante no solo (NIELSEN, 1991; KAVANAGH et al., 1963; UGWUANYI & OBETA, 1991).

As colônias em MEA são branca-creme e 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 conhecida por *Aspergillus fischeri*, entretanto o estado teleomórfico é o mais encontrado (PITT & HOCKING, 1999; TOURNAS, 1994).

PITT & HOCKING (1999), constataram que a temperatura ótima de crescimento de *N. fischeri* está na faixa de 25 a 37°C, não apresentando crescimento a 5°C. A atividade de água mínima para crescimento de *N. fischeri* é de 0,915 (BAGLIONI, 1998).

## 1.2. PRODUÇÃO DE ENZIMAS E MICOTOXINAS POR FUNGOS TERMORRESISTENTES

Os fungos filamentosos termorresistentes produzem várias enzimas, sendo as pectinases, as amilases e as proteinases as mais abundantes (TOURNAS, 1994). OLIVER & RENDLE (1934) relataram a primeira produção de enzimas pectinolíticas por *Byssoschlamys*.

UGWUANYI & OBETA (1999) relataram a atividade de enzimas celulolíticas e pectinolíticas produzidas por *Byssoschlamys nivea*, *Neosartorya spp.* e *Paecilomyces varioti* em meio contendo pectina, em tecido de manga. Estes autores também avaliaram o efeito da desintegração causada por estas enzimas, em meios artificiais contendo tecidos de manga. Houve produção de liases, pectinases e hidrolases em todos os meios analisados. Para *B. nivea*, foi observada uma grande atividade de celulases. Foi verificado que os isolados causaram uma considerável desintegração dos meios.

Muitos fungos são indesejáveis nos alimentos, por produzirem uma grande variedade de enzimas que provocam a deterioração dos mesmos. Além disso, muitos fungos podem produzir metabólitos secundários tóxicos quando estão se multiplicando. Estes metabólitos são denominados “micotoxinas” e, quando ingeridos, podem causar alterações biológicas prejudiciais tanto ao homem, quanto aos animais.

Dentre os gêneros de fungos termorresistentes, o de maior interesse na produção de micotoxinas é o *Byssoschlamys*, produzindo



metabólitos como a patulina, ácido byssochlâmico, byssotoxina A, asyetrina e variotina (BEUCHAT & RICE, 1979).

Algumas linhagens de *Neosartorya fischeri* são capazes de produzir toxinas como as fumitremorginas (A, B e C), verruculogena, fischerina e terrina (TOURNAS, 1994; HOIRE & YAMAZAKI, et al., 1979; PATTERSON et al., 1981). Estes compostos são capazes de atuar no sistema nervoso central e causar tremores, convulsões e morte em animais (TOURNAS, 1994; YAMAZAKI et al., 1971; PERERA et al., 1982). A verruculogena é a mais tóxica, causando tremores em ovelhas e suínos em concentração de 5 a 10 mg/kg de peso corporal, administrado por meio intravenoso (PERERA, et al., 1982).

NIELSEN et al. (1988), em estudo realizado para verificar a produção de micotoxinas por *N. fischeri* em vários meios, observaram que a adição de glicose, frutose e sacarose aumentavam a produção de fumitremorgina. A verruculogena foi produzida em todos os meios testados, em maior quantidade que as demais, seguida da fumitremorgina A e C. Os autores também estudaram as temperaturas ótimas para a produção de verruculogena e fumitremorginas A e C, em CYA a pH 7,0. Os resultados obtidos foram 25°C, 30°C e 37°C, respectivamente. A produção de fumitremorgina foi retardada à temperatura de 15°C, mas aumentando o período de incubação observou-se uma concentração aproximadamente igual à observada a 25°C. O uso de luz aumentou a produção de fumitremorgina, mas não tão acentuadamente como quando foi adicionada glicose, frutose ou sacarose ao meio (CYA, pH 3,5, 25°C). A produção desta micotoxina 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. A produção de fumitremorgina foi observada em atividades de água tão baixas quanto 0,92 em CYA suplementado com glicose, mas não em atividades de água menores que 0,97 em CYA suplementado com sacarose.

A patulina, considerada tóxica para plantas, microrganismos e animais, e extremamente nociva à saúde humana, é uma micotoxina produzida por espécies do gênero *Aspergillus* (*A. clavatus*, *A. terreus*), *Penicillium* (*P. urticae*, *P. expansum*) e *Byssochlamys* (*B. nivea* e *B. fulva*); sendo que estes últimos têm demonstrado alto potencial para a produção da mesma (RICE et al., 1977; TOURNAS, 1994).

O controle da patulina em sucos e derivados de frutas pode ser obtido utilizando-se matéria-prima de boa qualidade e estocagem em atmosfera controlada. Devem ser retirados tecidos e frutas rompidas ou danificadas. Também pode ser utilizada filtração com carvão ativado,

fermentação do suco, adição de dióxido sulfúrico, adição de ácido ascórbico, irradiação e pasteurização (LEGGOT & SHEPHARD, 2001).

### 1.3. ALIMENTOS SUSCEPTÍVEIS À CONTAMINAÇÃO

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

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

Vários trabalhos demonstraram 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), suco concentrado de abacaxi e maracujá congelados (TOURNAS & TRAXLER, 1994) e *Byssochlamys* de *drink* de uva termicamente processado (VAN DER RIET & VAN DER WALT, 1985), suco de fruta concentrado – 50°Brix (PALOU et al., 1998) e polpa de morango (ARAGÃO, 1989).

JASENKA et al. (1991) constataram o recebimento de conservas deterioradas por fungos provindos de uma planta de processamento. As cepas identificadas foram de *N. fischeri* (49,2%), *B. nivea* (16,4%) e *T. flavus* (20,9%).

Em estudo da ocorrência de fungos termorresistentes durante o processamento asséptico de polpa de tomate foram encontradas cinquenta linhagens, sendo que o isolado mais termorresistente, identificado como *N. fischeri*, sobreviveu ao choque térmico de 100°C por 25 minutos. Também foi constatado que a maior contaminação por *N. fischeri* na linha de processamento se deu na matéria-prima e na água de transporte e de pré-lavagem. Conclui-se que o aparecimento deste fungo ocorreu devido à falta de matéria-prima de boa qualidade, sanificação adequada, condições assépticas das áreas de processamento

e embalagens e procedimento adequado de higienização (BAGLIONI, 1998).

Vinte culturas de fungos filamentosos termorresistentes foram isoladas de pasta de tomate enlatada, com o objetivo de estimar a eficiência da pasteurização aplicada em produtos enlatados comerciais. Dentre as cepas isoladas, foram identificados ascósporos de nove linhagens, sendo três de *B. fulva*, duas de *B. nivea* e quatro de *N. fischeri* (KOTZEKIDOU, 1997).

#### 1.4. PRODUÇÃO DOS ASCÓSPOROS

A produção de ascósporos é uma característica dos fungos filamentosos termorresistentes. O tamanho, forma e ornamentação dos mesmos variam com o tipo, espécie, cepa e condição do meio onde foram formados. A produção e a ativação destes ascósporos são dependentes tanto da forma de fatores genéticos, como a linhagem do microrganismo, quanto fatores externos como tempo, temperatura, meio de crescimento e/ou aquecimento (TOURNAS, 1994).

Ao estudar a esporulação de um isolado de *Byssochlamys* encontrado em bebida de frutas, SPLITTSTOESSER et al. (1969) reportaram que este fungo formou poucos ascósporos em laboratório. Ao investigar os fatores que afetaram a esporulação desta cepa, observou-se que a população máxima de ascos estava presente quando estes cresciam em caldo de extrato de malte a 5%, pH 2,0 e 3,0, por um período de 4 a 14 dias a 30°C. Diferentes sucos de frutas e vegetais foram testados como substratos para o crescimento destes fungos; os sucos de ameixa, maçã e uva propiciaram a maior produção de ascósporos seguidos pelo suco de laranja, coquetel de vegetais e tomate.

O meio PDA (Agar Extrato de Batata) foi utilizado por RAJASHEKHARA et al. (1996) e SURESH et al. (1996) para a produção de ascósporos de *N. fischeri* isolados, respectivamente, de mamão e uva. A temperatura e o tempo de incubação utilizados em ambos os trabalhos foi de 30°C por 30 dias.

SAMSON & VAN REENEN-HOEKSTRA (1988) reportaram que o meio MEA tem maior capacidade de produção de esporos em comparação com outros meios, pelo fato desse ser mais rico em nutrientes.

### 1.5. ATIVAÇÃO DOS ASCÓSPOROS

Uma vez que os ascósporos de fungos termorresistentes são formados, estes desenvolvem com o tempo uma dormência (estado de baixa função metabólica), que pode ser quebrada por um tratamento sub-letal, usualmente um choque térmico chamado ativação. A ativação permite a germinação e o crescimento em condições favoráveis (BEUCHAT & RICE, 1979; BEUCHAT, 1986; SPLITTSTOESSER et al., 1993).

GOTTLIEB (1964) citou que 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, entre outros.

Em experimentos realizados por BEUCHAT (1986), foi determinada a ótima ativação dos ascósporos de *Byssochlamys*, *Neosartorya* e *Talaromyces* em meio específico de aquecimento. No experimento foram testadas três linhagens de *T. flavus*, três de *N. fischeri*, duas de *B. nivea* e uma de *B. fulva*. O tratamento térmico ocorreu nas temperaturas de 70, 75, 80 e 85°C. Verificou-se que o tempo e a temperatura ótimos para ativação variam com a linhagem do microrganismo, sendo então, específicos para cada cepa testada. As cepas mais termorresistentes de *T. flavus* e *N. fischeri* apresentaram ativação ótima em 85°C por 15-30 minutos e 85°C por 15 minutos, respectivamente. As linhagens de *B. fulva* e *B. nivea* testadas exibiram menor termorresistência que as cepas de *T. flavus* e *N. fischeri*, que necessitaram de 70 a 75°C por 30 minutos para ativação.

RAJASHEKHARA et al. (1996), após testarem tratamentos de 70, 75, 80, 85 e 90°C para a ativação de ascósporos de *N. fischeri*, encontraram o binômio tempo/temperatura de 80°C por 30 minutos. Neste mesmo ano, SURESH et al. (1996) encontraram que o tempo de ativação para ascósporos de *N. fischeri* foi de 15 a 60 minutos na temperatura de 75°C e 15 minutos a 80°C.

Recentemente, SLONGO & ARAGÃO (2006), estudando a influência do meio de aquecimento, temperatura de produção e idade dos ascósporos na ativação de esporos de *N. fischeri*, reportaram que os menores tempos de ativação (85°C/5' para suco de abacaxi e 85°C/10' para suco de mamão) foram observados com os esporos produzidos a

25°C e um mês de idade. Entretanto, quando os ascósporos foram produzidos a 35°C por três meses, foram necessários 15 minutos a 85°C para ativá-los em suco de abacaxi e 20 minutos à mesma temperatura para ativá-los em suco de mamão.

#### 1.6. FATORES QUE INTERFEREM NO CRESCIMENTO E NA RESISTÊNCIA DE FUNGOS FILAMENTOSOS TERMORRESISTENTES

A conservação de produtos a base de frutas baseia-se principalmente no uso de processamento térmico e na utilização de conservantes químicos. Como a deterioração destes produtos é devido à ação microbiológica, o tratamento térmico, pasteurização e/ou esterilização dado ao produto, deve ser adequado para a destruição da maioria dos contaminantes, sejam eles bactérias, fungos filamentosos ou fungos filamentosos termorresistentes; contudo, o tratamento não deve diminuir a qualidade do produto processado. Caso isto não seja possível, medidas preventivas com a finalidade de evitar o desenvolvimento destes microrganismos e a deterioração provocada por eles, devem ser aplicadas (TOURNAS, 1994).

Industrialmente, são vários os fatores que contribuem para a sobrevivência e crescimento de fungos termorresistentes em alimentos, sendo o mais importante a contaminação inicial, que deve ser rigorosamente controlada. Outros fatores importantes que também devem ser controlados são:  $a_w$ , pH, presença de ácidos orgânicos, tipos de meios de aquecimento, adição de conservantes, potencial de óxido-redução, conteúdo de nutrientes, idade e temperatura de produção dos ascósporos, atmosfera ( $O_2$ ,  $CO_2$ ,  $N_2$ ), tensão de oxigênio na embalagem e temperatura de estocagem dos produtos (TOURNAS, 1994; JAY, 1992).

Se o grau de contaminação inicial for baixo, um tratamento térmico mais ameno reduzirá o número de unidades formadoras de colônias (UFC) a níveis aceitáveis, porém se a contaminação inicial for alta, serão necessários tempos mais longos e temperaturas mais elevadas de processamento para que o produto alcance o mesmo nível de esterilidade (TOURNAS, 1994). O autor relata ainda que, aquecimentos excessivos alteram as características organolépticas e, conseqüentemente, alteram a qualidade nutricional do produto. O tratamento térmico deve destruir a maioria dos fungos termorresistentes, sem diminuir a qualidade do produto final. Com o objetivo de garantir esta qualidade final do produto, algumas alternativas, consideradas a

seguir, podem ser adotadas para controlar o crescimento de fungos termorresistentes.

### 1.6.1. Atividade de Água ( $a_w$ )

Em alimentos, a água é o componente dominante e pode ocorrer na forma intracelular e/ou extracelular em vegetais e animais. A influência da  $a_w$  no crescimento, germinação e produção de metabólitos dos microorganismos é um fenômeno bem conhecido (COUVERT, et al. 2007).

A  $a_w$  mínima necessária varia para cada microrganismo e é influenciada por fatores do meio que a compõem. BAGLIONI (1998) encontrou que a  $a_w$  mínima para crescimento de *N. fischeri* é de 0,91. Já ROLAND & BEUCHAT (1984) encontraram que a mínima  $a_w$  para crescimento de *B. nivea* foi 0,89 a 30°C e 0,87 a 37°C.

Para que não haja a germinação de ascósporos sobreviventes do processo de pasteurização, produtos com alta  $a_w$  devem ser estocados em temperaturas baixas. A diminuição simultânea da  $a_w$  e da temperatura de armazenamento, exerce ação sinérgica na conservação de alimentos termo processados (BEUCHAT & RICE, 1979; NIELSEN et al., 1988).

OBETA E UGWUANYI (1997) avaliaram o crescimento de *Neosartorya* sp. em ágar contendo sucos de frutas nigerianos (ágar suco de manga, ágar suco de laranja e ágar suco de abacaxi) contendo vários níveis de açúcar adicionados. A adição de sacarose nas concentrações de 10% para o suco de abacaxi, 11,5% para o suco de laranja e 9% para o suco de manga aumentou o número de colônias. Entretanto, a adição de sacarose nas concentrações iguais ou superiores a 30 % para suco de abacaxi, 31,5% para suco de laranja e 29% para suco de manga, diminuíram o número de colônias produzidas.

### 1.6.2. Temperatura de Estocagem

A temperatura é um dos fatores extrínsecos mais importantes no controle do crescimento de microrganismos. Para a destruição dos ascósporos seria necessário um tratamento térmico tão severo que comprometeria a textura, as características organolépticas e nutricionais e a qualidade do produto. Entretanto, outros fatores devem ser aplicados para controlar o crescimento dos fungos termorresistentes (TOURNAS, 1994).

O efeito da temperatura de estocagem foi o primeiro parâmetro estudado na tentativa de prevenir a deterioração das frutas processadas.

OLLIVER & RENDLE (1934) reportaram que a temperatura ótima para crescimento de *Byssochlamys* estava entre 30 e 37°C, e que ao estocar o produto na faixa entre -12°C e -7°C, o crescimento era inibido, não significando, no entanto, a morte do microrganismo.

Segundo NIELSEN et al. (1988), *N. fischeri* cresceu entre 10°C e 52°C, com uma temperatura ótima entre 26 e 45°C. PITT & HOCKING (1999), constataram que a temperatura ótima de crescimento de *N. fischeri* está na faixa de 25 a 37°C, não apresentando crescimento a 5°C.

Estes estudos revelam que o crescimento de *Byssochlamys* e *Neosartorya* pode ser controlado estocando os produtos em temperaturas reduzidas, mesmo que a inativação dos ascósporos não possa ser assegurada (TOURNAS, 1994).

### 1.6.3. pH ou Presença de Ácidos Orgânicos

De acordo com TOURNAS (1989), espécies de *Byssochlamys* cresceram em substratos com pH entre 2,0 e 9,0, enquanto *Neosartorya fischeri* cresceu entre valores de 3,0 e 7,95. Poucos estudos trazem informações sobre a faixa de pH ou sobre o pH ótimo de crescimento de fungos termorresistentes, porém sabe-se que estes crescem muito bem em regiões de acidez. No entanto, a manipulação do pH para o controle do crescimento seria impraticável, pois seriam necessários valores muito reduzidos, inadequados para produtos alimentícios (TOURNAS, 1994).

Em estudo do efeito do pH do meio de aquecimento na porcentagem de germinação de ascósporos de *B. nivea*, o pH ótimo dos meios foi de 3,0 a 5,5 e, após o choque térmico (75°C/5'), verificou-se a germinação apenas na faixa de pH de 4,0 a 4,5 e acima de pH 5,0 (YATES et al., 1967).

Conforme SLOGO (2004), o efeito dos ácidos orgânicos sobre a tolerância de ascósporos de fungos termorresistentes depende principalmente do tipo de ácido e do pH do meio de aquecimento. CONNER & BEUCHAT (1987) estudaram a inativação térmica de ascósporos de *N. fischeri* utilizando como meios de aquecimento soluções de ácido fumárico, málico e tartárico (1 e 2%) a pH 2,5, 3,0 e 3,5. Os autores verificaram que ocorreu uma diminuição da resistência térmica dos ascósporos no meio com ácido fumárico e um pequeno aumento da mesma nos meios com os demais ácidos.

#### 1.6.4. Idade e Temperatura de Produção dos Ascósporos

CONNER & BEUCHAT (1987) avaliaram a resistência térmica de *N. fischeri* utilizando diferentes idades e temperaturas de produção de ascósporos. Os ascósporos foram coletados em intervalos de tempo durante 114 dias. As temperaturas de produção foram 18, 21, 25 e 30°C e o meio de crescimento utilizado foi ágar suco de uva. A resistência térmica foi testada em tratamentos de 70 e 80°C, durante 30 e 60 minutos e o meio de aquecimento utilizado foi uma solução de tampão fosfato (pH 7,0). Os resultados mostraram uma maior dormência e um aumento da resistência térmica com o aumento do tempo de produção. No fim dos 114 dias, observou-se que um tratamento térmico de 85°C por 60 minutos não foi suficiente para inativar os ascósporos formados a 21, 25 e 30°C.

Em estudo da influência da temperatura de produção de esporos na resistência térmica de *B. nivea*, ENGEL & TEUBER (1991) realizaram experimentos com ascósporos em meio MEA por 21 dias nas temperaturas de 20, 25, 30 e 37°C. Os autores observaram que a produção a 30°C proporcionou a maior resistência térmica.

TOURNAS & TRAXLER (1994) estudaram a influência da idade dos ascósporos de *N. fischeri* na sua resistência térmica. Os ascósporos foram incubados a 30°C durante 1, 2, 3 e 6 meses. Ao final de cada período de produção, realizou-se um tratamento térmico a 88°C por 1 hora em água deionizada. Como resultado obteve-se que o tempo de produção gerou um aumento da resistência térmica do fungo.

#### 1.6.5. Atmosfera (O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>)

TANIWAKI et al. (2001) em estudo realizado para verificar o crescimento de fungos e produção de micotoxinas em atmosfera modificada, observaram que *B. nivea* foi capaz de crescer em atmosferas com 20% ou 40% de CO<sub>2</sub> e menos que 0,5% de O<sub>2</sub>. YATES et al. (1967) verificaram que o crescimento de *B. nivea* era comprometido quando o mesmo crescia em atmosferas com elevadas concentrações de CO<sub>2</sub>, o que proporcionou a redução do crescimento do micélio, onde, em alguns casos, como para atmosfera de 100% de CO<sub>2</sub>, este fungo apresentou um crescimento de apenas 4% em relação ao seu crescimento normal. KING Jr. & WHITEHAND (1990) realizaram estudos de tolerância do crescimento de fungos termorresistentes (*B. fulva*, *T. flavus* e *N. fischeri*) sob baixas tensões de O<sub>2</sub> e demonstraram que o



fungo *T. flavus* é o menos tolerante a baixos níveis de oxigênio, em relação aos demais.

### 1.7. BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO (BPF) E ANÁLISE DE PERIGOS E PONTOS CRÍTICOS DE CONTROLE (APPCC)

As Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Análises de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) são ferramentas de qualidade que asseguram que os produtos sejam fabricados e controlados com padrões de qualidade apropriados para o uso pretendido e requerido pelo registro. Como os fungos termorresistentes são provenientes do solo, podendo contaminar as frutas e, posteriormente as linhas de processamento, esse controle de qualidade se torna indispensável para a obtenção de produtos seguros (SLONGO, 2004).

Em linhas de processamento de sucos, as Boas Práticas de Fabricação consistem em verificar os critérios adequados de lavagem para remoção das sujidades das frutas, utilizar cloro para lavagem das frutas lisas, utilizar um transporte adequado para que não haja risco de rompimento, realizar a lavagem e sanificação adequadas das caixas de transporte das frutas, remover resíduos provenientes da matéria-prima antes de chegar à linha de processamento e desprezar sempre a água de lavagem das frutas (GRESSONI, 2002).

## 2. CONSUMO DE BEBIDAS À BASE DE FRUTAS

Os refrigerantes dominaram quase solitários a seção de bebidas não alcoólicas dos supermercados durante décadas. Nos últimos tempos, foram obrigados a dividir espaço com produtos que cada vez mais caem no gosto dos consumidores. São os sucos que não precisam de refrigeração, os chás e as bebidas à base de frutas. Nos últimos anos, as vendas de sucos prontos para consumo mais que dobraram no Brasil, embalados pela demanda por produtos mais saudáveis. O produto industrializado que, por melhoria nas técnicas de embalagem e conservação, mantém as características do suco feito na hora, trouxe um processo de fabricação que, na prática, resulta em um suco com sabor mais próximo ao da fruta e “gostinho” de que acabou de ser feito. O aumento do consumo de sucos é um fenômeno mundial. Ao examinar a situação mundial, descobre-se que o Brasil é um dos mercados mais atraentes a ser explorado (RAMIRO, 2003).

O Brasil teve uma previsão de colheita próxima de 18 milhões de toneladas de frutas em 2007, sendo o abacaxi, o sexto na lista dos mais

produzidos, com 1,7 milhões de frutos (ABIR, 2008). Em pesquisa realizada por SAVITCI et al. (1995), em 1995, os países que mais importaram o suco de abacaxi brasileiro foram os EUA, Holanda, Inglaterra, Itália e Espanha, e em menor escala foram França, Canadá, Alemanha, Portugal, Finlândia e Bélgica.

Os sucos de caixa foram os mais vendidos em 2006, representando em média 80% do total de sucos vendidos. Apenas nos primeiros cinco meses de 2007, foram produzidos mais de 190 milhões de litros de sucos. No mercado de sucos, o grande filão que ainda existe para ser explorado é a tendência para o aspecto "vida saudável." Ademais há grande capacidade de oferta ainda não consolidada, mas em permanente expansão, de frutas tropicais, onde o Brasil se destaca pela variedade de sabores (ABIR, 2008).

Segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e Bebidas Não-Alcoólicas (ABIR), no ano de 2006 o volume de sucos prontos produzidos no país foi de 388,4 milhões de litros, o que representou um crescimento de 16,5% em relação ao ano anterior (ABIR, 2008).

### 3. MICROBIOLOGIA PREDITIVA

Nos anos 20 se iniciaram 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 *Clostridium botulinum* (McMEEKIN, & ROSS, 2002; WHITING, 1995).

A microbiologia preditiva é uma ferramenta importante para avaliar o crescimento de fungos termorresistentes em diversos produtos. Através desta, é possível prever o quanto o crescimento destes fungos poderá interferir na vida de prateleira dos produtos. Esta análise pode ser feita através de modelos matemáticos utilizados para descrever o comportamento dos microrganismos sob diferentes condições de temperatura, pH, atividade de água, entre outros fatores (ZWIETERING et al., 1991; CHEROUTRE-VIALETE et al., 1998).

### 3.1. OBJETIVOS E APLICAÇÕES

De acordo com VAN IMPE (2005), a microbiologia preditiva oferece modelos matemáticos, com um desenvolvimento preciso e ao mesmo tempo com versatilidade. Segundo SHIMONI & LABUZA (2000), a microbiologia preditiva de alimentos é uma área promissora e está em grande desenvolvimento na microbiologia de alimentos. Ela tem recebido significativa atenção científica nos últimos anos, fornecendo base de dados e pacotes de *softwares* que podem ser ferramentas úteis na análise de riscos. A microbiologia preditiva é considerada uma área multidisciplinar, pois abrange conhecimentos de microbiologia, engenharia e estatística para fornecer prognósticos convenientes sobre o comportamento microbiano em alimentos (SCHAFFNER & LABUZA, 1997). Conforme VALÍK et al. (1999), a microbiologia preditiva estuda o comportamento de microrganismos sob diferentes condições químicas, físicas e físico-químicas, tais como temperatura,  $a_w$ , pH ou compostos antimicrobianos. Isto pode ajudar a identificar os pontos críticos da produção e processos de distribuição, além da otimização da produção e distribuição em cadeia.

O objetivo da microbiologia preditiva é descrever matematicamente o crescimento ou a diminuição de microrganismos presentes em alimentos sob condições ambientais específicas (WHITING, 1995; MEMBRÉ et al., 2005; McMEEKIN et al., 1997; ROSS, 1999).

Microbiologistas de alimentos têm procurado modelos eficientes para prever o crescimento microbiano e sua conseqüência na estocagem destes produtos (BARANYI & ROBERTS, 1994). Eles utilizam três parâmetros na caracterização da curva de crescimento microbiano: a duração da fase lag ( $\lambda$ ), a velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{max}$ ) e a densidade populacional máxima (A); sendo que todos os três precisam ser estimados de forma precisa (BATY & DELIGNETTE-MULLER, 2004).

Segundo DALGAARD & KOUTSOUMANIS (2001), a estimativa exata dos parâmetros de crescimento, particularmente a velocidade específica máxima de crescimento e a duração da fase lag, são essenciais em muitas áreas da microbiologia. Alguns exemplos são a caracterização de efeitos antimicrobianos, a otimização de meios microbiológicos e o desenvolvimento de modelos cinéticos utilizados nas tecnologias de alimentos e de fermentação. A microbiologia preditiva também tem utilidade na elaboração de planos de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), identificando perigos e

pontos críticos, especificando limites e ações corretivas (McMEEKIN & ROSS, 2002; VERSYCK et al., 1999; SKINNER et al., 1994).

Modelos que descrevem o crescimento da população de microrganismos formam a base da estratégia adotada para a segurança alimentar. A avaliação do risco em segurança alimentar requer conhecimento da probabilidade para que o tamanho da população microbiana não exceda valores definidos. Esta probabilidade geralmente limita a vida de prateleira de muitos alimentos (SOBOLEVA et al. 2000; KAKIOMENOUR et al., 1995; JACXSENS et al., 2003; CORBO et al., 2004).

DAVEY (1994), ALAVI et al. (1999) e VAN IMPE et al. (1995), relataram que o uso de modelos preditivos pode reduzir a necessidade de análises laboratoriais dispendiosas e, em longo prazo, poderá ser considerado um pré-requisito para o controle computacional de operações e otimização de processos. Segundo McCLURE et al. (1994), as aproximações feitas pela microbiologia preditiva estão sendo largamente aceitas, sendo 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.

### 3.2. MODELOS PREDITIVOS

Poder-se-ia pensar, há muitos anos, que os modelos a serem utilizados para a microbiologia preditiva poderiam ser simplesmente copiados daqueles elaborados para a biotecnologia e a engenharia química, mas BARANYI & ROBERTS (1994) ressaltam que são muitos os motivos que para que a microbiologia preditiva construa seus próprios modelos estatístico-matemáticos. Alguns destes motivos são listados a seguir:

- Contrariamente do que ocorre na biotecnologia, que visa a otimização, o objetivo dos microbiologistas de alimentos é minimizar ou prevenir o crescimento microbiano, investigando profundamente os fatores inibitórios;
- A concentração de células de interesse é muito menor do que na biotecnologia (maior que  $10^6$  ou  $10^7$  células/mL). Conseqüentemente, alguns métodos que são validados a altas concentrações celulares, como a turbidimetria e as medidas de condutância, não podem ser aplicados diretamente; sendo necessário estabelecer a relação entre o número de células e a medida na menor concentração celular;

- A fase lag do crescimento microbiano é menos importante em um biorreator do que na microbiologia de alimentos;
- A quantidade de informações sobre 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.

Os modelos que descrevem o crescimento microbiano formam a base para a adoção de estratégias na área de segurança alimentar. O objetivo de um modelo é prever quando e em quais circunstâncias, o número microbiano crescerá a um nível que possa ameaçar a saúde pública (SOBOLEVA et al. 2000).

Os modelos desenvolvidos na microbiologia preditiva podem ser utilizados para calcular o número de microrganismos presentes em um alimento, dado a composição específica, a linha de produção e a cadeia de distribuição do mesmo (WIJTZES et al., 1998).

