



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS



**MODELAGEM DO CRESCIMENTO DE *Aspergillus niger* EM
NÉCTAR DE MANGA, FRENTE A pH e TEMPERATURA**

ALESSANDRA REGINA DA SILVA

Engenheira Agrônoma

Orientadora: Prof^a Pilar Rodriguez de Massaguer, PhD

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos
da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do grau de
Mestre em Ciência de Alimentos

Campinas – SP

2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Si38m Silva, Alessandra Regina da
Modelagem do crescimento de *Aspergillus niger* em néctar de
manga, frente a pH e temperatura / Alessandra Regina da Silva. –
Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Pilar Rodriguez de Massaguer
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. *Aspergillus niger*. 2. Microbiologia preditiva. 3. Vida de
prateleira. 4. Superfície de resposta. I. Massaguer, Pilar Rodriguez
de. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia
de Alimentos. III. Título.

Titulo em inglês: Growth modeling of *Aspergillus niger* in mango nectar, as a function
of pH and temperature

Palavras-chave em inglês (Keywords): *Aspergillus niger*, Predictive microbiology,
Shelf life, Response surface

Titulação: Mestre em Ciências de Alimentos

Banca examinadora: Pilar Rodriguez de Massaguer

José Luiz Pereira

Flávio Luís Schmidt

Wilmer Edgard Luera Peña

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciências de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Pilar Rodríguez de Massaguer, PhD
orientadora

Prof. Dr. José Luiz Pereira
membro

Prof. Dr. Flávio Luís Schmidt
membro

Dr. Wilmer Edgard Luera Peña
membro

AGRADECIMENTOS

- ✂ À Deus, pela onipotência e onipresença em todos os momentos;
- ✂ A meus pais, por todo carinho, amor, compreensão e apoio ao longo desta jornada;
- ✂ Ao meu marido, pelo amor e compreensão e minha querida filha, por seus sorrisos, que me fazem seguir em frente;
- ✂ À Pilar Rodriguez de Massaguer, pela orientação e preciosos ensinamentos;
- ✂ À EMBRAPA, pelo apoio;
- ✂ À CAPES, pela bolsa concedida;
- ✂ Aos colegas e amigos do Laboratório de Termobacteriologia, em especial, Ana Cláudia, Cristiana, e Wilmer, pelos ensinamentos;
- ✂ À Verônica, pelo auxílio em parte desta pesquisa;
- ✂ À Rosa Maria, pelos conselhos e grande apoio;
- ✂ À Viviane Guerra, pelo suporte estatístico;
- ✂ Ao secretário de pós-graduação Cosme Perota, por sua eficiência e prontidão no atendimento;
- ✂ Aos membros da banca examinadora, pela atenção dispensada;

*“...Melhor é ouvir a repreensão do sábio, do que ouvir
alguém a canção do tolo...”*

*No dia da prosperidade goza bem, mas no dia da
adversidade considera; porque também Deus fez a
este em oposição àquele, para que o homem nada
ache que tenha de vir depois dele.’*

Eclisíastes, 8, v.5;14.

*À meus pais que me concederam a vida,
À meu querido marido que me concedeu amor e quem
mais amo na vida:
Minha Filha...*

A estes, dedico...

SUMÁRIO

ABSTRACT	XIV
RESUMO GERAL	XVII
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL	4
PRIMEIRA PARTE: DESCRIÇÃO DO PRODUTO E MICRORGANISMO	4
2.1. Manga (<i>Mangifera indica</i> , L.).....	4
2.1.1. Manga ubá	5
2.2. Néctar de manga.....	6
2.2.1. Mercado consumidor	7
2.3. Principais grupos de fungos deteriorantes em alimentos	8
2.3.1. Características Gerais de Fungos.....	8
2.3.2. Principais grupos deteriorantes	10
2.4. Deteriorantes do néctar de manga.....	14
2.5. <i>Aspergillus niger</i>	16
2.5.1. Características Gerais	16
2.5.2. Características Microscópicas.....	17
2.5.3. Fisiologia	17
2.5.4. Ocorrência	20
2.6. Fatores controladores do crescimento de bolores.....	21
2.6.1. Inibidores de contaminação em sucos.....	21
2.6.2. Temperatura.....	24
2.6.3. Atividade de água (<i>A_w</i>).....	26
2.6.4. pH.....	30
SEGUNDA PARTE: MICROBIOLOGIA PREDITIVA.....	32
2.7. Histórico	32
2.8. Definição.....	35
2.9. Forma geral de um modelo preditivo.....	36
2.10. Metodologia para desenvolvimento de modelos preditivos	37
➤ Planejamento	38
➤ Coleta e análise de dados	40
➤ Descrição matemática.....	41
➤ Validação dos modelos preditivos	41
2.11. Características desejáveis em um modelo preditivo	43
2.12. Modelagem Matemática.....	45
2.13. Níveis de modelos	48
2.13.1. Nível primário	48
2.13.2. Nível Secundário	51
➤ Modelagem secundária Polinomial (<i>Modelos de superfície de resposta</i>).....	52
2.13.3. Modelagem Terciária.....	53
❖ Combase	54
❖ Sea Food Spoilage Predictor (<i>SSP</i>).....	54
❖ Food MicroModel (<i>FMM</i>)	55
❖ Pathogen Microbial Model (<i>PMP</i>).....	55
❖ Growth predictor & <i>Perfringens</i> Predictor	56
2.14. Aplicações de Modelos Preditivos	56
2.15. Microbiologia Preditiva do crescimento e/ou inativação de fungos.....	59
3. NOMENCLATURA	64
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

4. OBJETIVOS GERAIS	81
4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	82
CAPÍTULO 02	83
SELEÇÃO DO BOLOR MAIS TERMORESISTENTE EM NÉCTAR DE MANGA E ESTUDO DE SEU CRESCIMENTO RADIAL, FRENTE À AW, PH E TEMPERATURA, EM EMBALAGENS PET.	84
RESUMO	85
INTRODUÇÃO	87
MÉTODOS	89
➤ ENUMERAÇÃO DE BOLORES TERMORESISTENTES	89
➤ SELEÇÃO DO ISOLADO MAIS TERMORESISTENTE	89
▪ <i>Preparo das suspensões de esporos</i>	89
▪ <i>Padronização das suspensões de esporos</i>	91
▪ <i>Determinação do isolado mais termoresistente</i>	91
▪ <i>Identificação do bolor mais termoresistente</i>	92
➤ TESTE DE CRESCIMENTO DO BOLOR TERMORESISTENTE EM NÉCTAR DE MANGA	92
➤ PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	94
▪ <i>Avaliação do impacto das variáveis sobre o crescimento do microrganismo</i>	94
▪ <i>Efeito do pH e temperatura no crescimento de A.niger em néctar de manga a aw constante (0,980)</i>	95
RESULTADOS	95
➤ CONTAGEM, SOBREVIVÊNCIA DE BOLORES TERMORESISTENTES E IDENTIFICAÇÃO DO BOLOR MAIS TERMORESISTENTE ENCONTRADO EM NÉCTAR DE MANGA	95
➤ MODELAGEM PRIMÁRIA DO CRESCIMENTO DE <i>ASPERGILLUS NIGER</i> EM NÉCTAR DE MANGA	96
➤ IMPACTO DAS VARIÁVEIS SOBRE O CRESCIMENTO RADIAL, EM DIFERENTES NÍVEIS DE INÓCULO	97
➤ EFEITO DO PH E TEMPERATURA SOBRE O CRESCIMENTO DE <i>ASPERGILLUS NIGER</i> EM NÉCTAR DE MANGA A AW CONSTANTE (0,980)	98
DISCUSSÃO	99
REFERÊNCIAS	105
AGRADECIMENTOS	110
CAPÍTULO 03	141
MODELAGEM POLINOMIAL DO TEMPO DE ADAPTAÇÃO E TAXA DE CRESCIMENTO DE ASPERGILLUS NIGER EM NÉCTAR DE MANGA VARIEDADE UBÁ COMO FUNÇÃO DA TEMPERATURA E PH.	142
MODELAGEM POLINOMIAL DO TEMPO DE ADAPTAÇÃO E TAXA DE CRESCIMENTO DE ASPERGILLUS NIGER EM NÉCTAR DE MANGA VARIEDADE UBA COMO FUNÇÃO DA TEMPERATURA E PH.	143
ABSTRACT	143

INTRODUÇÃO	145
MATERIAL E MÉTODOS	148
➤ MICRORGANISMO E PREPARO DA SUSPENSÃO DE ESPOROS	148
➤ PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	149
➤ INOCULAÇÃO E INCUBAÇÃO	150
➤ AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO	151
➤ ANÁLISE DOS DADOS DE CRESCIMENTO	151
▪ <i>Modelagem primária do crescimento</i>	151
▪ <i>Modelagem polinomial de superfície de resposta</i>	153
RESULTADOS E DISCUSSÃO	154
➤ <i>Modelagem primária do crescimento</i>	154
➤ <i>Modelagem polinomial de superfície de resposta</i>	159
▪ <i>Modelagem do tempo de adaptação de Aspergillus niger</i>	160
▪ <i>Modelagem da taxa de crescimento de Aspergillus niger</i>	163
CONCLUSÕES	166
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	168
AGRADECIMENTOS.....	173
CONCLUSÕES GERAIS	207
APÊNDICE 1	209
MEIOS DE CULTURA E REAGENTES	209
APÊNDICE 2 – DADOS DO DIÂMETRO EXPERIMENTAL E CALCULADO DAS COLÔNIAS DE A.NIGER EM NÉCTAR DE MANGA OBTIDOS PELOS MODELOS DE GOMPERTZ MODIFICADO E BARANYI & ROBERTS.	211
APÊNDICE 3 – MODELAGEM PRIMÁRIA DO CRESCIMENTO DE <i>A.niger</i> EM NÉCTAR DE MANGA.....	227

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABELA 01. <i>Características químicas essenciais ao néctar de manga</i>	7
--	---

CAPÍTULO 2

TABELA 1. <i>Choques térmicos para determinação do isolado mais termoresistente em néctar de manga</i>	111
TABELA 2. <i>Correspondência das medidas da quantidade de sólidos solúveis (Brix) e atividade de água (aw) em néctar de manga</i>	112
TABELA 3. <i>Planejamento experimental para crescimento de Aspergillus niger, em néctar de manga com valores reais, para estudo da influência de Aw</i>	113
TABELA 4. <i>Planejamento experimental para crescimento de Aspergillus niger, em néctar de manga com valores reais, a aw fixa em 0,980 para estudo da influência de pH e temperatura</i>	114
TABELA 5. <i>Sobrevivência de bolores termoresistentes em néctar de manga</i>	115
TABELA 6. <i>Identificação completa do isolado I5E16M e preliminar dos demais bolores termoresistentes isolados de néctar de manga</i>	116
TABELA 7. <i>Contagem da população inicial das suspensões de esporos de cada isolado</i>	117
TABELA 8. <i>Parâmetros de crescimento de Aspergillus niger em néctar de manga, sendo obtidos por modelagem de Gompertz modificado (G) e Baranyi & Roberts (B), a partir de ensaios de Tabela 4</i>	118
TABELA 9. <i>Análise de significância para estudo da influência de pH, temperatura e aw sobre parâmetros de crescimento de A.niger em néctar de manga, com inóculo de 9.3×10^3 esporos/mL</i>	119

CAPÍTULO 3

TABELA 1. <i>Planejamento experimental para estudo do impacto de pH, temperatura e aw sobre o crescimento de Aspergillus niger em néctar de manga</i>	201
TABELA 2. <i>Planejamento experimental para estudo do crescimento de Aspergillus niger em néctar de manga, a aw 0,980</i>	202
TABELA 3. <i>Análise de significância para estudo da influência de pH, temperatura e aw sobre parâmetros de crescimento de A.niger em néctar de manga</i>	203

TABELA 4. <i>Parâmetros de crescimento de Aspergillus niger em néctar de manga, sendo obtidos por modelagem de Gompertz modificado (G) e Baranyi & Roberts (B), segundo ensaios da Tabela 2</i>	204
TABELA 5. <i>Dados experimentais do tempo de adaptação (λ; dias) e da taxa de crescimento (μ; mm.dia⁻¹) para Aspergillus niger, em néctar de manga, utilizados para ajuste do modelo polinomial quadrático</i>	205
TABELA 6. <i>Coeficientes significativos ($p < 0,05$) para a modelagem polinomial do tempo de adaptação (λ; dias) e da taxa de crescimento (μ; mm.dia⁻¹) de A.niger em néctar de manga</i> .	206

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 01. <i>Distribuição do consumo de sucos prontos para beber no Brasil</i>	8
--	---

CAPÍTULO 2

FIGURA 1. <i>Diferentes representações de Aspergillus niger: A. microscopia ótica com aumento de 1000 vezes do isolado 15E16M com hifa, corpo de frutificação e conidiósporos; B. microscopia eletrônica de varredura representado o conidióforo, métula, esterigma e conídeos, retirado de Genomics and Blood Substitutes for 21st Century Europe (2006</i>	121
FIGURA 2. <i>Deslocamento médio da curva de crescimento de Aspergillus niger, em néctar de manga, em condição de redução de Aw de 0.986 a 0.980, em temperatura de 22°C e pH 3.5 e em nível de inóculo de 6.8×10^0 esporos/mL, modeladas por Gompertz modificado e Baranyi & Roberts</i>	124
FIGURA 3. <i>Incremento no diâmetro final das colônias de Aspergillus niger em função da mudança de pH de 3.5 (A) para 4.5 (B)</i>	127
FIGURA 4. <i>Deslocamento médio da curva de crescimento de Aspergillus niger, em néctar de manga, com redução de Aw de 0.990 para 0.970 (ensaios 2 e 6 do primeiro planejamento,</i>	

respectivamente), mantendo-se constantes temperatura e pH a 22°C e 3.5, respectivamente, com inóculo de 9.3×10^3 esporos/mL, modeladas por Gompertz modificado e Baranyi & Roberts 130

FIGURA 5. Deslocamento médio da curva de crescimento de *Aspergillus niger*, em néctar de manga, com redução da temperatura de 22°C para 18°C (primeiro planejamento, ensaios 1 e 5, respectivamente) mantendo-se constantes A_w e pH a 0.990 e 4.5, respectivamente, com nível de inóculo de 9.3×10^3 esporos/mL, modeladas por Gompertz modificado e Baranyi & Roberts 133

FIGURA 6. Deslocamento médio da curva de crescimento de *Aspergillus niger*, em néctar de manga, modeladas por Gompertz modificado e Baranyi & Roberts, nas seguintes condições: **1:** pH 4,0 e 20°C, ensaio 7; **2:** pH 3,28 e 20°C, ensaio 8; **3:** pH 4,7 e 20°C, ensaio 10, com inóculo de 9.3×10^3 esporos/mL 136

FIGURA 7. Deslocamento médio da curva de crescimento de *Aspergillus niger*, em néctar de manga, com redução de temperatura de 22,8 a pH 4,0 (ensaio 9) para 17,2°C a pH 4,0 (ensaio 11), modeladas por Gompertz modificado e Baranyi & Roberts, com inóculo de 9.3×10^3 esporos/mL 139

CAPÍTULO 3

FIGURA 1. Metodologia de medição das colônias de *Aspergillus niger* em néctar de manga .. 175

FIGURA 2. Deslocamento da curva de crescimento de *Aspergillus niger*, em néctar de manga, modeladas por Gompertz modificado e Baranyi & Roberts, nas seguintes condições: **1:** pH 4,0 e 20°C, ensaio 7; **2:** pH 3,28 e 20°C, ensaio 8; **3:** pH 4,7 e 20°C, ensaio 10, conforme planejamento da Tabela 2..... 178

FIGURA 3. Deslocamento médio da curva de crescimento de *Aspergillus niger*, em néctar de manga, com redução de temperatura ensaio 9 (22,8°C e pH 4,0) e ensaio 11 (17,2°C e pH 4,0) modeladas por Gompertz modificado e Baranyi & Roberts, conforme ensaios da Tabela 2 181

FIGURA 4. Diagrama de Pareto para análise dos efeitos dos parâmetros sobre o tempo de adaptação de *A.niger* em néctar de manga 184

FIGURA 5. Valores Preditos versus observados para tempo de adaptação para *A.niger* em néctar de manga..... 187

FIGURA 6. Superfície de resposta para tempo de adaptação (dias)..... 190

FIGURA 7. <i>Diagrama de Pareto para análise dos efeitos dos parâmetros sobre a taxa de crescimento de A.niger em néctar de manga.....</i>	<i>193</i>
FIGURA 8. <i>Valores Preditos versus observados para taxa de crescimento de A.niger em néctar de manga</i>	<i>196</i>
FIGURA 9. <i>Superfície de resposta para taxa de crescimento (mm.dia⁻¹) de Aspergillus niger em néctar de manga.....</i>	<i>199</i>

ABSTRACT

In 2005, the world production of mango fruits was 850,000ton and Brazil was the 7th in ranked of world production. The mango nectar is the third ranked in flavor preference. Concerning the emerging contaminant microorganisms of this product are molds, which are able to survive pasteurization process, it is essential to know the contamination level of heat resistant molds in this product and to identify the most heat resistant. Moreover, pasteurization process is unable to eliminate these molds, so it is necessary to study both the effect of hurdle factors and the interaction of factors in the growth.

The aim of this research was: *i.* to quantify, isolate and identify the most heat resistant mold in the mango nectar; *ii.* to evaluate the effect of hurdle factors on growth parameters of the isolated, considering two levels of inoculum, 6.8×10^0 and 9.3×10^3 spores/mL of mango nectar, selecting the most impact variables through primary modeling; *iii.* to model growth parameters such adaptation time (λ ; days) and growth rate (μ ; mm.day^{-1}) of the most heat resistant mold by polynomial response surface.

For this purpose, 50L of mango nectar were used for isolating the thermal resistant strains (Bechat & Pitt, 2001). To screen of heat resistance of the isolated was performed as indicated in Baglioni (1998). Concerning low inoculum level (10^0 spores/mL mango nectar), temperature was from 12 to 25°C, pH, from 3.2 to 4.8 and aw, from 0.979 to 0.988, which were tested by a central composite design, 2^3 with 3 central points and 6 star points. For 10^3 spores/mL of mango nectar, temperature was from 18 to 22°C, pH, from 3.5 to 4.5 and aw, from 0.970 to 0.990, tested by factorial design 2^3 with 3 central points. Fungal growth was measured as colony diameter on daily basis. Primary predictive models of Baranyi & Roberts and modified Gompertz were used to fit growth data. For a secondary polynomial model was used a central composite design 2^2 with 3 central points and 4 star points, in which temperature varied from 17.2 to 22.8°C and pH, from 3.2 to 4.7, and aw was fixed at 0.980. For all experiments conducted the mold was inoculated in 230mL PET bottles mango nectar, sanitized according to Petrus (2000).

The total count average of heat resistant molds from mango nectar was 7.4×10^3 spores/mL, from this total were isolated 8 different strains and the most heat resistant was *Aspergillus niger* (100°C/15 minutes).

Concerning the low inoculum level (10^0 spores/mL of mango nectar), was observed that pH reductions increase adaptation time from 4 to 10 days, as well, an increase of 0,01 on aw reduced shelf life in 3 days. In temperatures $\leq 18^\circ\text{C}$ the growth mold was not observed. For inoculation level 9.3×10^3 spores/mL of mango nectar, was observed that aw was not significant ($p < 0.05$) on the mold growth parameters. In abuse temperatures conditions, reductions of 5.6°C (from 22.8 to 17.2°C), increase the adaptation time in 23 days. Same effects were observed when pH of mango nectar changed from 4.0 to 4.7, while adaptation time decreased from 11 to 3 days and the maximum diameter tripled. It was verified that Baranyi & Roberts' model adjusted better the experimental data, with higher adjustment coefficients (0.998).

The obtained model for adaptation time, with temperature, $(\text{temperature})^2$ and pH as significant factors ($p < 0.05$), was: $\lambda(\text{days}) = 7.176 - 1.676 * pH - 7.366 * T + 2.335 * T^2$. This model was verified with R^2 0.981, 1.06 bias factor, 1.16 accuracy factor and $F_{\text{val}}/F_{\text{tab}}$ 23.4. The statistical analyses demonstrate that a decrease in pH of 0.5 unit could double the product shelf-life (from 10 to 20 days). The same effect was observed with reductions of about 0.8°C in temperature. The maximum shelf life obtained (about 30 days) was for pH 3.28 and 17.2°C .

The obtained model for growth rate, with pH, $(\text{pH})^2$, temperature and $(\text{temperature})^2$ as significant factors was: $\mu(\text{mm.dia}^{-1}) = 1,474998 + 0,679572 * pH + 1,365807 * pH^2 + 0,212507 * T + 1,245089 * T^2$

This model was verified with R^2 0.882, 1.06 bias factor, 1.16 accuracy factor and $F_{\text{val}}/F_{\text{tab}}$ 2.6. Statistical analysis demonstrated when pH was 4.0 and temperature was 20°C , the growth rate was lower (1.33mm.day^{-1}).

Thus, pH and temperature were significant factors ($p < 0.05$) on growth of *A.niger* in mango nectar. However, for the studied levels, this factor only retards

the mold growth, without eliminating. So, it is essential to control storage refrigeration, avoiding abuse temperature, since temperatures $\leq 15^{\circ}\text{C}$, do not permit *A.niger* growth, no matter the inoculum level. In the same manner, variation in pH of 0.5 units can implicate in strong changes in product shelf life. However pH and temperature variation are not able to guarantee the product microbial stability, since it depends on raw material quality assurance, among other factors. Hence, pH and temperature can contribute to mango nectar preservation.

RESUMO GERAL

Em 2005, a produção mundial de manga “in natura” foi de 850000 toneladas, sendo o que Brasil ocupa o sétimo lugar no ranking mundial de produção. Neste mercado, o néctar de manga ocupa o terceiro lugar da preferência mundial por sabor. Considerando-se que os contaminantes emergentes deste produto são fungos que apresentam características de resistência ao processo de pasteurização empregue pelas indústrias, torna-se essencial que se conheça o nível de contaminação do produto por estes bolores termoresistentes, bem como que se identifique qual espécie é a mais termoresistente isolada do produto. Além disso, como o processo de pasteurização por si só não é capaz de eliminar totalmente essa microbiota contaminante, sem alterar sensorialmente o produto, é indispensável o estudo do efeito de fatores controladores do crescimento destes microrganismos termoresistentes, bem como que se modele seu crescimento em função de alterações nestes fatores.

Considerando o exposto, esta pesquisa visou: *i.* quantificar, isolar e identificar o bolor mais termoresistente presente em néctar de manga; *ii.* avaliar o efeito das variáveis controladoras do crescimento sobre os parâmetros de crescimento desse isolado, quando em dois níveis de inoculação, $6,8 \times 10^0$ esp./mL e $9,3 \times 10^3$ esp./mL, selecionando as variáveis de maior impacto, via modelagem preditiva primária; *iii.* modelar os parâmetros de crescimento, como tempo de adaptação (λ ; dias) e taxa de crescimento (μ ; mm.dia⁻¹) do bolor mais termoresistente utilizando a modelagem polinomial de superfície de resposta.