De acordo com STRINGER & DENNIS (2000), o desenvolvimento de um modelo microbiológico deve incluir as seguintes considerações:

- Seleção e preparação apropriada do microrganismo alvo;
- Inoculação do microrganismo em um meio de cultura apropriado e com características definidas;
- Armazenamento do meio de cultura sob condições controladas;
- Amostragem dos meios de crescimento para o microrganismo alvo em intervalos de tempo determinados;
- Construção de um modelo que descreva as respostas do microrganismo alvo;
- Validação das predições do modelo, tendo como preferência a validação do modelo em um alimento para assegurar que são significativas;
- Reparametrização ou melhoramento do modelo.

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

WHITING & BUCHANAN (1993) propuseram uma classificação dos modelos matemáticos utilizados na microbiologia preditiva, onde os modelos são divididos em primários, secundários e

terciários. De acordo com 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 uma população média de células; estruturado, quando é formado por vários componentes, ou não estruturado, quando é formado por um único componente.

### 3.2.1. Modelos Primários

Os modelos primários descrevem mudanças no número de microrganismos ou nas respostas microbianas (produção de toxinas e/ou enzimas) com o tempo, num ambiente específico. Estes modelos podem estimar a quantidade de unidades formadoras de colônias por mililitros (UFC/mL), formação de toxinas, níveis de substrato e produtos metabólicos, que são medidas diretas de resposta (SWINNEN et al., 2004; WHITING, 1995). Uma equação ou função matemática descreve a mudança da resposta com o tempo, fornecendo um grupo de valores dos parâmetros.

Os parâmetros obtidos pelos modelos primários mais conhecidos são:  $\lambda$  - duração da fase lag (horas),  $\mu_{\max}$  - velocidade específica máxima de crescimento ( $\text{horas}^{-1}$ ) e  $A$  - aumento logarítmico da população (UFC/mL). Estes parâmetros podem ser visualizados na Figura 2.1.

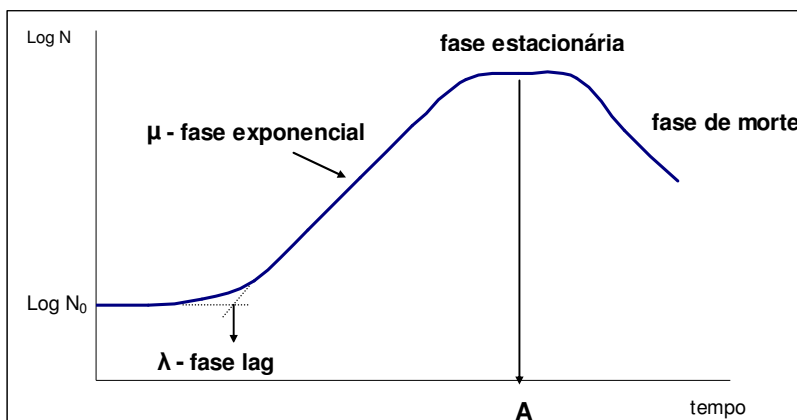


Figura 2.1. Curva típica de crescimento microbiano (VAN IMPE et al. 1995; SWINNEN et al. 2004).

A curva de crescimento microbiano normalmente apresenta um comportamento sigmoideal (VAN IMPE et al. 1995). Em condições de crescimento, a fase lag é um período nos quais as células microbianas se modificam ao invés de tirar vantagem do novo ambiente e iniciar o crescimento exponencial (BUCHANAN & KLAWITTER, 1991).

Exemplos de modelos primários são: o modelo de primeira ordem de Monod (LABUZA & FU, 1993), o modelo Logístico, o modelo de Schnute (ZWIETERING et al., 1990), o modelo de Boltzman (ERKMEN & ALBEN, 2002), o modelo de inativação térmica de primeira ordem (WHITING, 1995) e os modelos mais utilizados na literatura, que são os modelos de BARANYI e ROBERTS (1995) e o de Gompertz (GIBSON et al., 1987).

### 3.2.1.1. Modelo de Gompertz

O modelo de Gompertz tem sido amplamente utilizado para descrever o comportamento microbiano em alimentos (MASSON et al., 2002; WHITING, 1995). Este foi introduzido na microbiologia de alimentos por GIBSON et al., em 1987, quando compararam a equação logística e a de Gompertz na parametrização de uma curva de crescimento de *Clostridium botulinum* (ROSS & McMEEKIN, 1994; GIANNUZZI et al., 1998).

O modelo de Gompertz é representado pela Equação 2.1 (ERKMEN, 2001).

$$\ln y = A \times \exp\{-\exp[-B(t - M)]\} \quad (2.1)$$

Onde  $y$  é a densidade da população (logaritmo do número de unidades formadoras de colônias por mililitros) em um dado tempo  $t$  em horas;  $A$  é o aumento logarítmico da população;  $B$  é a velocidade relativa máxima de crescimento ( $\text{h}^{-1}$ ) no tempo  $M$ ; e  $M$  é o tempo necessário para atingir a velocidade máxima de crescimento ( $\text{h}$ ). Os parâmetros  $A$ ,  $B$  e  $M$ , são estimados pelo modelo. Estes parâmetros estão relacionados com os parâmetros microbiológicos de crescimento  $\lambda$  (duração da fase lag) e  $\mu_{\max}$  (velocidade específica máxima de crescimento) pelas Equações 2.2 e 2.3.

$$\mu_{\max} = \frac{B \times A}{e} \quad (2.2)$$

$$\lambda = M - \left( \frac{1}{B} \right) \quad (2.3)$$

Onde  $e = 2,7182$

### 3.2.1.2. Modelo de Gompertz Modificado

Para que os parâmetros estimados pudessem ter um significado biológico, ZWIETERING et al. em 1990, modificou o Modelo de Gompertz. Assim, os parâmetros  $\mu_{\max}$  (velocidade específica máxima de crescimento) e  $\lambda$  (duração da fase lag) 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).

De acordo com ZWIETERING et al. (1990), em quase todos os casos testados, o Modelo de Gompertz Modificado é estatisticamente suficiente para descrever dados de crescimento e também é o mais simples de utilizar (VAN IMPE et al., 1995; WHITING, 1995).

O modelo de Gompertz Modificado é apresentado na Equação 2.4.

$$\ln y = A \exp \left\{ - \exp \left\{ \left( \frac{\mu_{\max} \times e}{A} \right) (\lambda - t) \right\} + 1 \right\} \quad (2.4)$$

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

O modelo de Gompertz quanto o modelo de Gompertz Modificado têm sido testados em muitas espécies de microrganismos com ótimos ajustes LABUZA & FU (1993).



### 3.2.1.3. Modelo Logístico

As curvas de crescimento microbiano são geralmente bem descritas pelo modelo Logístico (VADASZ et al., 2001). Uma curva de crescimento obtida por este modelo é sigmoideal em um plano cartesiano ordinário (FUJIKAWA et al., 2004).

A equação utilizada para descrever o modelo Logístico está representada na Equação 2.5, a seguir (ERKMEN, 2000):

$$\ln y = \frac{A}{[1 + \exp(D - Bt)]} \quad (2.5)$$

Onde  $y$  é a densidade da população (UFC/mL) em um dado tempo  $t$  em horas;  $A$  é o aumento logarítmico da população;  $D$  é um parâmetro adimensional; e  $B$  é o crescimento relativo na metade do tempo da fase exponencial ( $h^{-1}$ ). Estes parâmetros estão relacionados com os parâmetros microbiológicos de crescimento  $\lambda$  (duração da fase lag) e  $\mu_{\max}$  (velocidade específica máxima de crescimento) pelas Equações 2.6 e 2.7.

$$\mu_{\max} = \frac{AB}{4} \quad (2.6)$$

$$\lambda = \frac{(D - 2)}{B} \quad (2.7)$$

Os parâmetros podem ser determinados ajustando-se o modelo Logístico aos dados experimentais pelo método iterativo de Gauss-Newton ou qualquer outro método iterativo de estimação, que determine o melhor ajuste de acordo com o critério dos mínimos quadrados (WHITING, 1995).

### 3.2.2. Modelos Secundários

Os modelos secundários descrevem como os parâmetros dos modelos primários variam com os fatores ambientais, como temperatura, pH, atividade de água, entre outros (WHITING, 1995; SCHAFFNER & LABUZA, 1997; SWINNEN ET AL., 2004). Muitos

modelos secundários têm sido propostos na literatura como os polinomiais ou metodologia de superfície de resposta, equação de Arrhenius, modelo da Raiz Quadrada ou de Ratkowsky (WHITING, 1995; McMEEKIN & ROSS, 2002; DAVEY & DAUGHTRY, 1995).

Além dos modelos da raiz quadrada e de Arrhenius, bastante utilizados na literatura, CORRADINI & PELEG (2005) têm demonstrado que modelos empíricos (equações *ad hoc*) podem ser utilizados para descrever a variação dos parâmetros dos modelos primários com a temperatura e outros fatores como atividade de água, pH, concentração de sal, entre outros.

A temperatura, o pH e a atividade de água são considerados os fatores ambientais mais importantes na determinação do crescimento microbiano em alimentos. De acordo com GIANNUZZI et al. (1998), a temperatura é, sem dúvida, 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 duração da fase lag são altamente dependentes deste parâmetro. Nem sempre a temperatura de refrigeração é mantida constante durante a manipulação e o transporte, mesmo estando diretamente ligada à estabilidade microbiológica dos alimentos. Dessa forma, os efeitos da temperatura na estabilidade microbiana têm sido estudados por muitos pesquisadores, através de modelos computacionais baseados na transferência de calor e estimativas de crescimento (ZWIETERING et al., 1991; McMEEKIN et al., 1992; BUCHANAN, 1993; ALMONACID-MERINO & TORRES, 1993).

### 3.2.3. Modelos Computacionais

Os modelos computacionais são ferramentas, onde as rotinas dos *softwares* computacionais transformam os modelos primários e os modelos secundários em programas amigáveis (WHITING, 1995).

### 3.3. DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO MICROBIANO

Quando o crescimento de um ou mais microrganismos é estudado, uma grande quantidade de dados torna-se necessário, 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 uma quantidade suficiente de repetições é realizada e, desde que cada repetição contenha um número suficiente e bem distribuído de pontos experimentais em todas as fases.

Este problema é ainda maior se o crescimento for avaliado em função de diferentes condições, como temperatura, pH ou atividade de água (AUGUSTIN et al., 1999; BEGOT et al., 1996).

### 3.3.1. Determinação do Crescimento de Fungos

A modelagem preditiva do crescimento de fungos filamentosos não tem recebido tanta atenção quanto o crescimento bacteriano, provavelmente devido à complexidade de se quantificar o crescimento destes fungos (BARANYI et al., 1996).

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 (GIBSON & HOCKING, 1997). Contrariamente às bactérias, que se reproduzem por cissiparidade e cujo crescimento normalmente ocorre apenas na superfície de meios sólidos ou de forma homogênea através de um meio líquido, as hifas produzidas pelos fungos podem penetrar nos alimentos em três dimensões (SAMAPUNDO et al., 2005). Todavia, este método de medida de diâmetro da colônia tem sido bastante utilizado para quantificar o crescimento de fungos. Pode-se citar o estudo realizado por MOLINA & GIANNUZZI (1999), que avaliaram o efeito da combinação de temperatura e de concentrações de ácido propiônico no crescimento de *Aspergillus parasiticus*; e o estudo realizado por VALIK & PIECKOVA (2001) que determinaram o efeito da atividade de água no crescimento de fungos termorresistentes.

Os trabalhos publicados sobre o efeito de fatores ambientais, como atividade de água, pH, temperatura, tensão de oxigênio, luminosidade, conservantes e ácidos orgânicos no crescimento de fungos termorresistentes são poucos; sendo que estes dados poderiam ser modelados matematicamente (VALIK & PIECKOVA, 2001). VALIK et al. (1999) estudaram o efeito da atividade de água no crescimento de *Penicillium roqueforti* através das técnicas da microbiologia preditiva. Pela medição do diâmetro, o crescimento da colônia foi modelado por uma função quadrática ajustada aos valores de atividade de água.

O crescimento de fungos filamentosos, em cultura líquida, pode ser medido através do aumento do peso seco em experimentos realizados em frascos de erlenmeyer de 500 mL, estacionários ou agitados. LANGVAD (1999), observou que houve uma relação linear

similar para diferentes fungos entre absorvância (lida a 630 nm) e o peso seco, com um coeficiente angular de 4,2 mg/mL de peso seco por unidade de absorvância.

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

A medida de ergosterol vem sendo usada no monitoramento do crescimento vegetativo de diversos fungos. Este esterol é predominante nos fungos e o principal componente das membranas (WANG et al., 1995). O ergosterol é o mais sensível marcador, mesmo com reduzidas quantidades de biomassa, podendo ser detectado após sete dias de incubação (MATCHAM et al., 1985). Pesquisas têm mostrado que as concentrações de ergosterol aumentam em paralelo com o crescimento dos fungos (STAHL & PARKIN, 1996). A determinação do ergosterol na biomassa fúngica pode ser realizada por espectrofotometria ultravioleta e infravermelha, associadas à métodos cromatográficos como camada delgada, líquida de alta eficiência (REGNER et al., 1994) e gasosa (EVERSCHEID et al., 1988). A análise de ergosterol serve para avaliar a população total de fungos em alimentos, embora esta determinação possa ser entediante e lenta. Em um estudo cinético prévio com *Penicillium expansum*, a determinação de ergosterol apresentou menor repetibilidade e sensibilidade que a medida de diâmetro da colônia (MARÍN et al., 2006).

**CAPÍTULO III**  
**MATERIAL E MÉTODOS**

## 1. FUNGOS FILAMENTOSOS TERMORRESISTENTES

Foram avaliados os crescimentos de *Neosartorya fischeri* e *Byssochlamys nivea*. O fungo *Neosartorya fischeri* foi isolado e identificado no laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina por SALOMÃO (2002) em amostras retiradas da linha de processamento de néctar de maçã. O fungo *Byssochlamys nivea* foi isolado por ARAGÃO (1989), em experimentos realizados no Laboratório de Termobacteriologia da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP.

A partir das suspensões de esporos (suspensões mãe) estocadas a 4°C, foram preparadas novas suspensões em temperaturas pré-definidas, para utilização nos experimentos.

### 1.1. PRÉ-PREPARAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE ASCÓSPOROS

Antes de serem inoculadas em garrafas de Roux, as suspensões mãe de *N. fischeri* e *B. nivea*, foram plaqueadas em PDA por 7 dias a 30°C, após serem previamente preparadas. Decorrido o tempo de incubação, as colônias foram ressuspensas com 2 mL/placa de água destilada estéril. Esta suspensão foi transferida para um frasco de erlenmeyer estéril para, em seguida, ser inoculado em garrafas de Roux previamente preparadas.

### 1.2. PREPARAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE ASCÓSPOROS

As suspensões pré-preparadas de *N. fischeri* e *B. nivea*, foram transferidas para garrafas de Roux, de acordo com a metodologia descrita por SALOMÃO (2002). Garrafas de Roux contendo 180 mL de MEA (pH 5,4, formulado conforme PITT & HOCKING, 1985) foram inoculados com pipeta estéril e com 0,5 mL da suspensão previamente preparada, descrita no item 1.1.

Este procedimento foi realizado em aproximadamente 75 garrafas para cada uma das cepas isoladas, e a incubação procedeu-se a 30°C por 30, 51, 60, 69 e 90 dias, para permitir a esporulação e desenvolvimento das estruturas de resistência dos fungos.

### 1.3. COLETA DOS ASCÓSPOROS DAS GARRAFAS DE ROUX

Após os tempos de incubação, a coleta dos ascósporos foi realizada segundo metodologia descrita por SALOMÃO (2002).

Transcorridos cada idade desejada para o amadurecimento dos esporos, vinte e cinco mililitros de água destilada estéril foram transferidos para cada garrafa, e a superfície do meio contendo as colônias foi raspada levemente com o auxílio de pérolas de vidro e uma bagueta de vidro estéreis. A suspensão resultante foi filtrada através de camadas de gaze estéril, para remover os fragmentos de hifas e centrifugada a 4000 rpm por 15 minutos. Posteriormente, foi realizada a lavagem do precipitado com água estéril, seguida de outra centrifugação e lavagem por mais duas vezes. A suspensão final foi preparada ressuspensando o precipitado em um volume de água mínimo, suficiente para se obter uma suspensão bastante concentrada (na ordem de  $10^6$  a  $10^8$  esporos/mL). A suspensão foi estocada sob refrigeração ( $4^{\circ}\text{C}$ ) em recipientes estéreis contendo pérolas de vidro, para facilitar a homogeneização antecedente ao uso.

#### 1.4. QUANTIFICAÇÃO DA SUSPENSÃO DE ESPOROS

Para a verificação do número de esporos nas suspensões preparadas (conforme item 1.3), expresso em esporos/mL, foi feita, de forma asséptica, uma diluição de cada uma das suspensões de esporos de *Byssoschlamys nivea* e *Neosartorya fischeri*. Para este procedimento utilizaram-se tubos de diluição com rosca de 16X100 mm contendo 4,5 mL de água destilada estéril e 0,5 mL de cada suspensão de esporos. Em seguida, estes tubos (diluição  $10^{-1}$ ) foram ativados em banho termostático (Tecnal-TE-184), ajustado previamente à temperatura de  $80^{\circ}\text{C}$ , por 30 minutos (RAJASHEKHARA et al., 1996). Transcorrido este tempo, os tubos foram colocados imediatamente em banho de gelo (SALOMÃO, 2002). A ativação térmica teve por finalidade interromper o estado de dormência dos esporos pela aplicação do choque térmico. Após a ativação, foram feitas diluições seriais em ordem crescente ( $10^{-1}$  até  $10^{-7}$ ), em câmara de fluxo laminar, com o objetivo de quantificar os ascósporos ativados.

A partir das diluições, foram realizados plaqueamentos por profundidade em meio PDA acrescido de solução de ácido tartárico 10% (m/v) até pH 3.5 e 1 mL/L de solução de rosa de bengala 5% (m/v), para evitar dispersão das colônias e inibir outras formas microbianas (BAGLIONI, 1998). As placas foram incubadas a  $30^{\circ}\text{C}$ , envolvidas por um filme plástico para evitar ressecamento. A leitura das placas para determinar o número de colônias formadas foi realizada no terceiro dia após o plaqueamento e confirmada no quinto dia. A contagem foi expressa em UFC/mL.

## 2. MEIOS DE CRESCIMENTO

Como meios de crescimento para a realização dos experimentos, foram utilizados suco de abacaxi comercial (pH 3,69 e 12,3°Brix originais) e suco de mamão comercial (pH 3,53 e 12,3°Brix originais), embalados em embalagens Tetra Brik® de 1000 mL, com selagem de topo e lateral intacta. As caixas de suco foram adquiridas diretamente de um distribuidor local, sendo todas do mesmo fabricante e do mesmo lote de produção.

### 2.1. PADRONIZAÇÃO DOS SUCOS - AJUSTE DA $a_w$

Para o ajuste dos valores de  $a_w$  dos sucos foram utilizadas sacarose e água destilada. A sacarose foi utilizada para diminuir os valores da  $a_w$  e a água destilada para aumentar os seus valores. As leituras para o ajuste da quantidade necessária de sacarose e água destilada, para cada valor determinado na pesquisa, foram realizadas no medidor de  $a_w$  modelo Aqua Lab Models Series 3TE.

## 3. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DOS FUNGOS

A avaliação do crescimento dos fungos *Byssoschlamys nivea* e *Neosartorya fischeri* foi realizada utilizando o método de medida do crescimento radial.

A metodologia utilizada foi baseada na citada por PEÑA et al. (2004), VALÍK & PIECKOVÁ (2001) e GIBSON et al. (1994). O método consistiu em medições, com auxílio de uma lanterna de uso doméstico, como está demonstrado na Figura 3.1. As medidas foram realizadas a cada 12 horas, ou em períodos menores de tempo para condições onde os fungos se desenvolvem com maior velocidade, do maior diâmetro da colônia formada, sendo na superfície para o suco de abacaxi e profundidade para o suco de mamão. A mudança do tamanho do diâmetro é considerada a expressão do crescimento do fungo.





Figura 3.1. Medida de diâmetro da colônia com auxílio de uma lanterna de uso doméstico.

O diâmetro mínimo das colônias foi considerado no tempo em que estas atingissem 2 mm, sendo que este foi o tamanho mínimo possível de ser observado a olho nu, ou seja, o menor tempo para visualização da colônia (fase lag). Segundo GIBSON et al. (1994), o tamanho mínimo para visualização das colônias é de 3 mm, sendo este o tamanho necessário para o produto ser rejeitado pelo consumidor.

Para o preparo do ensaio e melhor visualização das colônias formadas, os sucos inoculados foram acondicionados em embalagens de PET (polietileno tereftalato) com capacidade de 250 mL. Cada garrafa foi preenchida, assepticamente, com 200 mL de suco, previamente pasteurizado a 110°C por 15 minutos, para garantir que não cresceriam microrganismos diferentes dos estudados. As garrafas, previamente sanitizadas, foram inoculadas com a suspensão de esporos na quantidade necessária para que se obtivesse um esporo/mL de meio, ativados a 80°C por 30 minutos.

As embalagens eram previamente sanitizadas com ácido peracético P3 Oxônia ativo 150 da Ecolab em solução aquosa na concentração de 0,3%, por um tempo de contato de 30 minutos. As tampas também eram sanitizadas pelo uso do mesmo produto, permanecendo pelo mesmo tempo de contato, entretanto a uma concentração de 0,05%. Após este tempo, cada garrafa era enxaguada duas vezes com água destilada estéril, sendo que para as tampas foi utilizado o mesmo procedimento das garrafas (SILVA, 2006).

As garrafas inoculadas foram estocadas a 30°C em estufa e inclinadas em suporte com ângulo de 45°, para aumentar a área superficial e facilitar a leitura do diâmetro.

A Figura 3.2 apresenta as garrafas PET, com suco de abacaxi inoculado, em suporte inclinado a 45°.



Figura 3.2. Garrafas de PET contendo suco de abacaxi, em suporte inclinado a 45°.

#### **4. EFEITO COMBINADO DA $A_w$ E DA IDADE DE FORMAÇÃO DOS ESPOROS NO CRESCIMENTO DE *N. FISCHERI* E *B. NIVEA* EM SUCO DE ABACAXI E SUCO DE MAMÃO (DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL)**

Com o objetivo de estudar o efeito combinado da  $a_w$  e da idade de formação dos esporos no crescimento de *N. fischeri* e *B. nivea* em suco de abacaxi e suco de mamão, foi elaborado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), com triplicata no ponto central. Os fatores analisados foram: idade de produção dos esporos e  $a_w$  dos meios utilizados.

A Tabela 3.1 apresenta os níveis do DCCR e a Tabela 3.2 apresenta o DCCR para os sucos de abacaxi e mamão.

Tabela 3.1. Níveis do DCCR para os sucos de abacaxi e mamão.

Fatores	Níveis				
	$-\sqrt{2}$	-1	0	1	$+\sqrt{2}$
Idade dos esporos (dias) ( $x_1$ )	30	51	60	69	90
$a_w$ do suco ( $x_2$ )	0,90	0,93	0,95	0,96	0,99

Tabela 3.2. DCCR para avaliação da influência dos fatores: idade de formação dos esporos (I) e atividade de água ( $a_w$ ), sendo  $x_1$  os valores codificados para I e  $x_2$  os valores codificados para  $a_w$ .

Ensaio	$x_1$	$x_2$	I	$a_w$
1	-1	-1	51	0,93
2	1	-1	69	0,93
3	-1	1	51	0,96
4	1	1	69	0,96
5	0	$+\sqrt{2}$	60	0,99
6	$+\sqrt{2}$	0	90	0,95
7	0	$-\sqrt{2}$	60	0,90
8	$-\sqrt{2}$	0	30	0,95
9	0	0	60	0,95
10	0	0	60	0,95
11	0	0	60	0,95

Na revisão bibliográfica realizada não foram encontrados estudos da influência da idade dos esporos no crescimento dos fungos. Optou-se por idades de até 90 dias porque para maiores que esta, o tempo gasto nos experimentos seria muito grande e não seria viável a sua realização durante este estudo.

Os valores de  $a_w$  foram escolhidos de acordo com a faixa de  $a_w$  que os fungos analisados crescem, sendo reportado na literatura  $a_w$  mínima de 0,915 para *Neosartorya fischeri* (BAGLIONI, 1998) e 0,89 a 30°C para *Byssoschlamys nivea* (ROLAND & BEUCHAT, 1984).

## 5. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO DOS FUNGOS

Os modelos de Gompertz Modificado e Logístico foram ajustados às curvas de crescimento obtidas para obtenção dos parâmetros cinéticos de crescimento:

- Velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\max}$ ) → em milímetros/hora;
- Diâmetro máximo atingido pela colônia (A) → assíntota superior, em milímetros;
- Duração da fase de adaptação ( $\lambda$ ) → em horas.

### 5.1. ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO

Os modelos primários de Gompertz Modificado (Equação 2.4) e Logístico (Equação 2.5) foram ajustados aos dados experimentais utilizando o *software Statística 6.0*.

O Modelo de Gompertz Modificado foi reparametrizado a partir do modelo de Gompertz (Equação 2.1) por ZWIETERING et al. (1990) para se obter diretamente os parâmetros estudados  $\lambda$ ,  $\mu_{\max}$  e A.

Para estudo do efeito da  $a_w$  no parâmetro  $\lambda$  de crescimento, foram utilizados modelos secundários empíricos (CORRADINI & PELEG 2005), da superfície de resposta, calculados pelo *software Statística 6.0*, e da potência, calculado através da planilha *Excel*.

A equação da superfície de resposta para um modelo quadrático é apresentada na Equação 3.1.

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 \quad (3.1)$$

Onde:  $b_0$ ,  $b_1$  e  $b_2$  são estimadores dos parâmetros do modelo e;  $x_1$  e  $x_2$  são os fatores.

A equação da potência utilizada para o modelo secundário é apresentada na Equação 3.2.

$$y = cx^b \quad (3.2)$$

Onde:  $c$  e  $b$  são constantes.

## 6. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS MODELOS

Para comparação dos modelos foram calculados os parâmetros estatísticos: coeficiente de correlação ( $R^2$ ), Erro Médio Quadrático (MSE), Fator Bias e Fator de Exatidão (SAMAPUNDO et al., 2005).

O coeficiente de correlação ( $R^2$ ) descreve o ajuste do modelo em toda a extensão da curva. Quanto mais próximo de 1, melhor o ajuste do modelo.

O Erro Médio Quadrático (MSE) é dado pela Equação 3.5 e apresenta o erro do modelo em relação aos dados, ou seja, o quanto os valores preditos são próximos dos valores observados. Portanto, quanto mais próximo de zero, melhor o ajuste.

$$MSE = \frac{RSS}{n} = \frac{\sum (v_{observado} - v_{predito})^2}{n} \quad (3.3)$$

Sendo,  $v_{observado}$  o valor experimental;  $v_{predito}$  o valor predito pelo modelo; e  $n$  o número de dados menos os parâmetros do modelo.

Para o Fator Bias, que está apresentado na Equação 3.6, quanto mais próximo de 1, melhor o modelo.

$$Bias = 10^{(\sum \log(v_{observado}/v_{predito})/n)} \quad (3.4)$$

Sendo,  $v_{observado}$  o valor experimental;  $v_{predito}$  o valor predito pelo modelo; e  $n$  o número de dados menos os parâmetros do modelo.

O Fator de Exatidão é o parâmetro estatístico mais idôneo e rigoroso, pois usa os valores preditos e os observados, avaliando a porcentagem de erro na predição. Este fator só leva em conta os valores absolutos. Quanto mais próximo de 1, menor a porcentagem de erro. O cálculo do Fator de Exatidão foi realizado aplicando a Equação 3.7.

$$Exatidão = 10^{\sum |\log(v_{observado}/v_{predito})|/n} \quad (3.5)$$

Sendo,  $v_{observado}$  o valor experimental;  $v_{predito}$  o valor predito pelo modelo; e  $n$  o número de dados menos os parâmetros do modelo.

## **7. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO OBTIDOS ATRAVÉS DE MODELAGEM MATEMÁTICA**

Uma vez definido o modelo que melhor se ajustou aos dados experimentais, os parâmetros de crescimento obtidos através da modelagem matemática foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e à estimativa dos efeitos. Devido à variabilidade encontrada nos dados experimentais por se tratar de fungos, foi definido para este trabalho nível de confiança de 90% e, conseqüentemente, nível de significância  $\alpha = 0,1$ . A análise estatística foi realizada com o auxílio do *software Statistica 6.0*.

## **8. MODELAGEM SECUNDÁRIA DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DOS FATORES DE CRESCIMENTO**

Os parâmetros de crescimento ( $\lambda$ ,  $\mu_{\max}$  e  $A$ ) de um microrganismo, em um mesmo suco, foram submetidos à modelagem secundária em função dos fatores de crescimento ( $a_w$  e  $I$ ). Através de modelos empíricos e com o auxílio do *software Excel* foram obtidas curvas e equações matemáticas que descreviam a relação entre os parâmetros e os fatores analisados.

**CAPÍTULO IV**  
**RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## **1. INFLUÊNCIA DA VARIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ÁGUA ( $a_w$ ) E DA IDADE DOS ESPOROS NO CRESCIMENTO DE *Byssochlamys nivea* E *Neosartorya fischeri* EM SUCOS DE FRUTAS – ANÁLISE COMPLETA**

Foi realizada uma análise completa do crescimento de *B. nivea* e *N. fischeri* em sucos de mamão e abacaxi pelo método de crescimento radial (mm/h). Para cada  $a_w$ , foram testadas todas as idades de esporulação de cada fungo estudado, bem como para ambos os sucos analisados.

Foram realizadas quatro repetições das curvas de crescimento para cada ensaio, sendo realizadas duas a duas em datas diferentes. Para análise, foram escolhidas as duas curvas que apresentaram o menor tempo de duração da fase lag e o maior  $\mu_{max}$ , sendo estas de maior risco para a indústria e para o consumidor. Também foram escolhidas as condições extremas e a média para analisar a  $a_w$  e idade, sendo as  $a_w$  de 0,99, 0,95 e 0,90 e as idades de 30, 60 e 90 dias. As demais curvas obtidas encontram-se no Apêndice I.

### **1.1. CRESCIMENTO DE *Byssochlamys nivea* EM SUCO DE MAMÃO**

Os ajustes dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento, obtidos através da medida de diâmetro da colônia, de *Byssochlamys nivea* em suco de mamão são apresentados a seguir.

#### **1.1.1. Variação da Idade nas diferentes $a_w$ analisadas de *Byssochlamys nivea* em suco de mamão**

A Figura 4.1 apresenta as curvas de crescimento de *Byssochlamys nivea* em suco de mamão nas diferentes  $a_w$  analisadas para idade de 30 dias.



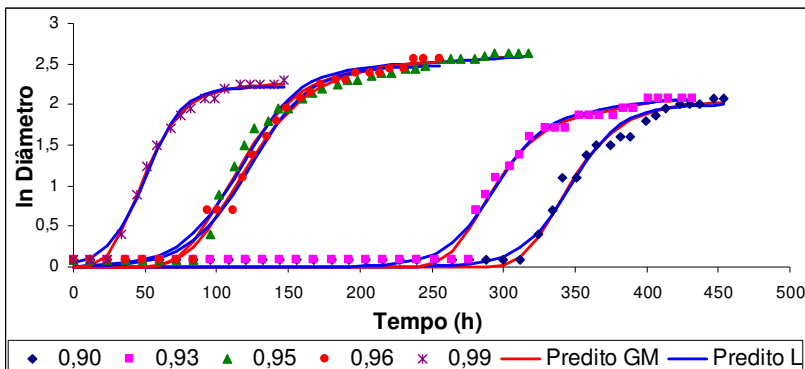


Figura 4.1. Curvas de crescimento de *B. nivea* em suco de mamão para todas as  $a_w$  estudadas na idade de 30 dias. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais.

As curvas de crescimento de *Byssochlamys nivea* em suco de mamão nas diferentes  $a_w$  analisados para idade de 60 dias são apresentadas na Figura 4.2.

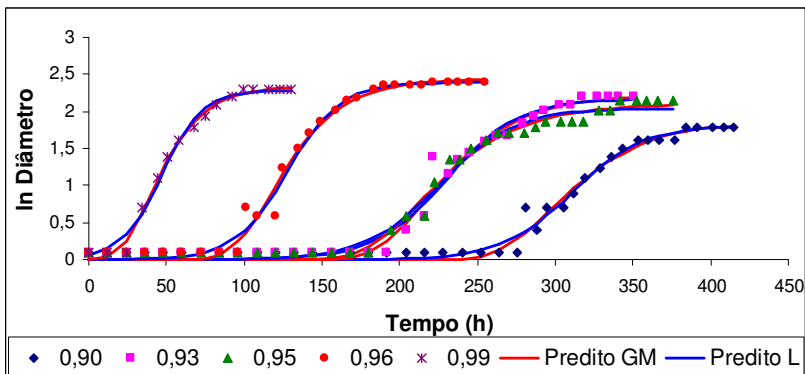


Figura 4.2. Curvas de crescimento de *B. nivea* em suco de mamão para todas as  $a_w$  estudadas na idade de 60 dias. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais.

A Figura 4.3 apresenta as curvas de crescimento de *Byssochlamys nivea* em suco de mamão nas diferentes  $a_w$  analisadas para idade de 90 dias.

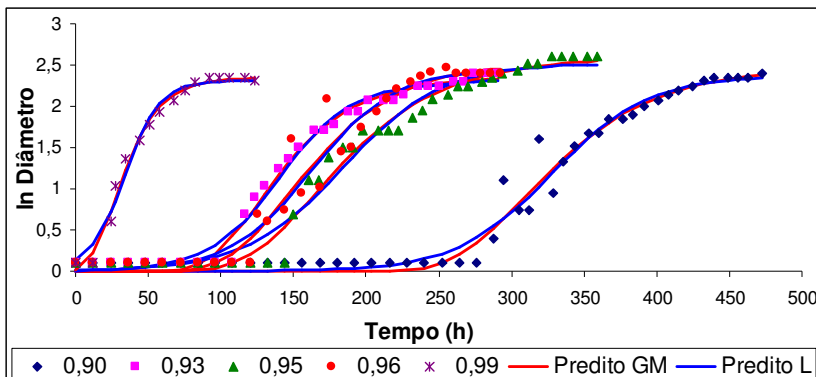


Figura 4.3. Curvas de crescimento de *B. nivea* em suco de mamão para todas as  $a_w$  estudadas na idade de 90 dias. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais.

Visualizando as Figuras 4.1, 4.2 e 4.3, é possível observar que o fator  $a_w$  teve efeito sobre o crescimento de *B. nivea* em suco de mamão. Quanto maior a  $a_w$ , maior a velocidade de crescimento e menor a fase lag.

### 1.1.2. Variação da $a_w$ nas diferentes Idades analisadas de *Byssochlamys nivea* em suco de mamão

As curvas de crescimento de *Byssochlamys nivea* em suco de mamão nas diferentes idades analisadas para  $a_w$  de 0,95 são apresentadas na Figura 4.4.

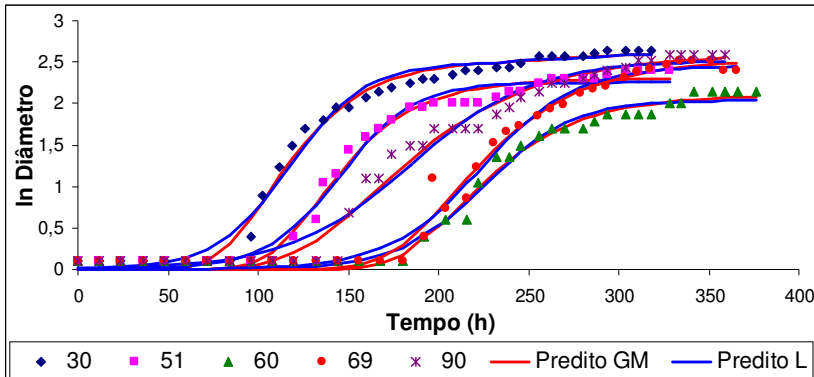


Figura 4.4. Curvas de crescimento de *B. nivea* em suco de mamão para todas as idades estudadas na  $a_w$  de 0,95. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais.

Analisando a Figura 4.4 é possível observar que, embora os parâmetros de crescimento não apresentem similaridade nas diferentes condições apresentadas, o aumento do fator idade não implica no aumento ou diminuição dos mesmos, ou seja, não há tendência no comportamento de *B. nivea* em suco de mamão, dentro destas condições analisadas.

A Figura 4.5 apresenta as curvas de crescimento de *Byssochlamys nivea* em suco de mamão nas diferentes idades analisadas para  $a_w$  de 0,99.

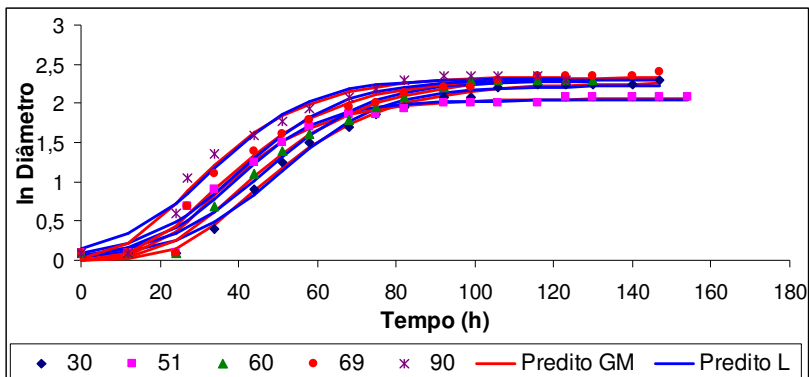


Figura 4.5. Curvas de crescimento de *B. nivea* em suco de mamão para todas as idades estudadas na  $a_w$  de 0,99. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais.

Na Figura 4.6 estão apresentadas as curvas de crescimento de *Byssochlamys nivea* em suco de mamão nas diferentes idades analisadas para  $a_w$  de 0,90.

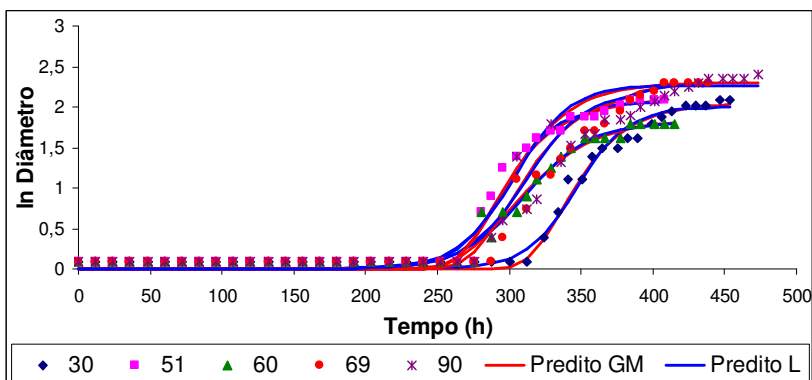


Figura 4.6. Curvas de crescimento de *B. nivea* em suco de mamão para todas as idades estudadas na  $a_w$  de 0,90. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais.

Visualizando as Figuras 4.5 e 4.6 é possível observar que o fator I não apresentou influência sobre o crescimento de *B. nivea* em suco de

mamão. As curvas apresentaram similaridade nos parâmetros de crescimento para as todas as idades analisadas nas condições de  $a_w$  0,99 e 0,90.

## 1.2. CRESCIMENTO DE *Byssoschlamys nivea* EM SUCO DE ABACAXI

Os ajustes dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento, obtidos através da medida de diâmetro da colônia de *Byssoschlamys nivea* em suco de abacaxi são apresentados a seguir.

### 1.2.1. Variação da Idade nas diferentes $a_w$ analisadas de *Byssoschlamys nivea* em suco de abacaxi

A Figura 4.7 apresenta as curvas de crescimento de *Byssoschlamys nivea* em suco de abacaxi nas diferentes  $a_w$  analisadas para idade de 30 dias.

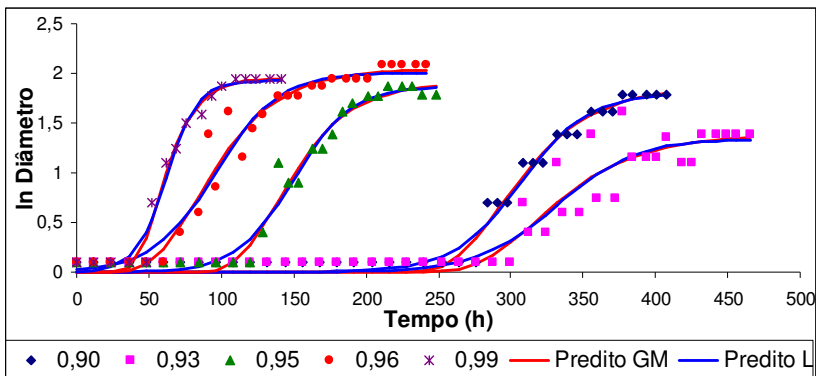


Figura 4.7. Curvas de crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi para todas as  $a_w$  estudadas na idade de 30 dias. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais.

As curvas de crescimento de *Byssoschlamys nivea* em suco de abacaxi nas diferentes  $a_w$  analisadas para idade de 60 dias são apresentadas na Figura 4.8.

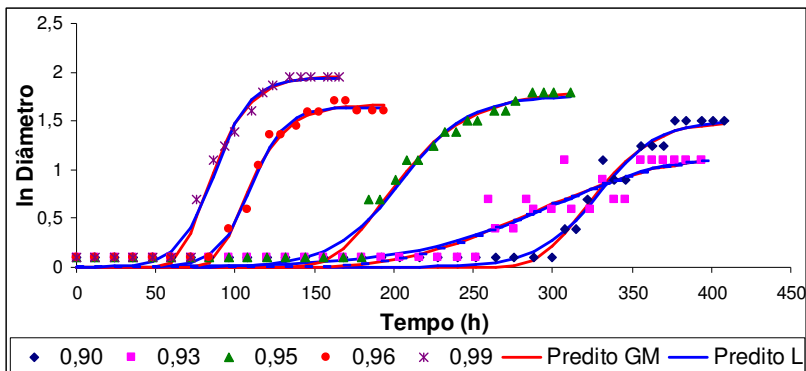


Figura 4.8. Curvas de crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi para todas as  $a_w$  estudadas na idade de 60 dias. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais.

Na Figura 4.9 estão apresentadas as curva de crescimento de *Byssochlamys nivea* em suco de abacaxi nas diferentes  $a_w$  analisadas para idade de 90 dias.

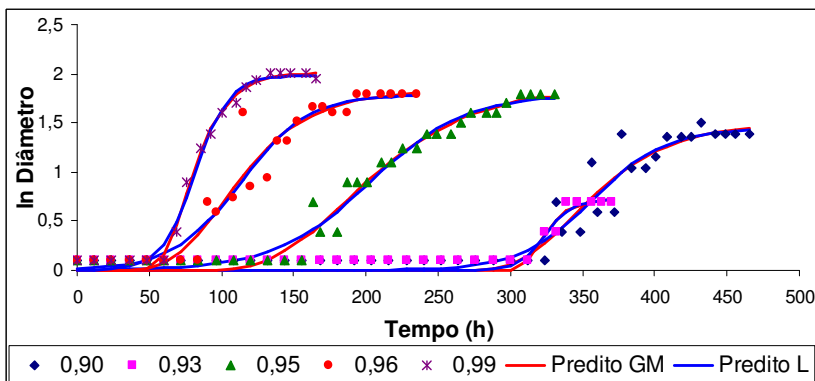


Figura 4.9. Curvas de crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi para todas as  $a_w$  estudadas na idade de 90 dias. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais.

Visualizando as Figuras 4.7, 4.8 e 4.9, é possível observar que o fator  $a_w$  teve efeito sobre o crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi.

Quanto maior a  $a_w$ , maior a velocidade de crescimento e menor a fase lag.

### 1.2.2. Variação da $a_w$ nas diferentes Idades analisadas de *Byssoschlamys nivea* em suco de abacaxi

A Figura 4.10 apresenta as curvas de crescimento de *Byssoschlamys nivea* em suco de abacaxi nas diferentes idades analisadas para  $a_w$  de 0,99.

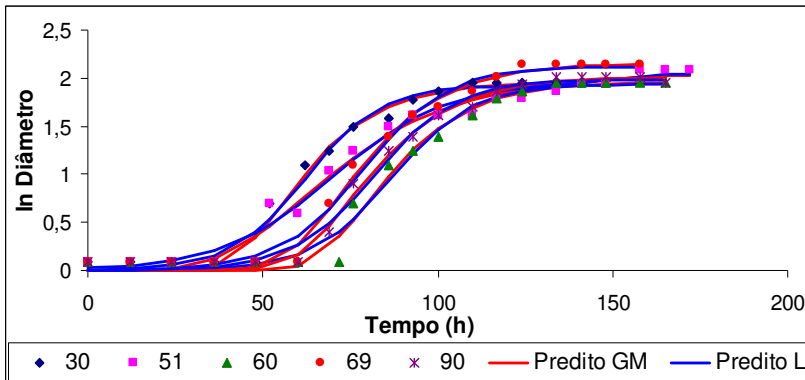


Figura 4.10. Curvas de crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi para todas as idades estudadas na  $a_w$  de 0,99. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais.

As curvas de crescimento de *Byssoschlamys nivea* em suco de abacaxi nas diferentes idades analisadas para  $a_w$  de 0,95 são apresentadas na Figura 4.11.

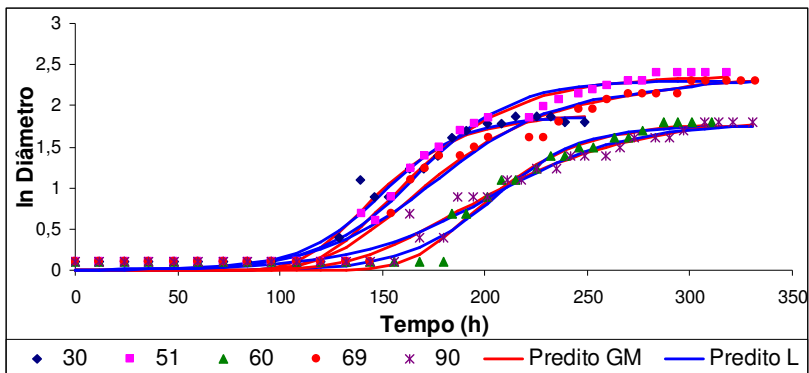


Figura 4.11. Curvas de crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi para todas as idades estudadas na  $a_w$  de 0,95. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais.

Na Figura 4.12 estão apresentadas as curvas de crescimento de *Byssochlamys nivea* em suco de abacaxi nas diferentes idades analisadas para  $a_w$  de 0,90.

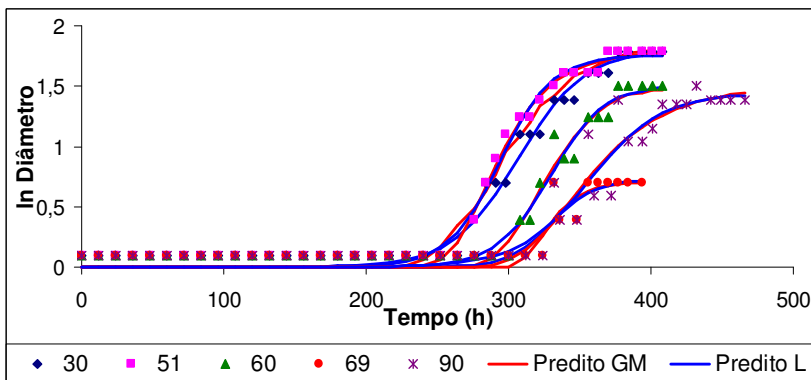


Figura 4.12. Curvas de crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi para todas as idades estudadas na  $a_w$  de 0,90. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais.

Visualizando as Figuras 4.10, 4.11 e 4.12, é possível observar que o fator I não apresentou influência sobre o crescimento de *B. nivea* em



suco de abacaxi. As curvas apresentaram similaridade nos parâmetros de crescimento para as todas as idades analisadas.

### 1.3. CRESCIMENTO DE *Neosartorya fischeri* EM SUCO DE MAMÃO

Os ajustes dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento, obtidos através da medida de diâmetro da colônia de *Neosartorya fischeri* em suco de mamão são apresentados a seguir.

#### 1.3.1. Variação da Idade nas diferentes $a_w$ analisadas de *Neosartorya fischeri* em suco de mamão

A Figura 4.13 apresenta as curvas de crescimento de *Neosartorya fischeri* em suco de mamão nas diferentes  $a_w$  analisadas para idade de 30 dias.

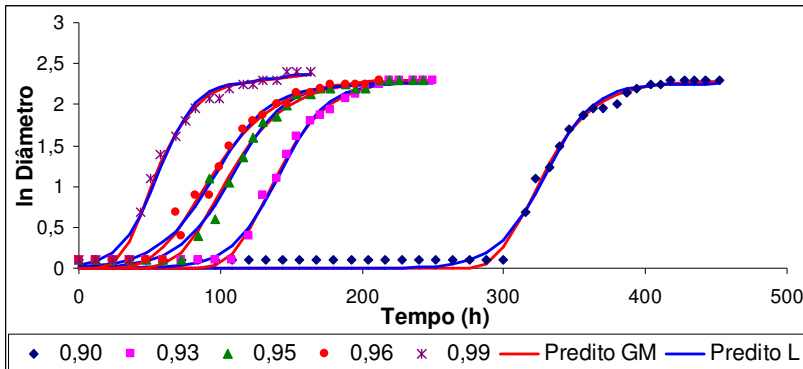


Figura 4.13. Curvas de crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão para todas as  $a_w$  estudadas na idade de 30 dias. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais.

As curvas de crescimento de *Neosartorya fischeri* em suco de mamão nas diferentes  $a_w$  analisadas para idade de 60 dias são apresentadas na Figura 4.14.

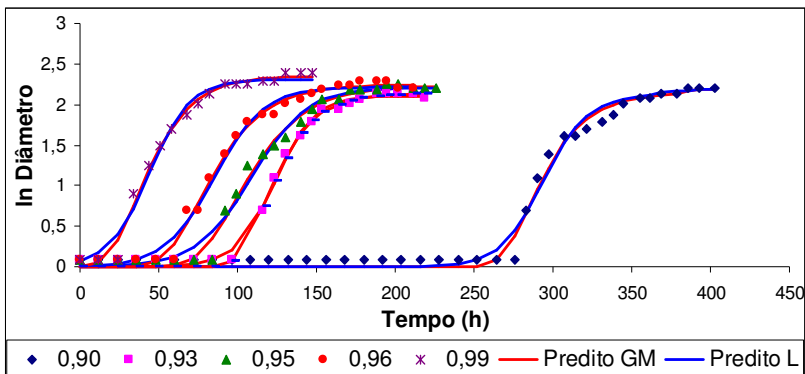


Figura 4.14. Curvas de crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão para todas as  $a_w$  estudadas na idade de 60 dias. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais.

Na Figura 4.15 estão apresentadas as curvas de crescimento de *Neosartorya fischeri* em suco de mamão nas diferentes  $a_w$  analisadas para idade de 90 dias.

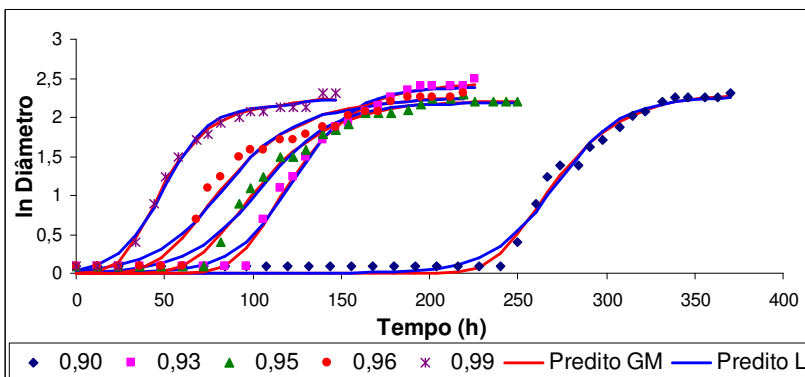


Figura 4.15. Curvas de crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão para todas as  $a_w$  estudadas na idade de 90 dias. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais.

Visualizando as Figuras 4.13, 4.14 e 4.15, é possível observar que o fator  $a_w$  teve efeito sobre o crescimento de *N. fischeri* em suco de

mamão. Quanto maior a  $a_w$ , maior a velocidade de crescimento e menor a fase lag.

### 1.3.2. Variação da $a_w$ nas diferentes Idades analisadas de *Neosartorya fischeri* em suco de mamão

A Figura 4.16 apresenta as curvas de crescimento de *Neosartorya fischeri* em suco de mamão nas diferentes idades analisadas para  $a_w$  de 0,99.

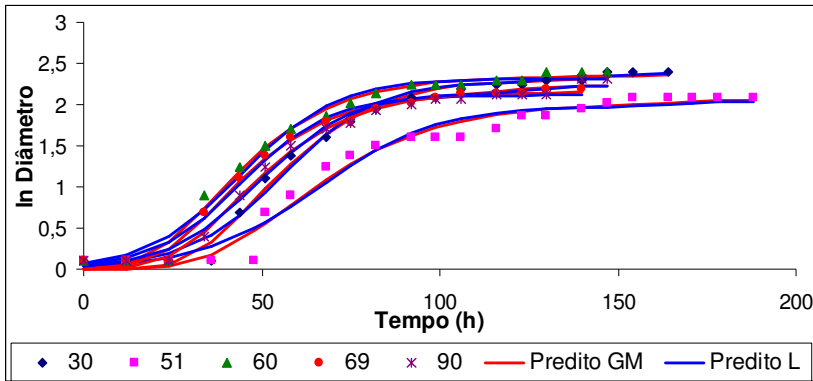


Figura 4.16. Curvas de crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão para todas as idades estudadas na  $a_w$  de 0,99. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais.

A curva de crescimento de *Neosartorya fischeri* em suco de mamão nas diferentes idades analisadas para  $a_w$  de 0,95 é apresentada na Figura 4.17.

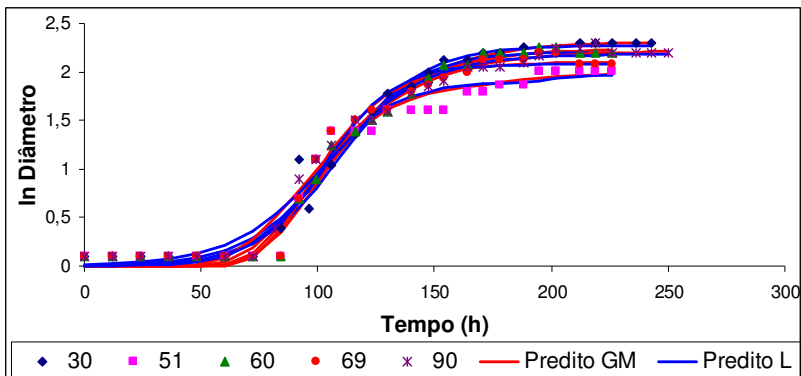


Figura 4.17. Curvas de crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão para todas as idades estudadas na  $a_w$  de 0,95. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais.

Na Figura 4.18 estão apresentadas as curvas de crescimento de *Neosartorya fischeri* em suco de mamão nas diferentes idades analisadas para  $a_w$  de 0,90.

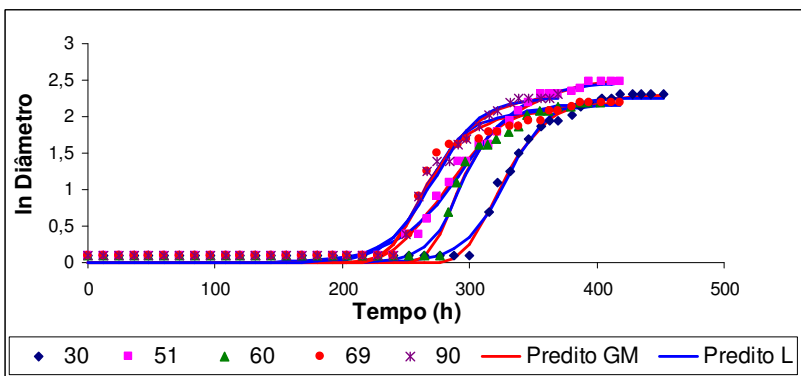


Figura 4.18. Curvas de crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão para todas as idades estudadas na  $a_w$  de 0,90. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais.

Visualizando as Figuras 4.16, 4.17 e 4.18, é possível observar que o fator I não apresentou influência sobre o crescimento de *N. fischeri* em

suco de mamão. As curvas apresentaram similaridade nos parâmetros de crescimento para as todas as idades analisadas.

#### 1.4. CRESCIMENTO DE *Neosartorya fischeri* EM SUCO DE ABACAXI

Os ajustes dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento, obtidos através da medida de diâmetro da colônia de *Neosartorya fischeri* em suco de abacaxi são apresentados a seguir.

##### 1.4.1. Variação da Idade nas diferentes $a_w$ analisadas de *Neosartorya fischeri* em suco de abacaxi

A Figura 4.19 apresenta as curvas de crescimento de *Neosartorya fischeri* em suco de abacaxi nas diferentes  $a_w$  analisadas para idade de 30 dias.

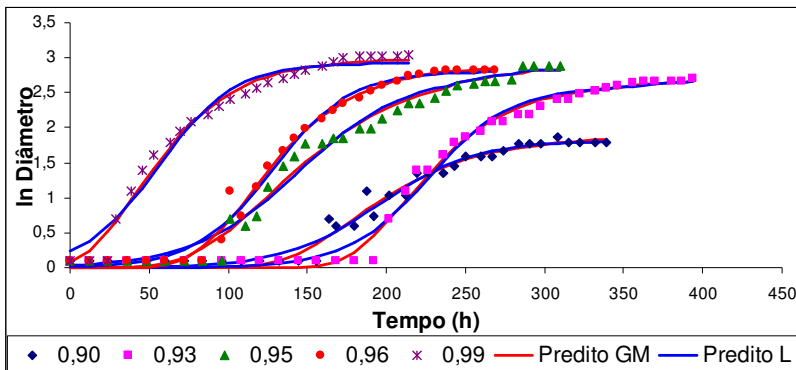


Figura 4.19. Curvas de crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi para todas as  $a_w$  estudadas na idade de 30 dias. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais.