Para tanto, 50L de néctar de manga foram utilizados para o isolamento das linhagens termoresistentes, conforme descrito por Bechaut & Pitt (2001). Para delineamento da termoresistência dos isolados utilizou-se metodologia adaptada de Baglioni (1998). No teste do nível baixo de inóculo (10^0 esp./mL de néctar de manga), a temperatura variou de 12 a 25°C, o pH, de 3,2 a 4,8 e a aw de 0,979 a 0,988, mediante um desenho fatorial 2^3 acrescido de 3 pontos centrais e 6 axiais; já para o nível de inóculo de 10^3 esp./mL, a temperatura variou de 18 a 22°C, o pH de 3,5 a 4,5 e aw de 0,970 a 0,990, mediante desenho fatorial 2^3 com 3 pontos centrais. Os dados do incremento diário nas medidas de diâmetro foram ajustados pelos modelos de crescimento de Baranyi (Baranyi & Roberts, 1995) e de Gompertz modificado (Zwietering et al., 1994). Para a modelagem secundária do crescimento, utilizou-se um desenho fatorial 2^2 com 3 pontos centrais e 4 axiais, sendo que a temperatura variou de 17,2 a 22,8°C e o pH variou

de 3,2 a 4,7, com a_w fixada em 0,980 (comum ao produto). Para estas avaliações o fungo foi inoculado em 230mL de néctar de manga, previamente esterilizados, dispostos em garrafas PET, higienizadas segundo Petrus (2000).

A contagem total de bolores termoresistentes presentes no néctar de manga foi de $7,4 \times 10^3$ esp./mL, deste total foram isoladas 8 linhagens diferentes, sendo a que apresentou maior termoresistência (100°C/15min) identificada como *Aspergillus niger*.

Considerando-se o nível de inóculo baixo ($6,8 \times 10^0$ esp./mL de néctar de manga), observou-se que reduções de pH causaram aumento do tempo de adaptação (4 para 10 dias), bem como incrementos de 0,01 na a_w o diminuíram em 3 dias, sendo que em temperaturas inferiores a 18°C não foi observado o crescimento do fungo. Já considerando-se o nível de inóculo de $9,3 \times 10^3$ esp./mL, observou-se que a a_w , na faixa natural ao produto, não apresentou impacto significativo ($p < 0,05$) sobre os parâmetros de crescimento do microrganismo. Em condições de abuso de temperatura, uma redução de 5,6°C (22,8 para 17,2°C), implicaram em aumento de 23 dias no tempo de adaptação do fungo. De maneira semelhante, quando o pH do néctar de manga passou de 4,0 para 4,7, o tempo de adaptação do microrganismo passou de 11 para 3 dias e o diâmetro final da colônia triplicou. Cabe salientar que o modelo de Baranyi demonstrou melhor performance no ajuste dos dados de crescimento, com valores maiores valores de R^2 (0,998).

Para a modelagem polinomial de superfície de resposta a a_w foi fixada em 0,980 (natural do produto). O modelo obtido para tempo de adaptação, com parâmetros significativos ($p < 0,05$) temperatura, linear e quadrática e pH linear (com valores codificados) foi:

$\lambda(days) = 7.176 - 1.676 * pH - 7.366 * T + 2.335 * T^2$. Este modelo foi verificado com R^2 0,981, 1.06 de fator bias, 1,16 de fator exatidão e relação F_{val}/F_{tab} de 23,4. As análises estatísticas do modelo demonstraram que reduções no valor de pH em 0,5 unidade podem ser capazes de duplicar o tempo de vida útil do produto (10 para 20 dias). Efeitos semelhantes foram observados para reduções de temperatura da ordem de 0,8°C.

Considerando-se a taxa de crescimento, o modelo polinomial obtido, tendo como fatores significativos ($p < 0,05$) pH, linear e quadrático e temperatura linear e quadrática, com valores codificados, foi:

$$\mu(mm.dia^{-1}) = 1,474998 + 0,679572 * pH + 1,365807 * pH^2 + 0,212507 * T + 1,245089 * T^2$$

Este modelo foi verificado com R^2 0,882, 1.06 de fator bias, 1,16 de fator exatidão e relação F_{val}/F_{tab} de 2.6. Análises estatísticas do modelo demonstraram que, em pH 4,0 e 20°C é observada menor taxa de crescimento (1,33mm. dia⁻¹).

Assim sendo, os resultados demonstraram que pH e temperatura são fatores que exercem influência significativa sobre o crescimento de *A.niger*, em néctar de manga. Entretanto, estes fatores, nos níveis estudados, somente retardam o crescimento do microrganismo, não o impedindo. É essencial então o controle por refrigeração, visando evitar abusos de temperatura, já que em temperaturas $\leq 15^\circ\text{C}$, independentemente do nível de inóculo utilizado, não foi notado o crescimento de *A.niger*. De modo similar, deve-se também optar pelo controle rígido nos valores de pH, pois alterações de 0,5 unidade podem implicar em mudanças severas na vida de prateleira do produto. Entretanto, somente alterações em valores de pH e temperatura não são suficientes para garantir a estabilidade microbiológica do produto, já que esta depende da qualidade da matéria-prima, dentre outros fatores, contudo, tanto pH quanto temperatura podem atuar como coadjuvantes na preservação do néctar de manga.

Modelagem do crescimento de *Aspergillus niger* em néctar de manga, frente a pH e temperatura, em embalagens PET.

1. Introdução Geral

As frutas por serem perecíveis e deteriorarem-se em poucos dias têm sua comercialização “in natura” dificultada a grandes distâncias. Além disso, estima-se que perdas de pós-colheita, em países em desenvolvimento, variam entre 30% e 40%, o que equivale a 15 milhões de toneladas de frutos perdidos (Abreu, 2006). A produção de polpas e sucos torna-se então um meio favorável para o aproveitamento integral das frutas na época da safra, evitando assim problemas ligados a sazonalidade (Bueno,2002), sendo que a produção brasileira de sucos prontos para beber, em 2004, foi de 308 milhões de litros, com estimativa de crescimento de 13% para 2005 (Finetto, 2005).

A manga tanto para seu consumo “in natura” quanto na forma industrializada de sucos, polpas, geléias, néctares, sorvetes e sobremesas geleificadas tem apresentado demanda crescente em todo o mundo (Vidal, 2004), ocupando o terceiro lugar no ranking mundial de preferência por sabor, com 13% de aceitação.

Os sucos naturais ou concentrados, em geral, podem ser obtidos espremendo-se os frutos, ou então a partir de prensados ou material

triturado, de modo a serem adquiridos juntamente com a polpa, ou ainda através de água (Franco & Landgraf, 1996).

Franco & Landgraf (1996), dizem ainda que o pH do suco depende da matéria-prima, variando de 2,4 para suco de limão até 4,2 para o de tomate. Todos eles apresentam açúcares em quantidade variável de 2 a 17%. O alto teor de água favorece o crescimento de leveduras e bactérias, mas bolores também podem crescer na superfície, quando em contato com o ar.

Os sucos como os de goiaba, manga, uva maçã e pêra são altamente suscetíveis a contaminação por bolores e possíveis micotoxinas produzidas pelos mesmos. Condições impróprias de transporte, armazenamento e seleção da matéria-prima podem também facilitar esta contaminação. Existem ainda algumas linhagens de fungos que têm a habilidade de sobreviver ao processamento destes sucos, sendo assim as possíveis causadoras das deteriorações pós-processo (Abdel-Sater *et al.*, 2001).

Neste enfoque torna-se importante então, o estudo de combinações, ou interações entre os vários fatores intrínsecos e extrínsecos que afetem a capacidade de sobrevivência e de multiplicação dos microrganismos nos alimentos (*hurdle technology*), permitindo prever a sua vida-de-prateleira e estabilidade microbiológica, bem como conhecer a capacidade de crescimento incluindo a produção de toxinas por microrganismos patogênicos eventualmente presentes nos mesmos (Van der Riet & Van der Walt, 1985).

A teoria de barreira (*hurdle technology*) estuda a interação entre fatores que possam afetar o crescimento e desenvolvimento de microrganismos, sendo que, em algumas circunstâncias estes efeitos podem ser acumulativos ou ainda possuir uma magnitude maior de efeito quando aplicados individualmente (McMeekin *et al.*, 2000).

A partir de combinações e interações entre fatores que possam afetar o crescimento ou desenvolvimento de determinado microrganismo pode-se criar um modelo preditivo que deverá incluir qualquer probabilidade de crescimento do microrganismo em estudo bem como os parâmetros de crescimento quando este ocorrer em alguma condição específica (López-Malo & Palou, 2000).

A validação deste modelo poderá permitir às indústrias alimentícias estenderem o tempo de vida de prateleira do néctar de manga, pronto para consumo, por meio de alterações nos parâmetros do modelo, sob condições de processo específicas.

2. Revisão Bibliográfica Geral

Primeira Parte: Descrição do produto e microrganismo

2.1. Manga (Mangifera indica, L.)

A manga é uma fruta nativa da Ásia, mais precisamente da Índia, trazida para o Brasil, pelos portugueses, por volta de 1700 (Maya, 2005) e disseminada em quase todas as regiões do país, especialmente no Sudeste e Nordeste, sendo uma fruta que apresenta variados tamanhos, formas, sabores e cores. Sua forma varia entre redonda, oval, alongada e fina, chegando ainda a aparentar-se na forma de um coração ou até mesmo um rim. A cor de sua casca varia entre verde, amarela ou vermelha (Agrofruit, 2005).

A manga apresenta-se como uma planta perene, de grande porte e sistema radicular vigoroso, muito sensível a geadas e, variavelmente, de produção alternada. Seus frutos são consumidos ao natural ou na forma industrializada de purê, néctar ou compota, e, verdes, são utilizados na confecção de picles, saladas, molhos e geléias (Boletim 200 IAC, 1998).

Em todo o mundo existem cerca de mil variedades, cultivadas em países tropicais e subtropicais. No Brasil estão presentes cerca de 40 cultivares sendo que algumas delas foram desenvolvidas no próprio país. Entre os principais produtores nacionais, destaca-se São Paulo, Minas

Gerais e alguns estados do Nordeste, especialmente Pernambuco (Agrofruit, 2005).

Na década de 90 a produção mundial de manga “in natura” cresceu cerca de 71.2%, sendo que aproximadamente 41.2% foram destinados à produção de suco. A partir de 2000, esta produção apresentou considerável aumento, chegando a 850 mil toneladas em 2004, sendo esta correspondente a uma área cultivada de 68000ha (FAO, 2005). Esta produção coloca o Brasil em sétimo lugar no ranking mundial (Maya, 2005).

Em pesquisa desenvolvida por Vilas Boas *et al.* (2003) foi avaliada a qualidade microbiológica de mangas variedade “Tommy Atkins” minimamente processadas, submetidas a diferentes tratamentos químicos. Independentemente do tratamento químico utilizado, observou-se, após o décimo e décimo segundo dias de incubação, a presença de fungos filamentosos e leveduras os quais podem ser considerados como contaminantes potenciais dos produtos fabricados com estas frutas.

2.1.1. Manga ubá

Esta variedade é cultivada na maioria das cidades mineiras, principalmente em Visconde do Rio Branco e tem como característica marcante seu sabor e textura. Apesar destas características em um mercado que prioriza a aparência, seu tamanho pequeno impedia o completo sucesso desta variedade. Todavia por possuir fibras curtas e macias e polpa suculenta e saborosa, sua utilização pela indústria de sucos

naturais tem sido crescente. Em adição a isto se pode dizer ainda que, sua crescente utilização está associada à manutenção da cor amarelo-claro após o processamento, à viscosidade apropriada para o consumo e a conservação do sabor, proporcionados pela variedade, além de ser rica em potássio e vitaminas C e A (Agrofruit, 2005).

2.2. Néctar de manga

Segundo a Instrução Normativa nº12, de 4 de Setembro de 2003, entende-se como néctar o suco obtido a partir de frutas polposas como abacaxi, acerola, manga etc., cuja quantidade mínima de polpa seja de 30% (m/m), ressalvado o caso de frutas com acidez ou conteúdo de polpa muito elevado ou sabor muito forte, sendo que neste caso, o conteúdo de polpa não deve ser inferior a 20% (m/m).

Segundo Dimarzio (2003), o néctar de manga é definido como a bebida não fermentada, obtida da dissolução, em água potável, da parte comestível da manga (*Mangifera indica*, L.) e açúcares destinados ao consumo direto, podendo ser adicionado de ácidos (Tabela 01).

As características físicas, químicas e organolépticas devem ser as provenientes da manga, observando-se os limites mínimos e máximos dos parâmetros fixados para o respectivo Néctar Tropical, parâmetros estes previstos nos padrões de identidade e qualidade específicos para cada fruta. Como características físicas obrigatórias deve possuir cor variando

entre amarelo e laranja, sabor característico e aroma próprio. As características químicas essenciais estão apresentadas na Tabela 01.

Tabela 01. **Características químicas essenciais ao néctar de manga.**

Característica	Mínimo	Máximo
Quantidade de suco ou polpa de manga (g/100g)	40,00	indefinido
Sólidos solúveis em °Brix (20°C)	10,00	indefinido
Acidez Total em ácido cítrico (g/100g)	0,20	indefinido
Açúcares Totais (g/100g)	7,00	indefinido

Fonte: Dimarzio (2003).

2.2.1. Mercado consumidor

O mercado dos sucos pronto para beber vem apresentando significativo crescimento nos últimos anos, com perspectiva de crescimento na produção nacional de 13% para 2005. Dois são os fatores que contribuem para este crescimento: o apelo, próprio do produto, associado a uma vida saudável e a praticidade, já que o produto apresenta-se pronto para beber. Na Figura 01 está demonstrado o consumo de sucos prontos para beber nas diferentes regiões brasileiras (Finetto, 2005).

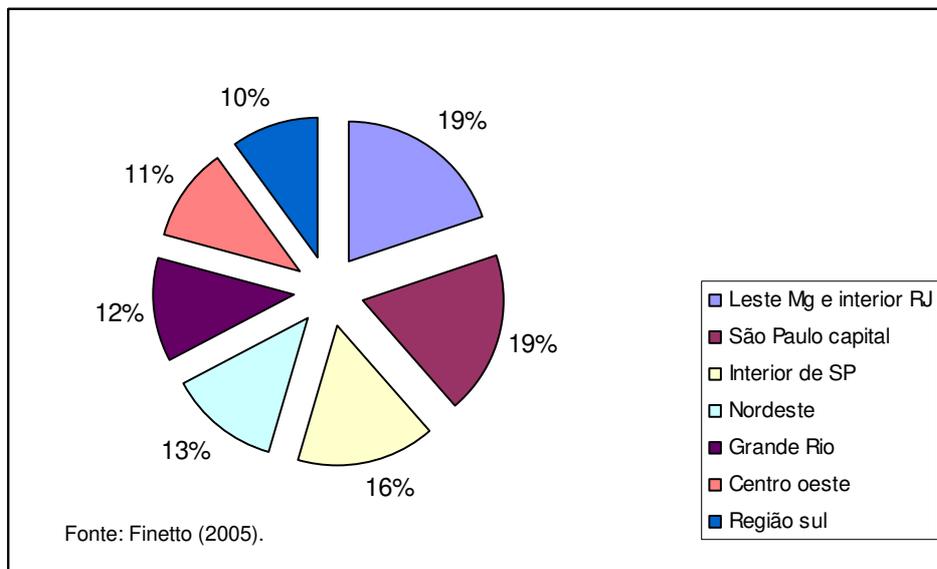


Figura 01. **Distribuição do consumo de sucos prontos para beber no Brasil.**

Pode-se observar que o consumo na região sudeste perfaz um total de 55%. Já quando se considera a preferência por sabores o sabor de manga ocupa o terceiro lugar no ranking mundial, com 13% da preferência, perdendo apenas para os de uva e pêsego, com 18% da preferência e de laranja com 15% (Finetto, 2005).

2.3. Principais grupos de fungos deteriorantes em alimentos

2.3.1. Características Gerais de Fungos

Os fungos são microrganismos largamente distribuídos no meio ambiente, incluindo o ar, a água, o solo e o pó. Como consequência os alimentos podem tornar-se contaminados com uma ampla variedade de espécies fúngicas, originárias destas fontes ambientais. Assim sendo, sob condições favoráveis podem multiplicar-se nos alimentos e provocar deterioração. Além disso, os fungos apresentam uma grande versatilidade

para crescer em substratos e condições que outros microrganismos não são capazes de utilizar, como por exemplo, atividade de água reduzida, dentro do limite de 0,65 (xerófilos extremos) até 0,99; crescimento em condições de amplo pH (2 – 9) e ampla faixa de temperatura (<0°C a 40°C); versatilidade na utilização de substratos para sobrevivência; capacidade de esporulação e disseminação em diferentes condições (Taniwaki & da Silva, 2001).

Ainda segundo os mesmos autores, alimentos que possuam atividade de água (aw) intermediária, entre 0,60 e 0,89 têm os fungos como principais microrganismos deteriorantes, ou seja, os fungos são, geralmente, os definidores da vida prateleira do produto. Retardando-se ou até mesmo prevenindo-se o crescimento fúngico, pode-se evitar perdas significativas na produção, estocagem e distribuição de alimentos, além de alterações na aparência, características organolépticas, valor nutricional e risco potencial para a saúde do consumidor, em decorrência de algumas espécies serem reportadas como produtores potenciais de micotoxinas. Em adição, mesmo que a deterioração do alimento não seja visível, a olho nu, é imprescindível que os fabricantes mantenham-se em alerta para as implicações do crescimento fúngico, mantendo programas de controle da matéria-prima e produtos acabados.

2.3.2. Principais grupos deteriorantes

➤ *Fungos xerófilos*

Fungos xerófilos são aqueles capazes de crescer em atividade de água abaixo de 0.85, em condições adversas de pH, temperatura, potencial redox e outros fatores de crescimento (Pitt, 1975; Beuchat & Hocking, 1990; Taniwaki & da Silva, 2001).

➤ *Fungos Termoresistentes*

Os fungos, como a maioria dos microrganismos são destruídos pelo calor, sendo que o micélio é inativado por um tratamento térmico de poucos segundos a 80°C. Os esporos apresentam-se como mais resistentes ao calor que o micélio, embora sejam menos resistentes que os esporos de bactérias. Alguns conídios de *Aspergillus* são inativados a 70°C por 10 minutos, enquanto que ascósporos de *Eurotium* requerem, para inativação, 80°C por 20 minutos. Ocasionalmente, ocorre de algumas espécies sobreviverem a temperaturas de 100°C por alguns minutos (Pitt & Hocking, 1997; Baggerman & Samson, 1988; Taniwaki & da Silva, 2001). Estes fungos que têm a capacidade de sobreviver a tratamentos térmicos a 80°C por 30 minutos são denominados bolores termoresistentes (Bechaut & Pitt, 2001).

Os bolores termoresistentes foram relatados pela primeira vez em 1933 por Oliver e Smith e podem ser definidos como sendo os bolores capazes de sobreviver às condições normais do processamento de

derivados de frutas e posteriormente causando deterioração nos mesmos (King Jr. & Halbrook, 1987).

Os fungos termoresistentes podem modificar a estrutura das frutas ou ainda alterar seus atributos sensoriais durante a estocagem, resultando em significativas perdas econômicas além de terem a capacidade de produzir um grande número de metabólitos secundários tóxicos que incluem a bissotoxina A, ácido bissoclâmico, patulina e fischerina (Valík & Piecková, 2001).

Para Pacheco (2001), as alterações provocadas por fungos termoresistentes em produtos processados caracterizam-se, principalmente, pela presença de micélio e desintegração progressiva no caso de substratos sólidos. Quando eventualmente ocorrer a produção de gases pelos microrganismos atuantes, pode ocorrer leve estufamento das embalagens.

Os fungos termoresistentes são freqüentemente distribuídos no solo e conseqüentemente podem deteriorar os produtos fabricados com estas frutas contaminadas. Caso a matéria-prima esteja excessivamente contaminada por estes fungos advindos do solo, o produto final poderá ser deteriorado, mesmo se submetido a tratamento térmico correto, já que este está dimensionado para ocasionar um número determinado de reduções decimais da suposta população microbiana inicial (King Jr. & Halbrook, 1987; Pacheco, 2001). Estes fungos têm ocorrência esporádica sendo um contínuo problema de contaminação nas indústrias alimentícias. Para King

Jr. & Halbrook (1987), a espécie de fungo, com resistência térmica, mais freqüentemente encontrada é *Byssochlamys fulva* e as encontradas com menor freqüência são *Neosartorya fischeri* e *Talaromyces flavus* (estágio perfeito do *Penicillium vermiculatum*). Já em pesquisa realizada por Baglioni (1998) foi constatado que em polpa de tomate, a linhagem mais termoresistente encontrada foi *Neosartorya fischeri*, resistindo a binômio de 100°C por 25 minutos.

King Jr. & Halbrook (1987), afirmam ainda que, no caso do *Talaromyces flavus*, já foi reportado que sua resistência térmica está associada à formação de ascósporos e a cleistotécia e que nos conídios e nos fragmentos do micélio esta resistência térmica não é encontrada. Isto é demonstrado facilmente quando se considera que os conídios são sensíveis ao álcool 70%, já os ascósporos são resistentes. Entretanto atualmente sabe-se que esta termoresistência também pode estar associada à mistura de hifas e clamidósporos, como no caso do *Paecilomyces variotii* (Peña *et al.*, 2004).

Blank *et al.* (1998) citam Doyle & Marth (1975) que demonstraram que esporos de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* produzidos em meio rico em açúcar e com altas concentrações de proteínas e aminoácidos se mostraram mais resistentes que os produzidos em meios com concentrações de nutrientes menores.

A deterioração em sucos pasteurizados geralmente está associada a espécies de *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Byssochlamys*, entre outros. Um considerável número de estudos têm sido conduzido sobre resistência térmica de ascósporos de fungos, os quais demonstram que as condições de processamento existentes não são adequadas à destruição destas estruturas, que serão responsáveis por posteriores contaminações e deteriorações em sucos (Shearer *et al.*, 2002).

➤ *Fungos toxigênicos*

Muitos fungos de origem alimentar são capazes de produzir micotoxinas. Estas se constituem como um risco sério para a saúde humana e animal, embora a gravidade dos casos de envenenamento seja muito variável dependendo das espécies envolvidas. Não são todos os fungos que produzem micotoxinas, de forma que a simples presença de fungos em um alimento não quer dizer necessariamente que as toxinas tenham sido ou venham a ser produzida. Por outro lado, a simples ausência de sinais visíveis de emboloramento também não deve ser interpretada como ausência de toxinas, pois estas podem permanecer em um alimento mesmo depois que o fungo que a produziu tenha desaparecido do produto processado (Taniwaki & da Silva, 2001).

2.4. Deteriorantes do néctar de manga

Os bolores termoresistentes são geralmente reportados como os principais deteriorantes de sucos e produtos oriundos do processamento de frutas (Valík & Piecková, 2001).

Alimentos altamente suscetíveis à deterioração por bolores termoresistentes são as frutas e os produtos fabricados a partir de frutas como sucos concentrados, frutas enlatadas e polpas de frutas. Esta degradação do produto processado de fruta é geralmente acompanhada por produção de gás e estufamento da embalagem, mudanças na cor, sabor e turbidez do produto, bem como crescimento micelial do fungo (Tournas,1994).

Em trabalho desenvolvido por Abdel-Sater *et al.* (2001), foi estudada a microflora de sucos de manga, goiaba, uva, maçã e pêra. Em todos os sucos observou-se a presença, em 100% das amostras, dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Para o suco de manga, as principais linhagens encontradas para o gênero *Aspergillus* foram: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* e para o gênero *Penicillium*: *Penicillium citrinum*, *Penicillium funiculosum*. Apesar desta contaminação em 100% das amostras, não foi detectada a produção de micotoxinas pelas mesmas, quando se considera o suco de manga.