As curvas de crescimento de *Neosartorya fischeri* em suco de abacaxi nas diferentes  $a_w$  analisadas para idade de 60 dias são apresentadas na Figura 4.20.

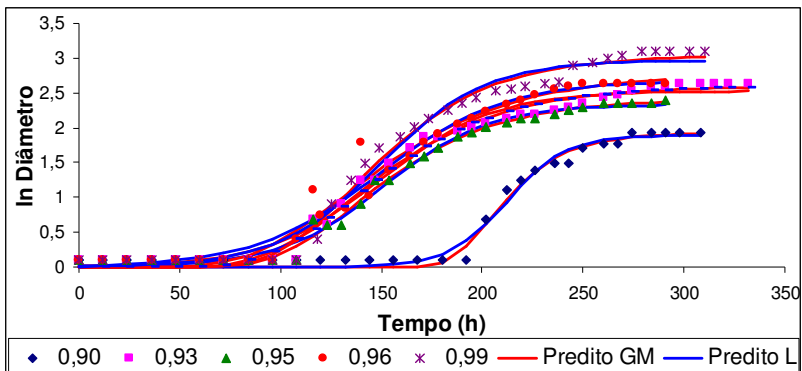


Figura 4.20. Curvas de crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi para todas as  $a_w$  estudadas na idade de 60 dias. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais.

Na Figura 4.21 estão apresentadas as curvas de crescimento de *Neosartorya fischeri* em suco de abacaxi nas diferentes  $a_w$  analisadas para idade de 90 dias.

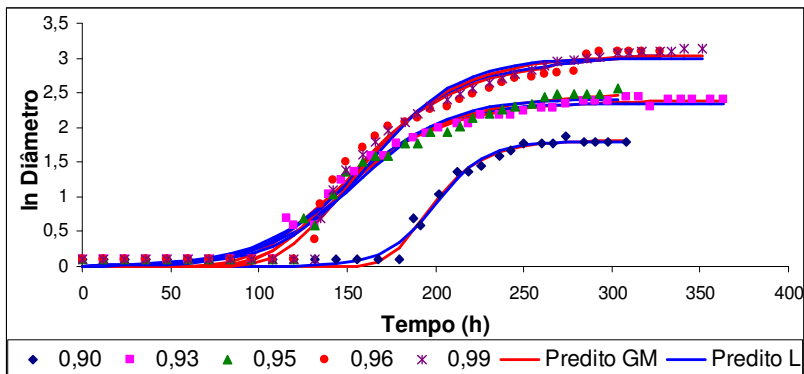


Figura 4.21. Curvas de crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi para todas as  $a_w$  estudadas na idade de 90 dias. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais.

Visualizando as Figuras 4.19, 4.20 e 4.21, é possível observar que o fator  $a_w$  teve efeito sobre o crescimento de *N. fischeri* em suco de

abacaxi somente para o parâmetro de crescimento A. Quanto maior a  $a_w$ , maior o diâmetro máximo atingido pela colônia.

#### 1.4.2. Variação da $a_w$ nas diferentes Idades analisadas de *Neosartorya fischeri* em suco de abacaxi

A Figura 4.22 apresenta as curvas de crescimento de *Neosartorya fischeri* em suco de abacaxi nas diferentes idades analisadas para  $a_w$  de 0,99.

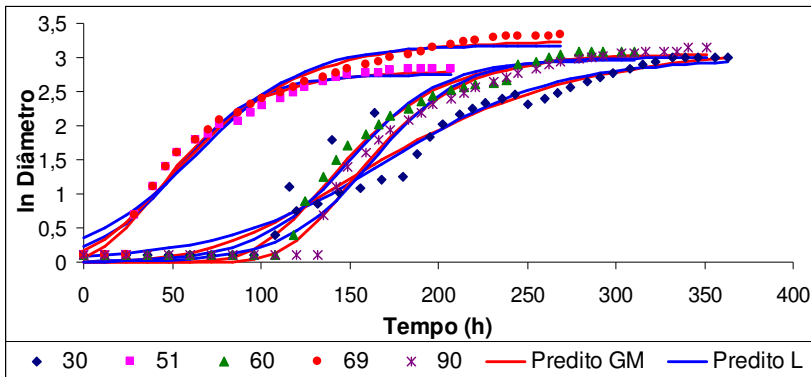


Figura 4.22. Curvas de crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi para todas as idades estudadas na  $a_w$  de 0,99. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais.

As curvas de crescimento de *Neosartorya fischeri* em suco de abacaxi nas diferentes idades analisadas para  $a_w$  de 0,95 são apresentadas na Figura 4.23.

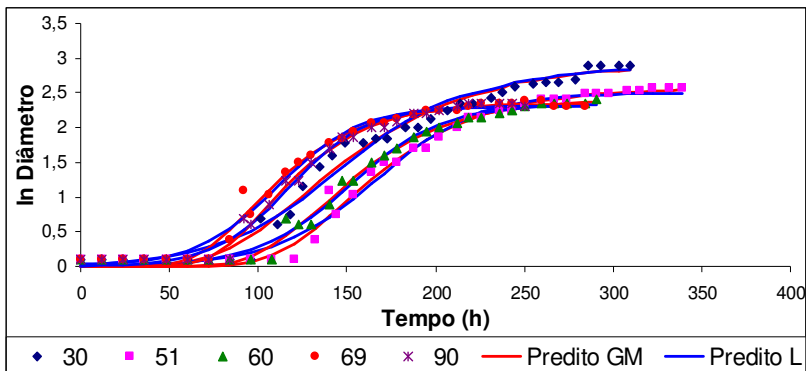


Figura 4.23. Curvas de crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi para todas as idades estudadas na  $a_w$  de 0,95. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais.

Na Figura 4.24 estão apresentadas as curvas de crescimento de *Neosartorya fischeri* em suco de abacaxi nas diferentes idades analisadas para  $a_w$  de 0,90.

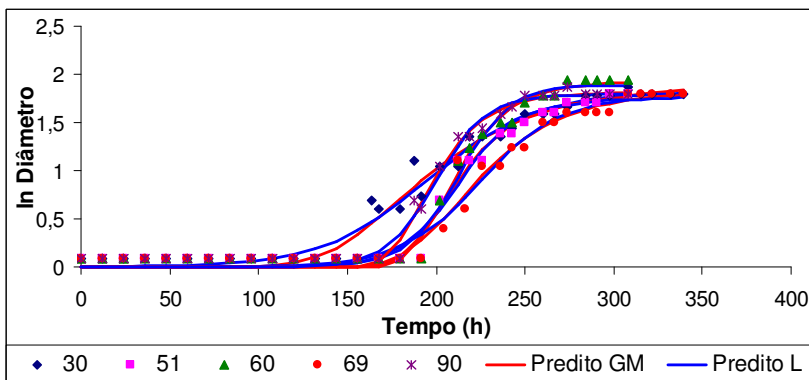


Figura 4.24. Curvas de crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi para todas as idades estudadas na  $a_w$  de 0,90. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais.

Visualizando as Figuras 4.22, 4.23 e 4.24, é possível observar que o fator I não apresentou influência sobre o crescimento de *N. fischeri* em



suco de abacaxi. As curvas apresentaram similaridade nos parâmetros de crescimento para as todas as idades analisadas.

## **2. INFLUÊNCIA DA VARIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ÁGUA ( $a_w$ ) E DA IDADE DOS ESPOROS NO CRESCIMENTO DE *Byssochlamys nivea* E *Neosartorya fischeri* EM SUCOS DE FRUTAS – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL**

Os crescimentos de *B. nivea* e *N. fischeri* em sucos de mamão e abacaxi foram avaliados pelo método de crescimento radial (mm/h) e os parâmetros de crescimento foram obtidos pelos ajustes dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico.

Foram realizadas quatro repetições das curvas de crescimento para cada ensaio do planejamento experimental, sendo realizadas duas a duas em diferentes datas. Para análise, foram escolhidas as duas curvas que apresentaram o menor tempo de duração da fase lag ( $\lambda$ ), e maior  $\mu_{max}$ , sendo estas de maior risco para a indústria e para o consumidor.

### **2.1. MODELAGEM DE CRESCIMENTO DE *Byssochlamys nivea* EM SUCO DE MAMÃO**

Os modelos de Gompertz Modificado e Logístico foram ajustados aos dados experimentais de crescimento ao longo do tempo, obtidos através da medida de diâmetro da colônia de *Byssochlamys nivea* em suco de mamão, para cada experimento estabelecido no planejamento experimental, conforme Tabela 3.2. Exemplos dos ajustes obtidos com ambos os modelos às médias adquiridas nas duplicatas são apresentados nas Figuras 4.25 para idade (I) de 60 dias e  $a_w$  de 0,99 e na Figura 4.26 para I de 51 dias e  $a_w$  de 0,93.

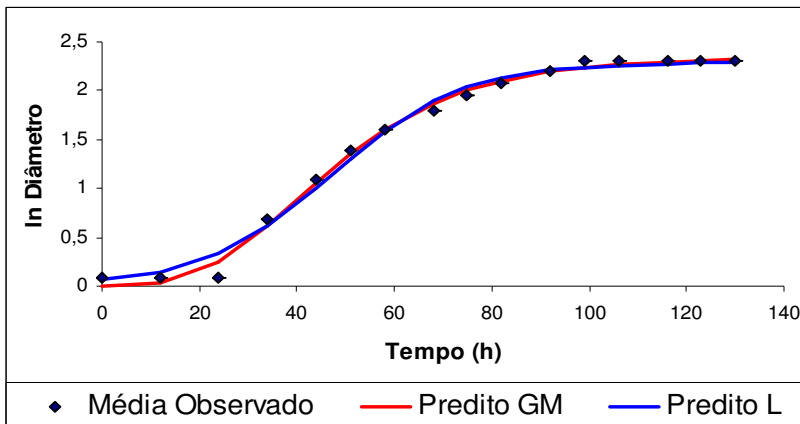


Figura 4.25. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) à média das duplicatas dos dados de crescimento de *B. nivea* em suco de mamão para idade (I) de 60 dias e  $a_w$  de 0,99.

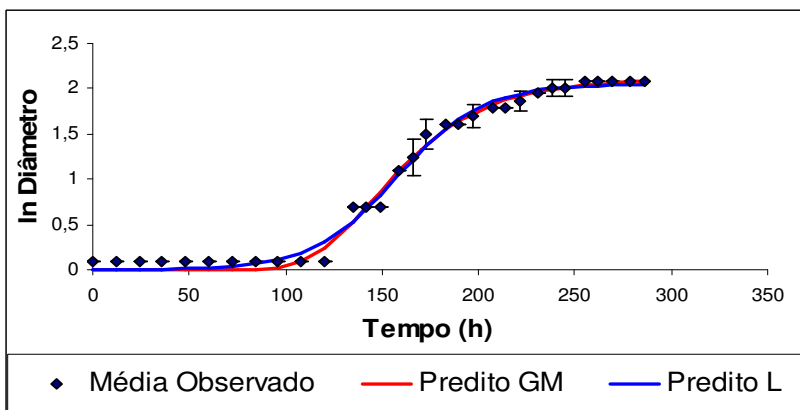


Figura 4.26. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) à média das duplicatas dos dados de crescimento de *B. nivea* em suco de mamão para idade (I) de 51 dias e  $a_w$  de 0,93. As barras representam o desvio padrão das duplicatas em cada ponto.

As condições de crescimento representadas nas Figuras 4.25 e 4.26 foram escolhidas aleatoriamente para mostrar que ambos os modelos de Gompertz Modificado e Logístico se ajustaram bem aos dados experimentais. Contudo, o modelo de Gompertz Modificado

apresentou melhor ajuste aos dados experimentais na transição da fase lag para a fase exponencial, comparado ao modelo Logístico.

Os parâmetros estatísticos que permitem comparar os modelos de Gompertz Modificado e Logístico no crescimento de *N. nivea* em suco de mamão são apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Parâmetros estatísticos para validar o emprego dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) no crescimento de *B. nivea* em suco de mamão.

Ensaio	Modelo	MSE	Fator Bias	Fator Exatidão	R <sup>2</sup>
1	GM	0,0390	1,0031	1,0030	<b>0,9956</b>
	L	0,0359	0,9982	1,0018	0,9951
2	GM	0,0310	1,0023	1,0021	<b>0,9940</b>
	L	0,0444	1,0044	1,0005	0,9916
3	GM	0,0354	1,0022	1,0003	<b>0,9925</b>
	L	0,0189	0,9903	1,0081	0,9903
4	GM	0,0340	1,0016	1,0007	<b>0,9964</b>
	L	0,0254	0,9974	1,0019	0,9936
5	GM	0,0666	1,0005	1,0048	<b>0,9973</b>
	L	0,0625	1,0000	1,0000	0,9948
6	GM	0,0288	1,0023	1,0023	<b>0,9926</b>
	L	0,0449	0,9897	1,0069	0,9898
7	GM	0,0288	1,0023	1,0023	0,9871
	L	0,0279	1,0016	1,0012	<b>0,9903</b>
8	GM	0,0313	0,9997	1,0058	<b>0,9944</b>
	L	0,0202	0,9962	1,0040	0,9913
9	GM	0,0146	1,0021	1,0059	<b>0,9952</b>
	L	0,0266	0,9993	1,0009	0,9923
10	GM	0,0432	1,0033	1,0023	<b>0,9960</b>
	L	0,0367	0,9999	1,0006	0,9946
11	GM	0,0219	0,9906	1,0069	<b>0,9910</b>
	L	0,0216	0,9978	1,0040	0,9864

Analisando a Tabela 4.1, pode-se concluir que ambos os modelos apresentaram bom ajuste aos dados experimentais, uma vez que o MSE foi próximo de 0, o Fator Bias e Fator de Exatidão próximos a 1 e o  $R^2$  próximo de 1. Embora os modelos tenham apresentado parâmetros estatísticos muito próximos, o modelo de Gompertz Modificado (GM) apresentou melhor ajuste através da análise de  $R^2$  (dados em negrito na Tabela 4.1).

A partir da análise visual das Figuras 4.25 e 4.26 e do parâmetro estatístico  $R^2$  da Tabela 4.1, decidiu-se utilizar apenas os parâmetros de crescimento obtidos através do ajuste com o modelo de GM.

Os valores dos parâmetros de crescimento de *B. nivea* em suco de mamão para cada ensaio do planejamento experimental, obtidos pelo ajuste do modelo de Gompertz Modificado, são mostrados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Parâmetros de crescimento de *B. nivea* em suco de mamão obtidos pelo ajuste do modelo de Gompertz Modificado, no DCCR.

Ensaio	Idade	$a_w$	$\lambda$ (h)	$\mu_{max}$ (mm/h)	A (mm)
1	51	0,93	113,4	0,024	8,2
2	69	0,93	124,0	<b>0,015</b>	12,3
3	51	0,96	91,0	0,027	11,4
4	69	0,96	89,5	0,026	<b>15,2</b>
5	60	0,99	<b>20,4</b>	<b>0,045</b>	10,4
6	90	0,95	149,9	0,024	11,1
7	60	0,9	<b>263,5</b>	0,020	<b>6,6</b>
8	30	0,95	76,4	0,032	12,5
9	60	0,95	49,8	0,040	13,6
10	60	0,95	99,0	0,029	11,8
11	60	0,95	52,7	0,020	11,5

Analisando a Tabela 4.2, observa-se através dos valores em destaque que no ensaio 7 houve o maior tempo de adaptação (263,5 horas) na condição de  $a_w$  0,90 e idade de 60 dias. Ao contrário, no ensaio 5, houve o menor tempo de adaptação (20,4 horas) na condição de  $a_w$  0,99 e idade de 60 dias. Nestes ensaios, com idades iguais a 60 dias, o  $\lambda$  aumentou mais de 10 vezes quando houve variação de  $a_w$  da condição mínima para a condição máxima estudada. De acordo com estes resultados, se o suco de mamão estivesse contaminado com *B. nivea* e fosse armazenado a 30°C em  $a_w$  de 0,99, o produto seria rejeitado no primeiro dia de vida de prateleira porque, nestas condições, a colônia do fungo se tornaria visível em aproximadamente 20 horas.

Para o  $\mu_{\max}$ , o maior valor foi observado no ensaio 5 (0,045 mm/h) sendo nas condições de  $a_w$  0,99 e idade de 60 dias, e o menor valor foi para o ensaio 2 (0,015 mm/h) sendo nas condições de  $a_w$  0,93 e idade de 69 dias.

Para o parâmetro A (diâmetro máximo atingido pela colônia), o ensaio 4 apresentou maior valor (15,2 mm), sendo nas condições de  $a_w$  0,96 e idade de 69 dias, e o ensaio 7 o menor valor (6,6 mm), sendo  $a_w$  de 0,90 e idade de 60 dias.

Os resultados da Tabela 4.2 foram submetidos à análise estatística com a finalidade de esclarecer quais dos fatores estudados,  $a_w$  e idade, afetaram significativamente os parâmetros de crescimento de *B. nivea* em suco de mamão. Os fatores foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,1$ . A análise de variância e de estimativa dos efeitos foi calculada através do *software Statistica 6.0* e são apresentados a seguir.

### 2.1.1. Análise de variância e estimativa dos efeitos calculados para o parâmetro $\lambda$ no crescimento de *B. nivea* em suco de mamão

Os efeitos estimados para cada um dos fatores independentes, lineares e quadráticos, em  $\lambda$  são mostrados na Tabela 4.3. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,1$ .

Tabela 4.3. Efeitos dos fatores estimados sobre o parâmetro  $\lambda$  no crescimento de *B. nivea* em suco de mamão.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(5)	p-valor	IC*(-90%)	IC*(+90%)
Idade(L)	28,282	37,440	0,755	0,484	-47,162	103,726
Idade(Q)	34,439	44,563	0,773	0,475	-55,358	124,235
$a_w$ (L)	<b>-100,192</b>	<b>37,440</b>	<b>-2,676</b>	<b>0,044</b>	<b>-175,636</b>	<b>-24,748</b>
$a_w$ (Q)	63,235	44,563	1,419	0,215	-26,561	153,032
Interação	-6,020	52,949	-0,114	0,914	-112,715	100,674

\*IC = Intervalo de Confiança

Observando a variável resposta  $\lambda$  (duração da fase de adaptação), nota-se que o fator  $a_w$  teve efeito significativo dentro da faixa estudada, quando este fator passa de um nível inferior ( $a_w$  0,90) para um nível superior ( $a_w$  0,99).

A Tabela 4.4 apresenta a ANOVA com a significância dos fatores  $a_w$  e idade ao nível de 90% de confiança.

Tabela 4.4. ANOVA dos efeitos dos fatores sobre a variável  $\lambda$  de *B. nivea* em suco de mamão.

ANOVA	Soma Quadrados	Graus Liberdade	Quadrado Médio	F <sub>cal</sub>	p-valor
Idade (L)	1599,75	1	1599,75	0,571	0,484
Idade (Q)	1674,40	1	1674,40	0,597	0,475
<b>a<sub>w</sub> (L)</b>	<b>20076,83</b>	<b>1</b>	<b>20076,83</b>	<b>7,161</b>	<b>0,044</b>
a <sub>w</sub> (Q)	5645,20	1	5645,20	2,014	0,215
Interação	36,25	1	36,25	0,013	0,914

A curva de nível e a superfície de resposta obtida para os fatores  $a_w$  versus idade para o parâmetro de crescimento  $\lambda$  são apresentadas na Figura 4.27.

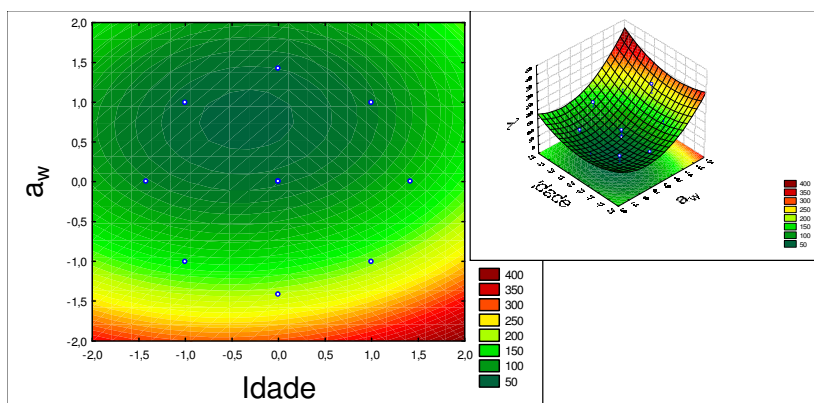


Figura 4.27. Curva de nível e superfície de resposta dos fatores  $a_w$  versus idade sobre o parâmetro de crescimento  $\lambda$  de *B. nivea* em suco de mamão.

Analisando a curva de nível e a superfície de resposta (Figura 4.27) é possível identificar a influência da  $a_w$  no fator de crescimento  $\lambda$ , independente da variação da idade dos esporos. Por exemplo, os pontos de máximo para  $\lambda$  são encontrados na condição de menor  $a_w$  tanto na maior quanto na menor condição de idade. Ainda analisando a curva de nível da Figura 4.3, uma faixa de mínimo valor de  $\lambda$  pode ser localizada entre as condições de  $a_w$  de 0,95 à 0,96. Nesta região, o microrganismo precisa de menos tempo para se adaptar ao meio, ou seja, estas são as condições de  $a_w$  que devem ser evitadas pela indústria.

Considerando apenas o fator significativo para a variável resposta A, a Equação 4.1 apresenta o modelo da superfície de resposta obtido.

$$\lambda = 67,17 - 52,33 \cdot a_w \quad (4.1)$$

### 2.1.2. Análise de variância e estimativa dos efeitos calculados para o parâmetro $\mu_{\max}$ no crescimento de *B. nivea* em suco de mamão

Os efeitos estimados para cada um dos fatores independentes, lineares e quadráticos, em  $\mu_{\max}$  são mostrados na Tabela 4.5. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,1$ .

Tabela 4.5. Efeitos dos fatores estimados sobre o parâmetro  $\mu_{\max}$  no crescimento de *B. nivea* em suco de mamão.

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t(5)	p-valor	IC*(-90%)	IC*(+90%)
Idade(L)	-0,008	0,005	-1,561	0,179	-0,022	0,005
Idade(Q)	-0,006	0,006	-0,997	0,364	-0,023	0,010
<b><math>a_w</math>(L)</b>	<b>0,014</b>	<b>0,005</b>	<b>2,588</b>	<b>0,049</b>	<b>0,000</b>	<b>0,027</b>
$a_w$ (Q)	0,001	0,006	0,093	0,930	-0,016	0,017
Interação	0,001	0,008	0,082	0,938	-0,019	0,020

\*IC = Intervalo de Confiança

Observando a variável resposta  $\mu_{\max}$ , nota-se que o fator  $a_w$  teve efeito significativo dentro da faixa estudada, quando este fator passa de um nível inferior ( $a_w$  0,90) para um nível superior ( $a_w$  0,99). A Tabela 4.6 apresenta a ANOVA com a significância dos fatores  $a_w$  e idade ao nível de 90% de confiança.

Tabela 4.6. ANOVA dos efeitos dos fatores sobre a variável  $\mu_{\max}$  de *B. nivea* em suco de mamão.

ANOVA	Soma Quadrados	Graus Liberdade	Quadrado Médio	F <sub>cal</sub>	p-valor
Idade (L)	0,0001379	1	0,0001379	2,436	0,179
Idade (Q)	0,0000563	1	0,0000563	0,994	0,364
<b><math>a_w</math> (L)</b>	<b>0,0003792</b>	<b>1</b>	<b>0,0003792</b>	<b>6,697</b>	<b>0,049</b>
$a_w$ (Q)	0,0000005	1	0,0000005	0,009	0,930
Interação	0,0000004	1	0,0000004	0,007	0,938

A curva de nível e a superfície de resposta obtida para os fatores  $a_w$  versus idade para o parâmetro de crescimento  $\mu_{\max}$  são apresentadas na Figura 4.28.

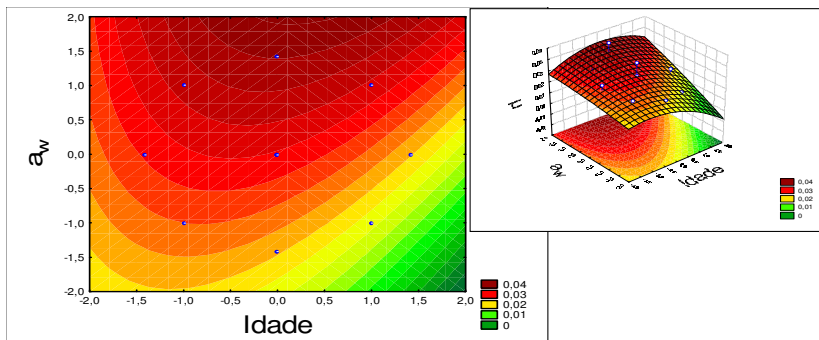


Figura 4.28. Curva de nível e superfície de resposta dos fatores  $a_w$  versus idade sobre o parâmetro de crescimento  $\mu_{max}$  de *B. nivea* em suco de mamão.

Analisando a curva de nível e a superfície de resposta (Figura 4.28) é possível identificar a grande influência da  $a_w$  no parâmetro de crescimento  $\mu_{max}$ . Um ponto de máximo valor de  $\mu_{max}$  pode ser visualizado na condição de maior  $a_w$ .

Considerando apenas o fator significativo para a variável resposta  $\mu_{max}$ , a Equação 4.2 apresenta o modelo da superfície de resposta obtido.

$$\mu_{max} = 0,0297 + 0,0069 \cdot a_w \tag{4.2}$$

### 2.1.3. Análise de variância e estimativa dos efeitos calculados para o parâmetro A no crescimento de *B. nivea* em suco de mamão

A Tabela 4.7 apresenta os efeitos estimados para cada um dos fatores independentes, lineares e quadráticos, em A. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,1$ .

Tabela 4.7. Efeitos dos fatores estimados sobre o parâmetro A no crescimento de *B. nivea* em suco de mamão.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(5)	p-valor	IC*(-90%)	IC*(+90%)
Idade(L)	<b>2,639</b>	<b>1,094</b>	<b>2,411</b>	<b>0,061</b>	<b>-0,174</b>	<b>5,452</b>
Idade(Q)	0,998	1,302	0,766	0,478	-2,350	4,346
$a_w$ (L)	<b>2,447</b>	<b>1,094</b>	<b>2,236</b>	<b>0,076</b>	<b>-0,366</b>	<b>5,260</b>
$a_w$ (Q)	<b>-3,467</b>	<b>1,302</b>	<b>-2,662</b>	<b>0,045</b>	<b>-6,815</b>	<b>-0,119</b>
Interação	0,583	1,548	0,376	0,722	-3,396	4,561

\*IC = Intervalo de Confiança



Observando a variável resposta A (tamanho máximo atingido pela colônia), nota-se que os fatores  $a_w$  linear e quadrático e o fator Idade linear tiveram efeito significativo dentro da faixa estudada, quando estes fatores passaram de um nível inferior ( $a_w$  0,90) para um nível superior ( $a_w$  0,99).

A Tabela 4.8 apresenta a ANOVA com a significância dos fatores  $a_w$  e idade ao nível de 90% de confiança. A influência significativa do fator idade sobre um parâmetro de crescimento foi observada somente para este microrganismo neste suco e quando analisado o parâmetro A.

Tabela 4.8. ANOVA dos efeitos dos fatores sobre a variável A de *B. nivea* em suco de mamão.

ANOVA	Soma Quadrados	Graus Liberdade	Quadrado Médio	F <sub>cal</sub>	p-valor
Idade (L)	13,925	1	13,925	5,814	0,061
Idade (Q)	1,407	1	1,407	0,587	0,478
$a_w$ (L)	11,977	1	11,977	5,001	0,076
$a_w$ (Q)	16,971	1	16,971	7,086	0,045
Interação	0,339	1	0,339	0,142	0,722

A curva de nível e a superfície de resposta obtida para os fatores  $a_w$  versus idade para o parâmetro de crescimento A são apresentadas na Figura 4.29.

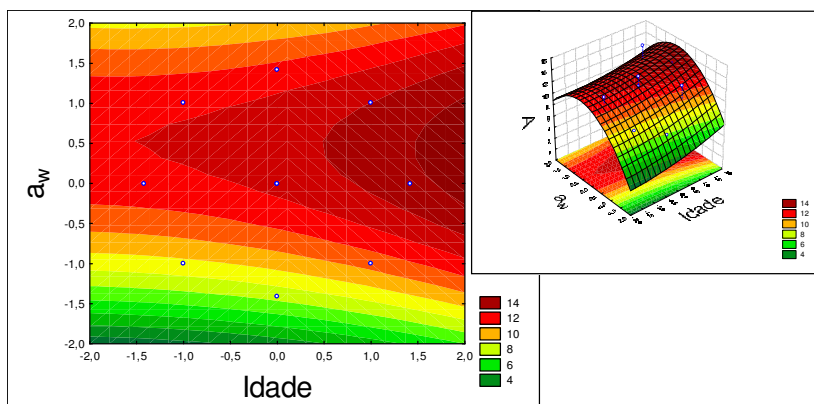


Figura 4.29. Curva de nível e superfície de resposta dos fatores  $a_w$  versus idade sobre o parâmetro de crescimento A de *B. nivea* em suco de mamão.