Para Beuchat (1982), deteriorações em sucos de frutas crus e processados são, na maioria das vezes, causadas por bolores e leveduras e

ainda por bactérias lácticas ácidas. O baixo pH desses sucos associado aos nutrientes prontamente disponíveis, que são utilizados na fermentação microbiana, inibe o crescimento de muitas bactérias.

Tournas (1994), considera que a alta acidez e alta concentração de açúcar predominantes nos sucos em geral restringem o crescimento de bactérias, mas proporcionam um ambiente conveniente para o desenvolvimento dos fungos, os quais podem crescer em substratos com altas concentrações de açúcar e baixos valores de pH. Entretanto, em 1984 foi descoberta uma relação entre a deterioração em suco de maçã e um novo gênero de bactéria, o *Alicyclobacillus*. Desde os anos 90 e até os dias atuais este microrganismo tem sido submetido a muitas pesquisas, tornando-se um microrganismo emergente. Estas pesquisas se justificam devido a sua crescente difusão natural, sobrevivência a tratamentos típicos de pasteurização e suas características termo-acidofílicas que possibilitam seu crescimento em altas temperaturas e baixos valores de pH. No processamento de produtos cítricos esta bactéria pode ser encontrada na água condensada proveniente do sistema de evaporação térmica necessária para a produção de sucos concentrados (Parish, sd).

Para López-Malo & Palou (2000), o desenvolvimento da flora natural presente em purês de manga, mamão e banana é inibido em condições de pH controlado (3 a 4.1), aw reduzida (0.980 a 0.95) com adição de sorbato de potássio ou benzoato de sódio (1000ppm) e em alguns casos, bissulfito

de sódio (150ppm). No entanto, existem linhagens de leveduras que apresentam resistência a estes preservantes, especialmente a *Zygosaccharomyces bailii*, já reportada como capaz de crescer e sobreviver em purês de frutas preservados por combinações destes fatores.

2.5. *Aspergillus niger*

2.5.1. Características Gerais

Colônias de *Aspergillus* usualmente crescem rapidamente, apresentando-se, em superfície, na cor branca, amarela, marrom amarelado ou marrom a preto, consistindo freqüentemente de uma densa camada de conidiósporos eretos. Os conidiosporos geralmente são asseptados, com estipes não ramificadas e vesículas com ápice “intumescido”. As filíades nascem diretamente sobre a vesícula ou sobre a métula. As vesículas, filíades, métula, quando presente, e conídios formam a cabeça conoidal (Sanson & Reenen-Hoekstra, 1988).

Para Pitt & Hocking (1985), as colônias de *Aspergillus niger*, em meio de cultura para identificação CYA (Cyzapeck yeast extract Agar), usualmente cobrem toda a superfície da placa de Petri, sendo planas e com aspecto aveludado, sendo que usualmente, a superfície inferior da colônia, considerando-se o direito da placa, é composta por um micélio branco e com cabeças conoidais radiais e pretas. O reverso se apresenta plano e amarelo brilhante. Já em MEA (Malt Extract Agar) as colônias variam de 30 a 60mm de diâmetro, sendo usualmente menores que em CYA. Em G25N

(25% Glycerol Nitrate Agar) o diâmetro das colônias varia entre 18 e 30 mm, e apresentando-se similares às encontradas em CYA. Quando cultivado a 5°C não ocorre crescimento e quando cultivado a 37°C, as colônias apresentam 60mm ou mais de diâmetro cobrindo totalmente o espaço da placa, e apresentam-se ainda algumas vezes sulcadas.

2.5.2. Características Microscópicas

Pitt & Hocking (1985) descrevem que os conidióforos de *Aspergillus niger* nascem da superfície das hifas e em abundância, com 1 a 3mm de comprimento, hialinos e de paredes lisas, a métula apresenta entre 10 e 15 µm de comprimento ou mais; as filíades apresentam de 7 a 10 µm de comprimento; a conidia apresenta-se sob a forma esférica, com 4-5µm de diâmetro, marrom com paredes proeminentes e rugosas e algumas vezes estriadas.

2.5.3. Fisiologia

Aspergillus niger, requer uma temperatura mínima para crescimento de 6-8°C, máxima de 45-47°C e ótima de 35-37°C (Pitt & Hocking, 1985). Apresenta-se como um fungo xerofílico o qual já teve germinação reportada a aw de 0,77, a 35°C. Quanto ao pH, ele tem a capacidade de crescer mesmo em valores baixos, como 2,0, por exemplo, desde que a atividade de água seja alta. Em razão da coloração preta de seus esporos estes apresentam, aparentemente, resistência à luz solar e a luz UV, o que torna sua eliminação em alguns ambientes dificultada (Pitt & Hocking, 1985).

Batthey *et al.*(2001), citam Banwart 1979 e De Bôer & Nielsen 1995, que dizem ser a linhagem *Aspergillus niger* altamente resistente a preservantes químicos como ácidos sórbicos e benzóicos, tolerante a condições de alta acidez e ambientes com baixa atividade de água.

Sob este enfoque Dantigny *et al.* (2005) desenvolveram pesquisa na qual estudaram os efeitos de etanol, antimicótico pulverizado em produtos de panificação, sobre a taxa de crescimento de bolores deteriorantes, dentre eles, *Aspergillus niger*. Os autores citam Geiges & Kuchen (1981) que dizem ser a inibição do crescimento de fungos, em condições laboratoriais e meio sintético, obtida por concentrações de etanol entre 5 e 12% (v/v), dependendo da linhagem de fungo. Como resultado, obteve-se que, para *Aspergillus niger*, a mínima concentração de etanol que inibe seu crescimento em produtos de panificação é de 4,22% (p/p). Entretanto, já foi reportado que, concentrações acima de 2% (p/p) provocam o aparecimento de sabor desagradável no produto, mas pôde-se observar que para a linhagem esta concentração não é uma barreira eficiente na inibição do crescimento (Dantigny *et al.*, 2005).

Cahagnier *et al.*(1993), desenvolveram pesquisa analisando os efeitos de diferentes valores de atividade de água (aw) no crescimento de *Aspergillus candidus* e *Penicillium implicatum*. Os resultados demonstraram que o crescimento dos fungos está diretamente relacionado à aw, sendo

que em baixos valores de aw notou-se a ocorrência de conídios enquanto que os micélios se formaram em valores de aw altos.

Sabe-se que os fungos possuem uma ampla faixa de pH para seu crescimento, com ótimo ao redor de 5,5. Linhagens de *Aspergillus niger* não têm seu crescimento afetado por valores de pH entre 5,5 e 7,5. Contudo, trabalhando-se com valores na faixa de 3,0 nota-se uma significativa redução de seu crescimento (López-Malo *et al.*, 1997).

Esporos de linhagens de *Aspergillus* foram reportados geralmente como possuidores de pequena resistência térmica, como por exemplo, de 5 minutos a 60°C (Splittstoesser & Splittstoesser, 1977). Todavia, já se tem reportado linhagens de *Aspergillus niger*, produtores de conidiósporos, com resistência térmica ao redor de 85°C por 60 minutos (Splittstoesser & Splittstoesser, 1977), sendo estas linhagens consideradas como microrganismos emergentes e como tais, deficientes de estudos.

Em pesquisa desenvolvida por López-Malo *et al.* (1997) foi estudado o efeito da concentração de vanilina (preservante químico), temperatura de incubação e pH sob linhagens de *Aspergillus*, dentre elas, *A. niger*, cultivadas em meio PDA (Potato Dextrose Agar). Observou-se que a temperatura exerceu efeito significativo sobre a resposta dos fungos, sendo que o crescimento não foi notado em temperatura igual ou inferior a 10°C. Pode-se dizer então que esta linhagem somente será um potencial

deteriorante em produtos estocados em condições de abuso de temperatura superiores a 10°C.

2.5.4. Ocorrência

O gênero *Aspergillus* é comumente encontrado como contaminante de vários substratos. Sua ocorrência em regiões tropicais e subtropicais é mais comum que a ocorrência do gênero *Penicillium*. Muitas espécies têm recebido atenção especial em razão de sua habilidade em produzir metabólitos tóxicos. Outras, por sua vez, recebem atenção por suas habilidades fermentativas ou ainda por sua aplicação industrial para produção de ácidos orgânicos e enzimas (Sanson & Reenen-Hoekstra, 1988).

Uma das linhagens de fungos mais comumente reportadas como deterioradora de alimentos é *Aspergillus niger*, cuja incidência está associada a climas tropicais. Juntamente com *Aspergillus flavus* aparece como o fungo mais comum associado à deterioração de noz, amendoim e milho, além de estar associado ao amolecimento de frutos como maçã, pêras, pêssegos, uvas, morangos, mangas, bem como tomates e melões, devido a enzimas produzidas que atuam na degradação da pectina (Pitt & Hocking, 1985).

Em pesquisa desenvolvida por Abdel-Sater (2001), foi realizado o levantamento da micoflora de contaminação natural, de sucos de frutas, dentre eles, manga. Todas as amostras analisadas apresentaram

contaminação por linhagens de *Aspergillus*, sendo que *Aspergillus niger*, obteve frequência de aparecimento de 80%.

2.6. Fatores controladores do crescimento de bolores

O crescimento dos bolores em alimentos é influenciado por uma variedade de complexas interações entre fatores intrínsecos e extrínsecos, tais como temperatura, tempo, pH, A_w , composição do alimento, composição gasosa, agentes antimicrobianos e alguns fatores que atuam como fungicidas ou fungistáticos (López-Malo *et al.*, 2005).

2.6.1. Inibidores de contaminação em sucos

Como tratamentos térmicos à 90°C por 3 minutos ou a temperaturas que variam entre 80-90°C muitas vezes não são adequadas para inativar ascósporos de algumas linhagens de fungos termoresistentes como *Byssochlamys*, *Neosartorya* e *Penicillium*, utiliza-se para controle de seu crescimento a diminuição da atividade de água do meio, conseguida através da adição de dióxido sulfúrico, sorbato ou benzoato, e ainda a lavagem dos frutos com solução de hipoclorito (0,5% ou 500ppm) antes do tratamento térmico. A lavagem com hipoclorito reduz o número de ascósporos e proporciona maior sucesso no tratamento térmico (Tournas, 1994).

A preservação de sucos e derivados baseia-se principalmente no uso de processamento térmico (pasteurização e/ou esterilização), ao invés de conservantes químicos. A deterioração é freqüentemente atribuída à ação microbiológica ao invés de causas químicas ou físicas, contudo,

temperaturas e tempos normais de processamento em conjunto com a alta acidez das frutas facilmente destroem as bactérias e a maioria dos fungos e leveduras; portanto, a presença de microrganismos em sucos de frutas e derivados é, conseqüentemente, devido à contaminação após processamento ou processamento inadequado (Abdel-Sater *et al.* 2001). Já para López-Malo *et al.* (2005), o crescimento de bolores em alimentos é freqüentemente controlado através da utilização de sistemas antimicrobianos, entretanto antimicrobianos naturais têm demonstrado importantes propriedades antifúngicas.

Fungos são os maiores agentes deteriorantes de alimentos, principalmente naqueles onde a atividade de água está ao redor de 0,85. Este sucesso dos fungos em relação a bactérias e leveduras deve-se a sua habilidade em produzir e dispersar grande número de esporos. É sabido que muitos destes esporos adquirem certo grau de resistência térmica, quando expostos a determinadas condições, durante seu processo de formação, como por exemplo, esporos de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, provenientes de meios de cultura com alta concentração de açúcares e baixas concentrações de proteínas e aminoácidos se apresentam mais termoresistentes que os produzidos em meios com concentrações normais destes componentes (Blank *et al.*, 1998).

Fungos são capazes de crescer em todos os tipos de alimentos, resultando em vários tipos de alterações (deteriorações) nos mesmos, como

por exemplo: *off-flavours*, toxinas, descoloração, apodrecimento e formação de propágulos alergênicos ou patogênicos. A deterioração de propriedades sensoriais é freqüentemente devido à produção de exoenzimas durante o crescimento, que podem continuar sua atividade independente da destruição ou remoção do micélio, ocasionando completa desintegração da textura do alimento (Tournas, 1994).

As matérias primas de origem vegetal freqüentemente apresentam porções de solo aderidos na sua superfície, que pode ser uma fonte importante de contaminação, caso não ocorra uma limpeza adequada no fruto (Faria, 1993).

A nível industrial, a causa da contaminação pode ser devido à contaminação inicial, manuseio e estocagem imprópria dos ingredientes, e tratamento térmico inadequado, como por exemplo, a pasteurização de frutas e derivados por 3 min a 90°C é o tratamento usual empregue, enquanto que poucos sucos de frutas sofrem tratamento em intervalo menor, variando entre 80°C e 90°C. Estes tratamentos, entretanto podem não ser suficientes para inativar ascósporos de *Neosartorya*, *Penicillium* e outros fungos termoresistentes (Tournas, 1994).

Muitos são os fatores que podem influenciar o crescimento de bolores termoresistentes em alimentos processados. Alguns dos mais importantes que podem ser citados são os níveis de contaminação inicial do produto, tipo de microrganismo, composição do produto, temperatura de estocagem,

pH, atividade de água, tensão de oxigênio, tratamento térmico, grau de ascósporos sobreviventes e presença de inibidores de crescimento (Tournas, 1994).

2.6.2. Temperatura

A temperatura é claramente o fator que mais influencia o crescimento, desenvolvimento e atividades metabólicas de fungos filamentosos. Muitos dos fungos filamentosos têm seu ciclo de vida comprometido ou até mesmo interrompido com os efeitos da temperatura sobre a germinação de esporos, crescimento de hifas e esporulação (Anderson & Smith, 1976).

Juntamente com a atividade de água a temperatura apresenta-se como um fator de extrema importância para o crescimento de bolores, sendo que, muitas vezes, este crescimento não ocorre a temperaturas abaixo de 10°C (López-Malo *et al.*, 1997).

Segundo Tournas (1994) os efeitos da temperatura sobre o crescimento de fungos termoresistentes já vem sendo investigado há longo tempo. A autora cita Olliver & Rendle (1934) que reportam ser a temperatura ótima para crescimento de *Byssochlamys* entre 30 e 37°C, não havendo crescimento a 8°C ou menos.

➤ Efeitos da temperatura no crescimento

A maioria dos fungos, no geral, tem como temperatura ótima para seu crescimento e desenvolvimento os limites de 25 a 30°C, todavia existem

linhagens termofílicas, ou seja, linhagens que têm como temperatura ótima de crescimento 40°C ou mais. Acredita-se que esta diferença entre temperaturas acarrete diferenças nas necessidades nutricionais de cada linhagem, como exemplo pode-se citar a linhagem *Aspergillus niger*, que quando cultivada a altas temperaturas requer maior quantidade de biotina para seu crescimento e desenvolvimento (Anderson & Smith, 1976).

López-Malo *et al.* (1997) desenvolveram pesquisa na qual avaliaram, em meio sintético Agar batata dextrose (PDA), o efeito da concentração de vanilina, do pH, temperatura e aw, sobre o crescimento de linhagens de *Aspergillus*, dentre elas, *Aspergillus niger*. Os valores de aw variaram de 0.98 a 0.92, os de pH variaram de 4.1 a 3.0, a temperatura variou entre 10 e 30°C e a concentração de vanilina foi estudada entre 350 e 1200ppm. Quando se considerou a temperatura de 15°C, pH 3,0 e concentração de vanilina de 1000ppm notou-se inibição do crescimento de *Aspergillus niger*.

Em pesquisa realizada por Cuppers *et al.* (1997) foi desenvolvido um modelo que combinou os efeitos de temperatura, variando entre 5 e 37°C e concentração de NaCl, variando entre 0 e 7%, em meio de cultura sólido, sobre o crescimento de linhagens de fungos comumente deteriorantes de alimentos, como *Penicillium roqueforti* e *Aspergillus niger*. Para descrição da taxa de crescimento, expressa através de incrementos no diâmetro das colônias em função do tempo, como uma função da temperatura e concentração de NaCl, foi desenvolvido um modelo de seis parâmetros.

Este modelo desenvolvido poderá ser utilizado na microbiologia de alimentos como recurso principal para prever a deterioração por fungos.

➤ Efeitos da temperatura nos componentes e estruturas celulares

Anderson & Smith (1976) citam Langvad (1972) que desenvolveu pesquisa sobre a influência da temperatura sobre a membrana celular de *Serpula lacrymans*. Esta é uma linhagem muito sensível ao calor, sendo que tem seu crescimento ótimo a 23°C, e por outro lado, este crescimento é totalmente inibido a 28°C. Após exposição a 37,5°C por 20 minutos a mitocôndria e a membrana nuclear começam a se quebrar e o material genético é expulso do núcleo. Já após 1 hora de exposição, a mitocôndria e núcleo não podem mais ser observados e após 4 horas as hifas apresentam-se completamente desorganizados e todas as organelas e sistemas de membranas dissolvidos. Em relação à germinação de ascósporos sabe-se que os mesmos contêm grandes quantidades de dissacarídeo trealose na membrana, em conjunto com enzimas de trealose que não são metabolizadas até a ativação dos ascósporos mediante choque térmico. Sugere-se então que o calor juntamente com outras variáveis químicas está associado ao incremento na permeabilidade da membrana plasmática.

2.6.3. Atividade de água (Aw)

A atividade de água juntamente com a temperatura exerce influência significativa sobre o crescimento microbiano. Em pesquisa realizada por

Anagnostopoulo (1973) e citada por Anderson e Smith (1976), observou-se que o crescimento microbiano decresce à medida que a_w e temperatura são diminuídas.

A influência da a_w nos microrganismos é complexa e combina o efeito de fatores intrínsecos (potencial nutritivo, pH e componentes antimicrobianos como SO_2 , nitritos e nitratos) e fatores extrínsecos (temperatura, oxigênio, tratamentos químicos e irradiação) os quais variam em função do tipo de alimentos e microrganismos (Laroche *et al.*, 2005).

Blank *et al.* (1998) afirmam que a atividade de água é um dos parâmetros mais importantes que regem a resistência térmica de esporos de fungos, particularmente daqueles presentes nos alimentos. Neste enfoque são desenvolvidos estudos demonstrando que **a resistência em termos de tempo de redução decimal decresce com o aumento da atividade de água do alimento**. Contudo, poucas são as informações conhecidas sobre qual o impacto da a_w sobre as propriedades de resistência térmica dos esporos. Acredita-se, entretanto que, os esporos produzidos em níveis reduzidos de a_w tornam-se mais sensíveis ao calor, talvez devido a injúrias ou danos ocorridos durante a esporogênese. Laroche *et al.* (2005), citam Brown & Melling, 1971; Corry, 1973; Daemen, 1981 e Bera *et al.*, 1988, como pesquisadores que demonstraram ser o efeito da a_w inversamente proporcional à resistência térmica dos microrganismos, ou seja, quanto menor a a_w do meio maior a resistência térmica dos

microrganismos. Conclusão semelhante foi obtida por Valík & Piecková (2001) quando estudaram o efeito da aw sobre a resistência térmica de fungos, sendo que para estes autores, a germinação, crescimento e resistência térmica destes organismos podem ser reduzidos em baixos valores de aw.

Do ponto de vista microbiológico, a atividade de água é um fator dominante no controle da deterioração dos alimentos, porque o crescimento dos microrganismos é absolutamente dependente da disponibilidade de água livre, isto é, água não comprometida com ligações químicas, dissolução de solutos, etc. Assim, quanto menor for a atividade de água de um alimento, menor será a velocidade de multiplicação desses microrganismos, retardando a deterioração conseqüente de sua presença (Taniwaki & da Silva, 2001). O mesmo pode ser dito da deterioração em alimentos provocada por bolores, ou seja, esta deterioração também está associada a alimentos com altos teores de aw. Nestes alimentos, o crescimento dos bolores depende da aw que é uma função direta da formulação do produto, solutos utilizados e temperatura (Rosso & Robinson, 2001). Em adição pode-se citar Pardo *et al.* (2005) que realizaram pesquisa na qual avaliaram o efeito da aw e temperatura sobre o crescimento de *Aspergillus ochraceus*, concluindo que em condições de aw de 0,80 e temperatura de 20-30°C, não foi observado o crescimento micelial da linhagem.

Segundo Battey *et al.* (2001), a quantidade de sólidos solúveis em determinado meio, tem um efeito significativo sobre o crescimento de bolores. Com aumentos nas concentrações de açúcares do meio, o crescimento dos bolores torna-se menos favorecido. Incrementos na concentração de açúcar do meio causam ligeiras reduções nos teores de atividade de água.

A relação entre água e microrganismos é de especial importância para a indústria de alimentos. O fato é que cada microrganismo requer uma atividade de água ideal para seu crescimento e trabalhar com atividades de água diferentes desta ideal pode acarretar ausência de crescimento destes microrganismos com conseqüente preservação do alimento (Blaszyk *et al.*, 1998). Freqüentemente a *aw* de alimentos é suficientemente reduzida para restringir o crescimento de bactérias, mas insuficiente para impedir o crescimento de alguns bolores deteriorantes. Estes bolores podem ser potenciais produtores de micotoxinas tornando-se então uma séria preocupação na indústria alimentícia (Gibson *et al.*, 1994).

López-Malo *et al.* (1997) avaliaram o efeito da concentração de vanilina, pH, temperatura de incubação e atividade de água sobre o crescimento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ocraceus* e *Aspergillus parasiticus*, em meio de cultura sintético, trabalhando com uma faixa de atividade de água que variou de 0,98 a 0,92, ajustados através da adição de glicose e sacarose. Como resultados obtiveram que o tempo de

germinação e o crescimento radial foram significativamente influenciados pelas variáveis em estudo, sendo reduzidos em valores menores de aw.

Sob este enfoque, Cahagnier *et al.* (1993), desenvolveram pesquisa na qual estudaram como o crescimento e produção de conídios por *Aspergillus candidus* e *Penicillium implicatum*, em grãos de cereais, é afetado pela aw e temperatura. Como resultados obtiveram que, a temperatura constante (30°C) e aw de 0.82 e 0.90, a produção de conídios, medida através da biomassa micelial foi maior a aw de 0.90.

Guynot *et al.*(2003) avaliaram o efeito de atmosferas modificadas no empacotamento sobre a prevenção de deterioração, por linhagens de fungos filamentosos, dentre elas o *Aspergillus niger*, de produtos de padaria com diferentes níveis de pH e atividade de água (aw). Para tanto trabalharam com os valores de aw de 0.80, 0.85 e 0.90, pH de 6 e 7.5 e diferentes composições de gases. Os resultados demonstraram que os níveis de aw de 0.80 a 0.90 obtiveram influência significativa sobre o crescimento dos fungos. No nível de aw de 0,85 a fase de adaptação aumentou 2 vezes quando o nível de CO₂ do espaço livre aumentou de 0 para 70%.

2.6.4. pH

Panagou *et al.*(2003) relataram que o pH juntamente com temperatura e aw são os principais fatores controladores do crescimento de microrganismos deteriorantes em alimentos. Uma combinação adequada

entre estes três fatores pode controlar, por exemplo, o crescimento de fungos, durante o período de estocagem dos alimentos.

É amplamente difundido que os bolores apresentam uma larga faixa de pH para crescimento e desenvolvimento. Sabe-se ainda que na faixa de pH entre 5.5 e 7.5, em meio de cultura sintético, os bolores não têm seu crescimento afetado. Todavia, em faixas de pH mais baixas, já foi reportado que em pH abaixo de 4.0, *Aspergillus flavus*, tem sua produção de micélio reduzida em 50% (López-Malo *et al.*, 1997).

Taniwaki & da Silva (1996), estudaram o efeito do pH sobre o desenvolvimento de fungos termoresistentes em suco de uva ajustado com o ácido tartárico e NaOH. Quando aquecidos em pH 2.5, cepas de *B. fulva* e *Aspergillus* (WR1) exibiram baixa resistência. O valor máximo de resistência foi observado em pH entre 3.0-4.0 para cepas de *B. fulva*, sendo que, acima desses valores as cepas tornaram-se mais sensíveis ao processamento térmico a medida que ocorria acréscimo no valor do pH.

Taniwaki & da Silva (1996) demonstraram ainda o efeito do pH na produção de ascósporos, sendo o pH ótimo encontrado menor do que 3,0 e entre 4.0 – 8.0 em caldo de extrato de malte. O uso de ácido tartárico, que promoveu a menor produção de biomassa, levou a uma máxima produção de ascósporos, enquanto que o ácido málico, que promoveu o melhor crescimento, induziu apenas a uma pequena queda na produção de ascósporos.

Em pesquisa desenvolvida por Panagou *et al.* (2003), foram modelados os efeitos da temperatura, pH e aw sobre o crescimento de *Monascus ruber*, um fungo termoresistente isolado de azeitonas verdes. Como resultados obtiveram que, em altas concentrações de NaCl, ou seja, baixos valores de aw, a máxima taxa de crescimento decaía à medida que o pH era reduzido de 5 para 3,5.

Linhagens de *Aspergillus niger* quando cultivadas em meios com altos valores de aw podem apresentar crescimento até em faixas de pH ao redor de 2.0 (Pitt & Hocking, 1981). Contudo, López-Malo *et al.* (1997) reportam que linhagens de *Aspergillus* são capazes de crescer em faixas de pH entre 4 e 7, e quando este valor é menor que 3, ocorre uma significativa redução no crescimento destes bolores.

Segunda Parte: Microbiologia Preditiva

2.7. Histórico

O uso de modelos matemáticos na microbiologia de alimentos começou aproximadamente em 1920, com o desenvolvimento de métodos para calcular o tempo de destruição térmica de microrganismos, sendo que, na época estes modelos revolucionaram a indústria de enlatados (Nakashima *et al.*, 2000). Já para Jagannath & Tsuchido (2003), o conceito de microbiologia preditiva é novo em sua aplicação ao longo da história. Esta aplicação data de 1922, quando Esty & Meyer utilizaram modelos matemáticos para determinar a sobrevivência de microrganismos.

Contudo, para Nakashima *et al.* (2000), a aplicação de técnicas de modelagem preditiva para o crescimento e sobrevivência de microrganismos em alimentos não recebeu muita atenção até a década de 80. A partir de então foi notado o crescente interesse em sua aplicação em decorrência a dois fatores:

- aumento marcante da incidência de importantes surtos de intoxicação alimentar durante a década de 80, ocasionando um aumento acentuado da preocupação pública em requerer o fornecimento de alimentos seguros e saudáveis;

- a conscientização por parte dos microbiologistas de alimentos de que os métodos microbiológicos tradicionais para a determinação da qualidade e segurança de alimentos eram limitados pelo tempo necessário para se obter um resultado e tinham, portanto, pouco valor preditivo; e os métodos indiretos baseados em mudanças químicas, físicas ou físico-químicas exigiam um número muito elevado de células para fornecer uma resposta, o mesmo ocorrendo com muitos métodos rápidos propostos.

Nakasima *et al.* (2000) citam Buchaman (1993) que aponta um terceiro fator como contribuidor do aumento no interesse da aplicação do conceito de microbiologia preditiva: a crescente facilidade de acesso aos computadores, visto que as ferramentas estatísticas, matemáticas e microbiológicas já existiam, mesmo antes da expansão dos estudos em modelagem. Sendo assim, todo o esforço em se trabalhar com a pesquisa

perderia o valor se não existisse a oportunidade de se solucionar de forma rápida as complexas equações de modelagem.

O artigo publicado em 1983, por Roberts & Jarvis pode ser considerado, como o marco inicial da microbiologia preditiva. Neste artigo, é questionado se o conhecimento obtido a partir da abordagem tradicional da microbiologia de alimentos seria suficiente para se obter uma resposta de crescimento dos microrganismos, em condições reais de estocagem (Roos & McMeekin, 1994; Nakashima *et al.*, 2000).

Já para McDonald & Sun (1999), tradicionalmente a segurança microbiológica de alimentos era estabelecida por meio de testes de desafio. Estes testes simulavam os efeitos de condições ambientais do alimento sobre o crescimento e proliferação de microrganismos, muitas vezes patogênicos. Eles eram utilizados até mesmo para prever o tempo de prateleira de alimentos. Contudo, estes testes exigem critério na expansão dos resultados, são trabalhosos além de despenderem muito tempo. Assim, para os autores, a partir das deficiências encontradas nos testes de desafio e da necessidade em simular condições para prever o crescimento de microrganismos alvo em alimentos, surgiu a Microbiologia Preditiva.

Muitos autores sugerem que a origem dos modelos preditivos para alimentos foi desenvolvida por Esty & Meyer, em 1922, para descrever um processo térmico suficiente para destruir uma suspensão de esporos de *C.botulinum* tipo A, com contagem de 10^{12} esporos/mL. Este modelo

descrevia um processo com uma ampla margem de segurança o que impediu, de certa forma, a difusão do modelo (McMeekin & Ross, 2002). Estes autores ainda dizem que a microbiologia preditiva “moderna” teve início entre os anos 60 e 70 quando os modelos cinéticos eram utilizados para descrever problemas de deterioração em alimentos e os probabilísticos utilizados para descrever problemas mais específicos, como o botulismo e outras intoxicações.

2.8. Definição

A Microbiologia Preditiva em alimentos pode ser definida como uma ciência multidisciplinar e emergente da microbiologia de alimentos. Ela engloba disciplinas como matemática, microbiologia, engenharia e química para o desenvolvimento e aplicação de modelos matemáticos que predigam a resposta de microrganismos em condições ambientais específicas (McDonald & Sun, 1999).

Sob este enfoque, Jagannath & Tsuchido (2003) definem a Microbiologia Preditiva como sendo a aplicação da pesquisa com a preocupação de quantificar a ecologia microbiana dos alimentos. Sendo assim, ela se baseia na premissa que as respostas de populações de microrganismos a fatores ambientais são reprodutíveis, e que, a partir da caracterização do ambiente mediante estes fatores que afetam o crescimento e sobrevivência microbiana, é possível, prever novas respostas dos microrganismos, em ambientes similares.

Para Pin & Baranyi (1998), a microbiologia preditiva em alimentos pode ser definida como uma ciência focada na modelagem da resposta microbiana, no que diz respeito ao ambiente do alimento, a segurança alimentar e na prevenção de deterioração. Assim sendo, os modelos preditivos são elaborados e publicados com o intuito de se descrever o crescimento de uma linhagem ou mistura de linhagens em condições ambientais características do alimento, sendo que, devido a grande variabilidade de microrganismos deteriorantes de alimentos, a elaboração dos modelos preditivos que predigam a resposta destes microrganismos é menos clara que os desenvolvidos para patogênicos e ainda sua aplicação é mais limitada.

2.9. Forma geral de um modelo preditivo

Para se compreender a microbiologia preditiva é necessária certa familiaridade com a terminologia matemática e estatística (Nakashima & *et al.*, 2000).

Para McMeekin *et al.* citados por Nakashima *et al.* (2000) um modelo de regressão, seja linear ou não linear, consiste de dois componentes, à parte determinística e a estocástica. A determinística representa a relação entre a variável resposta e a exploratória. Já a parte estocástica representa o erro indicado pela letra 'ε', ou seja, o quanto a resposta esperada se desvia da observada ou real, conforme representado na equação 1.

$$Y = \alpha + \beta_1 X_1 + \dots + \beta_p X_p + \varepsilon$$

Equação 1

Onde: Y = variável dependente;

α = média ou intercepto;

$X_{1...p}$ = variáveis independentes;

$\beta_{1...p}$ = coeficientes estimados pelo modelo

Estes coeficientes quantificam a relação entre a resposta e as variáveis independentes, sendo estimados através dos dados experimentais. Eles ainda devem ser ajustados para minimizar a diferença entre a resposta observada e a prevista pelo modelo (resíduo) (Nakashima *et al.*, 2000).

2.10. Metodologia para desenvolvimento de modelos preditivos

Em alimentos, como não se conhece o tipo, concentração dos nutrientes, microrganismos presentes, os modelos matemáticos definidos para avaliar sua segurança e qualidade se tornam empíricos. Todavia, apesar de empíricos, estes modelos são baseados em técnicas de regressão linear e não-linear (Nakashima *et al.*, 2000).

Para Draper & Smith (1981) e Farber (1986), citados por Nakashima *et al.* (2000), são cinco os estágios para o desenvolvimento de modelos preditivos, sendo estes definidos como: Planejamento, coleta e análise de dados, descrição matemática, validação e manutenção. Segue descrição de cada uma das etapas.

➤ **Planejamento**

Nesta etapa devem ser definidas características relacionadas à variável dependente, à variável independente, ao inóculo e ao modelo experimental.

❖ Variável (eis) independente(s)

Segundo Whiting (1997), citado por Nakashima *et al.* (2000), o comportamento microbiano em um alimento é determinado basicamente por 3 a 5 fatores principais, sendo eles: temperatura, pH, aw e atmosfera. Já para McMeekin & Ross (2002), podem ser incluídos ainda a concentração de nitrito de sódio e de ácidos orgânicos, como fatores que geralmente compõem os modelos.

Cabe ressaltar que, a faixa de variação dos fatores ambientais deve incluir os valores de interesse ao usuário do modelo. A utilização de valores das variáveis independentes fora da faixa de estudo para o desenvolvimento do modelo é extremamente perigoso (Whiting, 1997, citado por Nakashima *et al.*, 2000).

❖ Variável dependente

A resposta primária medida é usualmente a mudança da densidade da população microbiana ao longo do tempo. Para tanto, a velocidade de mudança é usualmente expressa como velocidade de crescimento, podendo também ser representada pelo período de duração

da fase lag, ou tempo de geração ou ainda como o tempo necessário para a população atingir determinada densidade.

O número de pontos, ou seja, a quantidade de valores da variável de resposta, necessários para ajustar um modelo de crescimento ou inativação depende da complexidade desse modelo. Sendo assim, McMeekin *et al.* (1993) indicam que os pontos devem ser apropriadamente distribuídos e variar entre 10 a 15.

❖ Inóculo

Nakashima *et al.* (2000) sugeriram que a mistura de cepas aumenta a probabilidade de se criar um modelo representativo da situação real do alimento, sendo que, em geral, o tamanho do inóculo parece não afetar a velocidade de crescimento exponencial ou a população máxima atingida. Contudo, a duração da fase de adaptação pode ser influenciada pelo tamanho do inóculo, dependendo do limite de detecção do método de determinação da variável de resposta a ser modelada.

❖ Modelo experimental

Para McMeekin *et al.* (1993), o sistema operacional utilizado no desenvolvimento de modelos preditivos é sempre baseado em um meio de crescimento que pode ser laboratorial ou o próprio alimento. Sendo assim, os modelos cinéticos podem ser melhor desenvolvidos partindo-se da variável dependente a intervalos pequenos das variáveis independentes, em um meio líquido de laboratório; passando-se por uma comparação dos

dados obtidos de um crescimento no alimento, com as previsões do modelo original; e, por fim, ajustar, se necessário, o modelo original, a partir dos resultados obtidos.

➤ **Coleta e análise de dados**

Os dados do crescimento microbiano podem ser obtidos de maneira direta ou indireta, dependendo do microrganismo em estudo. López *et al.* (2004) desenvolveram pesquisa na qual avaliaram 56 curvas de crescimento. Quando estas curvas representavam o crescimento de algumas bactérias e fungos, os dados de entrada para sua elaboração foram obtidos em termos de unidades formadoras de colônia e incrementos no diâmetro final das colônias, respectivamente (método direto), enquanto que na aquisição de dados para elaboração de curvas de crescimento para outras linhagens de bactérias eram utilizados os métodos de turbidimetria e condutividade.

Nakashima *et al.*(2000), explicaram que os métodos de medida do crescimento de microrganismos em microbiologia preditiva, devem ser empregues para se identificar cada uma das fases de crescimento dos microrganismos e definem estes métodos como diretos e indiretos. Sendo assim, os métodos diretos distinguem e contam individualmente os microrganismos, enquanto que nos métodos indiretos, são medidas as propriedades da população total, com a vantagem de apresentarem capacidade de monitorar várias amostras ao mesmo tempo.

➤ **Descrição matemática**

A escolha de uma função para descrever uma determinada resposta é um caminho estatístico considerando que se está lidando com estimativas da resposta real. O processo de ajuste de uma função está baseado no princípio dos mínimos quadrados. Assim sendo, os modelos matemáticos podem ser classificados em lineares e não-lineares, de acordo com seus parâmetros. Uma importante consequência da não linearidade de um modelo de regressão é que os estimadores de mínimos quadrados dos seus parâmetros não possuem as propriedades estatísticas desejáveis dos correlatos nos modelos de regressão linear (McMeekin *et al.*, 1993). Portanto, para Nakashima *et al.*(2000), a habilidade de se obter a estimativa dos parâmetros de uma regressão não-linear depende, em parte, da estimativa inicial dos parâmetros.

➤ **Validação dos modelos preditivos**

Após o desenvolvimento de modelos preditivos através da utilização de dados experimentais, o modelo deve ser validado em situações reais, sendo esta uma fase crítica para que o modelo tenha confiabilidade (McDonald & Sun, 1999).

Para McElroy *et al.* (2000) a validação de modelos preditos é essencial para que os mesmos tenham confiabilidade. Esta validação inclui a habilidade de entender o significado das incoerências existentes nas possíveis previsões realizadas pelos modelos. Em adição, Nakashima *et al.*

(2000) dizem que a validação de modelos preditivos é imprescindível para que os mesmos possam ser aplicados a novas situações e prever com exatidão a resposta dos microrganismos. Entretanto, independentemente do quanto um modelo se ajusta ao conjunto de dados que o geraram, o seu valor real está baseado no quão bem ele pode prever a variável resposta, sob condições não testadas especificamente para derivá-lo. Sendo assim, o último teste de qualquer modelo é a avaliação de sua habilidade em prever respostas a novas situações.

Ainda segundo McElroy *et al.* (2000), uma forma de se avaliar a qualidade dos modelos preditivos é através do cálculo dos fatores de bias e de exatidão. O fator de bias atesta o quanto os valores preditos pelo modelo, encontram-se na região denominada segura ou na região perigosa da predição. Já o fator de exatidão indica a precisão dos valores preditos pelo modelo em relação aos valores observados.

Para Ross (1996), o fator bias é descrito pela equação 2 e o fator exatidão é descrito pela equação 03.

$$bias = 10^{(\sum \log(predito / observado) / n)}$$

Equação 2

$$exatidão = 10^{(\sum |\log(predito / observado)| / n)}$$

Equação 3

Uma perfeita concordância entre os valores preditos pelo modelo e os observados experimentalmente é conseguida quando o fator bias é igual a 1. Assim sendo, valores maiores que 1 indicam que o modelo encontra-se na região perigosa da predição. Já para o fator exatidão, valores acima de 1 indicam a porcentagem de variação entre os dados preditos e observados (Ross, 1996).

Para Baty & Delignette-Muller (2004), a performance dos modelos preditivos pode ser avaliada através de vários índices estatísticos, como por exemplo, o erro padrão residual, composto pela soma de quadrados residual, número de dados e número de parâmetros. Já para López *et al.* (2004), a performance de modelos preditivos pode ser avaliada em termos de resíduos, quando se considera distribuição residual, fator de bias e correlação de série, ou ainda em termos de ajuste do modelo, quando se considera o quadrado médio residual, fator exatidão e teste F.

2.11. Características desejáveis em um modelo preditivo

Para McMeeking *et al.*, 1993 e Ratkowsky, 1993, citados por Nakashima *et al.* (2000), a comparação de modelos preditivos se dá sob a luz de sete critérios básicos que podem ser entendidos como sendo as características desejáveis de modelos preditivos:

- a. *Bom ajuste da função de dados (goodness-of-fit):* a este critério é atribuída à capacidade da função de descrever o comportamento de microrganismos de

interesse em situações reais, quanto maior esta capacidade de ajuste melhor o modelo;

b. *Parcimônia*: quanto maior o número de parâmetros em um modelo de regressão não-linear, maior a extensão de seu comportamento não linear, ou seja, as características estatísticas dos estimadores dos parâmetros estarão mais distantes das características desejáveis. Assim sendo, na escolha de modelos deve-se sempre optar por aqueles que possuam o menor número de parâmetros, considerando-se que estes possuem maior facilidade de reprodução;

c. *Propriedades dos estimadores dos parâmetros*: o fato de um modelo ajustar-se bem aos dados coletados não garante que as propriedades dos estimadores de seus parâmetros sejam adequadas. Portanto, uma reparametrização, ou seja, uma alteração na forma na qual os parâmetros aparecem em um modelo, é a melhor maneira de se melhorar as propriedades dos estimadores de parâmetros deste modelo.

Uma das principais características que um modelo deve conter é a *parcimônia*, ou seja, dentre todos os modelos preditivos que explicam determinado fenômeno, deve-se optar pelo mais simples, que contenha o menor número de parâmetros possível. Esta preferência se deve ao fato de que, modelos mais simples são mais fáceis de se testar através de replicações, além do que são menos custosos, quando utilizados na prática, e mais fáceis de se entender, permitindo uma avaliação mais precisa dos coeficientes que os compõem.

O intervalo de aplicabilidade é a segunda característica desejável de modelos preditivos, ou seja, o modelo deverá ser bom o suficiente para descrever todo o espectro do acontecimento.

A normalidade dos erros é a última característica a se considerar. Para que um modelo preditivo seja considerado como válido é necessário que os erros, ou as diferenças entre os dados reais e preditos pelo modelo, possuam uma distribuição normal, com média o mais próximo possível de zero.

2.12. Modelagem Matemática

O termo modelo foi definido em diversas e excelentes revisões de modelagem matemática de processos microbiológicos. O termo modelo matemático é mais rigoroso e se refere a um conjunto básico de hipóteses nos processos estudados, alguns deles são possivelmente expressos por meios de funções e equações (diferenciais). Portanto, de um ponto de vista

mecanístico, função e modelo não são termos equivalentes. Função é uma abstração matemática que torna mais fácil a descrição de um modelo particular (Baranyi & Roberts, 1995).

Microbiologia preditiva tem sido considerada geralmente, sob duas partes principais. Os *modelos cinéticos* que têm por objetivo representar a proporção e a taxa de crescimento dos microrganismos de referência, e os *probabilísticos* que tem por objetivo prever a probabilidade de ocorrência de alguns eventos, como a germinação de esporos ou a detecção da quantidade de toxina a ser formada, num conhecido período de tempo (Ross & McMeekin, 1994). Para Jagannath & Tsuchido (2003), os modelos preditivos podem ser classificados ainda sob o ponto de vista de realizarem aproximações empíricas, onde os dados são convertidos em relações matemáticas, ou mecanísticas, que constroem bases teóricas para interpretação de respostas em termos de fenômenos conhecidos; e através das variáveis independentes, consideradas na modelagem, em primários, secundários e terciários.

A classificação dos modelos preditivos é baseada no comportamento da população de microrganismos. Esta classificação descreve e abrange modelos de crescimento, modelos de limites de crescimento (interface) e modelos de inativação (McMeekin & Ross, 2002).

Delignette-Muller *et al*, 1995, dizem que os modelos podem ser utilizados para prever a vida-de-prateleira de novos produtos quando fatores

físicos e químicos do produto e a microbiota são conhecidos. Para este autor, existem três tipos de modelos principais que têm sido desenvolvidos: Modelo de Arrhenius, Modelo da raiz quadrada e Modelos polinomiais, sendo que os dois primeiros analisam o crescimento microbiano em função da temperatura e o último, considera o efeito de diversos fatores como pH, aw, concentração de agentes antibacterianos, etc.

Todos esses modelos têm por objetivo a predição da segurança microbiana ou a vida-de-prateleira. Assim, as predições devem ser seguras, e, portanto o conhecimento da precisão da predição é essencial (Delignette-Muller *et al*, 1995).

Para López-Malo & Palou (2000), as formas de modelagem de crescimento mais utilizadas são as de regressão logística e polinomial.

Ainda segundo os mesmos autores, os modelos probabilísticos baseados em regressão logística proporcionam um caminho útil para descrever as interfaces de crescimento e não crescimento e podem ser utilizados para explorar os efeitos das condições ambientais sobre as respostas de microrganismos. Já os modelos polinomiais são utilizados para modelar os parâmetros cinéticos de crescimento dos microrganismos, como tempo de adaptação, população máxima e taxa de crescimento.

2.13. Níveis de modelos

2.13.1. Nível primário

De acordo com McMeekin & Roos (2002), considera-se que o nível primário dos modelos corresponda a modelos matemáticos que descrevem a mudança do número de microrganismos em função do tempo. Já para López *et al.*(2004), o nível primário de modelos é composto por uma equação ou função utilizada para descrever a resposta microbiana ao longo do tempo parametrizando valores. Estas respostas microbianas podem ser expressas em termos de números de microrganismos, ou seja, concentração de unidades formadoras de colônias, ou ainda, através de densidade óptica, como um método indireto de quantificação.

O modelo mais utilizado para descrever curvas de crescimento é o de Gompertz, modificado por Zwietering *et al.* (1991), Equação 4. Nesta modificação, segundo McDonald & Sun (1999), o modelo foi reparametrizado e nele foram incluídos três parâmetros novos: o tempo de adaptação, a taxa de crescimento específica e a máxima população do microrganismo em estudo.

Sob este enfoque, Gibson *et al.* (1994), reportaram que estas curvas também podem ser obtidas pela equação de Baranyi (Baranyi & Roberts, 1995), representada pela equação 5. Cabe ressaltar que em pesquisa realizada por López *et al.* (2004) na qual os autores realizaram uma avaliação estatística dos modelos de crescimento microbiano, obtidos

através de medidas diretas e indiretas de população, na grande maioria dos casos o modelo de Baranyi obteve a melhor performance em termos de análises de resíduos (distribuição residual, fator de bias e correlação em série) e de qualidade de ajuste de dados (quadrado médio residual, fator exatidão e teste F, dentre outros). Sobretudo, o modelo de crescimento de Baranyi demonstra melhor comportamento para ajuste de dados, independentemente de variações nos critérios de avaliação de resultados. A preferência pela utilização do modelo de crescimento de Baranyi & Roberts em detrimento ao de Gompertz modificado é explicada também em pesquisa desenvolvida por Battey & Miller (2004), na qual constataram que o modelo de crescimento de Baranyi & Roberts obteve melhor performance no ajuste de dados que o modelo de Gompertz modificado. Além disso, este último apresentou grande inconsistência durante este ajuste.