Analisando a curva de nível e a superfície de resposta (Figura 4.29), a faixa de máximo valor de A pode ser identificada nas condições de maior idade e de  $a_w$  entre 0,95 e 0,96. O fator idade foi estatisticamente significativo somente para este microrganismo neste suco e quando analisado o parâmetro A. Este foi um caso isolado dentro de todo o estudo desenvolvido e pode ser justificado devido a erros experimentais e variabilidade biológica dos dados.

Considerando apenas os fatores significativos para a variável resposta A, a Equação 4.3 apresenta o modelo da superfície de resposta obtido.

$$A = 12,29 + 1,32.I + 1,22.a_w - 1,73.a_w^2 \quad (4.3)$$

Analisando-se a influência dos fatores independentes  $a_w$  e idade sobre os parâmetros de crescimento  $\lambda$ ,  $\mu_{\max}$  e A, observa-se que a idade foi estatisticamente significativa somente para o parâmetro A e que a  $a_w$  foi significativa em todos os parâmetros de crescimento estudados para *B. nivea* em suco de mamão a  $p < 0,1$ , dentro da faixa estudada.

## 2.2. MODELAGEM DE CRESCIMENTO DE *Byssochlamys nivea* EM SUCO DE ABACAXI

Os modelos de Gompertz Modificado e Logístico foram ajustados aos dados experimentais de crescimento ao longo do tempo, obtidos através da medida de diâmetro da colônia de *Byssochlamys nivea* em suco de abacaxi, para cada experimento estabelecido no planejamento experimental, conforme Tabela 3.2. Exemplos dos ajustes obtidos com ambos os modelos às médias adquiridas nas duplicatas são apresentados nas Figuras 4.30 para idade (I) de 60 dias e  $a_w$  de 0,95 e na Figura 4.31 para I de 60 dias e  $a_w$  de 0,99.

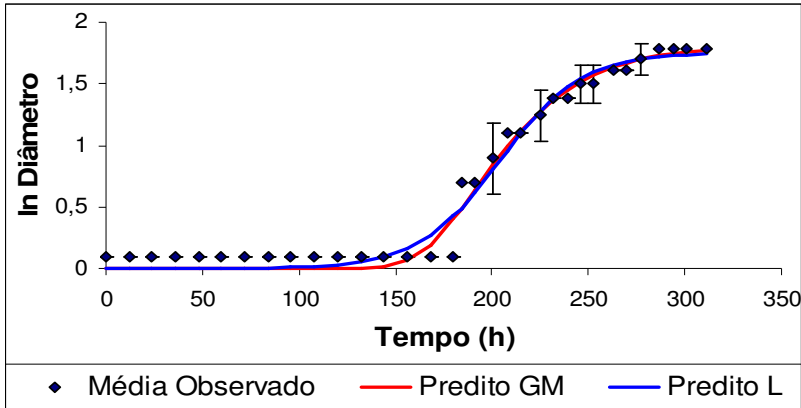


Figura 4.30. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) à média das duplicatas dos dados de crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi para idade (I) de 60 dias e  $a_w$  de 0,95. As barras representam o desvio padrão das duplicatas em cada ponto.

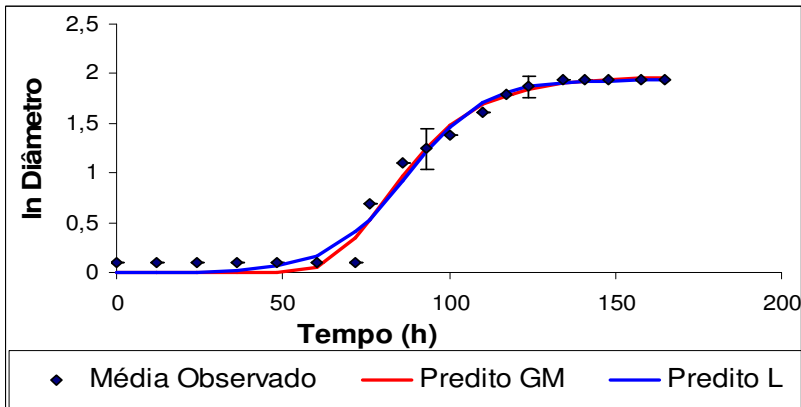


Figura 4.31. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) à média das duplicatas dos dados de crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi para idade (I) de 60 dias e  $a_w$  de 0,99. As barras representam o desvio padrão das duplicatas em cada ponto.

As condições de crescimento representadas nas Figuras 4.30 e 4.31 foram escolhidas aleatoriamente para mostrar que ambos os modelos de Gompertz Modificado e Logístico se ajustaram bem aos dados experimentais. Contudo, o modelo de Gompertz Modificado

apresentou melhor ajuste aos dados experimentais na transição da fase lag para a fase exponencial, comparado ao modelo Logístico.

Os parâmetros estatísticos que permitem comparar os modelos de Gompertz Modificado e Logístico no crescimento de *N. nivea* em suco de abacaxi são apresentados na Tabela 4.9.

Tabela 4.9. Parâmetros estatísticos para validar o emprego dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) na modelagem do crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi.

Ensaio	Modelo	MSE	Fator	Fator	R <sup>2</sup>
			Bias	Exatidão	
1	GM	0,0403	1,0032	1,0032	0,8924
	L	0,0391	1,0022	1,0015	<b>0,9371</b>
2	GM	0,0295	1,0023	1,0023	0,9677
	L	0,0295	1,0023	1,0023	<b>0,9684</b>
3	GM	0,0674	1,0043	1,0022	<b>0,9955</b>
	L	0,0534	1,0000	1,0000	0,9939
4	GM	0,0493	1,0003	1,0086	<b>0,9927</b>
	L	0,0362	0,9963	1,0028	0,9915
5	GM	0,0578	0,9865	1,0092	<b>0,9927</b>
	L	0,0538	1,2019	1,0000	0,9913
6	GM	0,0336	1,0026	1,0026	<b>0,9885</b>
	L	0,0422	1,0032	1,0006	0,9877
7	GM	0,0303	1,0024	1,0024	<b>0,9834</b>
	L	0,0301	1,0023	1,0022	0,9830
8	GM	0,0448	1,0035	1,0035	<b>0,9883</b>
	L	0,0302	1,0009	1,0015	0,9878
9	GM	0,0367	1,0029	1,0029	<b>0,9903</b>
	L	0,0356	1,0026	1,0044	0,9890
10	GM	0,0318	1,0025	1,0025	<b>0,9902</b>
	L	0,0301	0,9996	1,0034	0,9897
11	GM	0,0356	1,0028	1,0028	<b>0,9932</b>
	L	0,0412	1,0086	1,0022	0,9916

Analisando a Tabela 4.9, pode-se concluir que ambos os modelos apresentaram bom ajuste aos dados experimentais, uma vez que o MSE foi próximo de 0, o Fator Bias e Fator de Exatidão próximos a 1 e o  $R^2$  próximo de 1. Embora os modelos tenham apresentado parâmetros estatísticos muito próximos, o modelo de Gompertz Modificado (GM) apresentou melhor ajuste através da análise de  $R^2$  (dados em negrito na Tabela 4.9).

A partir da análise visual das Figuras 4.30 e 4.31 e do parâmetro estatístico  $R^2$  da Tabela 4.9, decidiu-se utilizar apenas os parâmetros de crescimento obtidos através do ajuste com o modelo de GM.

Os valores dos parâmetros de crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi para cada ensaio do planejamento experimental, obtidos pelo ajuste do modelo de Gompertz Modificado, são mostrados na Tabela 4.10.

Tabela 4.10. Parâmetros de crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi obtidos pelo ajuste do modelo de Gompertz Modificado, no DCCR.

Ensaio	Idade	$a_w$	$\lambda$ (h)	$\mu_{max}$ (mm/h)	A (mm)
1	51	0,93	251,5	0,015	<b>2,3</b>
2	69	0,93	<b>322,5</b>	0,016	3,3
3	51	0,96	<b>43,2</b>	0,043	7,4
4	69	0,96	74,8	0,030	6,5
5	60	0,99	64,8	<b>0,046</b>	7,1
6	90	0,95	134,9	<b>0,014</b>	6,6
7	60	0,90	291,6	0,021	4,9
8	30	0,95	110,7	0,025	6,8
9	60	0,95	162,2	0,022	6,1
10	60	0,95	152,4	0,018	7,1
11	60	0,95	174,7	0,036	<b>8,4</b>

Analisando a Tabela 4.10, observa-se através dos valores em destaque que no ensaio 2, houve o maior tempo de adaptação (322,5 horas) na condição de  $a_w$  0,93 e idade de 69 dias. Ao contrário, no ensaio 3, houve o menor tempo de adaptação (43,2 horas) na condição de  $a_w$  0,96 e idade de 51 dias. De acordo com estes resultados, se o suco de abacaxi estivesse contaminado com *B. nivea* e fosse armazenado a 30°C em  $a_w$  de 0,96, o produto seria rejeitado no segundo dia de vida de prateleira porque, nestas condições, a colônia do fungo se tornaria visível em aproximadamente 43 horas.

Para o  $\mu_{max}$ , o maior valor foi observado no ensaio 5 (0,046 mm/h) sendo nas condições de  $a_w$  0,99 e idade de 60 dias, e o

menor valor foi para o ensaio 6 (0,014 mm/h) sendo nas condições de  $a_w$  0,95 e idade 90 dias.

No parâmetro A, o ensaio 11 que apresentou maior valor de diâmetro (8,4 mm), sendo  $a_w$  de 0,95 e idade de 60 dias, e o ensaio 1 com o menor valor (2,3 mm), sendo  $a_w$  de 0,93 e idade de 51 dias.

Os resultados da Tabela 4.10 foram submetidos à análise estatística com a finalidade de esclarecer quais dos fatores estudados,  $a_w$  e idade, afetaram significativamente os parâmetros de crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi. Os fatores foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,1$ . A análise de variância e de estimativa dos efeitos foi calculada através do *software Statistica 6.0* e são apresentados nas Tabelas 4.11 e 4.12.

### 2.2.1. Análise de variância e estimativa dos efeitos calculados para o parâmetro $\lambda$ no crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi

Os efeitos estimados para cada um dos fatores independentes, lineares e quadráticos, em  $\lambda$  são mostrados na Tabela 4.11. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,1$ .

Tabela 4.11. Efeitos dos fatores estimados sobre o parâmetro  $\lambda$  no crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(5)	p-valor	IC*(-90%)	IC*(+90%)
Idade(L)	34,194	20,321	1,683	0,153	-18,042	86,430
Idade(Q)	-29,054	24,186	-1,201	0,283	-91,227	33,119
$a_w$ (L)	<b>-194,194</b>	<b>20,321</b>	<b>-9,556</b>	<b>0,000</b>	<b>-246,430</b>	<b>-141,957</b>
$a_w$ (Q)	26,361	24,186	1,090	0,325	-35,812	88,535
Interação	-19,770	28,738	-0,688	0,522	-93,643	54,103

\*IC = Intervalo de Confiança

Analisando a variável resposta  $\lambda$ , nota-se que o fator  $a_w$  teve efeito significativo dentro da faixa estudada, verifica-se uma estimativa de queda do  $\lambda$  de *B. nivea*, quando este fator passa de um nível inferior ( $a_w$  0,90) para um nível superior ( $a_w$  0,99).

A Tabela 4.12 apresenta a ANOVA com a significância dos fatores  $a_w$  e idade ao nível de 90% de confiança.

Tabela 4.12. ANOVA dos efeitos dos fatores sobre a variável  $\lambda$  de *B. nivea* em suco de abacaxi.

ANOVA	Soma Quadrados	Graus Liberdade	Quadrado Médio	F <sub>cal</sub>	p-valor
Idade (L)	2338,45	1	2338,45	2,832	0,153
Idade (Q)	1191,72	1	1191,72	1,443	0,283
<b>a<sub>w</sub> (L)</b>	<b>75422,24</b>	<b>1</b>	<b>75422,24</b>	<b>91,326</b>	<b>0,000</b>
a <sub>w</sub> (Q)	981,06	1	981,06	1,188	0,325
Interação	390,87	1	390,87	0,473	0,522

A Figura 4.32 apresenta a curva de nível e a superfície de resposta obtida para os fatores  $a_w$  versus idade para o parâmetro de crescimento  $\lambda$ .

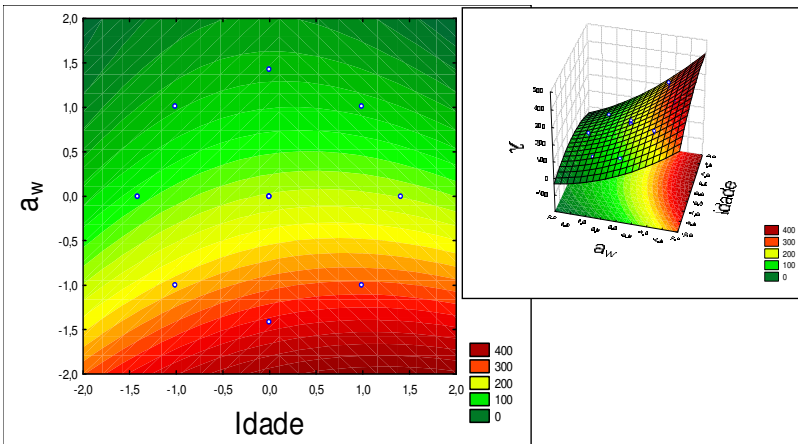


Figura 4.32. Curva de nível e superfície de resposta dos fatores  $a_w$  versus idade sobre o parâmetro de crescimento  $\lambda$  de *B. nivea* em suco de abacaxi.

Analisando a curva de nível e a superfície de resposta (Figura 4.32) é possível identificar a influência da  $a_w$  no fator de crescimento  $\lambda$ , independente da variação da idade dos esporos. Por exemplo, os pontos de máximo para  $\lambda$  são encontrados na condição de menor  $a_w$  tanto na maior quanto na menor condição de idade. Nestas condições de  $a_w$ , o microrganismo precisa de mais tempo para se adaptar ao meio, ou seja, estas são as condições, que seria interessante que fossem aplicadas pela indústria, sempre que possível.

Considerando apenas o fator significativo para a variável resposta  $\lambda$ , a Equação 4.4 apresenta o modelo da superfície de resposta obtido.

$$\lambda = 163,11 - 97,10 \cdot a_w \tag{4.4}$$

**2.2.2. Análise de variância e estimativa dos efeitos calculados para o parâmetro  $\mu_{\max}$  no crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi**

Os efeitos estimados para cada um dos fatores independentes em  $\mu_{\max}$  são apresentados na Tabela 4.13. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,1$ .

Tabela 4.13. Efeitos dos fatores estimados sobre o parâmetro  $\mu_{\max}$  no crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi.

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t(5)	p-valor	IC*(-90%)	IC*(+90%)
Idade(L)	-0,007	0,004	-1,620	0,166	-0,019	0,004
Idade(Q)	-0,006	0,005	-1,183	0,290	-0,020	0,007
$a_w$ (L)	<b>0,020</b>	<b>0,004</b>	<b>4,399</b>	<b>0,007</b>	<b>0,008</b>	<b>0,031</b>
$a_w$ (Q)	0,008	0,005	1,485	0,198	-0,006	0,021
Interação	-0,007	0,006	-1,165	0,297	-0,024	0,009

\*IC = Intervalo de Confiança

Observando a variável resposta  $\mu_{\max}$  (velocidade específica máxima de crescimento), nota-se que o fator  $a_w$  teve efeito significativo dentro da faixa estudada, quando este fator passa de um nível inferior ( $a_w$  0,90) para um nível superior ( $a_w$  0,99).

A Tabela 4.14 apresenta a ANOVA com a significância dos fatores  $a_w$  e idade ao nível de 90% de confiança.

Tabela 4.14. ANOVA dos efeitos dos fatores sobre a variável  $\mu_{\max}$  de *B. nivea* em suco de abacaxi.

ANOVA	Soma Quadrados	Graus Liberdade	Quadrado Médio	F <sub>cal</sub>	p-valor
Idade (L)	0,0001	1	0,0001	2,6236	0,1662
Idade (Q)	0,0001	1	0,0001	1,3990	0,2901
$a_w$ (L)	<b>0,0008</b>	<b>1</b>	<b>0,0008</b>	<b>19,3487</b>	<b>0,0070</b>
$a_w$ (Q)	0,0001	1	0,0001	2,2057	0,1976
Interação	0,0001	1	0,0001	1,3576	0,2965



A curva de nível e a superfície de resposta obtida para os fatores  $a_w$  versus idade para o parâmetro de crescimento  $\mu_{\max}$  são apresentadas na Figura 4.33.

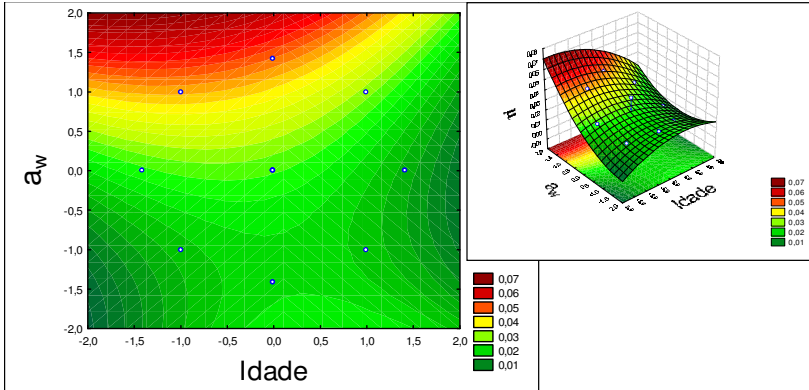


Figura 4.33. Curva de nível e superfície de resposta dos fatores  $a_w$  versus idade sobre o parâmetro de crescimento  $\mu_{\max}$  para *B. nivea* em suco de abacaxi.

Analisando a curva de nível e a superfície de resposta (Figura 4.33) é possível identificar a grande influência da  $a_w$  no fator de crescimento  $\mu_{\max}$ . Um ponto de máximo valor de  $\mu_{\max}$  pode ser visualizado na condição de maior  $a_w$ .

Considerando apenas o fator significativo para a variável resposta  $\mu_{\max}$ , a Equação 4.5 apresenta o modelo da superfície de resposta obtido.

$$\mu_{\max} = 0,02 + 0,01 \cdot a_w \quad (4.5)$$

### 2.2.3. Análise de variância e estimativa dos efeitos calculados para o parâmetro A no crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi

A Tabela 4.15 apresenta os efeitos estimados para cada um dos fatores independentes, lineares e quadráticos, em A (diâmetro máximo atingido pela colônia). Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,1$ .

Tabela 4.15. Efeitos dos fatores estimados sobre o parâmetro A no crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(5)	p-valor	IC*(-90%)	IC*(+90%)
Idade(L)	-0,002	1,013	-0,002	0,999	-2,605	2,602
Idade(Q)	-1,247	1,206	-1,034	0,348	-4,346	1,852
a <sub>w</sub> (L)	<b>2,848</b>	<b>1,013</b>	<b>2,812</b>	<b>0,037</b>	<b>0,245</b>	<b>5,452</b>
a <sub>w</sub> (Q)	-1,938	1,206	-1,607	0,169	-5,037	1,161
Interação	-0,973	1,433	-0,679	0,527	-4,655	2,709

\*IC = Intervalo de Confiança

Analisando a variável resposta A, onde o fator a<sub>w</sub> teve efeito significativo dentro da faixa estudada, verifica-se uma estimativa de aumento no valor de A de *B. nivea*, quando este fator passa de um nível inferior (a<sub>w</sub> 0,90) para um nível superior (a<sub>w</sub> 0,99).

A Tabela 4.16 apresenta a ANOVA com a significância dos fatores a<sub>w</sub> e idade ao nível de 90% de confiança.

Tabela 4.16. ANOVA dos efeitos dos fatores sobre a variável A de *B. nivea* em suco de abacaxi.

ANOVA	Soma Quadrados	Graus Liberdade	Quadrado Médio	F <sub>cal</sub>	p-valor
Idade (L)	0,00001	1	0,00001	0,000003	0,998788
Idade (Q)	2,19512	1	2,19512	1,069677	0,348425
a <sub>w</sub> (L)	<b>16,22759</b>	<b>1</b>	<b>16,22759</b>	<b>7,907665</b>	<b>0,037457</b>
a <sub>w</sub> (Q)	5,30155	1	5,30155	2,583432	0,168898
Interação	0,94679	1	0,94679	0,461367	0,527150

A Figura 4.34 apresenta a curva de nível e a superfície de resposta obtida para os fatores a<sub>w</sub> versus idade para o parâmetro de crescimento A.

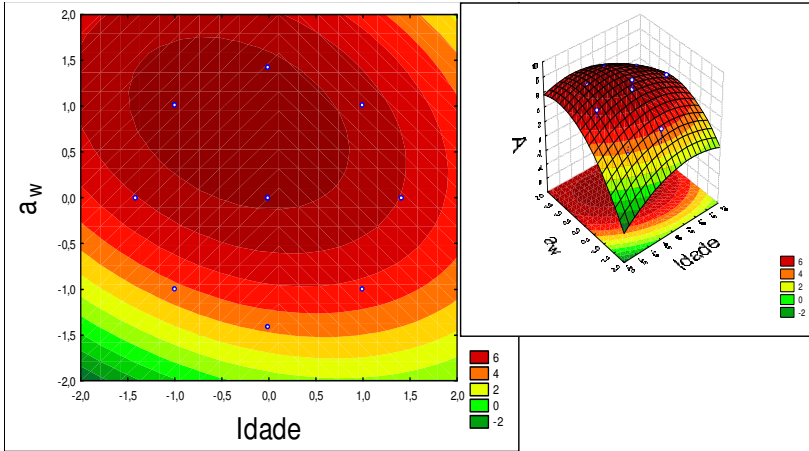


Figura 4.34. Curva de nível e superfície de resposta dos fatores  $a_w$  versus idade sobre o parâmetro de crescimento  $A$  para *B. nivea* em suco de abacaxi.

Analisando a curva de nível e a superfície de resposta (Figura 4.34), a faixa de máximo valor de  $A$  pode ser identificada nas condições de  $a_w$  entre 0,95 e 0,99.

Considerando apenas o fator significativo para a variável resposta  $A$ , a Equação 4.6 apresenta o modelo da superfície de resposta obtido.

$$A = 7,20 + 1,42 \cdot a_w \quad (4.6)$$

Analisando-se a influência dos fatores independentes  $a_w$  e idade sobre os parâmetros de crescimento  $\lambda$ ,  $\mu_{\max}$  e  $A$ , observa-se que a  $a_w$  foi estatisticamente significativa para todos os parâmetros de crescimento e que a  $I$  não foi significativa em nenhum dos parâmetros de crescimento estudados para *B. nivea* em suco de abacaxi a  $p < 0,1$ , dentro da faixa estudada.

### 2.3. MODELAGEM DE CRESCIMENTO DE *Neosartorya fischeri* EM SUCO DE MAMÃO

Os modelos de Gompertz Modificado e Logístico foram ajustados aos dados experimentais de crescimento ao longo do tempo, obtidos através da medida de diâmetro da colônia de *Neosartorya fischeri* em suco de mamão, para cada experimento estabelecido no planejamento

experimental, conforme Tabela 3.2. Exemplos dos ajustes obtidos com ambos os modelos às médias adquiridas nas duplicatas são apresentados nas Figuras 4.35 para idade (I) de 60 dias e  $a_w$  de 0,99 e na Figura 4.36 para I de 60 dias e  $a_w$  de 0,90.

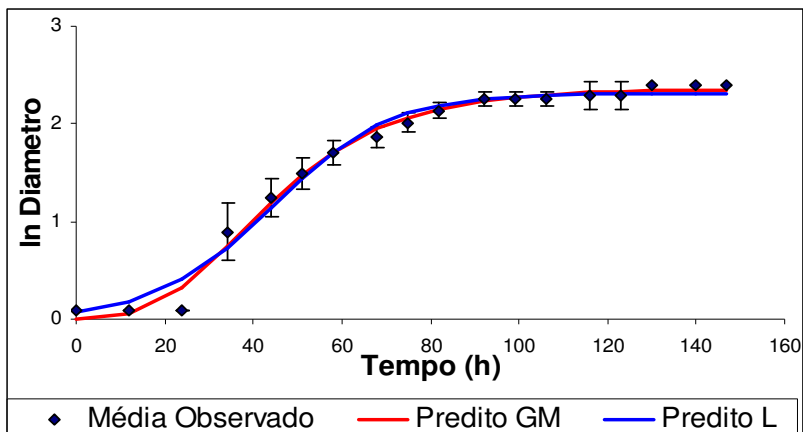


Figura 4.35. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) à média das duplicatas dos dados de crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão na idade (I) de 60 dias e  $a_w$  de 0,99. As barras representam o desvio padrão das duplicatas em cada ponto.

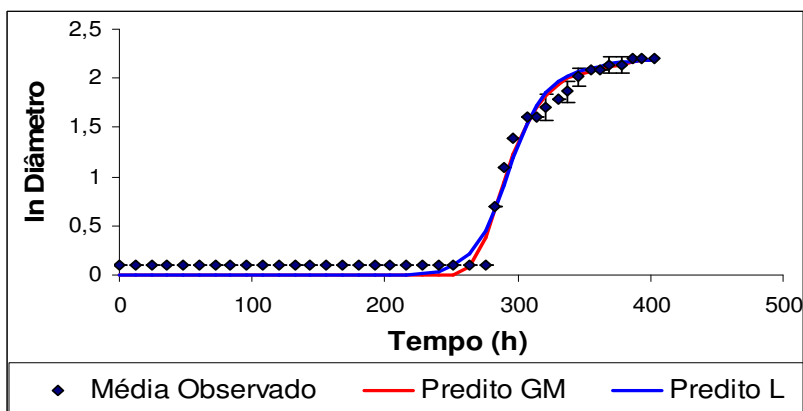


Figura 4.36. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) à média das duplicatas dos dados de crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão na idade (I) de 60 dias e  $a_w$  de 0,90. As barras representam o desvio padrão das duplicatas em cada ponto.

As condições de crescimento representadas nas Figuras 4.35 e 4.36 foram escolhidas aleatoriamente para mostrar que ambos os modelos de Gompertz Modificado e Logístico se ajustaram bem aos dados experimentais. Contudo, o modelo de Gompertz Modificado apresentou melhor ajuste aos dados experimentais na transição da fase lag para a fase exponencial, comparado ao modelo Logístico.

Os parâmetros estatísticos que permitem comparar os modelos de Gompertz Modificado e Logístico no crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão são apresentados na Tabela 4.17.

Tabela 4.17. Parâmetros estatísticos para validar o emprego dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) no crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão.

Ensaio	Modelo	MSE	Fator Bias	Fator Exatidão	R <sup>2</sup>
1	GM	0,0504	1,0040	1,0038	0,9952
	L	0,0399	1,0016	1,0032	<b>0,9955</b>
2	GM	0,0526	1,0041	1,0021	<b>0,9954</b>
	L	0,0388	1,0028	1,0023	0,9937
3	GM	0,0233	1,0005	1,0068	<b>0,9907</b>
	L	0,0471	1,0030	1,0019	0,9867
4	GM	0,0273	1,0068	1,0021	<b>0,9926</b>
	L	0,0378	0,9997	1,0028	0,9906
5	GM	0,0581	0,9996	1,0045	<b>0,9952</b>
	L	0,0659	1,0000	1,0000	0,9917
6	GM	0,0347	0,9939	1,0038	<b>0,9958</b>
	L	0,0332	0,9982	1,0026	0,9935
7	GM	0,0303	1,0024	1,0024	<b>0,9930</b>
	L	0,0301	1,0022	1,0020	0,9913
8	GM	0,0394	0,9967	1,0024	<b>0,9933</b>
	L	0,0331	0,9998	1,0010	0,9931
9	GM	0,0452	0,9996	1,0099	<b>0,9951</b>
	L	0,0350	1,0017	1,0010	0,9934
10	GM	0,0535	1,0005	1,0055	0,9948
	L	0,0516	1,0016	1,0005	<b>0,9965</b>
11	GM	0,0441	0,9999	1,0109	<b>0,9896</b>
	L	0,0289	0,9980	1,0001	0,9865

Analisando a Tabela 4.17, pode-se concluir que ambos os modelos apresentaram bom ajuste aos dados experimentais, uma vez que o MSE foi próximo de 0, o Fator Bias e Fator de Exatidão próximos a 1 e o R<sup>2</sup> próximo de 1. Embora os modelos tenham apresentado parâmetros estatísticos muito próximos, o modelo de Gompertz

Modificado (GM) apresentou melhor ajuste através da análise de  $R^2$  (dados em negrito na Tabela 4.17).

A partir da análise visual das Figuras 4.35 e 4.36 e do parâmetro estatístico  $R^2$  da Tabela 4.17, decidiu-se utilizar apenas os parâmetros de crescimento fornecidos através do ajuste com o modelo de GM.

Os valores dos parâmetros de crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão para cada ensaio do planejamento experimental, obtidos pelo ajuste do modelo de Gompertz Modificado, são mostrados na Tabela 4.18.

Tabela 4.18. Parâmetros de crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão obtidos pelo ajuste do modelo de Gompertz Modificado, no DCCR.