Através dos modelos primários pode-se obter valores da taxa de crescimento de determinada população, estimar o tempo de adaptação e ainda a população máxima (Jagannath & Tsuchido, 2003).

$$y = A \cdot e^{-e^{\left\{ \left[\frac{\mu_m \cdot e}{A} (\lambda - t) \right] + 1 \right\}}}$$

Equação 4

Onde

y = diâmetro final da colônia

A= função de ajuste

$\mu_{\text{máx}}$ = taxa máxima de crescimento

λ = tempo de adaptação

$$y(t) = y_0 + (\mu_{m\acute{a}x} \cdot A(t)) - \ln\left(1 + \frac{e^{\mu_{m\acute{a}x} \cdot A(t)} - 1}{e^{y_{m\acute{a}x} - y_0}}\right)$$

Equação 5

Onde:

- $y(t)$ = diâmetro final da colônia
- $\mu_{m\acute{a}x}$ = taxa máxima de crescimento
- y_0 = diâmetro inicial
- $y_{m\acute{a}x}$ = diâmetro máximo da colônia
- $A(t)$ = função de ajuste

O modelo de Baranyi & Roberts supõe que, após certo período de ajuste da população, a taxa de crescimento se torna constante e uma assíntota superior pode ser acomodada, descrevendo uma fase linear de crescimento, ou seja, a fase exponencial do crescimento pode ser representada como uma reta (Gibson *et al.*, 1994).

Já o modelo de Gompertz modificado tem sido utilizado extensivamente, pois se acredita que suas equações descrevem suficientemente os dados de crescimento microbiano, além de serem de fácil utilização. Entretanto, muitos estudos concluem que o modelo de Gompertz modificado demonstra desvios sistemáticos no ajuste de dados de crescimento microbiano (López *et al.*, 2004).

2.13.2. Nível Secundário

De acordo com McMeekin e Ross (2002), a modelagem secundária tem por objetivo considerar o efeito individual de cada fator, mas em diferentes situações, sendo necessário considerar a maneira pela qual diferentes fatores interagem restringindo o crescimento microbiano.

Já para Nakashima *et al.* (2000), o nível secundário da modelagem envolve equações que descrevem como as respostas dos modelos primários (duração da fase de adaptação, velocidade de crescimento e densidade máxima da população), mudam com alterações de fatores ambientais. Quando um grupo específico de alimentos está sendo modelado, particularmente quando a temperatura for o fator primário de interesse, como é freqüentemente o caso, estas equações podem ser baseadas nas equações de Arrhenius ou de Bélerádek (modelo da raiz quadrada). A equação de Arrhenius assume que a velocidade de crescimento é controlada pela velocidade limite de uma única reação enzimática. Já no modelo de Bélerádek na relação linear existente além da temperatura, a raiz quadrada da velocidade de crescimento, que se situa abaixo da velocidade de crescimento ótima para o microrganismo. Para este modelo, é assumido que os fatores ambientais são independentes, ou seja, que não existe interação entre eles.

➤ ***Modelagem secundária Polinomial (Modelos de superfície de resposta)***

Para Peña (2005), os modelos polinomiais podem ser definidos como modelos que representam aproximações empíricas entre a variável resposta e as variáveis independentes. Os modelos de crescimento ou morte microbiana, construídos em microbiologia preditiva, utilizam polinômios para relacionar parâmetros em função de variáveis individuais e independentes, tais como temperatura, pH e A_w .

A metodologia de superfície de resposta (*Response Surface Methodology*) é definida por Neto *et al.* (2002), como sendo uma técnica de otimização baseada em planejamentos fatoriais, introduzida nos anos 50 e que desde então tem sido utilizada com grande sucesso na modelagem de processos. Ainda segundo os mesmos autores, esta metodologia é composta por duas etapas distintas: a *modelagem* e o *deslocamento*, que deve ser repetido tantas vezes quanto necessário com o objetivo de se atingir a região ótima da superfície investigada. Esta modelagem é feita ajustando-se modelos, lineares ou quadráticos, a respostas obtidas com planejamentos fatoriais ou planejamentos fatoriais ampliados. Assim, o deslocamento na superfície será ao longo do caminho de máxima inclinação de um determinado modelo, ou seja, da trajetória na qual a resposta varia de forma mais pronunciada.

Os modelos polinomiais geram superfícies de resposta que descrevem o comportamento do microrganismo frente as variáveis em estudo. Assim sendo, a equação geral dos modelos polinomiais, segundo Ross & McMeekin (1994), está descrita na Equação 6.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad \text{Equação 6}$$

Onde:

$\beta_0 \beta_1 \beta_2 \dots \beta_{ij}$ são parâmetros a serem estimados e $X_1, X_2 \dots X_{ij}$ são as variáveis a serem estudadas; Y é a variável resposta e ε , o erro.

2.13.3. Modelagem Terciária

Este nível de modelagem compreende a utilização de *software* que convertem os modelos primários e secundários em programas amigáveis de uso fácil (Peña, 2005).

No entanto, o sucesso do uso de modelos pela indústria para aplicações específicas depende do desenvolvimento de tecnologias apropriadas para a sua aplicação (McMeekin & Roos, 2002).

Como exemplo destes programas podem ser citados Combase, SSP (Sea Food Spoilage Predictor), Food Micromodel (FMM), Pathogen Microbial Model (PMP) e Growth Predictor & *Perfringens* Predictor.

❖ **Combase**

Combase pode ser definido como uma base de dados crus que ajudam a gerar respostas microbianas, a diferentes condições ambientais, utilizando para tanto ferramentas específicas ou combinadas (Baranyi, 2006). Ele foi lançado na 4ª Conferência Internacional de Modelagem Preditiva em alimentos, realizado em junho de 2003, na França.

Na geração de respostas o Combase utiliza dados de modelos preditivos, como PMP, Growth Predictor, SeaFood Spoilage Predictor, dentre outros, links de outras bases de dados de predição (Antimicrobial on line) e ferramentas de análises de risco. Na base de dados, o pacote conta com 24000 gravações de curvas de crescimento e sobrevivência de microrganismos, que abrangem microrganismos deteriorantes, taxas de crescimento/morte e microrganismos patogênicos. Alguns exemplos de microrganismos que podem ser citados são: *Bacillus cereus* (esporos e células vegetativas), *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* e *innocua*, *Staphylococcus aureus*, etc., além da total microbiota contaminante de bactérias psicotróficas em carnes (Baranyi, 2006).

❖ **Sea Food Spoilage Predictor (SSP)**

O *Seafood Spoilage Predictor* é um *software* que foi desenvolvido para os modelos cinéticos de crescimento de microrganismos deteriorantes específicos de origem marinha e para a taxa relativa de crescimento dos mesmos (Daalgard *et al.*, 2002). Dentre os mais atuais se encontram os modelos desenvolvidos para *Photobacterium phosphoreum*, um modelo

polinomial e quadrático e o modelo de raiz quadrada para *Shewanella putrefaciens* (Ministry of Food, Agriculture and Fisheries, 2006).

❖ **Food MicroModel (FMM)**

O software FMM foi desenvolvido pelo Ministério de Agricultura, Pesca e Alimentos (MAFF – Reino Unido) e contempla equações preditivas para o crescimento, sobrevivência e morte de patógenos e deteriorantes, tais como *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus cereus*, dentre outros (McClure, et al., 1994).

As curvas de crescimento foram desenvolvidas em meios líquidos homogêneos, para o crescimento dos microrganismos se desse mais rápido que o observado em alimentos, assim o programa poderia gerar previsões seguras (Giffel & Zwietering, 1999).

❖ **Pathogen Microbial Model (PMP)**

O software PMP lança mão do uso de parâmetros obtidos pelo modelo de Gompertz por reparametrização para gerar as superfícies de resposta (Buchanan et al. 1989).

Este software foi desenvolvido primeiramente para prever o efeito da concentração de Nitrito de Sódio (NaNO_2), no crescimento de *Listeria monocytogenes* em carnes curadas, com uma combinação de pH ácido, embalagem a vácuo, alta concentração de sal e refrigeração adequada (Buchanan et al. 1989).

A versão 7.0, mais atual do software PMP, engloba: *i. modelos de crescimento* para: *Aeromonas*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, etc.; *ii. Modelos de inativação térmica* para: *Clostridium botulinum*, *E.coli* e *Listeria monocytogenes*; *iii. Modelos de irradiação gama* para: *Salmonella typhimurium* e *E.coli*, *iv. Modelos de tempo para intoxicação* para *Clostridium botulinum*, dentre outros (USDA, 2005).

❖ **Growth predictor & Perfringens Predictor**

Growth predictor se originou de uma série de modelos para predição do crescimento de microrganismos como função de fatores ambientais, incluindo temperatura, pH e aw. Alguns modelos também incluem um quarto fator adicional, como concentração de CO₂ ou concentração de ácido acético. Cabe ressaltar que modelos de morte também são abrangidos pelo Growth predictor. Já o software Perfringens Predictor, é utilizado na predição do crescimento de *Clostridium perfringens*, durante o resfriamento ou congelamento de carnes (IFR, 2006).

2.14. Aplicações de Modelos Preditivos

Para Jaganath & Tushido (2003), os modelos preditivos podem ser usados para promover a eficiência do sistema através da construção de programas testes e nomeação de áreas críticas para pesquisas.

O estabelecimento de limites e respostas em Análise de Riscos e Pontos Críticos para Controle requer dados científicos. Neste contexto de perigos

microbiológicos, as informações dadas por modelos preditivos incrementam informações de pontos de risco já conhecidos. Assim, quando existe, por exemplo, um limite de contaminação para um ponto em particular, pode-se através de modelos preditivos, se especificar combinações de fatores, tais como pH, tempo e temperatura, que minimizem o risco naquele local, fazendo com que se trabalhe mais distante do limite especificado (McMeekin & Ross, 2002). Sob este enfoque, os mesmos autores ainda dizem que com relação aos perigos microbiológicos, a microbiologia preditiva auxilia a APPCC, pois proporciona uma ligação, em tempo real, entre medidas, utilizadas para monitorar processos, e o potencial para crescimento ou morte de microrganismos específicos do contexto. Assim sendo, aos modelos preditivos cabe o papel de auxiliar a APPCC em vários pontos:

- *Análise de perigos ou riscos*, principalmente os modelos de interface de crescimento / não crescimento, na identificação de pontos críticos de controle;
- *Definindo o processo* em termos de parâmetros como temperatura, pH, aw etc., identificando combinações que favoreçam o crescimento ou morte dos microrganismos alvo;
- *Especificação de limites* sugerindo alterações no processo em decorrência de riscos emergentes ou por incrementos em riscos já existentes;

➤ *Especificação de ações corretivas:* caso ocorra uma perda de controle em algum dos pontos críticos de controle, a mudança na população de microrganismos associada ao desvio no processo, pode ser um indicativo para quantificar e especificar a medida de controle apropriada a se tomar.

Para Nakashima *et al.*(2000), a aplicação dos modelos preditivos pode ser desenvolvida nos seguintes aspectos:

- **Educação:** Os modelos podem auxiliar no comportamento microbiano a pessoas técnicas ou não, devido a sua habilidade em ilustrar rapidamente os efeitos ambientais sobre o comportamento dos microrganismos.
- **Desenvolvimento de produtos:** As conseqüências microbianas decorrentes de alterações na composição ou processamento podem ser avaliadas rapidamente. Os modelos de crescimento podem auxiliar na definição de prazos de validade.
- **Análise dos dados e planejamento laboratorial:** Técnicas de modelagem estão se tornando uma ferramenta de rotina para descrição e análise de dados microbiológicos. A eficiência de laboratórios aumenta quando se utilizam modelos para delinear os experimentos.
- **Controle de Qualidade:** Estimativas quantitativas dos fatores ambientais, a diferentes níveis, indicam as faixas aceitáveis e podem

determinar os limites dos pontos críticos de controle de APPCC. Os modelos também são úteis quando uma anomalia, com uma elevação inesperada de temperatura, deve ser avaliada quanto às conseqüências microbianas.

- **Avaliação de risco (*Risk Assessment*):** A aplicação de modelagem de patógenos de origem alimentar é útil para se estimar a probabilidade de um alimento causar doença em um indivíduo, pois a técnica utilizada para este fim, a Avaliação de Risco (*Risk Assessment*), inclui a necessidade de informação sobre a velocidade de crescimento, destruição e/ou sobrevivência de microrganismos.

2.15. Microbiologia Preditiva do crescimento e/ou inativação de fungos

Alguns autores têm trabalhado com a modelagem, logística ou polinomial, do crescimento de fungos resistentes ao processamento térmico. Como a quantificação da população dos fungos via contagem direta muitas vezes, é impossível, devida a grande mobilidade e dispersão de seus esporos, desenvolveu-se o método da quantificação através de medida de incrementos diários no tamanho de suas colônias, sendo que estes dados são utilizados de maneira direta na modelagem, já que, em pesquisa realizada por Dantigny *et al.*(2005), foi constatado que não existem diferenças significativas entre os resultados gerados pelos dados de entrada utilizando a transformação logarítmica e não a utilizando, assim sendo, a

esta transformação freqüentemente utilizada para a modelagem da taxa de crescimento de bactérias, não se aplica à modelagem da taxa de crescimento de fungos.

Sob este enfoque pode-se citar Pardo *et al.* (2005) que modelaram os efeitos de aw e temperatura sob a germinação de isolados ocratoxigênicos de *Aspergillus ochraceus* em meio basal de café. Para a modelagem foram necessários os dados de crescimento, quantificados através de incrementos no diâmetro das colônias, medido no sentido horizontal e vertical, desenvolvidas no meio de cultura em placas de Petri, durante 30 dias. A partir dos dados foram gerados modelos de regressão linear para se obter as taxas de crescimento nas condições de temperatura e aw analisadas.

Panagou *et al.* (2003) modelaram os efeitos combinados de temperatura, pH e aw sob a taxa de crescimento de *Monascus ruber*, um fungo termoresistente isolado de azeitonas termicamente processadas e cultivado em meio de cultura sólido. Para avaliação do crescimento do fungo foi utilizado como base incrementos diários no diâmetro das colônias. Após estabilização das medidas, estes dados foram utilizados para a elaboração das curvas de crescimento na modelagem primária e os parâmetros de crescimento obtidos a partir desta modelagem foram utilizados na modelagem secundária.

Valík e Piecková (2001) modelaram o crescimento de fungos termoresistentes frente à aw em meio basal Agar sabouraud. Na avaliação

do crescimento utilizaram a medida diária do diâmetro, até estabilização, tanto na horizontal quanto na vertical, expresso em mm/dia. Estes dados foram modelados através dos modelos de Baranyi *et al.*(1993) e pela transformada Gibson *et al.* (1994).

Rosso & Robinson (2001) desenvolveram um modelo cardinal para descrever o efeito da a_w sob a taxa de crescimento de diversas linhagens de *Aspergillus*, *Eurotium amstelodami*, *Eurotium chavalieri* e *Xeromyces bisporus*, cultivados em Agar Sabouraud. As taxas de crescimento radial foram obtidas a partir de dados de incremento diário no diâmetro das colônias.

De maneira similar, Membré & Kubaczka (2000) desenvolveram um modelo primário para o crescimento de *Penicillium brevicompactum*, utilizando para tanto, dados de incrementos no diâmetro das colônias, até estabilização ou em um período de 50 dias, modelados segundo o modelo primário de crescimento de Baranyi & Roberts (1995).

Em trabalho conduzido por López-Malo & Palou (2000) foi modelada a interface de crescimento/não crescimento de *Zygosaccharomyces bailii*, em purê de manga, utilizando para tanto a regressão logística para prever a temperatura crítica de inibição do crescimento após 35 dias em pH 3.5, concentração de 1000ppm de sorbato de potássio (KS) ou benzoato de sódio (NaB) e em diferentes níveis de atividade de água, variando de 0,99 a

0,97. O modelo de regressão logística utilizado pelos autores está apresentado na equação 7.

$$g(x) = \beta_0 + \beta_1 t + \beta_2 T + \beta_3 aw + \beta_4 A + \beta_5 taw + \beta_7 tA + \beta_8 Taw + \beta_9 TA + \beta_{10} awA + \beta_{11} tTaw + \beta_{12} tawA + \beta_{13} tTA + \beta_{14} TawA + \beta_{15} tTawA$$

Equação 7

A partir da equação de regressão logística foi avaliada a significância dos coeficientes sendo eliminados do modelo os com probabilidade de 0 a maior que 0,1. Todas as probabilidades de crescimento foram calculadas utilizando a equação de regressão logística para avaliar as condições. Utilizando este modelo e com probabilidade de crescimento de 0,05, a temperatura foi mais crítica para altos valores de KS que para os de NaB. O uso de KS inibiu o crescimento da linhagem de levedura *Zygosaccharomyces bailii* para purê de manga após 30 dias de estocagem a temperatura de 6,4°C.

Gibson & Hocking (1997) citam Fang *et al.* (1994) que modelaram os efeitos combinados de quitosina e concentração de açúcar (°Brix) sobre o crescimento de *Aspergillus niger* e *Aspergillus parasiticus* em doces de mini-laranjas, variedade kumquat, com baixos teores de açúcar. O número de dias para visualizar o crescimento foi monitorado turbidometricamente e os fatores de significância bem como suas interações foram identificadas. Gerou-se então um modelo polinomial de segunda ordem para prever

vida de prateleira, representado por y (dias para se verificar o crescimento), mostrado na equação 8.

$$y = a + b[\text{chitosina}] + c(^{\circ}\text{Brix}) + d[\text{chitosina}]^2 + e[\text{chitosina}](^{\circ}\text{Brix}) + f(^{\circ}\text{Brix})^2$$

Equação 8

Cuppers *et al.* (1989) e Gibson *et al.* (1994) também utilizaram metodologia semelhante às citadas anteriormente para a quantificação do crescimento de fungos, desenvolvendo a partir dos dados, modelos matemáticos que descrevem a influência da a_w sobre o crescimento de diversas linhagens de fungos.

3. Nomenclatura

Y = variável dependente (ou de resposta)

$x_1 \dots x_p$ = variáveis independentes (ou preditivas ou explanatórias)

$\alpha, \beta_1 \dots \beta_p$ = parâmetros obtidos por regressão

ε = erro

n = número de ensaios

y = diâmetro final da colônia

$A(t)$ = função de ajuste do modelo

$\mu_{\text{máx}}$ = taxa máxima de crescimento ($\text{mm} \cdot \text{dia}^{-1}$)

μ = taxa de crescimento ($\text{mm} \cdot \text{dia}^{-1}$)

λ = tempo de lag (dias)

$y(t)$ = diâmetro final da colônia (mm)

y_0 = diâmetro inicial (mm)

$y_{\text{máx}}$ = diâmetro máximo da colônia (mm)

k = taxa de crescimento (mm^{-1})

T = temperatura ($^{\circ}\text{C}$)

T_{min} = temperatura mínima de crescimento ($^{\circ}\text{C}$)

T_{max} = temperatura máxima de crescimento, análoga a T_{min} ($^{\circ}\text{C}$)

c = coeficiente a ser estimado

$C_1 \dots C_4$ = coeficientes a serem calculados

V_1 e V_2 = fatores ambientais (a_w , temperatura absoluta ou pH)

$\beta_1 \dots \beta_i$ = coeficientes obtidos por regressão

x_i = variáveis analisadas

y = tempo de adaptação (λ ; dias)

$a, b \dots f$ = constantes geradas por regressão

[chitosina] = concentração de chitosina (inibidor de crescimento)

$^{\circ}\text{Brix}$ = concentração de sólidos solúveis

F_{cal}/F_{tab} = relação estatística do valor de F calculado dividido pelo valor de F tabelado

CYA = Czapeck Extrato de Levedura Agar

MEA = Extrato de Malte Agar

PDA = Batata Dextrose Agar

G25N = 25% Glicerol Nitrato Agar

esp./mL = esporos/mL

4. Referências Bibliográficas

1. ABREU, C.M.P. **Conservação de frutos pós-colheita.** Disponível em:

http://ctjovem.mct.gov.br/index.php?action=/content/view&cod_objeto=19132.

Acesso em: 02/05/2006.

2. ABDEL-SATER, M.A.; ZOHRI, A.A.; ISMAL, M.A. Natural contamination of some egyptian fruit juices and beverages by mycoflora and mycotoxins.

Journal of Food Science Technology. V.38, n.04. p.407-411. 2001.

3. AGROFRUIT. **Manga ubá.** Disponível em:

<http://www.mangauba.com.br/interna.asp?id=4>. Acesso em: 20/07/2005.

4. ANDERSON, J.G.; SMITH, J.E. Effects of temperature on filamentous fungi. In: **Inhibition and inactivation of vegetative microbes.** Ed.: F.A.

Skimer and W.B. Hugo. p.191-218. 1976.

5. BAGGERMAN, W.I.; SAMSON, R.A. Heat resistance of fungal spores.

In: **Introduction to Food-borne Fungi,** R.A. Samson & E.S. van Reenen-Hoekstra, eds. Baarn, Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, p. 262-267. 1988.

6. BAGLIONI, F. Estudo da ocorrência de fungos filamentosos termoresistentes em polpa de tomate envasada assepticamente. Campinas, 1998. 94p. Tese de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas.

7. BARANYI, J. **The ComBase project to pool food microbiology data and expertise.** Institute of Food Research, Norwich, UK. 9p. 2006.

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

9. BARANYI, J.*et al.* A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. **Food Microbiology**. V.10, p.43-59. 1993.

10. BATTEY, A.S. *et al.* Modelling mold spoilage in cold-filled ready-to-drink beverages by *Aspergillus niger* e *Penicillium spinulosum*. **Food Microbiology**. V.18, p.521-529. 2001.

11. BEUCHAT, L.R.; Hocking, A.D. Some considerations when analysing foods for the presence of xerophilic fungi. **Journal of Food Protection**, v. 53. p.984-989. 1990.

12. BEUCHAT, L.R.; PITT, J.I. Detection and Enumeration of Heat Resistant Molds. In: **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. APHA: 4^aed. p. 217-222. 2001. Washington, DC. American Public Health Association.
13. BEUCHAT, L.R. Thermal inactivation of yeasts in fruit juices supplemented with food preservatives and sucrose. **Journal of Food Science**. V.47, p.1679-1682. 1989.
14. BLANK, G.; YANG, R.; SCANLON, G. Influence of sporulation aw on heat resistance and germination of *Penicillium roqufort* spores. **Food Microbiology**, v. 15, p. 151-156. 1998.
15. BLASZYK, M. *et al.* Reduced water activity during sporogenesis in selected penicillia: impact on spore quality. **Food Research International**. V.31, n.6-7, p.503-509. 1998.
16. BOLETIM TÉCNICO, IAC 200. **Frutíferas – manga**. 1998. Disponível em:
[http://www.iac.sp.gov.br/Centros/centro%20de%20fruticultura/FRUTIFERA S/Manga.htm](http://www.iac.sp.gov.br/Centros/centro%20de%20fruticultura/FRUTIFERA/S/Manga.htm). Acesso em 20/02/2006.

17. BUCHANAN , R.L.; STAHL, H.G.; WHITING, R.C. Effects and interactions of temperature, pH, atmosphere, sodium chloride and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**. V. 52, n.12, p.844-85. 1989.
18. BUENO, S.M. *et al.* Avaliação da qualidade de polpas de frutas congeladas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 62(2): 121-126, 2002.
19. CAHAGNIER, B.; LESAGE, L.; MOLARD, R.D. Mould growth and conidiation in cereal grains as affected by water activity and temperature. **Letters in Applied Microbiology**, v. 17, p. 7-13. 1993.
20. CUPPERS, H. G. A. M.; OMES S. and BRUL S. A model for the combined effects of temperature and salt concentration on growth rate of food spoilage molds. **Applied Environmental Microbiology**. V.63, n.10, p.3764-3769. 1997.
21. DALGAARD, P.; BUCH,P.; SILBERG, S.. Seafood Spoilage Predictor – development and distribution of a product specific application software. **International Journal of Food Microbiology**, V. 73, p.343-349, 2002.

22. DANTIGNY, P.; GUILMART, A.; RADOI, F.; BENSOUSSAN, M.; ZWIETERING, M. Modelling the effect of ethanol on growth rate of food spoilage moulds. **International Journal of Food Microbiology**. V. 98, p.261-269, 2005.

23. DARVEY, K.R. Linear- Arrhenius for bacterial growth and death and vitamin denaturations. **Journal of industrial Microbiology**. V. 12 p. 172-179, 1993.

24. DELIGNETTE-MULLER, M.L.; ROSSO, L.; FLANDROIS, J.P. Accuracy of microbial growth predictions with square root and polynomial models. **International Journal of Food Microbiology**, V. 27 p.139-146, 1995.

25. DIMARZIO, J.A. **Padrões de identidade e qualidade de néctar de manga**. Disponível em:

http://www.engetecno.com.br/legislacao/beb_nectar_manga.htm. Acesso em: 20/07/2005.

26. FAO. Disponível em:

<http://faostat.fao.org/faostat/servlet/XteServlet3?Areas=21&Items=571&Elements=51&Years=2004&Years=2003&Years=2002&Years=2001&Format=Table&Xaxis=Years&Yaxis=Countries&Aggregate=&Calculate=&Domain=SU>

A&ItemTypes=Production.Crops.Primary&language=EM. Acesso em:
20/07/2005.

27. FRANCO, B.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos.** São Paulo: Atheneu,182p. 1996.

28. FINETTO, M. Suco pronto é artigo básico para muita gente. **Correio Popular.** 20/01/2005.

29. 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.

30. GIFFEL, M.C.; ZWIETERING, M.H. Validation of predictive models describing the growth. **International Journal of Food Microbiology.** V.46, p135-149. 1999.

31. GOCK, M.A., HOCKING, A.D., PITT, J.I., POULOS, P.G. Influence of temperature, water activity and pH on growth of some xerophilic fungi. **International Journal of Food Microbiology.** N.2481, p.11-19. 2002.

32. GUYNOT, M.E. *et al.* Modified atmosphere packaging for prevention of mold spoilage of bakery products with different pH and water activity levels.

Journal of Food Protection. V.6, n.10. p.1864-1872. 2003.

33. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 12, DE 4 DE SETEMBRO DE 2003.

Disponível em:

http://www.engetecno.com.br/legislacao/beb_nectar_manga.htm. Acesso em: 20/07/2005.

34. IFR – INSTITUTE OF FOOD RESEARCH. **Growth Predictor &**

Perfringens Predictor. Disponível em:

<http://www.ifr.ac.uk.Safety/GrowthPredictor/>. Acesso em 24/05/2006.

35. JAGANNATH, A.; TSUCHIDO, T. Predictive microbiology: A Review.

Biocontrol Science, v.8, n.1, p.1-7. 2003.

36. KING, A.D.; HALBROOK, W.U. Ascospore heat resistance and control measures for *Talaromyces flavus* isolated from fruit juice concentrate.

Journal of Food Science. V.52, n.5. p.1252-1266. 1987.

37. LAROCHE, C.; FINE, F.; GERVAIS, P. Water activity affects heat resistance of microorganismos in food powders. **International Journal of Food Microbiology**, v.97, p. 307-315. 2005.
38. LÓPEZ-MALO, A.; ALZAMORA, S.M.; PALOU, E. *Aspergillus flavus* growth in the presence of chemical preservatives and naturally occurring antimicrobial compounds. **International Journal of Food Microbiology**, v.99, p.119-128. 2005.
39. LÓPEZ, S.; PRIETO, M.; DIJKSTRA, J.; DHANOA, M.S.; FRANCE, J. Statistical evaluation of mathematical models for microbial growth. **International Journal of Food Microbiology**, v. 96, p.289-300. 2004.
40. LÓPEZ-MALO, A.; PALOU, E. Modeling the growth/no-growth interface of *Zygosaccharomyces bailii* in mango puree. **Journal of Food Science**. V.65, n.3, p.516-520. 2000.
41. LÓPEZ-MALO, A.; ALZAMORA, S.M.; ARGAIZ, A. Effect of vanillin concentration, pH and incubation temperature on *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus parasiticus* growth. **Food Microbiology**, v.14, p.117-124. 1997.

42. MAYA, E. **Manga**. Disponível em:

<http://www.chefonline.com.br/home/noticia.php?codigo=691> Acesso em:
20/07/2005.

43. McCLURE, P.J.; BLACKBURN,C.de W.; COLE,M.B.; CURTIS, P.S.; JONES, J.E.; LEGAN,J.D.; OGDEN, I.D.; PECK,M.W.; ROBERTS, T.A.; SUTHERLAND, J.P.; WALKER, S.J. Modelling the growth, survival and death of microorganisms in foods: the UK Food Micromodel approach. **International Journal of Food Microbiology**, V. 23, 265-275, 1994.

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

45. McELROY, D.M. *et al.* Validations and analysis of modeled predictions of growth of *Bacillus cereus* spores in boiled rice. **Journal of Food Protection**. V.63, n.02, p.268-272. 2000.

46. McMEEKIN, T.A.; OLLEY, J.N; ROOST. RATKOSWSKY,D.A.. **Predictive microbiology: theory and e application**.1993. In: NAKASHIMA, S.M.K.; ANDRÉ, C.D.S.; FRANCO. B.D.G.M.. Revisão:

Aspectos Básicos da Microbiologia Preditiva. **Brazilian Journal of Food Technology**, V.3 p. 41-51, 2000.

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

48. MEMBRÉ, J.M.; KUBACZKA, M. Predictive modelling approach to spoilage fungi: growth of *Penicillium brevicompactum* on solid media. **Letters of Applied Microbiology**. V. 31, p. 247-250. 2000.

49. MINISTRY OF FOOD, AGRICULTURE AND FISHERIES. ***Protobacterium phosphoreum* and *Shewanella putrefaciens***. Danish Institute for Fisheries Research. Disponível em: <http://www.dfu.min.dk/micro/ssp/help.sp.htm>. Acesso em: 24/05/2006.

50. NAKASHIMA, S.M.K.; ANDRÉ, C.D.S.; FRANCO, B.D.G.M. Revisão: Aspectos básicos da Microbiologia Preditiva. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.3, p. 41-51. 2000.

51. NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos. Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria.** Campinas: UICAMP, 2^aed., p.251-252. 2002.

52. PACHECO, C.P. **Validação do processo de esterilização para polpa de tomate em unidade UHT.** Campinas, 2001. 154p. Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos para obtenção do título de mestre. Universidade Estadual de Campinas.

53. PEÑA, W.E.L. **Uso de modelos preditivos no crescimento e inativação de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de laranja e maçã.** Campinas, 2005. 360p. Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos para obtenção do título de doutor. Universidade Estadual de Campinas.

54. PANAGO, E.Z.; SKANDAMIS, P.N.; NYCHAS, G.J.E. Modelling the combined effect of temperatura, pH and aw on the growth rate of *Manascus ruber*, a heat-resistant fungus isolated from green table olives. **Journal of Applied Microbiology**, v.94, p.146-156. 2003.

55. PARDO, E.; RAMOS, A.J.; SANCHIS, V., MARÍN, S. Modelling of effects of water activity and temperature on germination and growth of

ochratoxigenic isolates of *Aspergillus ochraceus* on green coffee-based medium. **International Journal of Food Microbiology**, v. 98, p.1-9. 2005.

56. PARISH, M. Alicyclobacillus in juice processing. **Citrus Research & Education Center**. University of Florida : Experiment Station Road. sd.

57. PEÑA, W.L.; FARIA, J.A.; de MASSAGUER, P.R. Development of a predictive model on the growth of the spoilage mould, *Paecilomyces variotii*, in pineapple juice. **Fruit Processing**, p. 420-426, November/December 2004.

58. PIN, C.; BARANYI, J. Predictive models means to quantify the interactions of spoilage organisms. **International Journal of Food Microbiology**. V.41, p.59-72. 1998.

59. PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. London: Blackie Academic & Professional. 1985.

60. PITT, J.I. Xerophilic fungi and the spoilage of foods of plant origin. In: **Water Relations of Foods**, R.B. Duckworth ed. London: Academic Press, p. 273-307. 1975.

61. RATKOWSKY, D.A. Some examples of, and some problems with, the use of nonlinear logistic regression in predictive food microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, V. 73, p. 119-125. 1983.
62. ROOS, T. Indices for performance evaluation of predictive models food microbiology. **Journal of Applied Bacteriology**, V.81p. 501-508, 1996.
63. ROSSO, L.; ROBINSON,T.P. A cardinal model to describe the effect of activity on the growth of moulds. **International Journal of Food Microbiology**, v.63, p.265-273. 2001.
64. SAMSOM, R.A.; REENEN-HOEKSTRA, E.S. **Identification of the common food-borne fungi.** p.3-5, 56-57 , 66-67. 1988.
65. SHEARER, A.E.H. *et al.* Heat resistance of juice spoilage microorganisms. **Journal of Food Protection.** V.65, n.8, p.1271-1275. 2002.
66. SPLITTSTOESSER, D.F.; SPLITTSTOESSER, C.M. Ascospores of *Byssochlamys fulva* compared with those of a heat resistant *Aspergillus*. **Journal of Food Science.** V.42, n.3. 1977.

67. TANIWAKI, M.H.; da SILVA, N. **Fungos em alimentos. Ocorrência e Detecção.** Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL, 82p., 2001.
68. TOURNAS V. Heat-Resistant Fungi of Importance to food and beverage industry. **Critical Reviews in Microbiol.** V. 20, n. 4, p. 243-263. 1994.
69. USDA – UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2005. **Pathogen Modeling Program version 7.0 – Current models.** Disponível em: <http://ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=6795>. Acesso em: 23/5/2006.
70. VALÍK, L.; PIECKOVÁ, E. Growth modelling of heat-resistant fungi: effect of water activity. **International Journal of Food Microbiology**, v.63, p.11-17. 2001.
71. VAN DER RIET W. B. and VAN DER WALT W. H. **Effect of ionizing radiation on ascospores of three strains of *B. fulva* in apple juice,** *Journal of Food Protection*, v.48, 12, p.1016-1018. 1985.
72. VILAS BOAS *et al.* Qualidade microbiológica de mangas “Tommy Atkins” minimamente processadas. Apresentado no 5º Simpósio Latino

Americano de Ciência de Alimentos - SLACA, Campinas, SP. 03-06/11/2003.

73. ZWIETERING, M.H. *et al.* Modeling of bacterial growth as a function of temperature. **Applied and Environmental Microbiology.** V.57, n.04, p.1094-1101. 1991.

4. Objetivos Gerais

Esta pesquisa teve como objetivo geral elaborar um modelo matemático que descrevesse o tempo de aparecimento das colônias, de *Aspergillus niger*, isolado mais termoresistente proveniente de néctar de manga, frente a diferentes combinações de pH, atividade de água e temperatura de incubação, em embalagens PET.

Este modelo permite que se estime o tempo de vida útil ou “shelf-life” do néctar de manga, permitindo também, que através de alterações nos valores dos parâmetros estudados se prorrogue este tempo de validade. Além disso, através dos modelos elaborados é possível se obter os valores críticos para pH e temperatura, variáveis significativas, para o crescimento de *Aspergillus niger*.

Para tanto, tornou-se necessário o cumprimento de alguns objetivos específicos.

4.1. Objetivos específicos

❖ Primeira fase

- enumeração dos contaminantes do néctar de manga
- seleção e identificação da linhagem mais termoresistente

❖ Segunda fase

- planejamento experimental exploratório
- realização dos ensaios de crescimento com a linhagem mais termoresistente, em dois níveis de inóculo (6.8×10^0 esp./mL e 9.3×10^3 esp./mL de néctar de manga)
- modelagem primária do crescimento do microrganismo mais termoresistente proveniente do néctar de manga
- avaliação da significância das variáveis controladoras do crescimento sobre o isolado mais termoresistente, quando em dois níveis de inóculo (6.8×10^0 esp./mL e 9.3×10^3 esp./mL de néctar de manga)

❖ Terceira fase

- elaboração e realização do novo planejamento experimental, expandindo a faixa de atuação das variáveis de impacto significativo ($p < 0.05$) sobre o crescimento do microrganismo;
- coleta de dados e realização das modelagens primária e secundária do crescimento;
- análise dos resultados e verificação dos modelos.

Capítulo 02

Artigo formatado de acordo com as normas de submissão da revista

“Food Microbiology”

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19

Seleção do bolor mais termoresistente em néctar de manga e estudo de seu crescimento radial, frente à Aw, pH e temperatura, em embalagens PET.

ALESSANDRA REGINA DA SILVA¹ e PILAR RODRIGUEZ DE MASSAGUER

Universidade Estadual de Campinas

Faculdade de Engenharia de Alimentos

Departamento de Ciência de Alimentos – Laboratório de Termobacteriologia

P.O.Box 6121, CEP 13083-862

Campinas, São Paulo - Brasil

¹ Corresponding author: State University of Campinas, Faculty of Food Engineering, Department of Food Science, CP 6121, CEP 13083-862. Campinas, São Paulo, Brasil. Phone/Fax: 55-19-3289-4966. E-mail: marx@fea.unicamp.br.

RESUMO

20
21 Esta pesquisa teve por objetivo isolar o bolor mais termoresistente, presente no néctar
22 de manga, estudar qual variável controladora do crescimento exerce maior impacto
23 sobre seu comportamento e modelar o tempo de aparecimento de suas colônias, em
24 diferentes combinações das variáveis de maior impacto mediante utilização da
25 modelagem primária. A quantificação de fungos termoresistentes foi realizada segundo
26 Beuchat & Pitt (2001) e a seleção e identificação do mais termoresistente, segundo
27 Baglioni (1998), Pitt & Hocking (1985) e Samson & vanReenen-Hoeskstra (1988). Este
28 isolado teve seu crescimento modelado em dois níveis de inóculo (6.8×10^0 esp./mL e
29 9.3×10^3 esp./mL). Para tanto, no nível de inóculo mais baixo, a temperatura variou de
30 12-25°C, o pH, de 3.2 a 4.8 e a aw de 0.979 a 0.988 ; já para o nível de inóculo mais
31 alto, a temperatura variou de 18 a 22°C, o pH de 3.5 a 4.5 e aw de 0.970 a 0.990. Os
32 dados do incremento diário nas medidas de diâmetro foram ajustados pelos modelos de
33 crescimento de Baranyi (Baranyi & Roberts, 1995) e de Gompertz modificado
34 (Zwietering et al., 1994). O nível de contaminação do néctar de manga comercial, por
35 bolores termoresistentes, foi de 7.6×10^3 esp./mL, sendo isoladas 8 linhagens
36 morfológicamente diferentes e destas, a que resistiu ao tratamento mais severo
37 (100°C/15 minutos), foi o *Aspergillus niger*. Para o nível de inóculo de 6.8×10^0 esp./mL,
38 reduções de pH causaram aumento do tempo de adaptação (4 para 10 dias), bem
39 como incrementos de 0,01 na aw o diminuíram em 5 dias, sendo que em temperaturas
40 inferiores a 18°C não foi observado o crescimento do fungo. Já se considerando o nível
41 de inóculo de $9,3 \times 10^3$ esp./mL, observou-se que a aw, na faixa natural ao produto, não
42 apresentou impacto significativo sobre os parâmetros de crescimento do

43 microrganismo. Em condições de abuso de temperatura, reduções de 5.6°C (22.8 para
44 17.2°C), implicam em aumento de 23 dias no tempo de adaptação do fungo. De
45 maneira semelhante, quando o pH do néctar de manga passou de 4.0 para 4.7, o
46 tempo de adaptação do microrganismo se reduziu de 11 para 3 dias e o diâmetro final
47 da colônia triplicou. Os resultados demonstraram que pH e temperatura são fatores que
48 exercem influência significativa sobre o crescimento de *A.niger*, em néctar de manga,
49 indicando assim a necessidade de controle de refrigeração, com manutenção de
50 temperatura abaixo de 15°C, condição esta que inibe o crescimento do fungo, mesmo
51 quando em concentração de 10^3 esp./mL de néctar de manga; bem como controle rígido
52 nos valores de pH, pois alterações de 0.7 unidades podem implicar em reduções
53 severas na vida útil do produto.

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

INTRODUÇÃO

65
66 A produção de sucos prontos para beber vem se incrementado anualmente,
67 sendo que neste mercado o néctar de manga apresenta-se como 3º no ranking mundial
68 de preferência por sabor (Finetto, 2005). Em decorrência desta grande demanda torna-
69 se essencial o conhecimento dos principais grupos de microrganismos deteriorantes
70 deste produto. Rosso & Robinson (2001) citaram que os bolores são a grande
71 preocupação da indústria de alimentos, por serem potenciais deteriorantes e produtores
72 de micotoxinas. Já Tournas (1994), citada por Valík & Piecková (2001) reportou os
73 fungos termoresistentes como os verdadeiros agentes deteriorantes em sucos de frutas
74 e outros produtos processados a base de frutas. Para se evitar a presença indesejada
75 destes microrganismos lança-se mão do uso de variáveis controladoras do crescimento,
76 tais como atividade de água (aw), pH, temperatura e preservantes químicos. Nesta
77 linha, López-Malo & Palou (2000), desenvolveram pesquisa na qual modelaram a
78 interface de crescimento/não crescimento de *Zygosaccharomyces bailii* (levedura
79 resistente aos preservantes adicionados ao produto) em purê de manga, tendo como
80 fatores controladores do crescimento a aw, sorbato de potássio e benzoato de sódio,
81 obtendo como resultados que delicados ajustes entre esses fatores de preservação,
82 quando integrados, permitem redução na probabilidade de crescimento de *Z.bailii*,
83 garantindo razoável extensão da vida de prateleira do produto. Em pesquisa realizada
84 por Abdel-Sater *et al.* (2001) foram isoladas 44 linhagens diferentes de fungos
85 presentes em sucos de uva, goiaba, manga, maçã e pêra. Destas linhagens,
86 *Aspergillus* demonstrou 100% de frequência de presença nas amostras. Isto é
87 elucidado quando se considera a pesquisa realizada por Ugwuanyi & Jason (1991) na

88 qual reportam que 17% das amostras de manga (fruta) analisadas apresentaram
89 contaminação por fungos termoresistentes, dentre eles *A.flavus*. Sob este enfoque,
90 Battey *et al.* (2001) citam De Bôer & Nielsen (1995) que reportam *Aspergillus niger* e
91 *Penicillium spinulosum* como fungos altamente resistentes a preservantes químicos
92 como ácido sórbico e benzóico. Ainda nesta linha, Dantigny *et al.* (2005) modelaram o
93 efeito de etanol, preservante químico, sobre a taxa de crescimento radial (μ) de fungos
94 deteriorantes, indicando que seria necessário 4,22% (p/p) de etanol para inibição total
95 de *Aspergillus niger*, deteriorante de pães, cabendo ressaltar que o permitido pela
96 legislação é de 2%(p/p). Dada a importância destes microrganismos faz-se essencial o
97 conhecimento de variáveis que possam atenuar ou impedir seu crescimento, bem
98 como, modelos que possam prever seu crescimento, muito embora a modelagem
99 preditiva do crescimento de fungos filamentosos esteja em desvantagem em relação a
100 modelagem preditiva do crescimento de bactérias (Dantigny *et al.*, 2006), já que estas
101 são exaustivamente estudadas.

102 Sob este enfoque esta pesquisa objetivou *i.* isolar e identificar o fungo mais
103 termoresistente presente em néctar de manga; *ii.* estudar o impacto de variáveis
104 controladoras do crescimento sobre o comportamento deste fungo, em dois níveis de
105 inóculo (10^0 e 10^3 esp./mL); *iii.* verificar os efeitos das variáveis de maior impacto sobre
106 os parâmetros de crescimento do fungo no nível de contaminação de 10^3 esp./mL.

107

108

109

110

111
112

MÉTODOS

113 ➤ **Enumeração de bolores termoresistentes**

114 A quantificação dos fungos termoresistentes foi realizada a partir de 50 amostras
115 de 1L de néctar pasteurizado de manga, variedade Ubá, pasteurizados de 100 a 105°C
116 por 30s, recebidos em embalagens cartonadas, multicamadas, e com selagens de topo,
117 fundo e lateral intactas e conservadas à temperatura ambiente, com pH 4,0, Brix 14° e
118 densidade 1,051g/cm³. A análise dos bolores termoresistentes foi realizada segundo
119 metodologia de Bechaut & Pitt (2001), mediante choque térmico a 80°C por 30 minutos,
120 em banho termostático (Polistat®, Poly Science, IL.USA ± 0,1°C de precisão), sendo a
121 contagem realizada em meio PDA (Potato Dextrose Agar, Difco), acrescido de
122 bactericida cloranfenicol, na proporção de 0,4g/L, 1,2 mL de ácido tartárico 10% p/v e
123 1mL de rosa de bengala para cada 100mL de meio (Baglioni, 1998). Essas placas
124 foram incubadas a 30°C por 30 dias, com observações semanais (Bechaut & Pitt,
125 2001). A partir do crescimento obtido foram selecionadas as linhagens que se
126 diferenciaram morfológicamente, sendo sua manutenção realizada em meio PDA
127 (Oxoid), seguida de posterior estocagem em sílica gel (Marcolino, 2003).

128 ➤ **Seleção do isolado mais termoresistente**

129 ▪ **Preparo das suspensões de esporos**

130 Para cada isolado encontrado foi preparada uma suspensão de esporos, sendo
131 que para tanto, cada um deles foi repicado em placas de Petri com meio PDA(Oxoid) e
132 incubadas a 30°C por 7 dias. Decorrido o período de incubação o crescimento das
133 placas foi ressuscitado em 2mL de água destilada com bagueta de ponta esférica
134 estéreis. Desta suspensão foi coletado 0,5mL, com pipeta estéril, que foi inoculado em

135 garrafas de Roux, com 200mL de MEA (Malt Extract Agar, formulado de acordo com
136 Samson & vanReenen-Hoeskstra (1988)), previamente esterilizado a 121°C por 15
137 minutos, e espalhado na superfície do meio com o auxílio de uma bagueta de vidro
138 estéril (Baglioni, 1998). Para cada isolado foram feitas 10 garrafas para que se tivesse
139 quantidade suficiente de suspensão para condução de todo o experimento. Estas
140 garrafas foram incubadas a temperatura de 25°C, para garantir a formação dos
141 esporos, por 30 dias, com observações semanais, já que no caso de fungos
142 Deuteromicetos, a formação dos esporos ocorre em um período de 5 a 12 dias
143 (Dantigny, 2006), ou até verificação da formação de esporos, mediante observação
144 através de lâmina com coloração com Lacto-Fucsina 0,1% (Pitt & Hocking (1985)), em
145 microscópio ótico Carl Zeiss Axiostar (com aumento de 400 vezes). Quando 70% da
146 lâmina estava coberta por esporos com parede rígida, foi realizada a raspagem do
147 crescimento, mediante colocação de, aproximadamente, 25mL de água destilada
148 estéril/ garrafa, seguida de remoção do crescimento com auxílio de bagueta de ponta
149 esférica estéril. A suspensão, filtrada em três camadas de gaze estéril, foi coletada em
150 frascos estéreis, homogeneizada e submetida a processo de centrifugação a 11962.6
151 xg e 5°C, durante 15 minutos, com observações microscópicas a cada final de ciclo
152 para se verificar a necessidade de nova centrifugação, sendo o sobrenadante eliminado
153 e o processo repetido por, no máximo, três vezes, evitando-se assim danificações na
154 parede celular do esporo. Após esse procedimento foi realizado ainda o processo de
155 ultrassom em banho de gelo, com temperatura de 0 a 4°C, por 3 minutos (tempo
156 necessário para obtenção de esporos livres) (Baglioni, 1998; Splittstoesser &
157 Splittstoesser, 1977). Estas suspensões finais foram transferidas para garrafas de vidro
158 com capacidade de 300mL, com aproximadamente 60 pérolas de vidro, sendo este

182 cada tubo e acoplados a uma unidade remota, que por sua vez estava conectada ao
183 aquisitor de dados de temperatura DORIC 245 A, Beckman Industrial TM.