Ensaio	Idade	$a_w$	$\lambda$ (h)	$\mu_{\max}$ (mm/h)	A (mm)
1	51	0,93	105,3	0,031	8,5
2	69	0,93	90,4	0,040	7,9
3	51	0,96	49,7	0,037	9,6
4	69	0,96	49,6	0,029	<b>6,9</b>
5	60	0,99	<b>18,1</b>	<b>0,046</b>	<b>10,5</b>
6	90	0,95	64,6	<b>0,028</b>	9,2
7	60	0,90	<b>267,4</b>	0,042	8,4
8	30	0,95	69,9	0,031	10,1
9	60	0,95	74,8	0,034	9,4
10	60	0,95	77,0	0,031	9,5
11	60	0,95	73,9	0,037	7,1

Analisando a Tabela 4.18, observa-se através dos valores em destaque que no ensaio 7, houve o maior tempo de adaptação (267,4 horas) na condição de  $a_w$  0,90 e idade de 60 dias. Ao contrário, no ensaio 5, houve o menor tempo de adaptação (18,1 horas) na condição de  $a_w$  0,99 e idade de 60 dias. Nestes ensaios, com idades iguais a 60 dias, o  $\lambda$  aumentou mais de 14 vezes quando houve variação de  $a_w$  da condição mínima para a condição máxima estudada. De acordo com estes resultados, se o suco de mamão estivesse contaminado com *N. fischeri* e fosse armazenado a 30°C em  $a_w$  de 0,99, o produto seria rejeitado no primeiro dia de vida de prateleira porque, nestas condições, a colônia do fungo se tornaria visível em aproximadamente 18 horas.

Para o  $\mu_{\max}$ , o maior valor foi observado no ensaio 5 (0,046 mm/h) sendo nas condições de  $a_w$  0,99 e idade de 60 dias, e o menor valor foi para o ensaio 6 (0,028 mm/h) sendo nas condições de  $a_w$  0,95 e idade 90 dias.

Para o parâmetro A (diâmetro máximo atingido pela colônia), o ensaio 5 que apresentou maior valor para diâmetro (10,5 mm), sendo nas condições de  $a_w$  0,99 e idade de 60 dias, e o ensaio 4 com o menor valor (6,9 mm), sendo  $a_w$  de 0,96 e idade de 69 dias.

Os resultados da Tabela 4.18 foram submetidos à análise estatística com a finalidade de esclarecer quais dos fatores estudados,  $a_w$  e idade, afetaram significativamente os parâmetros de crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão. Os fatores foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,1$ . A análise de variância e de estimativa dos efeitos foi calculada através do *software Statistica 6.0* e são apresentados nas Tabelas 4.19 e 4.20.

### 2.3.1. Análise de variância e estimativa dos efeitos calculados para o parâmetro $\lambda$ no crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão

Os efeitos estimados para cada um dos fatores independentes, lineares e quadráticos, em  $\lambda$  encontram-se na Tabela 4.19. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,1$ .

Tabela 4.19. Efeitos dos fatores estimados sobre o parâmetro  $\lambda$  no crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(5)	p-valor	IC*(-90%)	IC*(+90%)
Idade(L)	-5,639	31,904	-0,177	0,867	-87,650	76,372
Idade(Q)	-23,634	37,973	-0,622	0,561	-121,247	73,979
$a_w$ (L)	<b>-112,239</b>	<b>31,904</b>	<b>-3,518</b>	<b>0,017</b>	<b>-194,251</b>	<b>-30,228</b>
$a_w$ (Q)	51,920	37,973	1,367	0,230	-45,692	149,533
Interação	7,421	45,119	0,164	0,876	-108,560	123,402

\*IC = Intervalo de Confiança

Analisando a variável resposta  $\lambda$  (duração da fase de adaptação), nota-se que o fator  $a_w$  teve efeito significativo dentro da faixa estudada. Verifica-se uma estimativa de queda do  $\lambda$  de *N. fischeri*, quando este fator passa de um nível inferior ( $a_w$  0,90) para um nível superior ( $a_w$  0,99).

A Tabela 4.20 apresenta a ANOVA com a significância dos fatores  $a_w$  e idade ao nível de 90% de confiança.



Tabela 4.20. ANOVA dos efeitos dos fatores sobre a variável  $\lambda$  de *N. fischeri* em suco de mamão.

ANOVA	Soma Quadrados	Graus Liberdade	Quadrado Médio	F <sub>cal</sub>	p-valor
Idade (L)	63,59	1	63,59	0,031	0,867
Idade (Q)	788,55	1	788,55	0,387	0,561
<b>a<sub>w</sub> (L)</b>	<b>25195,39</b>	<b>1</b>	<b>25195,39</b>	<b>12,377</b>	<b>0,017</b>
a <sub>w</sub> (Q)	3805,73	1	3805,73	1,869	0,230
Interação	55,07	1	55,07	0,027	0,876

A curva de nível e a superfície de resposta obtida para os fatores a<sub>w</sub> versus idade para o parâmetro de crescimento  $\lambda$  são apresentadas na Figura 4.37.

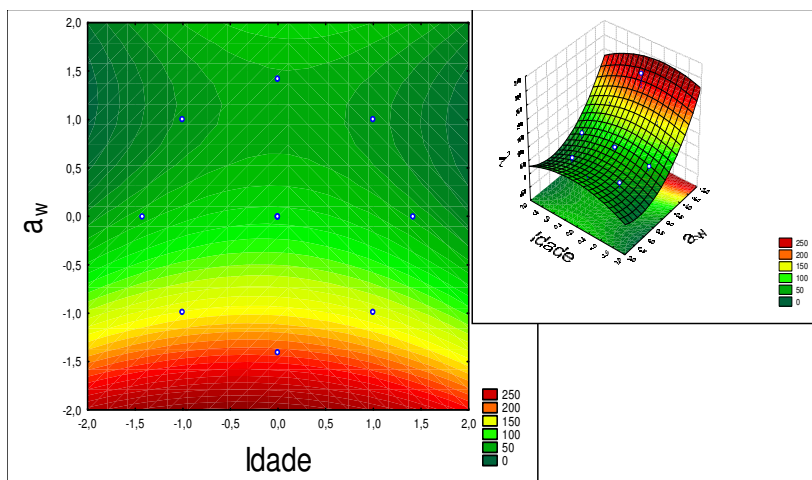


Figura 4.37. Curva de nível e superfície de resposta dos fatores a<sub>w</sub> versus idade sobre o parâmetro de crescimento  $\lambda$  para *N. fischeri* em suco de mamão.

Analisando a curva de nível e a superfície de resposta (Figura 4.37) é possível identificar a influência da a<sub>w</sub> no fator de crescimento  $\lambda$ , independente da variação da idade dos esporos. Por exemplo, os pontos de máximo para  $\lambda$  são encontrados na condição de menor a<sub>w</sub> tanto na maior quanto na menor condição de idade. Nestas condições de a<sub>w</sub>, o microrganismo precisa de mais tempo para se adaptar ao meio, ou seja, estas são as condições que devem ser aplicadas pela indústria.

Considerando apenas o fator significativo para a variável resposta  $\lambda$ , a Equação 4.7 apresenta o modelo da superfície de resposta obtido.

$$\lambda = 75,23 - 56,12 \cdot a_w \tag{4.7}$$

### 2.3.2. Análise de variância e estimativa dos efeitos calculados para o parâmetro $\mu_{\max}$ no crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão

Os efeitos estimados para cada um dos fatores independentes, lineares e quadráticos, em  $\mu_{\max}$  são mostrados na Tabela 4.21. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,1$ .

Tabela 4.21. Efeitos dos fatores estimados sobre o parâmetro  $\mu_{\max}$  no crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(5)	p-valor	IC*(-90%)	IC*(+90%)
Idade(L)	-0,0008	0,002	-0,345	0,744	-0,007	0,005
Idade(Q)	-0,0054	0,003	-1,970	0,106	-0,012	0,002
$a_w$ (L)	0,0004	0,002	0,152	0,885	-0,006	0,006
$a_w$ (Q)	<b>0,0089</b>	<b>0,003</b>	<b>3,265</b>	<b>0,022</b>	<b>0,002</b>	<b>0,016</b>
<b>Interação</b>	<b>-0,0086</b>	<b>0,003</b>	<b>-2,658</b>	<b>0,045</b>	<b>-0,017</b>	<b>0,000</b>

\*IC = Intervalo de Confiança

Observando a variável resposta  $\mu_{\max}$  (velocidade específica máxima de crescimento), nota-se que o fator  $a_w$  (quadrático) e a interação entre  $a_w$  e idade tiveram efeito significativo dentro da faixa estudada, quando estes fatores passam de um nível inferior ( $a_w$  0,90 e idade 30 dias) para um nível superior ( $a_w$  0,99 e idade 90 dias).

A Tabela 4.22 apresenta a ANOVA com a significância dos fatores  $a_w$  e idade ao nível de 90% de confiança.

Tabela 4.22. ANOVA dos efeitos dos fatores sobre a variável  $\mu_{\max}$  de *N. fischeri* em suco de mamão.

ANOVA	Soma Quadrados	Graus Liberdade	Quadrado Médio	F <sub>cal</sub>	p-valor
Idade (L)	0,000001	1	0,000001	0,119	0,744
Idade (Q)	0,000041	1	0,000041	3,880	0,106
$a_w$ (L)	0,000000	1	0,000000	0,023	0,885
$a_w$ (Q)	<b>0,000112</b>	<b>1</b>	<b>0,000112</b>	<b>10,660</b>	<b>0,022</b>
<b>Interação</b>	<b>0,000075</b>	<b>1</b>	<b>0,000075</b>	<b>7,066</b>	<b>0,045</b>

A curva de nível e a superfície de resposta obtida para os fatores  $a_w$  versus idade para o parâmetro de crescimento  $\mu_{\max}$  são apresentadas na Figura 4.38.

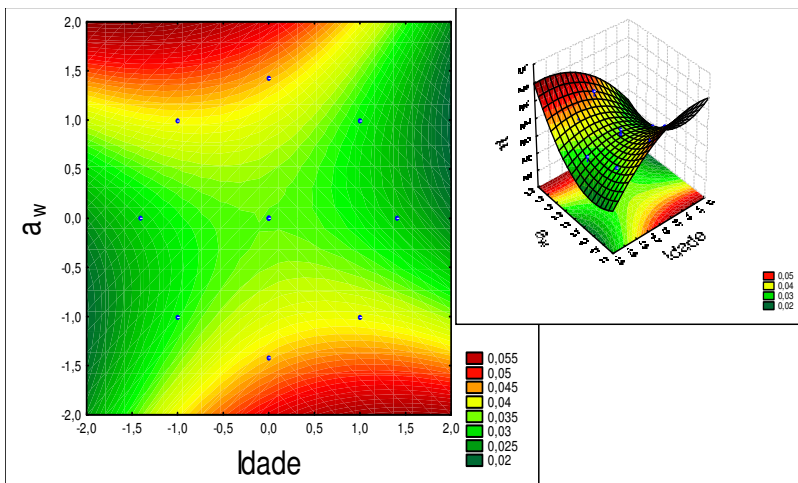


Figura 4.38. Curva de nível e superfície de resposta dos fatores  $a_w$  versus idade sobre o parâmetro de crescimento  $\mu_{\max}$  para *N. fischeri* em suco de mamão.

Analisando a curva de nível e a superfície de resposta (Figura 4.38) é possível identificar a interação entre os fatores  $a_w$  e idade de formação dos esporos. Este foi um caso isolado dentro de todo o estudo desenvolvido e, portanto, para as conclusões gerais do trabalho, a influência da interação dos fatores sobre o parâmetro  $\mu_{\max}$  para *N. fischeri* em suco de mamão não será levada em consideração.

Considerando apenas os fatores significativos para a variável resposta  $\mu_{\max}$ , a Equação 4.8 apresenta o modelo da superfície de resposta obtido.

$$\mu_{\max} = 0,034 + 0,0045 \cdot a_w^2 - 0,0043 \cdot I \cdot a_w \quad (4.8)$$

### 2.3.3. Análise de variância e estimativa dos efeitos calculados para o parâmetro A no crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão

Os efeitos estimados para cada um dos fatores independentes, lineares e quadráticos em A será apresentado na Tabela 4.23.

Tabela 4.23. Efeitos dos fatores estimados sobre o parâmetro A no crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(5)	p-valor	IC*(-90%)	IC*(+90%)
Idade(L)	-1,181	0,923	-1,279	0,257	-3,555	1,193
Idade(Q)	0,343	1,099	0,312	0,768	-2,482	3,168
a <sub>w</sub> (L)	0,774	0,923	0,838	0,440	-1,600	3,148
a <sub>w</sub> (Q)	0,133	1,099	0,121	0,908	-2,693	2,958
Interação	-1,026	1,306	-0,785	0,468	-4,383	2,332

\*IC = Intervalo de Confiança

Os fatores a<sub>w</sub> e idade não foram significativos ( $p < 0,1$ ) para o parâmetro A, nas faixas estudadas.

Analisando-se a influência dos fatores independentes a<sub>w</sub> e idade sobre os parâmetros de crescimento  $\lambda$ ,  $\mu_{\max}$  e A, observa-se que a a<sub>w</sub> foi estatisticamente significativa para os parâmetros  $\lambda$  e  $\mu_{\max}$  e que a I não foi significativa em nenhum dos parâmetros de crescimento estudados para *N. fischeri* em suco de mamão a  $p < 0,1$ , dentro da faixa estudada.

#### 2.4. MODELAGEM DE CRESCIMENTO DE *Neosartorya fischeri* EM SUCO DE ABACAXI

Os modelos de Gompertz Modificado e Logístico foram ajustados aos dados experimentais de crescimento ao longo do tempo, obtidos através da medida de diâmetro da colônia de *Neosartorya fischeri* em suco de abacaxi, para cada experimento estabelecido no planejamento experimental, conforme Tabela 3.2. Exemplos dos ajustes obtidos com ambos os modelos às médias adquiridas nas duplicatas são apresentados nas Figuras 4.39 para idade (I) de 60 dias e a<sub>w</sub> de 0,95 e na Figura 4.40 para I de 60 dias e a<sub>w</sub> de 0,99.

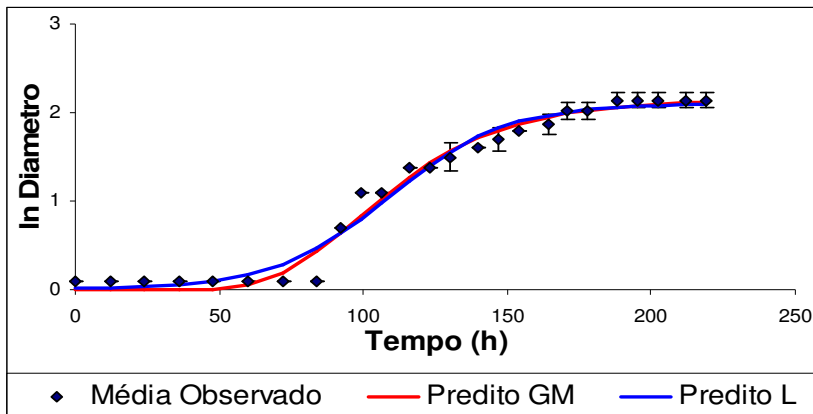


Figura 4.39. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) à média das duplicatas dos dados de crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi na idade (I) de 60 dias e  $a_w$  de 0,95. As barras representam o desvio padrão das duplicatas em cada ponto.

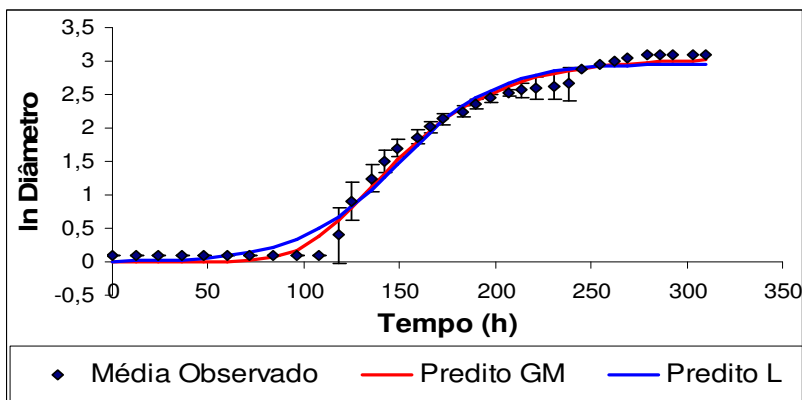


Figura 4.40. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) à média das duplicatas dos dados de crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi na idade (I) de 60 dias e  $a_w$  de 0,99. As barras representam o desvio padrão das duplicatas em cada ponto.

As condições de crescimento representadas nas Figuras 4.39 e 4.40 foram escolhidas aleatoriamente para mostrar que ambos os modelos de Gompertz Modificado e Logístico se ajustaram bem aos dados experimentais. Contudo, o modelo de Gompertz Modificado

apresentou melhor ajuste aos dados experimentais na transição da fase lag para a fase exponencial, comparado ao modelo Logístico.

Os parâmetros estatísticos que permitem comparar os modelos de Gompertz Modificado e Logístico no crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi são apresentados na Tabela 4.24.

Tabela 4.24. Parâmetros estatísticos para validar o emprego dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) no crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi.

Ensaio	Modelo	MSE	Fator Bias	Fator Exatidão	R <sup>2</sup>
1	GM	0,0309	1,0015	1,0004	<b>0,9924</b>
	L	0,0409	1,0020	1,0005	0,9891
2	GM	0,0270	0,9989	1,0030	<b>0,9772</b>
	L	0,0156	0,9932	1,0023	0,9751
3	GM	0,0355	1,0025	1,0006	<b>0,9930</b>
	L	0,0231	0,9950	1,0052	0,9899
4	GM	0,0299	0,9949	1,0038	<b>0,9962</b>
	L	0,0227	0,9955	1,0044	0,9931
5	GM	0,0344	1,0023	1,0010	<b>0,9950</b>
	L	0,0301	0,9978	1,0029	0,9917
6	GM	0,0366	1,0027	1,0020	<b>0,9930</b>
	L	0,0298	0,9996	1,0039	0,9900
7	GM	0,0390	1,0031	1,0031	<b>0,9934</b>
	L	0,0304	1,0018	1,0011	0,9898
8	GM	0,0297	0,9987	1,0049	<b>0,9921</b>
	L	0,0302	0,9977	1,0027	0,9882
9	GM	0,0438	0,9965	1,0133	<b>0,9908</b>
	L	0,0326	1,0002	1,0008	0,9878
10	GM	0,0294	1,0006	1,0017	<b>0,9806</b>
	L	0,0394	1,0035	1,0000	0,9776
11	GM	0,0365	1,0025	1,0014	<b>0,9960</b>
	L	0,0302	0,9994	1,0004	0,9954

Analisando a Tabela 4.24, pode-se concluir que ambos os modelos apresentaram bom ajuste aos dados experimentais, uma vez que o MSE foi próximo de 0, o Fator Bias e Fator de Exatidão próximos a 1 e o  $R^2$  próximo de 1. Embora os modelos tenham apresentado parâmetros estatísticos muito próximos, o modelo de Gompertz Modificado (GM) apresentou melhor ajuste através da análise de  $R^2$  (dados em negrito na Tabela 4.24).

A partir da análise visual das Figuras 4.39 e 4.40 e do parâmetro estatístico  $R^2$  da Tabela 4.24, decidiu-se utilizar apenas os parâmetros de crescimento obtidos através do ajuste com o modelo de GM.

Os valores dos parâmetros de crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi para cada ensaio do planejamento experimental, obtidos pelo ajuste do modelo de Gompertz Modificado, são mostrados na Tabela 4.25.

Tabela 4.25. Parâmetros de crescimento *N. fischeri* em suco de abacaxi obtidos pelo ajuste do modelo de Gompertz Modificado, no DCCR.

Ensaio	Idade	$a_w$	$\lambda$ (h)	$\mu_{max}$ (mm/h)	A (mm)
1	51	0,93	96,2	0,015	10,3
2	69	0,93	77,7	<b>0,012</b>	13,0
3	51	0,96	91,9	0,034	14,6
4	69	0,96	<b>68,2</b>	0,030	21,0
5	60	0,99	97,7	0,030	<b>21,1</b>
6	90	0,95	102,7	0,024	12,1
7	60	0,90	<b>184,3</b>	<b>0,035</b>	<b>6,8</b>
8	30	0,95	77,0	0,021	17,4
9	60	0,95	69,3	0,028	8,6
10	60	0,95	87,2	0,021	18,2
11	60	0,95	98,1	0,023	11,2

Analisando a Tabela 4.25, observa-se através dos valores em destaque que no ensaio 7, houve o maior tempo de adaptação (184,3 horas) na condição de  $a_w$  0,90 e idade de 60 dias. Ao contrário, no ensaio 4, houve o menor tempo de adaptação (68,2 horas) na condição de  $a_w$  0,96 e idade de 69 dias. De acordo com estes resultados, se o suco de abacaxi estivesse contaminado com *N. fischeri* e fosse armazenado a 30°C em  $a_w$  de 0,96, o produto seria rejeitado no terceiro dia de vida de prateleira porque, nestas condições, a colônia do fungo se tornaria visível em aproximadamente 68 horas.

Para  $\mu_{max}$ , o maior valor foi observado no ensaio 7 (0,035 mm/h) sendo nas condições de  $a_w$  0,90 e idade de 60 dias, e o menor valor foi

para o ensaio 2 (0,012 mm/h) sendo nas condições de  $a_w$  0,93 e idade 69 dias.

No parâmetro A (diâmetro máximo atingido pela colônia), o ensaio 5 que apresentou maior valor de diâmetro (21,1 mm), sendo  $a_w$  de 0,99 e idade de 60 dias, e o ensaio 7 com o menor valor (6,8 mm), sendo  $a_w$  de 0,90 e idade de 60 dias.

Os resultados da Tabela 4.25 foram submetidos à análise estatística com a finalidade de esclarecer quais dos fatores estudados,  $a_w$  e idade, afetaram significativamente os parâmetros de crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi. Os fatores foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,1$ . A análise de variância e de estimativa dos efeitos foi calculada através do *software Statistica 6.0* e são apresentados nas Tabelas 4.26 e 4.27.

#### 2.4.1. Análise de variância e estimativa dos efeitos calculados para o parâmetro $\lambda$ no crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi

Os efeitos estimados para cada um dos fatores independentes, lineares e quadráticos, em  $\lambda$  são mostrados na Tabela 4.26.

Tabela 4.26. Efeitos dos fatores estimados sobre o parâmetro  $\lambda$  no crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(5)	p-valor	IC*(-90%)	IC*(+90%)
Idade(L)	-1,455	21,701	-0,067	0,949	-57,239	54,330
Idade(Q)	-10,989	25,829	-0,425	0,688	-77,386	55,407
$a_w$ (L)	-34,047	21,701	-1,569	0,177	-89,832	21,737
$a_w$ (Q)	40,149	25,829	1,554	0,181	-26,248	106,545
Interação	-2,626	30,690	-0,086	0,935	-81,517	76,265

\*IC = Intervalo de Confiança

Os fatores  $a_w$  e idade não foram significativos ( $p < 0,1$ ) para o parâmetro  $\lambda$ , nas faixas estudadas.

#### 2.4.2. Análise de variância e estimativa dos efeitos calculados para o parâmetro $\mu_{\max}$ no crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi

Os efeitos estimados para cada um dos fatores independentes, lineares e quadráticos, em  $\mu_{\max}$  são apresentados na Tabela 4.27.



Tabela 4.27. Efeitos dos fatores estimados sobre o parâmetro  $\mu_{\max}$  no crescimento de *fischeri* em suco de abacaxi.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(5)	p-valor	IC*(-90%)	IC*(+90%)
Idade(L)	-0,000514	0,005754	-0,089346	0,932275	-0,015305	0,014277
Idade(Q)	-0,003683	0,006848	-0,537740	0,613819	-0,021287	0,013922
$a_w$ (L)	0,007441	0,005754	1,293188	0,252468	-0,007350	0,022232
$a_w$ (Q)	0,006249	0,006848	0,912492	0,403361	-0,011355	0,023854
Interação	-0,000578	0,008137	-0,071035	0,946124	-0,021495	0,020339

\*IC = Intervalo de Confiança

Os fatores  $a_w$  e idade não foram significativos ( $p < 0,1$ ) para o parâmetro  $\mu_{\max}$ , nas faixas estudadas.

### 2.4.3. Análise de variância e estimativa dos efeitos calculados para o parâmetro A no crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi

A Tabela 4.28 apresenta os efeitos estimados para cada um dos fatores independentes, lineares e quadráticos, em A. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,1$ .

Tabela 4.28. Efeitos dos fatores estimados sobre o parâmetro A no crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(5)	p-valor	IC*(-90%)	IC*(+90%)
Idade(L)	0,395	3,025	0,131	0,901	-7,381	8,172
Idade(Q)	2,291	3,601	0,636	0,553	-6,964	11,547
$a_w$ (L)	<b>8,081</b>	<b>3,025</b>	<b>2,671</b>	<b>0,044</b>	<b>0,304</b>	<b>15,857</b>
$a_w$ (Q)	1,483	3,601	0,412	0,697	-7,773	10,739
Interação	1,860	4,278	0,435	0,682	-9,137	12,858

\*IC = Intervalo de Confiança

Analisando a variável resposta A (diâmetro máximo atingido pela colônia), nota-se que o fator  $a_w$  teve efeito significativo dentro da faixa estudada. Verifica-se uma estimativa de aumento de A de *N. fischeri*, quando este fator passa de um nível inferior ( $a_w$  0,90) para um nível superior ( $a_w$  0,99).

A Tabela 4.29 apresenta a ANOVA com a significância dos fatores  $a_w$  e idade ao nível de 90% de confiança.

Tabela 4.29. ANOVA dos efeitos dos fatores sobre a variável A de *N. fischeri* em suco de abacaxi.

ANOVA	Soma Quadrados	Graus Liberdade	Quadrado Médio	F <sub>cal</sub>	p-valor
Idade (L)	0,313	1	0,313	0,017	0,901
Idade (Q)	7,413	1	7,413	0,405	0,553
<b>a<sub>w</sub> (L)</b>	<b>130,591</b>	<b>1</b>	<b>130,591</b>	<b>7,135</b>	<b>0,044</b>
a <sub>w</sub> (Q)	3,106	1	3,106	0,170	0,697
Interação	3,461	1	3,461	0,189	0,682

A curva de nível e a superfície de resposta obtida para os fatores a<sub>w</sub> versus idade para o parâmetro de crescimento A são apresentadas na Figura 4.41.

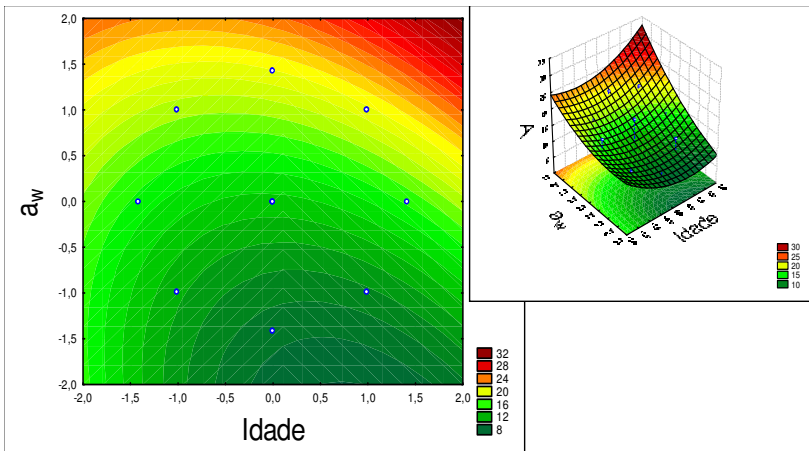


Figura 4.41. Curva de nível e superfície de resposta dos fatores a<sub>w</sub> versus idade sobre o parâmetro de crescimento A para *N. fischeri* em suco de abacaxi.

Analisando a curva de nível e a superfície de resposta (Figura 4.41), a faixa de mínimo valor de A pode ser identificada nas condições de mínima a<sub>w</sub>.

Considerando apenas o fator significativo para a variável resposta A, a Equação 4.9 apresenta o modelo da superfície de resposta obtido.

$$A = 12,65 + 4,04 \cdot a_w \tag{4.9}$$

Analisando-se a influência dos fatores independentes  $a_w$  e idade sobre os parâmetros de crescimento  $\lambda$ ,  $\mu_{\max}$  e  $A$ , observa-se que a  $a_w$  foi estatisticamente significativa somente para o parâmetro  $A$  e que a  $I$  não foi significativa em nenhum dos parâmetros de crescimento estudados para *N. fischeri* em suco de abacaxi a  $p < 0,1$ , dentro da faixa estudada.

### 3. DISCUSSÕES SOBRE A INFLUÊNCIA DA VARIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ÁGUA ( $a_w$ ) E DA IDADE DOS ESPOROS NO CRESCIMENTO DE *Byssochlamys nivea* E *Neosartorya fischeri* EM SUCOS DE FRUTAS

A Tabela 4.30 apresenta os dados estatísticos estimativa dos efeitos e valores de  $p$  que representam a influência da variação dos fatores  $a_w$  e  $I$  sobre os parâmetros de crescimento  $\lambda$ ,  $\mu_{\max}$  e  $A$  de *Byssochlamys nivea* e *Neosartorya fischeri* em sucos de mamão e abacaxi.

Tabela 4.30: Estimativa dos efeitos e valores de  $p$  que representam a influência da variação dos fatores  $a_w$  e  $I$  sobre os parâmetros de crescimento  $\lambda$ ,  $\mu_{\max}$  e  $A$  de *Byssochlamys nivea* e *Neosartorya fischeri* em sucos de mamão e abacaxi

Fator	Parâmetro	<i>Byssochlamys nivea</i>				<i>Neosartorya fischeri</i>			
		Suco Mamão		Suco Abacaxi		Suco Mamão		Suco Abacaxi	
		Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor
$a_w$	$\lambda$	-104,670	<b>0,0271</b>	-194,194	<b>0,0002</b>	-112,239	<b>0,0170</b>	-34,047	0,1775
	$\mu_{\max}$	0,014	<b>0,0490</b>	0,020	<b>0,0070</b>	0,008*	<b>0,0223*</b>	0,007	0,2525
$I$	$\lambda$	21,187	0,5587	34,194	0,1533	-5,639	0,8666	-1,455	0,9492
	$\mu_{\max}$	-0,008	0,1793	-0,007	0,1662	-0,001	0,7441	-0,001	0,9323

\* Valor referente ao fator  $a_w$  quadrático

O fator  $a_w$  apresentou influência sobre os parâmetros de crescimento  $\lambda$  e  $\mu_{\max}$  de *B. nivea* para ambos os sucos analisados. Para *N. fischeri*, este fator apresentou influência sobre os parâmetros de crescimento apenas para o suco de mamão. Este fato pode ser associado ao metabolismo do microrganismo e às diferenças físico-químicas do suco de abacaxi em relação ao suco de mamão, como por exemplo, a acidez. Em estudos anteriores utilizando os mesmos sucos comerciais, Slongo (2004) encontrou valores de percentual de acidez de 0,5 para suco de abacaxi e 0,28 para suco de mamão.

Gibson et al. (1994) reportaram que o final da vida de prateleira do produto ocorre quando a colônia de microrganismo atinge 3 mm,

pois o consumidor passa a ver a colônia. Sendo assim, diâmetro de colônia maior que 3mm tem pouca importância em termos industriais e a influência do fator  $a_w$  e idade sobre o parâmetro de crescimento  $\lambda$  não parece ser um dado relevante.

De forma similar ao encontrado nesta pesquisa, VALÍK & PIECKOVÁ (2001), estudaram o efeito da atividade de água em meio de crescimento (Sabouraud Ágar), utilizando diferentes concentrações de sacarose para ajuste da  $a_w$ , para vários fungos termorresistentes, a taxa de crescimento radial de *Byssochlamys fulva* passou de 6,66 mm/dia na  $a_w$  de 0,90 para 0,86 mm/dia na  $a_w$  0,85, e para *N. fischeri* a taxa de crescimento radial passou de 8,24 mm/dia na  $a_w$  0,90 para 2,79 mm/dia na  $a_w$  0,85. De acordo com GIBSON et al. (1994), que estudaram a influência da atividade de água no crescimento de *Aspergillus flavus*, a taxa de crescimento radial passou de 425  $\mu\text{m/h}$  na  $a_w$  de 0,99 para 70  $\mu\text{m/h}$  na  $a_w$  de 0,85. Estes dados indicam que a quantidade de água livre exerce um efeito importante na taxa de crescimento dos fungos.

O fator idade não apresentou influência sobre os parâmetros de crescimento  $\lambda$  e  $\mu_{\text{max}}$  de *B. nivea* e *N. fischeri* para nenhum dos sucos analisados. Slongo (2004) verificou que o fator idade influencia na termorresistência de *N. fischeri* em suco de mamão e de abacaxi. Até o momento não foi encontrada nenhuma referência na literatura que descreva a influência da idade dos esporos no crescimento de fungos filamentosos termorresistentes.

#### **4. ANÁLISE DA VARIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ÁGUA ( $a_w$ ) NO TEMPO DE ADAPTAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Byssochlamys nivea* E *Neosartorya fischeri* EM SUCOS DE FRUTAS**

Considerando-se que o término da vida de prateleira dos sucos é o momento em que a colônia do fungo torna-se visível, o parâmetro  $\lambda$  é determinante para definir a vida de prateleira do produto.

Dentre os fatores estudados ( $a_w$  e I), a  $a_w$  foi o fator de maior influência sobre o crescimento dos fungos estudados. Nesta parte do trabalho, analisou-se apenas a influência da  $a_w$  sobre o parâmetro  $\lambda$  para ambos os fungos nos sucos de mamão e abacaxi, considerando-se todas as idades estudadas.

#### 4.1. *Byssochlamys nivea* EM SUCO DE MAMÃO

Conforme discutido anteriormente no planejamento experimental, a idade dos esporos não tem influência sobre o parâmetro  $\lambda$ , permitindo que a média dos valores de  $\lambda$  obtidos para as 5 condições de idade em cada condição de  $a_w$  pudesse ser aplicada. A Figura 4.42 apresenta a média dos valores de  $\lambda$  de *B. nivea* em suco de mamão em função da  $a_w$ , para as diferentes idades estudadas.

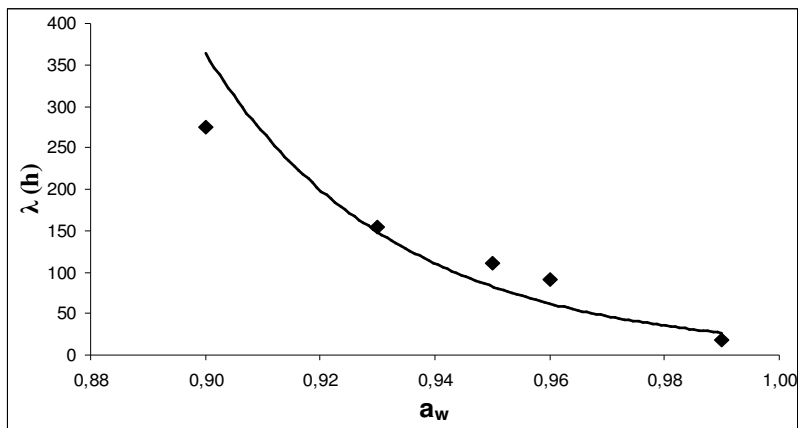


Figura 4.42. Influência da  $a_w$  sobre a média dos valores de  $\lambda$  de *B. nivea* em suco de mamão, nas diferentes idades estudadas. A linha contínua mostra o ajuste de um modelo secundário empírico (potência) aos dados obtidos.

Como já discutido anteriormente, observa-se que a  $a_w$  influencia o parâmetro  $\lambda$ . Com estes dados foi possível obter um modelo secundário que descreve unicamente a influência da  $a_w$  sobre o valor de  $\lambda$ . Foi utilizada uma equação empírica, como modelo secundário, conforme descrito por CORRADINI e PELEG (2005), sendo apresentada na Equação 4.10.

$$\lambda = 20,29 \cdot a_w^{-27,39} \quad R^2 = 0,8833 \quad (4.10)$$

Através do valor de  $R^2$  e da Figura 4,42, pode-se observar que o modelo secundário empírico da potência se ajustou bem aos dados experimentais de crescimento.

#### 4.2. *Byssochlamys nivea* EM SUCO DE ABACAXI

A Figura 4.43 apresenta a média dos valores de  $\lambda$  de *B. nivea* em suco de abacaxi em função da  $a_w$ , para as diferentes idades estudadas.

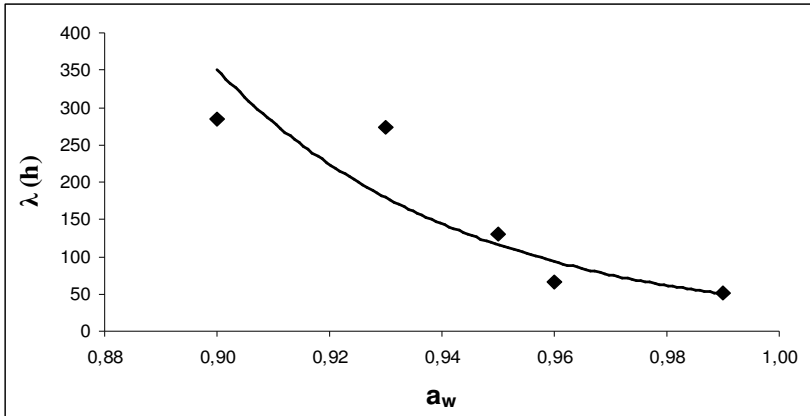


Figura 4.43. Influência da  $a_w$  sobre a média dos valores de  $\lambda$  de *B. nivea* em suco de abacaxi, nas diferentes idades estudadas. A linha contínua mostra o ajuste de um modelo secundário empírico (potência) aos dados obtidos.

Como já discutido anteriormente, observa-se que a  $a_w$  influencia o parâmetro  $\lambda$ . Foi utilizada uma equação empírica, como modelo secundário, conforme descrito por CORRADINI e PELEG (2005), sendo apresentada na Equação 4.11.

$$\lambda = 40,52 \cdot a_w^{-20,49} \quad R^2 = 0,8535 \quad (4.11)$$

Através do valor de  $R^2$  e da Figura 4,43, pode-se observar que o modelo secundário empírico da potência se ajustou bem aos dados experimentais de crescimento.

#### 4.3. *Neosartorya fischeri* EM SUCO DE MAMÃO

A Figura 4.44 apresenta a média dos valores de  $\lambda$  de *N. fischeri* em suco de mamão em função da  $a_w$ , para as diferentes idades estudadas.

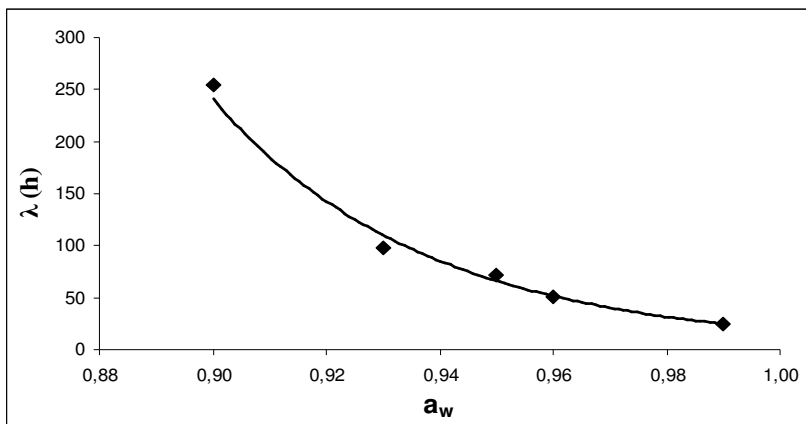


Figura 4.44. Influência da  $a_w$  sobre a média dos valores de  $\lambda$  de *N. fischeri* em suco de mamão, nas diferentes idades estudadas. A linha contínua mostra o ajuste de um modelo secundário empírico (potência) aos dados obtidos.

Como já discutido anteriormente, observa-se que a  $a_w$  influencia o parâmetro  $\lambda$ . Foi utilizada uma equação empírica, como modelo secundário, conforme descrito por CORRADINI e PELEG (2005), sendo apresentada na Equação 4.12.

$$\lambda = 19,47 \cdot a_w^{-23,89} \quad R^2 = 0,9925 \quad (4.12)$$

Através do valor de  $R^2$  e da Figura 4.44, pode-se observar que o modelo secundário empírico da potência se ajustou muito bem aos dados experimentais de crescimento.

#### 4.4. *Neosartorya fischeri* EM SUCO DE ABACAXI

A Figura 4.45 apresenta a média dos valores de  $\lambda$  de *N. nivea* em suco de abacaxi em função da  $a_w$ , para as diferentes idades estudadas.

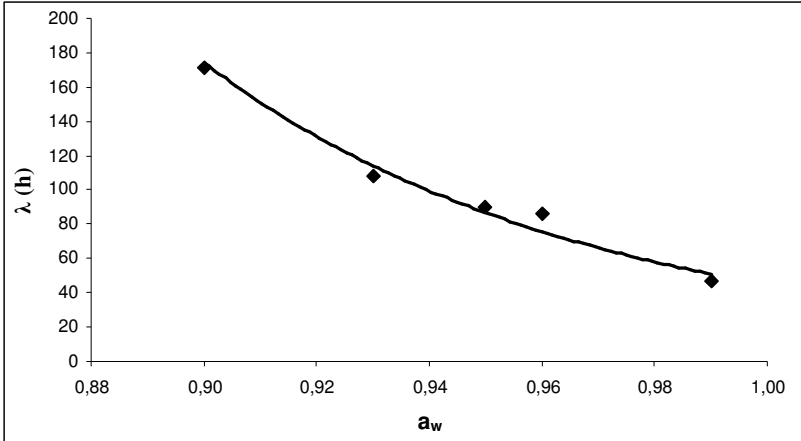


Figura 4.45. Influência da  $a_w$  sobre a média dos valores de  $\lambda$  de *N. fischeri* em suco de abacaxi, nas diferentes idades estudadas. A linha contínua mostra o ajuste de um modelo secundário empírico (potência) aos dados obtidos.

Como já discutido anteriormente, observa-se que a  $a_w$  influencia o parâmetro  $\lambda$ . Foi utilizada uma equação empírica, como modelo secundário, conforme descrito por CORRADINI e PELEG (2005), sendo apresentada na Equação 4.13.

$$\lambda = 44,77 \cdot a_w^{-12,89} \quad R^2 = 0,9676 \quad (4.13)$$

Através do valor de  $R^2$  e da Figura 4.45, pode-se observar que o modelo secundário empírico da potência se ajustou bem aos dados experimentais de crescimento.

O modelo empírico que melhor se ajustou aos dados experimentais foi o da potência, cuja equação descreve a relação entre  $\lambda$  e  $a_w$  que pode ser aplicada dentro da faixa de  $a_w$  estudada.



**CAPÍTULO V**  
**CONCLUSÕES**

## 1. CONCLUSÕES

A leitura do diâmetro das colônias foi realizada por profundidade em suco de mamão, para os fungos *B. nivea* e *N. fischeri*. Isto facilitou a leitura, pois as colônias apresentaram-se bem definidas. Já em suco de abacaxi, para ambos os fungos este fato não ocorreu, pois as colônias se apresentaram visíveis de forma dispersa apenas na superfície do suco, diminuindo a precisão da leitura.

Ambos os modelos primários utilizados, Gompertz Modificado e Logístico, descreveram bem o crescimento de *Bysochlamys nivea* e *Neosartorya fischeri* em sucos de mamão e abacaxi. Entretanto, o modelo de Gompertz Modificado se ajustou ligeiramente melhor do que o modelo Logístico na fase de adaptação para os ensaios realizados, o que pôde ser comprovado através dos índices estatísticos  $R^2$ , MSE, Fator Bias e Fator de Exatidão e da análise visual das curvas.

A partir do delineamento composto central rotacional (DCCR), foi possível verificar a influência da  $a_w$  e da idade de formação dos esporos no crescimento de *B. nivea* e de *N. fischeri* em sucos de mamão e de abacaxi.

Assumindo nível de confiança de 90%, o fator  $a_w$  foi estatisticamente significativo para os parâmetros de crescimento  $\lambda$  e  $\mu_{max}$  para *B. nivea* em ambos os sucos, e para *N. fischeri* em suco de mamão. O mesmo não foi observado para o crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi. Já o fator idade, não apresentou influência estatisticamente significativa em praticamente todos os ensaios analisados. O único caso onde a influência do fator idade ocorreu foi sobre o parâmetro de crescimento A para *B. nivea* em suco de mamão.

O parâmetro de crescimento A foi influenciado pelo fator  $a_w$  no crescimento *N. fischeri* e *B. nivea* em suco de abacaxi. Já no crescimento de *B. nivea* em suco de mamão, o parâmetro A foi influenciado pela  $a_w$  e I, e para *N. fischeri* em suco de mamão, o parâmetro A não apresentou influência de nenhum dos fatores. Sendo assim, neste estudo, a influência dos fatores  $a_w$  e I sobre o parâmetro de crescimento A não foi conclusiva.

Ao avaliar o crescimento de *B. nivea*, pode-se observar que no suco de mamão o fungo apresentou o menor tempo de adaptação ( $\lambda$ ) e o maior diâmetro máximo atingido pela colônia (A), quando comparado ao suco de abacaxi.

Analisando o crescimento de *N. fischeri*, pode-se observar que no suco de mamão o tempo de adaptação ( $\lambda$ ) do microrganismo foi menor do que em suco de abacaxi.

A influência da  $a_w$  sobre o parâmetro de crescimento  $\lambda$  foi claramente demonstrada através de modelos matemáticos que podem ser empregados para ambos os fungos e sucos analisados, independente da idade do esporo, dentro da faixa de  $a_w$  estudada.

Os resultados desta pesquisa mostram que o valor de  $\lambda$  variou de 18 a 322 horas (0,75 a 13,4 dias), sendo estes valores muito inferiores à vida de prateleira pretendida pela indústria (240 dias). A presença de fungos filamentosos termorresistentes que sobreviverem ao processamento térmico, aliado à temperatura ambiente normalmente utilizada durante o armazenamento pode causar uma drástica redução da vida de prateleira do produto. O uso de refrigeração ou de outra forma de controle é indispensável para manter os sucos de frutas estáveis microbiologicamente durante o armazenamento.

## SUGESTÕES

Avaliar o crescimento de fungos filamentosos termorresistentes pelo método de dosagem do ergosterol, uma vez que este método também tem sido descrito na literatura para avaliação do crescimento de fungos;

É fundamental que as indústrias de processamento de sucos tenham implantado sistemas de qualidade que assegurem matérias-primas de boa qualidade, com a realização de lavagem, seleção e sanitização adequadas para minimizar a presença de fungos filamentosos termorresistentes nas linhas de processamento.

Estudar o crescimento de fungos filamentosos termorresistentes sob influência da  $a_w$  relacionada com a temperatura de armazenamento dos sucos, com o objetivo de verificar a temperatura ideal de armazenagem dos sucos, evitando o crescimento destes fungos.

## REFERÊNCIAS

ABIR – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE REFRIGERANTES E BEBIDAS NÃO-ALCÓOLICAS. Fruticultura – uma nova fronteira para exportação, 2008. [http://www.abir.org.br/rubrique.php3?id\\_rubrique=141](http://www.abir.org.br/rubrique.php3?id_rubrique=141).

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.

ALAVI, S.H.; PURI, V.M.; KNABEL, S.J.; MOHTAR, R.H.; WHITING, R.C. Development and validation of a dynamic growth model for *Listeria monocytogenes* in fluid milk. **Journal of Food Protection**, v.62, p.170-176, 1999.

ALMONACID-MERINO, S.F.; TORRES, J.A. Mathematical models to evaluate temperature abuse effects during distribution of refrigerated solid food. **Journal of Food Engineering**, v.20, p.223-225, 1993.

ARAGÃO, G.M.F. Identificação e determinação da resistência térmica de fungos filamentosos termorresistentes isolados da polpa de morango. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 139 pp., 1989.

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

BAGLIONI, F. Estudo da ocorrência de fungos filamentosos termorresistentes em polpa de tomate envasada assepticamente. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 94pp., 1998.

BARANYI, J; ROBERTS, T.A. Mathematics of predictive food microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v.26, p.199-218, 1995.

- BARANYI, J; 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.
- 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.
- BATY, F.; DELIGNETTE-MULLER, M.L. Estimating the bacterial lag time: which model, which precision. **International Journal of Food Microbiology**, v.91, p.261-277, 2004.
- BEGOT, C.; DESNIER, I.; DAUDIN, J.D.; LABADIE, J.C.; LEBERT, A. Recommendations of calculating growth parameters by optical density measurements. **Journal of Microbiological Methods**, v.25, p.225-232, 1996.
- BEUCHAT, L.R.; RICE, S.L. Behavior of *Byssoschlamys nivea* ascospores in fruit syrups. **Transactions of British Mycological Society**, v.68, n.1, p.65-71, 1979.
- BEUCHAT, L.R.; RICE, S.L. *Byssoschlamys spp.* and their importance in processed fruits. **Advances in Food Research**, v.25, p.237-289, 1979.
- BEUCHAT, L.R. Extraordinary heat resistance of *Talaromyces flavus* and *Neosartorya fischeri* ascospores in fruit products. **Journal of Food Science**, v.51, n.6, p.1506-1510, 1986.
- BUCHANAN, R.L.; KLAWITTER, L.A. Effect of temperature history on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A at refrigeration temperatures. **International Journal of Food Microbiology**, v.12, p.235-246, 1991.
- BUCHANAN, R.L. Developing and distributing user-friendly application software. **Journal of Industrial Microbiology**, v.12, p.251-255, 1993.
- CHAPMAN, B.; WINLEY, E.; FONG, A.S.W.; HOCKING, A.D.; STEWART, C.M.; BUCKLE, K.A. Ascospore inactivation and germination by high pressure processing is affected by ascospore age.

**Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.8, p.531-534, 2007.

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

CONNER, D.E.; BEUCHAT, L.R. Heat resistance of ascospores of *Neosartorya fischeri* as affected by sporulation and heating medium. **International Journal of Food Microbiology**, v.4, p.303-312, 1987.

CORBO, M.R.; ALTIERI, C.; AMATO, D.D.; CAMPANIELLO, D.; NOBILE, M.A.D.; SINIGAGLIA, M. Effect of temperature on shelf life and microbial population of lightly processed cactus pear fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.31, p.93-104, 2004.

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

COUVERT, O.; THUAULT, D.; LeMAGUER, M. Computer simulation of water activity in food products. **5<sup>th</sup> International Conference Predictive Modelling in Foods**, Athenas, 2007.

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.

DAVEY, K.R.; 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: temperature, salt concentration and pH. **Food Research International**, v.28, n.3, p.233-237, 1995.

DAVEY, K.R. Review Paper. Modeling 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.

DÍAZ, T.M.L.; GONZÁLEZ, C.J.; MORENO, B.; OTERO, A. Effect of temperature, water activity, pH and some antimicrobials on the growth

of *Penicillium olsonii* isolated from the surface of Spanish fermented met sausage. **Food Microbiology**, v.19, p.1-7, 2002.

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

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.

ERKMEN, O. Mathematical modeling of *Escherichia coli* inactivation under high-pressure carbon dioxide. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.92, n.1, p.39-43, 2001.

ERKMEN, O. Predictive Modelling of *Listeria monocytogenes* Inactivation Under High Pressure Carbon Dioxide. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.33, n.7, p.514-519, 2000.

EVERSHED, R.P.; SPOONER, N.; PRESCOTT, M.C.; GOAD, L.J. Isolation and characterisation of intact steryl ferulates from seeds. **Journal of Chromatography**, v.440, p.23-35, 1988.

FUJIKAWA, H.; KAI, A.; MOROZUMI, S. A new logistic model for *Escherichia coli* growth at constant and dynamic temperatures. **Food Microbiology**, v.21, p.501-509, 2004.

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

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



GIBSON, A.M.; BRATCHELL, N.; ROBERTS, T.A. The effect of sodium chloride and temperature on 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.

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

GRESSONI, I. APPCC – Base para sucos processados assepticamente. Dissertação de Mestrado em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2002.

HOCKING, A.D.; PITT, J.I. Food spoilage fungi. II. Heat Resistant Fungi. CSIRO Division of Food Research, North Ryde, N.S.W., 2113, v.44, n.4, p.73-82, 1984.

HOIRE, Y.; YAMAZAKI, M. Productive of tremorgenic mycotoxins, fumitremorgins A e B in *Aspergillus fumigatus* and vallyed species. **Nippon Kingakkai Kaiko**. V.22, p.113-119, 1981. Apud NIELSEN, P.V.; BEUCHAT, L.R.; FRISVAD, J.C. Growth and fumitremorgin production by *Neosartorya fischeri* as affected by temperature, light and water activity. **Applied and Environmental Microbiology**. V.54, n.6, p.1504-1510, 1988.

HULL, R. Studies of *Byssochlamys fulva* and control measures in processed fruits. **Applied Biology**, v.26, p.800-822, 1939.

JACXSENS, L.; DEVLIEGHERE, F.; RAGAERT, P.; VANNESTE, E.; DEBEVERE, J. Relation between microbiological quality, metabolite production and sensory quality of equilibrium modified atmosphere packaged fresh cut produce. **International Journal of Food Microbiology**, v.83, p.263-280, 2003.

JASENKA, Z.; PIECKOVÁ, E.; SEPTIKOVA, J. Thermoresistant propagules of *Neosartorya fischeri*: Some ecologic consideration. **Journal of Food Protection**, v.54, n.8, p.582-584, 1991.

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

- KAKIOMENOUR, N.; KAKOURI, A.; TASSOU, C.C.; NYCHAS, G.J.E. Storage of shredded carrots with modified atmospheres: possible role of microbial metabolites as indicator of spoilage. **Int. Biodeterior. Biodegrad.**, v.36, p.466, 1995.
- KAVANAGH, J.; LARCHET, N.; STUART, M. Occurrence of heat resistance specie of *Aspergillus* in canned strawberries. **Nature**, v.198, p.1322, 1963.
- KING Jr. A.D.; WHITEHAND, L.C. Alterations of *Talaromyces flavus* heat resistance by growth conditions and heat medium composition. **Journal of Food Science**, v.55, n.3, p.830-836, 1990.
- KOTZEKIDOU, P. Heat resistance of *Byssochlamys nivea*, *Byssochlamys fulva* and *Neosartorya fischeri* isolated from canned tomato paste. **Journal of Food Science**, v.62, n.2, p.410-412, 1997.
- 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 efficient method for growth measurement of filamentous fungi. **Journal of Microbiological Methods**, v.37, p.97-100, 1999.
- LEGGOTT, N.L.; SHEPHARD, G.S. Patulin in South African commercial apple products. **Food Control**, v.12, p.73-76, 2001.
- MARÍN, S.; RAMOS, A.J.; SANCHIS, V. Comparison of methods for the assessment of growth of food spoilage moulds in solid substrates. **International Journal of Food Microbiology**, v.99, p.329-341, 2006. Apud MARÍN, S.; CUEVAS, D.; RAMOS, A.J.; SANCHIS, V. Fitting of colony diameter and ergosterol as indicators of food borne mould growth to known growth models in solid medium. **International Journal of Food Microbiology**, v.121, p.139-149, 2008.
- MASSON, Y.; AINSWORTH, P.; FULLER, D.; BOZKURT, H.; IBANOGLU, S. Growth of *Pseudomonas fluorescens* and *candida* sake in homogenized mushrooms under modified atmosphere. **Journal of Food Engineering**, v.54, p.125-131, 2002.

MATCHAM, S.E.; JORDAN, B.R.; WOOD, D.A. Estimation of fungal biomass in a solid substrate by tree independent methods. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.21, p.108-112, 1985. Apud BRUM, A. A. Perfil enzimático e degradação lignocelulósica durante o crescimento vegetativo de *Agaricus brasiliensis* em diferentes substratos. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 110pp., 2005.

McCLURE, P.J.; BLACKBURN, C.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. Modeling 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 *Aspegillus fischeri* var *glaber* in canned strawberries. **Irish Agric. Res.**, v.9, p.59, 1970. Apud. TOURNAS, V. Heat resistant fungi of importance to the food and beverage industry. **Critical Review Microbiology**, v.20, n.4, p.243-263, 1994.

McMEEKIN, T.A.; BROWN, J.; KRIST, K.; MILES, D.; NEUMEYER, K.; NICHOLS, D.S.; OLLEY, J.; PRESSER, K.; RATKOWSKY, D.A.; ROSS, T.; SALTER, M.; SOONTRANON, S. Quantitative microbiology: a basis for food safety. **Emerging Infectious Diseases**, v.3, n.4, p.541-549, 1997.

McMEEKIN, T.A.; ROSS, T.; OLLEY, J. Application of predictive microbiology to assure the quality and safety of fish and fish products. **International Journal of Food Microbiology**, v.15, p.13-32, 1992.

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.

MEMBRÉ, J.M.; LEPORQ, B.; VIALETTE, M.; METTLER, E.; PERRIER, L.; THUAULT, D.; ZWIETERING, M. Temperature effect on bacterial growth rate: quantitative microbiology approach including cardinal values and variability estimates to perform growth simulations on/in food. **International Journal of Food Microbiology**, v.100, p.179-186, 2005.

- 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.
- NIELSEN, P.V. Preservative and temperature effect on growth of tree varieties of the heat resistant mold, *Neosartorya fischeri*, as measured by an impedimetric method. **Journal of Food Science**, v.56, n.6, p.1735, 1991.
- NIELSEN, P.V.; BEUCHAT, L.R.; FRISVAD, J.C. Growth and fumitremorgin production by *Neosartorya fischeri* as affected by temperature, light and water activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, n.6, p.1504-1510, 1988.
- OBETA, J.A.N.; UGWUANYI, J.O. Shelf life study of some Nigerian fruit juices inoculated of *Neosartorya* sp. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.50, p.325-331, 1997.
- OLIVER, 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.166, 1934. Apud BEUCHAT, L.R.; RICE, S.L. Behavior of *Byssochlamys nivea* ascospores in fruit syrups. **Transactions of British Mycological Society**, v.68, n.1, p.65-71, 1979.
- PALOU, E.; LOPEZ-MALO, A.; BARBOSA-CANOVAS, G.V.; WELTI-CHANES, J.; DAVIDSON, P.M.; 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.
- PATTERSON, D.S.P., SHREEVE, B.J., ROBERTS, B.B.; McDONALD, S.M. Verruculogen produced by soil fungi in England and Wales. **Applied and Environmental Microbiology**. V.42, p.916-917, 1981.
- PEÑA, W.; FARIA, J.A.; MASSAGUER, P.R. Development of Predictive Model on the Growth of the Spoilage Mould, *Paecilomyces variotti* in Pineapple Juice. **Fruit Processing**, v.14, n.6, p.420-426, 2004.