184 ▪ **Identificação do bolor mais termoresistente**

185 Na identificação do bolor isolado e caracterizado como mais termoresistente
186 foram utilizadas as metodologias de Pitt & Hocking (1985) e Samson & vanReenen-
187 Hoeskstra (1988). Foram utilizadas estas metodologias em virtude das mesmas se
188 complementarem quanto ao teste de crescimento a diversas temperaturas: 5, 25, 30 e
189 37°C. Como meios de identificação foram utilizados os meios formulados: CYA (Czapek
190 Yeast Extract Agar), MEA (Malt Extract Agar) e G25N (25% Glycerol Nitrate Agar),
191 sendo esterilizados a 121°C por 15 minutos (Samson & vanReenen-Hoeskstra, 1988).
192 A inoculação foi realizada, com agulha estéril, utilizando-se 2 placas para cada meio,
193 sendo que em uma foi feito um ponto central e na outra 3 pontos equidistantes. O
194 período de incubação foi de 7 dias.

195 Após incubação, o crescimento obtido nas placas foi avaliado no direito e no
196 reverso, sendo as colônias avaliadas a olho nu e em lupa Citoval 2, Carl Zeiss Jena,
197 micro e macroscopicamente, quanto a sua morfologia (tipo de borda, cor (topo e fundo),
198 aspecto da colônia e tipo de crescimento), presença ou ausência de exsudado e
199 tamanho e microscopicamente, em microscópio ótico, quanto a forma de suas
200 estruturas (disposição e forma de esporos, hifas, filíades e métula).

201 ➤ **Teste de crescimento do bolor termoresistente em néctar de**
202 **manga**

203 Para cada ensaio foram inoculadas 3 garrafas PET (0.041cc/Oxigênio/m²/dia),
204 higienizadas com ácido peracético 13.5% (v/v), sendo utilizado na concentração de
205 0.3% (v/v) para garrafas e 0.05% (v/v) para as tampas (Petrus, 2000), contendo, cada

206 uma, 230mL de néctar de manga, dispostas em suportes inclinados em 45°. As
 207 medidas diárias do diâmetro começaram a ser adquiridas a partir de 3mm, momento no
 208 qual a colônia se torna visível ao olho nu, segundo critério proposto por Gibson *et al.*
 209 (1994). Para tanto, essas medidas foram obtidas a partir de cada colônia, tanto na
 210 horizontal quanto na vertical, diariamente até que se atingisse a fase estacionária do
 211 crescimento, mediante observação em estereoscópio de transmissão de luz (Peña *et al.*,
 212 2004, Pardo *et al.*, 2005; Gibson *et al.*, 1994). Foram selecionados ainda, para ajuste os
 213 maiores valores das medidas dos diâmetros (Panagou *et al.*, 2003), objetivando-se
 214 assim a predição para o lado seguro. Os dados obtidos foram ajustados utilizando-se os
 215 modelos primários de crescimento de Baranyi & Roberts e Gompertz modificado
 216 (Baranyi & Roberts, 1995), mediante utilização do programa DMFIT que lança mão do
 217 uso das equações 1 (Baranyi & Roberts) e 2 (Gompertz modificado) para cálculo dos
 218 parâmetros de crescimento, tais como tempo de adaptação (λ ; dias); taxa de
 219 crescimento (μ ; mm.dia⁻¹) e diâmetro máximo (mm). Como dados de entrada utilizou-se,
 220 durante os tempos nos quais não era notável o crescimento do fungo, o valor de
 221 0,1mm, para o tempo $y(0)$, conforme recomendado por Gibson *et al.* (1994). O período
 222 de incubação, para estimativa da interface de crescimento/não crescimento, foi de 90
 223 dias.

$$y(t) = y_0 + (\mu_{m\acute{a}x} \cdot A(t)) - \ln\left(1 + \frac{e^{\mu_{m\acute{a}x} \cdot A(t)} - 1}{e^{y_{m\acute{a}x} - y_0}}\right)$$

227 Onde $y(t)$ = diâmetro final da colônia Equação 1
 228 $\mu_{m\acute{a}x}$ = taxa máxima de crescimento
 229 y_0 = diâmetro inicial
 230 $y_{m\acute{a}x}$ = diâmetro máximo da colônia
 231 $A(t)$ = função de ajuste

232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259

$$y = A \cdot e^{-e^{\left\{ \left[\frac{\mu_{m \cdot e}}{A} (\lambda - t) \right] + 1 \right\}}}$$

Onde

Equação 2

- y = diâmetro final da colônia
- A= função de ajuste
- $\mu_{m \cdot e}$ = taxa máxima de crescimento
- λ = tempo de adaptação

➤ **Planejamento experimental**

Foram selecionadas como variáveis controladoras do crescimento a aw, pH e temperatura, sendo que destas, apenas duas, as de maior impacto sobre o crescimento, foram utilizadas na avaliação final.

▪ **Avaliação do impacto das variáveis sobre o crescimento do microrganismo**

Nesta etapa utilizou-se um planejamento composto central, 2³, acrescido de 3 pontos centrais e 4 pontos axiais, sendo que a temperatura variou de 12 a 25°C, pH, de 3.2 a 4.8 e aw, de 0.979 a 0.986. Cabe esclarecer que a faixa de variação do pH contempla a variação que o produto sofre ao longo da safra de produção, sendo este valor de 4.0±0,5. Já na fixação dos valores para aw, considerou-se a variação no teor de sólidos solúveis (°Brix) do produto ao longo da safra, sendo esta de 14±2°. A partir do ajuste dos valores de °Brix, mediante adição de sacarose ou água destilada, mediuse a aw correspondente em aparelho Aqualab Cx02 (Decagon Devises In. Pullman, WA). A correspondência entre os valores de Brix e aw está apresentada na TABELA 2.

Tabela 2

260 Para simulação de um teste de desafio de crescimento do microrganismo no
261 néctar de manga foi utilizado o nível de inóculo baixo (6.8×10^0 esp./mL). Considerando-
262 se o nível de contaminação detectado no produto, utilizou-se novo desenho
263 experimental, 2^3 , acrescido de 3 pontos centrais, com nível de inóculo de
264 9.3×10^3 esp./mL. Para este teste as variáveis foram fixadas na faixa de (18-22°C), pH
265 (3.5-4,5) e aw (0.970-0.990), conforme planejamento experimental apresentado na
266 TABELA 3.

267 Tabela 3

- 268 **▪ Efeito do pH e temperatura no crescimento de *A.niger* em néctar**
269 **de manga a aw constante (0.980)**

270 A partir das variáveis consideradas de maior impacto sobre o crescimento do
271 bolor termoresistente (temperatura e pH) foi realizado um terceiro planejamento
272 experimental, com base em um planejamento composto central, 2^3 , acrescido de 3
273 pontos centrais e 4 axiais, com nível de inóculo de 9.3×10^3 esp./mL. As variáveis tiveram
274 os seguintes limites de atuação: temperatura (17.2-22.8°C), pH (3.28-4.70) e aw fixada
275 em 0.980, característica do néctar de manga (TABELA 4).

276 Tabela 4

277 RESULTADOS

- 278 ➤ **Contagem, sobrevivência de bolores termoresistentes e**
279 **identificação do bolor mais termoresistente encontrado em**
280 **néctar de manga**

281 A partir de 50 amostras de néctar de manga foram isoladas 8 linhagens que
282 diferiram morfológicamente entre si. Na TABELA 5 está apresentado o delineamento
283 dos choques sucessivos para avaliação do nível de termoresistência dos bolores

284 provenientes do néctar de manga, sendo que foi obtida uma contagem média de
285 7.4×10^3 esp./mL de néctar de manga. A linhagem mais termoresistente (I5E16M)
286 sobrevivente a 100°C/15 minutos, foi identificada como *Aspergillus niger*.

287 Tabela 5

288 Na FIGURA 1 está apresentado o respectivo isolado (I5E16M) em microscopia
289 ótica em comparação com *A.niger* em microscopia eletrônica de transmissão, retirada
290 de *Genomics and Blood Substitutes for 21st Century Europe* (2006). As demais foram
291 identificadas preliminarmente como *Penicillium* sp.

292 Figura 1

293 As características da identificação da linhagem mais termoresistente e da
294 identificação preliminar dos demais isolados estão apresentadas na TABELA 6. A
295 contagem final de cada suspensão está apresentada na TABELA 7.

296 Tabela 6

297 Tabela 7

298 ➤ **Modelagem primária do crescimento de *Aspergillus niger* em**
299 **néctar de manga**

300 Na TABELA 8, estão apresentados os parâmetros de crescimento de *A.niger*, em
301 néctar de manga, correspondentes ao planejamento apresentado na Tabela 4. Pode-se
302 observar que o modelo de Baranyi ajustou melhor as curvas de crescimento que o
303 modelo de Gompertz e que os valores do desvio padrão com relação às repetições são
304 baixos, o que indica boa repetibilidade dos experimentos. Resultados semelhantes
305 foram obtidos por López *et al.* (2004) e Battey & Miller (2004).

306 Tabela 8

331 5 para 11 dias e no diâmetro final das colônias, de 14 para 22mm (FIGURA 5). De
332 modo semelhante, reduções em uma unidade no valor de pH (4.5 para 3.5), implicaram
333 em triplicação no tempo de adaptação experimental do microrganismo.

334 **Figura 5**

335 Assim sendo e considerando-se o nível de inóculo de 10^3 esp./mL de néctar de
336 manga, como nível médio de contaminação do produto, observou-se que o ajuste na
337 concentração de sólidos solúveis, inversamente proporcional a a_w , foi a variável de
338 menor impacto sobre o crescimento do microrganismo, na faixa estudada.

339 ➤ **Efeito do pH e temperatura sobre o crescimento de *Aspergillus***
340 ***niger* em néctar de manga a a_w constante (0,980)**

341 Nesta etapa observou-se que a redução do pH em uma unidade, quando a
342 temperatura estava fixada em seu limite superior (22,8°C), acarretou em um aumento
343 no tempo de lag de quatro dias com conseqüente redução do diâmetro final das
344 colônias, de 32 para 20,2mm.

345 Na FIGURA 6, pode-se observar que, para as curvas 1 e 2 correspondentes aos
346 ensaios 7 (representante dos pontos centrais) e 8 (TABELA 4), respectivamente, não
347 foram notadas diferenças relevantes entre o tempo de adaptação, 10.5 dias em média e
348 o diâmetro final das colônias, 15.3 mm em média. Já quando se considera a curva de
349 crescimento 3 pode-se observar que, quando o néctar de manga se encontra em pH
350 4.7, o tempo de adaptação de *A.niger* é reduzido de, aproximadamente, 11 para 3 dias,
351 o que implica diretamente em um estreitamento do tempo de vida de prateleira do
352 produto. Por outro lado, o diâmetro final da colônia aumenta para, aproximadamente,
353 33mm.

354 **Figura 6**

355 Considerando-se as condições extremas para temperatura de estocagem do
356 néctar de manga, presentes no planejamento experimental (TABELA 4), observou-se
357 que diminuições nesta variável da ordem de 5.6°C (2 2.8°C para 17.2°C, ensaios 9 e 11
358 respectivamente), implicam em aumento no tempo de adaptação de 23 dias (FIGURA
359 7). Isto é de grande importância quando se considera que 22.8°C está bem próxima a
360 temperatura ambiente a qual o produto é submetido antes da abertura para consumo.

361 **Figura 7**

362 Com relação à taxa de crescimento, observa-se que quando o pH é reduzido em
363 uma unidade, a temperatura de 20°C, esta taxa é reduzida em 35.06%. Considerando-
364 se o diâmetro máximo das colônias, quando se compara os ensaios 8 e 10 (TABELA 4),
365 observa-se que redução no pH de 1.42 unidade diminuiu em 17.75mm o diâmetro
366 máximo das colônias (TABELA 8). Reduções semelhantes são observadas quando se
367 considera a variável temperatura, já que se comparando os ensaios 7 e 9 (TABELA 4),
368 observa-se que a diminuição de 2.8°C culminou em uma diminuição de,
369 aproximadamente, 19 mm no diâmetro máximo das colônias (TABELA 8).

370 **DISCUSSÃO**

371 Quando se considera a micobiota de contaminantes encontrada no néctar de
372 manga pasteurizado, observou-se que esta foi basicamente composta pelos gêneros
373 *Penicillium* e *Aspergillus*, sendo que originalmente esta flora pode ser proveniente do
374 suco fresco, assim, este resultado condiz com o reportado por Abdel-Sater *et al.* (2001),
375 em pesquisa na qual realizaram a enumeração da contaminação natural de sucos
376 frescos por fungos e suas micotoxinas, encontrando que para o suco de manga o
377 *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. foram detectados com freqüências de 100 e 70%,

378 respectivamente. Cabe salientar que, nesta pesquisa a porcentagem de frequência
379 encontrada para *Penicillium* foi de 87.5% e para *Aspergillus*, de 12.5%. Já em pesquisa
380 realizada por Vilas Boas *et al.* (2003) com mangas variedade “Tommy Atkins”,
381 minimamente processadas e submetidas a diferentes tratamentos químicos, foi relatado
382 que independentemente do tratamento químico utilizado ocorreu a presença de fungos
383 filamentosos e leveduras a partir do décimo e décimo segundo dias de armazenamento.
384 De modo semelhante, pesquisa realizada por Ugwuanyi & Obeta (1991), relata que
385 aproximadamente 17% das amostras de manga (“in natura”), se apresentaram
386 contaminadas por linhagens de fungos termoresistentes, dentre elas *Aspergillus flavus*,
387 o que condiz com o encontrado nesta pesquisa, cujo nível de contaminação por bolores
388 termoresistentes foi de 28% e o isolado mais termoresistente também pertence ao
389 gênero *Aspergillus*. Cabe ressaltar ainda que, a contagem média obtida de bolores
390 termoresistentes, 7.3×10^3 esporos/mL de néctar de manga, é alta quando se considera
391 que o néctar de manga comercial analisado era um produto pasteurizado de 100 a
392 105°C por 30s e envasado em embalagens que aparentemente se apresentavam
393 íntegras.

394 Apesar dos Deuteromicetos não apresentarem estruturas relacionadas a
395 termoresistência, como ascósporos e ascos, o isolado mais termoresistente, obtido a
396 partir do néctar de manga, foi identificado como *Aspergillus niger*, resistindo a 100°C
397 por 15 minutos. Em mesma linha, resultados semelhantes foram obtidos por
398 Splittstoesser & Splittstoesser (1977), em pesquisa na qual estudaram a resistência
399 térmica de linhagens de *Aspergillus*, constatando sobrevivência da linhagem *Aspergillus*
400 WR1 a 85°C por até 60 minutos, em suco de uva. De modo semelhante, Peña *et al.*
401 (2004), citam Samsom *et al* (1996) dizendo que algumas linhagens de *Fusarium* spp. e

402 *Paecilomyces variotii*, podem sobreviver a tratamentos térmicos a 95°C por 10 a
403 20 segundos, provavelmente devido a existência de estruturas resistentes como hifas
404 e/ou clamidósporos.

405 Considerando-se o nível de inóculo de $6,8 \times 10^0$ esporos/mL, observou-se que
406 reduções na aw, da ordem de 0.01, implicaram em aumento no tempo de adaptação do
407 microrganismo de 5 para 10 dias e diminuição no tamanho final da colônia de 22 para
408 16mm. Resultados semelhantes foram obtidos por Panagou *et al.* (2003) ao modelar os
409 efeitos de temperatura, pH e Aw na taxa de crescimento de *Monascus ruber*,
410 detectando que reduções na Aw do meio implicavam na diminuição no tamanho final da
411 colônia. Já pesquisa realizada por Valík & Piecková (2001), na qual estudaram o efeito
412 da Aw, ajustada através de adição de sacarose, sobre o crescimento de fungos
413 termoresistentes, em meio de cultura sintético, constataram que a germinação e o
414 crescimento de fungos termoresistentes podem ser reduzidos por baixos valores de Aw.
415 Além disso, observou-se que, para este nível de inóculo, *Aspergillus niger* não
416 apresentou crescimento em temperaturas $\leq 18^\circ\text{C}$. Este fato pode ser entendido como
417 mais uma característica diferencial desta linhagem, em virtude da mesma apresentar
418 maior temoresistência que as descritas na literatura, pois López-Malo *et al.* (1997),
419 constataram que o crescimento de linhagens de *A.niger*, em meio sintético PDA (potato
420 dextrose Agar), somente não ocorre em temperaturas inferiores a 10°C .

421 Considerando-se o nível de inóculo de 9.3×10^3 esporos/mL de néctar de manga,
422 observou-se que reduções na aw, semelhantes as realizadas no nível de inóculo de
423 10^0 esp./mL, acarretaram menor impacto sobre o crescimento do fungo, já que o tempo
424 de adaptação do microrganismo se prolongou de 9 para 11 dias. Nestas condições,
425 quando o pH se reduziu, a temperatura de 22°C e aw de 0,990 (ensaios 1 e 2, Tabela

426 3) observou-se que a taxa de crescimento diminui pela metade, o tempo de adaptação
427 aumentou, aproximadamente, 4 dias e o diâmetro máximo diminui cerca de 2 mm.
428 Sendo assim, em condições de temperatura e a_w altas 22°C e 0.990, respectivamente,
429 uma alternativa para se prolongar o tempo de vida útil (“*shelf-life*”) do néctar de manga
430 pode ser a diminuição do pH de 4.5 para 3.5, demonstrando que o pH exerce influência
431 marcante sobre o período de adaptação do microrganismo. Resultados semelhantes
432 foram obtidos por Battey *et al.* (2001). Considerando-se reduções na temperatura, de
433 4°C (22 para 18°C) notou-se que esta proporcionou uma redução de,
434 aproximadamente, 73% na taxa de crescimento de *Aspergillus niger* em néctar de
435 manga. Resultados semelhantes foram obtidos por López-Malo *et al.* (1997) em relação
436 a alterações na taxa de crescimento como consequência de reduções de temperatura,
437 sendo que a taxa de crescimento diminuiu em 64%, quando a temperatura decaiu 10°C.
438 Nesta linha, os resultados condizem com o descrito por Anderson e Smith (1976), que
439 ressaltam a temperatura como o principal fator que influencia o crescimento dos fungos,
440 afetando a sua germinação, esporulação e crescimento de hifa.

441 Para o inóculo de 9.3×10^3 esp./mL não foi observado o crescimento do fungo em
442 temperaturas inferiores a 15°C. Assim sendo, na faixa de variação de a_w que o produto
443 sofre no decorrer da produção (20%) e considerando-se o nível de contaminação do
444 produto (10^3 esp./mL), concluiu-se que a a_w não exerceu influência marcante sobre o
445 crescimento de *Aspergillus niger*, quando comparadas as influências das variáveis pH e
446 temperatura. Este fato pode ser elucidado quando se consideram as enzimas
447 produzidas por *Aspergillus niger*, ou seja, a poligalacturonase e pectinametilesterase.
448 Segundo pesquisa desenvolvida por Nikolíc & Majovic (2006) estas enzimas produzidas
449 por *Aspergillus niger* têm seu pH ótimo de atividade entre 3.2 e 4.0 e aumento de

450 atividade nas temperaturas entre 20 e 30°C. Assim sendo, tanto a faixa de pH quanto a
451 de temperatura estão contemplados pelos experimentos com nível de inóculo de 10^0 e
452 de 10^3 esp./mL, o que leva a concluir que, no caso do nível de inóculo de 10^3 esp./mL, o
453 fato da população ser maior acarretou uma maior produção destas enzimas, o que
454 levou a separação de fases, notada durante o experimento. Juntamente com esta
455 separação de fases ocorreu variação na aw, ou seja, como esta, supostamente, não foi
456 constante, não gerou efeito significativo ($p < 0.05$) sobre o crescimento do
457 microrganismo, conforme observado na Tabela 9.

458 Tabela 9

459 Observando-se apenas os efeitos de pH e temperatura sobre o crescimento de
460 *A.niger*, a aw constante (0.980), no nível de inóculo de 9.3×10^3 esp./mL, constatou-se
461 que a temperatura de 20°C, diferentemente da temperatura de 22°C, a redução de pH
462 de 4.0 para 3.28 não é significativa sobre os parâmetros de crescimento, sendo o
463 tempo de adaptação de 10.5 dias e o diâmetro final das colônias de 15.3mm, em média.
464 Assim sendo pode-se dizer que, após o microrganismo vencer a barreira imposta para
465 seu crescimento, no caso, o valor do pH de néctar fora da faixa ótima de crescimento
466 do microrganismo, seu crescimento se torna constante (Baranyi & Roberts, 1995),
467 fazendo com que o fungo se comporte de maneira semelhante em ambos os ensaios 7
468 e 8 (TABELA 4), independentemente dos valores das variáveis controladoras do
469 crescimento. Por outro lado, quando o pH do néctar de manga passa de 4.0 para 4.7, o
470 tempo de adaptação do microrganismo passa de 11 para 3 dias e o diâmetro final da
471 colônia se triplica. Resultados semelhantes foram obtidos por Battey *et al.*(2001) em
472 pesquisa na qual modelaram o crescimento de *Aspergillus niger* e *Penicillium*
473 *spinulosum*, em sucos resfriados, prontos para beber, sendo que os autores

474 constataram que o pH destes sucos exerce efeitos altamente significativos sobre o
475 crescimento destas linhagens de fungos, ou seja, estas linhagens são capazes de
476 sobreviver a baixos valores de pH, entretanto, nestas condições, tem seu crescimento
477 retardado. Assim sendo, cabe ressaltar que estas pequenas alterações nos valores de
478 pH podem ser úteis para efeito de prolongamento da vida de prateleira do néctar de
479 manga, quando *A.niger*, estiver presente.