PERERA, K.P.W.C; DAY, J.B.; MANTLE, P.G.; RODRIGUES, L. Metabolism of verruculogena in rats. **Applied an Environmental Microbiology**, v.43, p.503-508, 1982.

PITT, J.I.; HOCKING A.D. Fungi and Food Spoilage. An Aspen Publication. Second edition. Gaithersburg, Maryland, 593 pp., 1999.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. Fungi and Food Spoilage. Sidney: Academic Press, 413pp., 1985.

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.

RAMIRO, D. Eles ensinaram o Brasil a beber suco. Revista Veja, Edição 1785, 15 janeiro de 2003.

REGNÉR, S.; SCHNÜRER, J.& JONSSON, A. Ergosterol content in relation to grain kernel weight. **Cereal Chemistry**, v.71, n.1, p.55-58, 1994.

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.

ROLAND, J.O.; BEUCHAT, L.R. Influence of temperature and water activity on growth and patulin production by *Byssochlamys nivea* in apple juice. **Applied Environmental Microbiology**, v. 47, p.205-207, 1984.

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

ROSS, T. Predictive Microbiology for the Meat Industry. Meat and Livestock Australia, North, Sydney, 196 pp., 1999.

SALOMÃO, B.C.M. Isolamento, identificação e estudo da resistência térmica de fungos filamentosos termorresistentes em produtos de frutas.

Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2002.

SAMAPUNDO, S.; DEVLIEGHIERE, F.; De MEULENAER, B.; GEERAERD, A.H.; VAN IMPE, J.F.; DEBEVERE, J.M. Predictive modelling of the individual and combined effect of water activity and temperature on the radial growth of *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* on corn. **International Journal of Food Microbiology**, v.105, p.35-52, 2005.

SAMSON, R.A.; VAN REENEN-HOEKSTRA, E.S. Introduction to food-born fungi. Netherlands: Central Bureal voor Schimmelcultures, 1988.

SAVITCI, L.A.; GASPARINO FILHO, J.; MORETTI, V.A. Perfil industrial e de mercado para suco de abacaxi. Coletânea do ITAL, Campinas, v.25, n.2, p.153-168, 1995.

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.

SHIMONI, E.; LABUZA, T. P. Modeling pathogen growth in meat products: future challenges. **Trends in Food Science; Technology**, v.11, p.394-402, 2000.

SILVA, A. R. Modelagem do crescimento de *Aspergillus niger* em néctar de manga, frente a pH e Temperatura. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 232pp., 2006.

SKINNER, G.E.; LARKIN, J.W.; RHODEHAMEL, E.J. Mathematical modeling of microbial growth: A review. **Journal of Food Safety**, v.16, p.175-217, 1994.

SLONGO, A.P.; ARAGÃO, G.M.F. Factors affecting the thermal activation of *Neosartorya fischeri* in pineapple and papaya nectars. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.266-270, 2006.

SLONGO, A.P. Estudo da influência de diferentes fatores na termorresistência do fungo *N. fischeri* em sucos tropicais. Dissertação de

Mestrado em Engenharia de Alimentos – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 125pp., 2004.

SOBOLEVA, T.K.; PLEASANTS, A.B.; LE ROUX, G. Predictive microbiology and food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v.57, p.183-192, 2000.

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

SPLITTSTOESSER, D.F. Fungi of importance in processed fruits. In ARORA, D.K.; MUKERJI, K.G.; MARTH, E.H. (Eds) **Handbook of Applied Mycology-Foods and Feeds**. New York: Marcel Dekker Inc., v.3, n.7, p.201-219, 1991.

SPLITTSTOESSER, D.F.; CADWELL, M. C.; MARTIN, M. Ascospore production by *Byssoschlamys fulva*. **Journal of Food Science**, v.34, p.248-250, 1969.

SPLITTSTOESSER, D.F.; KUSS, F.R.; HARRISON, W. Enumeration of *Byssoschlamys* and other heat-resistant molds. **Applied Microbiology**, v.20, p.393-397, 1970.

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

STAHL, P.D.; PARKIN, T.B. Relationship of soil ergosterol concentration and fungal biomass. **Soil Biology; Biochemistry**, v.28, p.847-855, 1996.

STRINGER, M.; DENNIS, C. Chilled foods. In: Editor Chilled foods. Cambridge, England: Woodhead Publishing Ltda, 2000.

SURESH, E.R.; ETHIRAJ, S.; JAYARAM. Heat resistance of *Neosartorya fischeri* isolated from grapes. **Journal of Food Science Technology**, v.33, n.1, p.76-77, 1996. Apud SWINNEN, I.A.M.; BERNAERTS, K.; DENS, E.J.J.; GEERAERD, A.H.; VAN IMPE, J.F. Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p.137-159, 2004.

- SWINNEN, I.A.M.; BERNAERTS, K.; DENS, E.J.J.; GEERAERD, A.H.; VAN IMPE, J.F. Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p.137-159, 2004.
- TANIWAKI, M.H.; HOCKING, A.D.; PITT, J.I.; FLEET, G.H. Growth of fungi and mycotoxin production on cheese under modified atmospheres. **International Journal of Food Microbiology**, v.68, p.125-133, 2001.
- TOURNAS, V.; TRAXLER, R.W. Heat resistance of a *Neosartorya fischeri* strain isolated from pineapple juice frozen concentrate. **Journal of Food Protection**, v.57, n.9, p.814-816, 1994.
- TOURNAS, V. Growth characteristics, heat resistance and ascospore ultrastructure of *Neosartorya fischeri*, Ph D dissertation, University of Rhode Island, Kingston, 1989.
- TOURNAS, V. Heat resistant fungi of importance to the food and beverage industry. **Critical Review Microbiology**, v.20, n.4, p.243-263, 1994.
- UGWUANYI, J.O.; OBETA, J.A.N. Incidence of heat fungi in Nsukka, Southern Nigeria. **International Journal of Food Microbiology**, v.13, p.157-164, 1991.
- UGWUANYI, J.O.; OBETA, J.A.N. Pectinolytic and cellulolytic activities of heat resistant fungi and their macerating effects on mango and African mango. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.79, p.1054-1059, 1999.
- VADASZ, A.S.; VADASZ, P.; ABASHAR, M.E.; GUPTHAR, A.S. Recovery of an oscillatory mode of batch yeast growth in water for a pure culture. **International Journal of Food Microbiology**, v.71, p.219-234, 2001.
- VALÍCK, L.; PIECKOVÁ, E. Growth modeling of heat resistant fungi: the effect of water activity. **International Journal of Food Microbiology**, v.63, p.11-17, 2001.



- VALÍK, L.; BARANYI, J.; GÖRNER, F. Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Penicillium roquefort*. **International Journal of Food Microbiology**, v.47, p.141-146, 1999.
- VAN DER RIET, W.B.; VAN DER WALT, W.H. Effect of ionizing radiation ascospores of three strains of *Byssoschlamys fulva* in apple juice. **Journal of Food Protection**, v.48, n.12, p.1016-1018, 1985.
- VAN IMPE, J.F.; NICOLAI, B.M.; SCHELLEKENS, M.; MARTENS, T.; DE BAERDEMAEKER, J. Predictive microbiology in a dynamic environment: a system theory approach. **International Journal of Food Microbiology**, v.25, p.227-249, 1995.
- VAN IMPE, J.F.; POSCHET, F.; A.H. GEERAERD, K.M.; VERECKEN, K.M. Towards a novel class of predictive microbial growth models. **International Journal of Food Microbiology**, v.100, p.97-105, 2005.
- VERSYCK, K. J.; BERNAERTS, K.; GEERAERD, A. H. Introducing optimal experimental design in predictive modeling: A motivating example. **International Journal of Food Microbiology**, v.51, p.39-51, 1999.
- WANG, Z.; CHEN, T.; GAO, Y.; BREUIL, C.; HIRATSUKA, Y. Biological degradation of resin acids in wood chips by wood-inhabiting fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.222-225, 1995.
- WHITING, R.C.; BUCHANAN, R.L. A classification of models for predictive microbiology. **Food Microbiology**, v.10, p.175, 1993.
- WHITING, R.C. Microbial modeling in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.35, p.467-494, 1995.
- WIJTZES, T.; VAN'T RIET, K.; VELD, J. H. A decision support system for the prediction of microbial food safety and food quality. **International Journal of Food Microbiology**, v.42, p.79-90, 1998.
- YAMAZAKI, M., SUZUKI, S.; MIYAKI, K. Neurotoxic studies on fumitremorgins A, a tremorgenic mycotoxin, on mice. **Journal**

**Pharmacobiodyn**, v.2, p.119-125, 1979. Apud NIELSEN, P.V.; BEUCHAT, L.R.; FRISVAD, .C. Growth and fumitremorgin production by *Neosartorya fischeri* as affected by temperature, light and water activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, n.6, p.1504-1510, 1988.

YAMAZAKI, M., SUZUKI, S.; MIYAKI, K. Tremorgenic toxins from *Aspergillus fumigatus*. **Chemical; Pharmaceutical Bulletin**, v.19, p.1739-1740, 1971. Apud NIELSEN, P.V.; BEUCHAT, L.R.; FRISVAD, .C. Growth and fumitremorgin production by *Neosartorya fischeri* as affected by temperature, light and water activity. **Applied and Environmental Microbiology**. V.54, n.6, p.1504-1510, 1988.

YATES, A.R.; SEAMAN, A.; WOODBINE, M. Growth of *Byssochlamys nivea* in various carbon dioxide atmospheres. **Canadian Journal of Microbiology**, v.13, p.1120-1123, 1967.

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

ZWIETERING, M.H.; KOOS, J.T.; HASENACK, B.E.; WIT, J.C.; 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.

## APÊNDICE I

**CURVAS DE CRESCIMENTO DAS COLÔNIAS DE *B. nivea* E *N. fischeri* EM SUCOS DE MAMÃO E BACAXI, NAS  $a_w$  DE 0,93 E 0,96 NAS IDADES DE 51 E 69 DIAS.**

I.A. AJUSTE DOS MODELOS DE GOMPERTZ MODIFICADO E LOGÍSTICO AOS DADOS EXPERIMENTAIS DE CRESCIMENTO, OBTIDOS ATRAVÉS DA MEDIDA DE DIÂMETRO DA COLÔNIA, DE *B. nivea* EM SUCO DE MAMÃO.

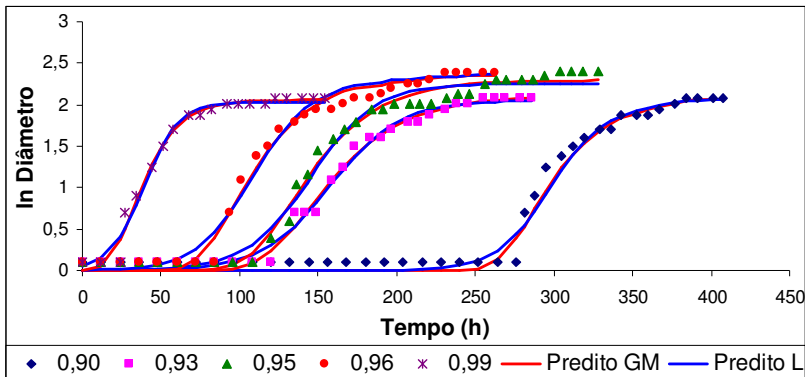


Figura A.1. Curvas de crescimento de *B. nivea* em suco de mamão para todas as  $a_w$  estudadas na idade de 51 dias. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais.

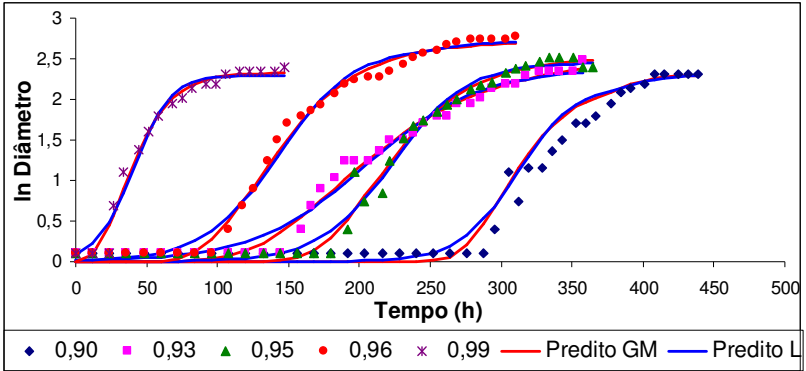


Figura A.2. Curvas de crescimento de *B. nivea* em suco de mamão para todas as  $a_w$  estudadas na idade de 69 dias. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais.

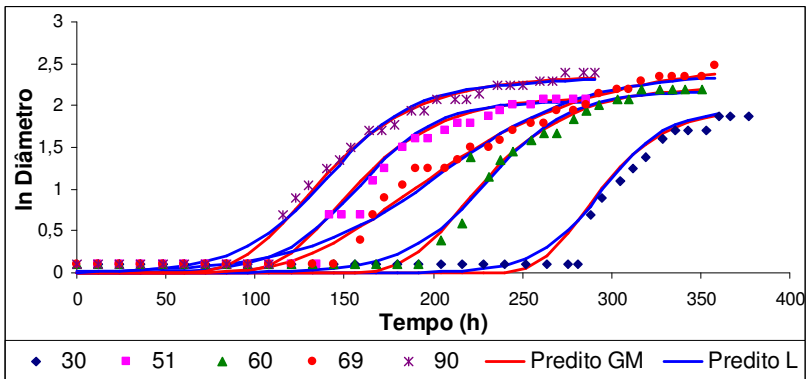


Figura A.3. Curvas de crescimento de *B. nivea* em suco de mamão para todas as idades estudadas na  $a_w$  de 0,93. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais.

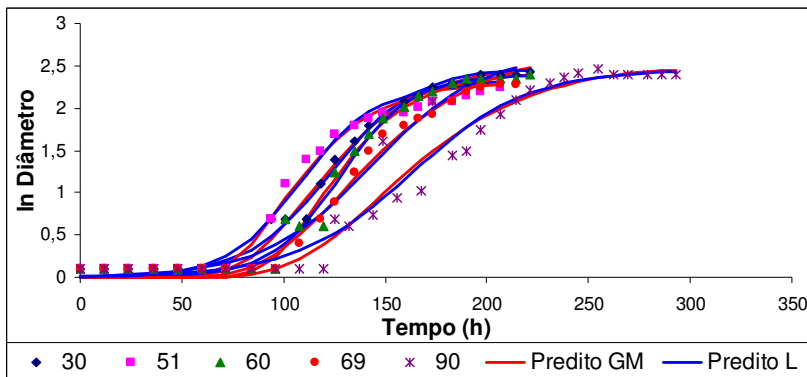


Figura A.4. Curvas de crescimento de *B. nivea* em suco de mamão para todas as idades estudadas na  $a_w$  de 0,96. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais.

I.B. AJUSTE DOS MODELOS DE GOMPERTZ MODIFICADO E LOGÍSTICO AOS DADOS EXPERIMENTAIS, OBTIDOS ATRAVÉS DA MEDIDA DE DIÂMETRO DA COLÔNIA, DE CRESCIMENTO DE *B. nivea* EM SUCO DE ABACAXI.

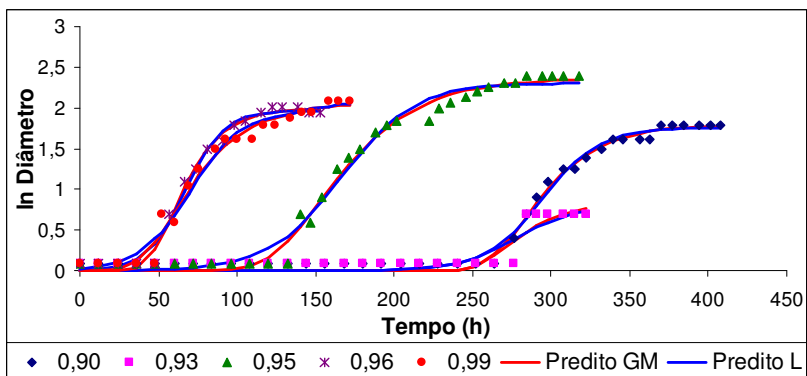


Figura B.1. Curvas de crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi para todas as  $a_w$  estudadas na idade de 51 dias. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais.

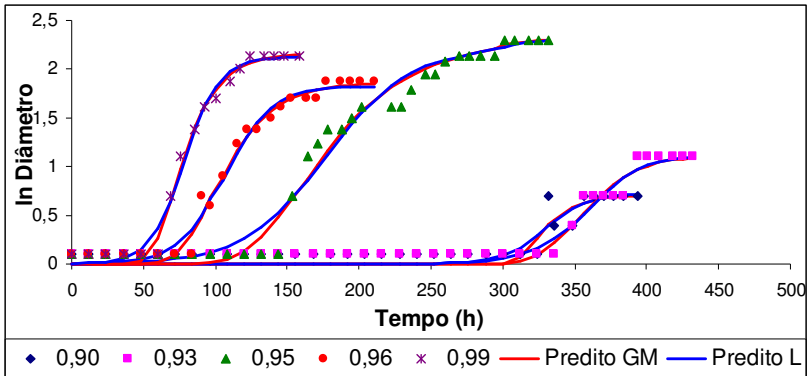


Figura B.2. Curvas de crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi para todas as  $a_w$  estudadas na idade de 69 dias. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais.

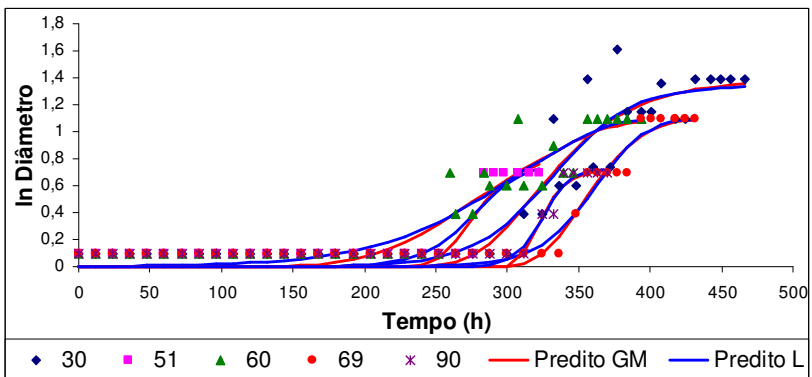


Figura B.3. Curvas de crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi para todas as idades estudadas na  $a_w$  de 0,93. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais.

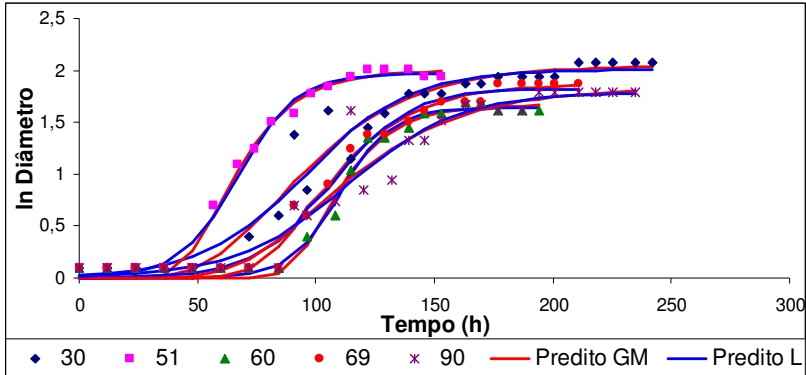


Figura B.4. Curvas de crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi para todas as idades estudadas na  $a_w$  de 0,96. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais.

### I.C. AJUSTE DOS MODELOS DE GOMPERTZ MODIFICADO E LOGÍSTICO AOS DADOS EXPERIMENTAIS, OBTIDOS ATRAVÉS DA MEDIDA DE DIÂMETRO DA COLÔNIA, DE CRESCIMENTO DE *N. fischeri* EM SUCO DE MAMÃO.

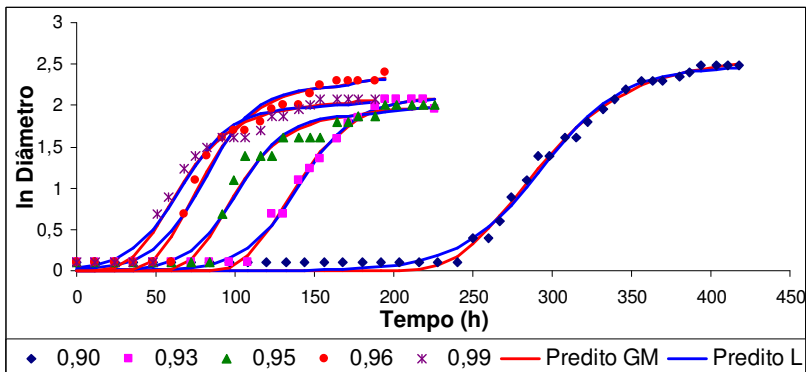


Figura C.1. Curvas de crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão para todas as  $a_w$  estudadas na idade de 51 dias. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais.

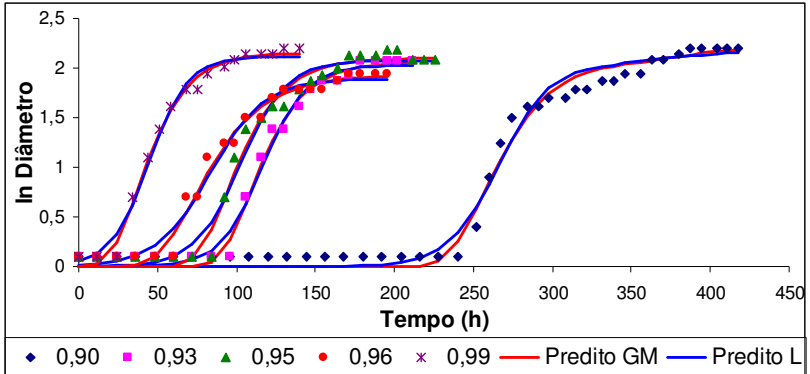


Figura C.2. Curvas de crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão para todas as  $a_w$  estudadas na idade de 69 dias. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais.

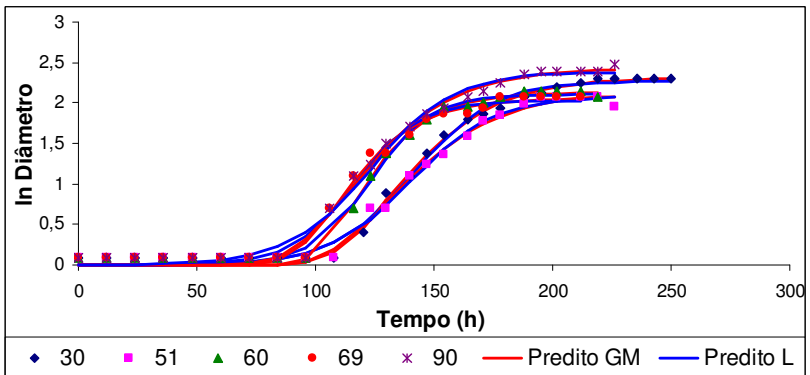


Figura C.3. Curvas de crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão para todas as idades estudadas na  $a_w$  de 0,93. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais.



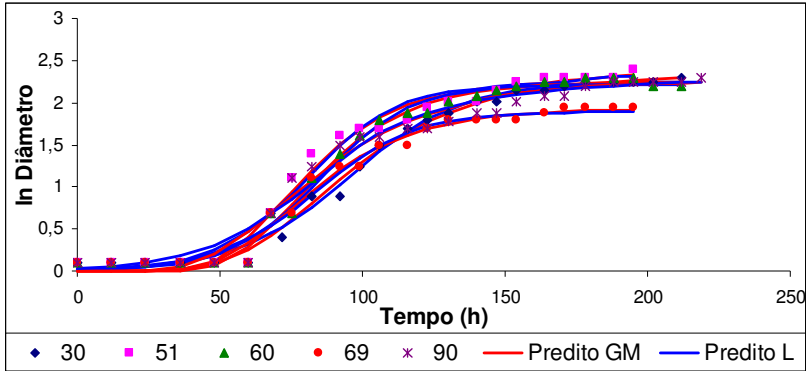


Figura C.4. Curvas de crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão para todas as idades estudadas na  $a_w$  de 0,96. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais.

I.D. AJUSTE DOS MODELOS DE GOMPERTZ MODIFICADO E LOGÍSTICO AOS DADOS EXPERIMENTAIS, OBTIDOS ATRAVÉS DA MEDIDA DE DIÂMETRO DA COLÔNIA, DE CRESCIMENTO DE *N. fischeri* EM SUCO DE ABACAXI.

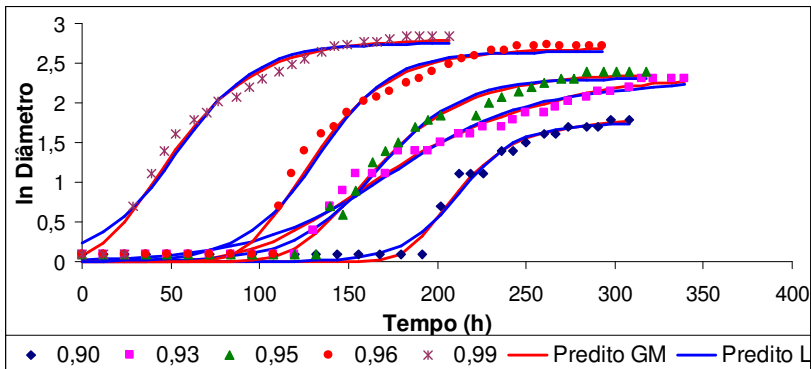


Figura D.1. Curvas de crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi para todas as  $a_w$  estudadas na idade de 51 dias. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais.

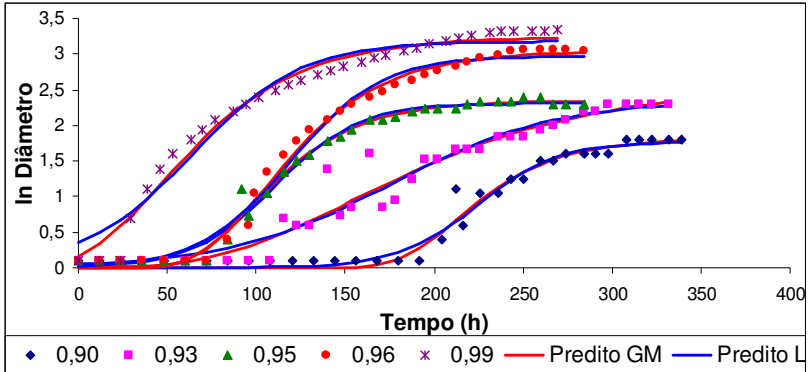


Figura D.2. Curvas de crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi para todas as  $a_w$  estudadas na idade de 69 dias. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais.

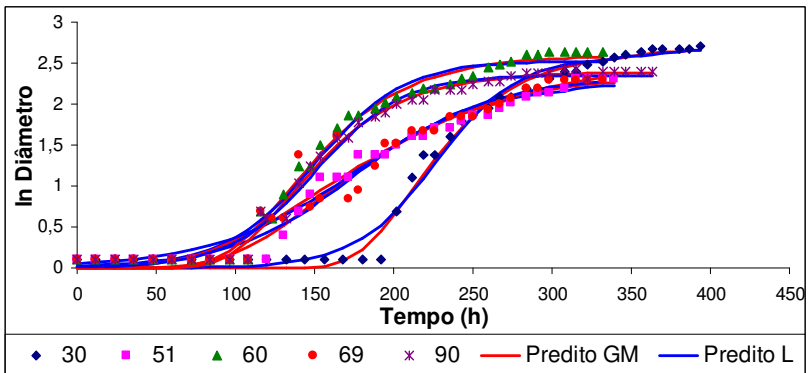


Figura D.3. Curvas de crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi para todas as idades estudadas na  $a_w$  de 0,93. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais.

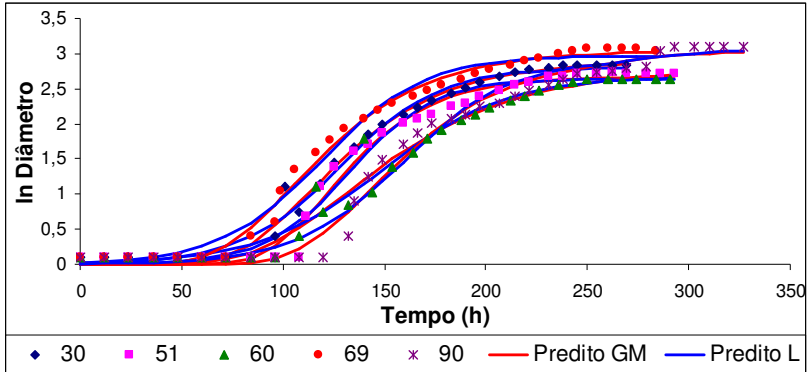


Figura D.4. Curvas de crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi para todas as idades estudadas na  $a_w$  de 0,96. A linha contínua representa o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (GM) e Logístico (L) aos dados experimentais.