480 Quando se consideram reduções de temperatura, da ordem de 5,6°C (22,8°C
481 para 17,2°C, ensaios 9 e 11, respectivamente), observou-se que o tempo de adaptação
482 do microrganismo aumentou e conseqüente o tempo de vida útil do produto passou de
483 0,13 dia (3,12h) para 22,01 dias (528,24h), com pH fixado em 4,0. Isto é de grande
484 importância quando se considera que 22,8°C está bem próxima a temperatura na qual o
485 produto é submetido antes da abertura para consumo. Na mesma linha de pesquisa,
486 Pardo *et al.*(2005), desenvolveram trabalho no qual modelaram os efeitos de *a_w* e
487 temperatura sobre o tempo de germinação e crescimento de *Aspergillus ochraceus*, em
488 meio CMEA (coffee meal extract Agar), observando que reduções na temperatura de
489 incubação de 30 para 10°C resultaram em uma aumento na fase lag ou no tempo de
490 adaptação de 140 para 650h. Efeitos semelhantes foram notados considerando-se a
491 taxa de crescimento de *A.niger*, ou seja, reduções de 2,8°C na temperatura (ensaios 7
492 e 9), a pH 4,0 (natural do produto) implicaram em reduções de 63,92% na taxa de
493 crescimento. Resultados semelhantes foram obtidos por López-Malo *et al.*(1997), em
494 pesquisa na qual observaram que reduções da ordem de 5°C na temperatura de
495 incubação, a pH 4,0, em meio PDA, acarretaram reduções na taxa de crescimento de
496 *Aspegillus niger* de até 64,44%, o que condiz com os resultados encontrados. Assim,
497 pode-se dizer que a temperatura de incubação exerce influência altamente significativa

498 sobre a taxa de crescimento do microrganismo já que, independentemente do nível de
499 inóculo, pH e aw, não foi notado crescimento do microrganismo em temperaturas
500 $\leq 15^{\circ}\text{C}$. Sendo assim, o indicado seria que este produto fosse mantido sob temperaturas
501 de refrigeração, abaixo de 15°C , para que, no caso de *Aspergillus niger*, bolor mais
502 termoresistente sobrevivente do processo de pasteurização do néctar de manga, estar
503 presente, sua germinação, seu crescimento o e/ou desenvolvimento seja impedido,
504 independentemente da contaminação inicial do produto estar em 10^0 ou 10^3 esp./mL.

505

506

REFERÊNCIAS

507 ABDEL-SATER, M.A. *et al.* Natural contamination of some egyptian fruit juices and
508 beverages by mycoflora and mycotoxins. **Journal Food Science and Technology**. V.
509 38, n.4, p. 407-411. 2001.

510

511 ANDERSON, J.G.; SMITH, J.E. Effects Of Temperature on Filamentous Fungi.
512 Inhibition and Inactivation of Vegetative Microbes. Edited by F.A.Skimmer and W.B.
513 Hugo. Academic Press, New York. p. 191-218. 1976.

514

515 BAGLIONI, F. Estudo da ocorrência de fungos filamentosos termoresistentes em polpa
516 de tomate envasada assepticamente. Campinas, 1998. 94p. Tese de Mestrado
517 apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de
518 Campinas.

519

520 BARANYI, J.; ROBERTS, T.A. Mathematics of predictive food microbiology. **Food**
521 **Microbiology**. V.26, p.199-218. 1995.

522 BATY, F.; DELIGNETTE-MULLER. Estimating the bacterial lag time: which model,
523 which precision? **International Journal of Food Microbiology**. V.91, p.261-277.
524 2004.

525

526 BATTEY, A., S.; DUFFY, S.; SCHAFFNER, D.W. Modelling mould spoilage in cold-fille
527 ready-to-drink beverages by *Aspergillus niger* and *Penicillium spinulosum*. **Food**
528 **Microbiology**. V. 18, p.521-529. 2001., doi:10.1006/fmic.2001.0438.

529

530 BEUCHAT, L.R.; PITT, J.I. Detection and Enumeration of Heat Resistant Molds. In:
531 **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. APHA:
532 4^aed. p. 217-222. 2001. Washington, DC. American Public Health Association.

533

534 BOLETIM TÉCNICO, IAC 200. **Frutíferas – manga**. 1998. Disponível em:
535 <http://www.iac.sp.gov.br/Centros/centro%20de%20fruticultura/FRUTIFERAS/Ma>
536 [nga.htm](http://www.iac.sp.gov.br/Centros/centro%20de%20fruticultura/FRUTIFERAS/Ma). Acesso em 20/02/2006.

537 DANTIGNY, P.; GUILMART, A.; RADOI, F.; BENSOUSSAN, M.; ZWIETERING, M.
538 Modelling the effect of ethanol on growth rate of food spoilage moulds. **International**
539 **Journal of Food Microbiology**. V. 98, p.261-269, 2005.

540

541 DANTIGNY, P.; BENSOUSSAN, M.; VASSEUR, V.; LEBRIHI, A.; BUCHET, C.;
542 ISMAILI-ALAOUI, M.; DEVLIEGHERE, F.; ROUSSOS, S. Standardisation of methods
543 for assessing mould germination: A workshop report. **International Journal of Food**
544 **Microbiology**, *In Press*, 2006.

545

546 FINETTO, M. Suco pronto é artigo básico para muita gente. **Correio Popular**.

547 20/01/2005.

548

549 GENOMICS AND BLOOD SUBSTITUTES FOR 21ST CENTURY EUROPE, 2006.

550 ***Aspergillus niger* (fungus)**. Disponível em:

551 <http://www.eurobloodsubstitutes.com/euroProject.htm>. Acesso em: 25/05/2006.

552

553 GIBSON, A. *et al.* Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus*

554 *flavus* and related species. **International Journal of Food Microbiology**. V.23, p.

555 419-431. 1994.

556

557 LÓPEZ, S.; PRIETO, M.; DIJKSTRA, J.; DHANOA, M.S.; FRANCE, J. Statistical

558 evaluation of mathematical models for microbial growth. **International Journal of Food**

559 **Microbiology**. V.96, p.289-300. 2004.

560

561 LÓPEZ-MALO, A. *et al.* Effect of vanillin concentration, pH and incubation temperature

562 on *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus parasiticus* growth. **Food**

563 **Microbiology**. V.14, p.117-124. 1997.

564

565 MARCOLINO, V.A. Quantificação de leveduras, bolores comuns e termoresistentes em

566 linha de processamento asséptico de bebida de uva. Campinas, 2003. 173p. Tese de

567 Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade

568 Estadual de Campinas.

569

570 NIKOLIC, M.V.; MOJOVIC, L. Hydrolysis of apple pectin by the coordinate activity of
571 pectic enzymes. **Food Chemistry**. 2006. *In Press*.

572

573 PANAGOU, E.Z. *et al.* Modelling the combinee effect of temperature, pH and a w on the
574 growth rate *Monascus ruber*, a heat-resistant fungus isolated form green table olives.
575 **Journal of Applied Microbiology**. V. 94, p. 146-156. 2003.

576

577 PARDO, E.; RAMOS, A.J.; SANCHIS, V., MARÍN, S. Modelling of effects of water
578 activity and temperature on germination and growth of ochratoxigenic isolates of
579 *Aspergillus ochraceus* on green coffee-based medium. **International Journal of Food**
580 **Microbiology**, v. 98, p.1-9. 2005.

581

582 PETRUS, R.R Desenvolvimento de processo e avaliação de estabilidade de bebida
583 isotônica acondicionada em garrafa plástica asséptica. Campinas, 2000. 122p. Tese
584 de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade
585 Estadual de Campinas.

586

587 PEÑA, W.L.; FARIA, J.A.; de MASSAGUER, P.R. Development of a predictive model
588 on the growth of the spoilage mould, *Paecilomyces variotii*, in pineapple juice. **Fruit**
589 **Processing**, p. 420-426, November/December 2004.

590

591 PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. Sydney: Acedemic Press. 413
592 p. 1985.

593

594 ROSSO, L.; ROBINSON, T.P. A cardinal model to describe the effect of activity on the
595 growth of moulds. **International Journal of Food Microbiology**, v.63, p.265-273.
596 2001.

597

598 SAMSOM, R.A.; REENEN-HOEKSTRA, E.S. **Identification of the common food-**
599 **borne fungi.** p.3-5, 56-57, 66-67. 1988.

600

601 SPLITTSTOESSER, D.F.; SPLITTSTOESSER, C.M. Ascospores of *Byssochlamys*
602 *fulva* compared with those of a heat resistant *Aspergillus*. **Journal of Food Science.**
603 V.42, n.3. 1977.

604

605 TOURNAS V. Heat-Resistant Fungi of Importance to food and beverage industry.
606 **Critical Reviews in Microbiology.** V. 20, n. 4, p. 243-263. 1994.

607

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

610

611 VILAS BOAS *et al.* Qualidade microbiológica de mangas “Tommy Atkins” minimamente
612 processadas. Apresentado no 5º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos -
613 SLACA, Campinas, SP. 03-06/11/2003.

614

615 VALÍK, L.; PIECKOVÁ, E. Growth modelling of heat-resistant fungi: the effect of water
616 activity. **International Journal of Food Microbiology.** V.63, p.11-17. 2001.

617 ZWIETERING, M.H. *et al.* Modeling of bacterial growth as a function of temperature.
618 **Applied and Environmental Microbiology.** V.57, n.04, p.1094-1101. 1991.

619 **AGRADECIMENTOS**
620 Os autores agradecem à EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) e
621 à CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Ensino Superior) pelo suporte
622 financeiro.

623
624

625
626
627
628
629
630
631

632

633

634

635

636

637

638

639

640

641

642

643

644

645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665

TABELA 1. *Choques térmicos para determinação do isolado mais termoresistente em néctar de manga.*

TEMPERATURA (°C)	TEMPO (minutos)
80	30
85	15
90	10
	5
95	10
	20
	5
	10
100	15
	20
	25

Fonte: Adaptado de Baglioni (1998).

666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688

TABELA 2. *Correspondência das medidas da quantidade de sólidos solúveis (Brix) e atividade de água (aw) em néctar de manga.*

Brix	Atividade de Água (aw)
10,6	0,990
12,0	0,986
13,0	0,984
13,5	0,981
14,0	0,980
15,6	0,979
16,0	0,974
16,3	0,970

* Leituras realizadas em aparelho Aqualab Cx02 (Decagon), a temperatura constante em 28,5°C, obtidas a partir da média aritmética de duas leituras.

689
690
691
692
693
694
695

696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709

TABELA 3. *Planejamento experimental para crescimento de Aspergillus niger, em néctar de manga para estudo da influência de Aw, pH e temperatura.*

<i>Ensaio</i>	<i>pH</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Aw</i>
01	4,5	22	0,990
02	3,5	22	0,990
03	4,5	18	0,990
04	3,5	18	0,990
05	4,5	22	0,970
06	3,5	22	0,970
07	4,5	18	0,970
08	3,5	18	0,970
09	4,0	20	0,980
10	4,0	20	0,980
11	4,0	20	0,980

710
711
712
713
714
715
716
717
718
719

TABELA 4. *Planejamento experimental para crescimento de Aspergillus niger, em néctar de manga, a aw fixa em 0,980, para estudo da influência de pH e temperatura.*

<i>Ensaio</i>	<i>pH</i>	<i>Temperatura (°C)</i>
01	3,5	18
02	4,5	18
03	3,5	22
04	4,5	22
05	4,0	20
06	4,0	20
07	4,0	20
08	3,28	20
09	4,0	22,8
10	4,7	20
11	4,0	17,2

720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730

731
732
733
734
735
736
737
738
739

740 **TABELA 5.** *Sobrevivência de bolores termoresistentes em néctar de manga.*

<i>Isolado</i>	80°C <i>30min</i>	85°C <i>15min</i>	90°C <i>10min</i>	95°C <i>10min</i>	100°C <i>15min</i>	100°C <i>20min</i>
I4E22M*	+	-	-	-	-	-
I7E16M	+	-	-	-	-	-
I3E14M	+	+	-	-	-	-
I1E4M	+	+	-	-	-	-
I6E4M	+	+	-	-	-	-
I2E7M	+	+	+	-	-	-
I8E16M	+	+	+	+	-	-
I5E16M	+	+	+	+	+	-

741
742
743
744
745
746
747
748
749

* I – isolado; 4 – número do isolado; E22 – número da embalagem.

750

751

752 **TABELA 6.** Identificação completa do isolado I5E16M e preliminar dos demais bolores
753 termoresistentes isolados de néctar de manga.

Isolado	Temperatura	Meio de identificação	Face da placa	Características das colônias	Conclusão
I5E16M	5°C	CYA, G25N, MEA	-	Sem crescimento	Aspergillus niger
			D*	Negra, arenosa, borda lisa; 60mm	
	25°C	CYA	R**	Bege, delimitada com crescimento radial, sem exsudado	
			D	Centro marrom escuro, cotonosa, bordas brancas e lisas, 30mm	
		G25N	R	Bege, ramificada, crescimento axial, sem exsudado	
			D	Negra, pulverulenta, 15mm	
		MEA	R	Bege	
			D	Negra, delimitada, arenosa, borda branca, sem exsudado, 60mm	
		30°C	CYA	R	
	D			Centro negro, borda marrom e lisa, 20mm	
	G25N		R	Bege, ramificada, crescimento axial	
			D	Negra, pulverulenta, 30mm	
	MEA		R	Bege om crescimento radial	
		D	Negra, arenosas, delimitada, borda branca, sem exsudado, 35mm		
	37°C	CYA	R	Bege	
D			Centro marrom, pulverulenta, 35mm		
G25N		R	Branca com centro esverdeado, ramificada com crescimento axial		
		D	Negra, pulverulenta, 35mm		
-	MEA	R	Bege com crescimento radial		
		D	Hifas não septadas, paredes paralelas, conidiósporos saindo das hifas com 2,5mm de comprimento, hialinos, filíades crescendo na superfície das métulas		
Demais isolados	-	Microscopia	-	Hifas não septadas de paredes simples, com Penicilli (estrutura em forma de "dedos") tri ou tetraverticulada	Penicillium sp.

754

755

* Direito

** Reverso

756
757

758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771

TABELA 7. *Contagem da população das suspensões de esporos de cada isolado.*

<i>Código do isolado</i>	<i>Contagem da população (esporos/mL)</i>
I4E22M*	$1,40 \times 10^6$
I7E16M	$1,0 \times 10^6$
I3E14M	$1,50 \times 10^6$
I1E4M	$1,01 \times 10^6$
I6E4M	$1,06 \times 10^6$
I2E7M	$2,5 \times 10^6$
I8E16M	$1,08 \times 10^6$
I5E16M	$1,04 \times 10^6$

772

773

774

775

776

777

778

779

780

781

782

* I – isolado; 4 – número do isolado; E22 – número da embalagem; M – néctar de manga.

783

784

785

786

787

788

TABELA 8. *Parâmetros de crescimento de Aspergillus niger em néctar de manga, obtidos por modelagem de Gompertz modificado (G) e Baranyi & Roberts (B), a partir de ensaios da Tabela 4.*

Ensaio	Modelo de crescimento	Parâmetros			Diâmetro máximo (mm)	Coeficiente de ajuste (R^2)
		Tempo de adaptação (λ ; dias)	Tempo de adaptação observado (dias)**	Taxa de Crescimento (μ ; mm.dia ⁻¹)		
1	B	18,04 ± 1,86*	19	4,3 ± 1,322	16,17 ± 2,758	0,997
	G	17,3 ± 0,276		1,75 ± 0,127	20,9 ± 1,541	0,959
2	B	16,42 ± 0,282	16	4,5 ± 1,209	22,76 ± 1,959	0,995
	G	15,35 ± 0,227		2,58 ± 0,127	24,9 ± 0,339	0,972
3	B	5,06 ± 0,510	6,3	3,3 ± 0,257	20,29 ± 0,796	0,996
	G	6,27 ± 0,436		3,95 ± 0,456	20,78 ± 1,037	0,992
4	B	1,5 ± 0,831	2,3	5,08 ± 0,592	32,99 ± 0,405	0,997
	G	1,99 ± 0,823		6,02 ± 0,748	35,79 ± 1,621	0,993
5	B	8,11 ± 1,06	10,7	1,5 ± 0,159	19,26 ± 1,750	0,992
	G	8,64 ± 1,16		1,6 ± 0,235	21,93 ± 3,366	0,985
6	B	6,78 ± 0,864	8,7	1,62 ± 0,305	18,49 ± 0,529	0,988
	G	7,33 ± 0,968		2,11 ± 0,512	22,48 ± 2,302	0,984
7	B	7,08 ± 0,839	9,7	1,31 ± 0,076	18,92 ± 1,756	0,991
	G	7,56 ± 1,409		1,89 ± 0,320	21,09 ± 3,218	0,980
8	B	9,12 ± 0,748	10,7	2,76 ± 0,381	15,6 ± 0,114	0,996
	G	9,26 ± 0,597		2,84 ± 0,349	16,48 ± 0,201	0,994
9	B	0,13 ± 0,803	1,7	4,49 ± 0,035	37,94 ± 0,815	0,998
	G	0,61 ± 0,781		5,31 ± 0,101	40,55 ± 0,928	0,996
10	B	3,31 ± 0,021	3,7	5,2 ± 0,637	33,19 ± 1,209	0,996
	G	3,62 ± 0,190		6,11 ± 0,611	34,95 ± 1,783	0,993
11	B	22,01 ± 0,961	24	2,99 ± 0,233	21,14 ± 2,171	0,990
	G	21,64 ± 0,038		2,15 ± 0,572	18,72 ± 0,658	0,993

789

790

791

792

793

794

** Tempo de adaptação médio de 3 repetições

* Desvio Padrão calculado a partir de 3 repetições.

795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816

TABELA 9. *Análise de significância para estudo da influência de pH, temperatura e aw sobre parâmetros de crescimento de A.niger em néctar de manga, com inóculo de 9.3×10^3 esporos/mL.*

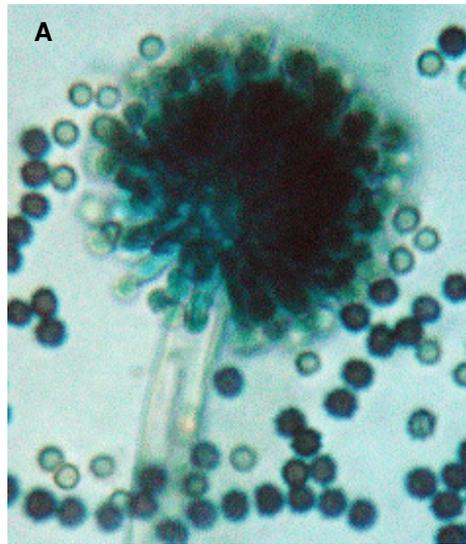
Variável	Valores de p*		
	λ (dias)	μ (mm.dia ⁻¹)	Dmax (mm)
pH	0,0191	0,004	0,0352
Temperatura	0,0173	0,0005	0,0134
Aw	0,9269	0,3471	0,2888

* valores de p calculados a intervalo com 95% de probabilidade, sendo significativos valores de p<0,05.

817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842

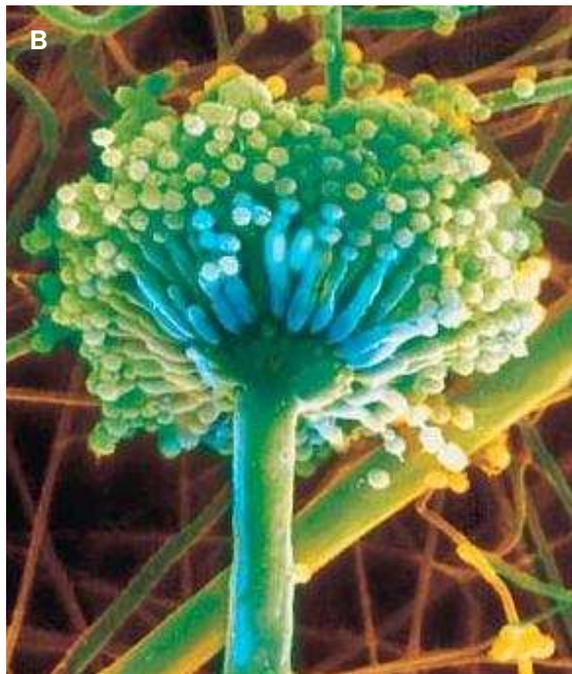
FIGURA 1. Diferentes representações de *Aspergillus niger*. **A.** microscopia ótica com aumento de 1000 vezes do isolado I5E16M com hifa, corpo de frutificação e conidiósporos; **B.** microscopia eletrônica de varredura representado o conidióforo, métula, esterigma e conídeos, retirado de *Genomics and Blood Substitutes for 21st Century Europe* (2006).

843



844

845



846

847

848

849

850

851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876

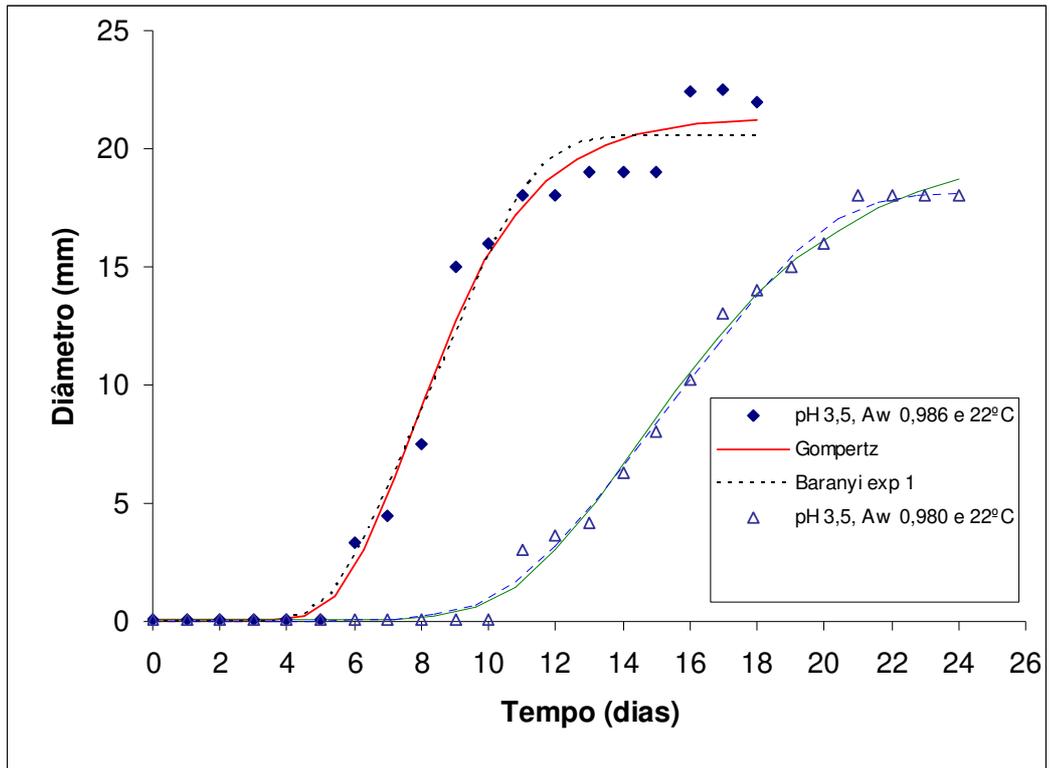
A. Alessandra Regina da Silva e Pilar Rodriguez de Massaguer
B. Genomics and Blood Substitutes for 21st Century Europe (2006).

877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900

FIGURA 02. *Deslocamento médio* da curva de crescimento de *Aspergillus niger*, em néctar de manga, em condição de redução de A_w de 0,986 a 0,980, em temperatura de 22°C e pH 3,5 e nível de inóculo de $6,8 \times 10^0$ esporos/mL, modeladas por Gompertz modificado e Baranyi & Roberts.*

* Deslocamento médio obtido a partir de 3 curvas de crescimento de *A.niger* em néctar de manga para cada ensaio.

901
902
903
904



905
906
907
908
909
910
911
912
913
914

915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942

Alessandra Regina da Silva e Pilar Rodriguez de Massaguer

943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968

FIGURA 03. *Incremento no diâmetro final das colônias de Aspergillus niger em função da mudança de pH de 3,5 (A) para 4,5 (B), a aw 0,980 e 22°C.*

969

970

971

972

973

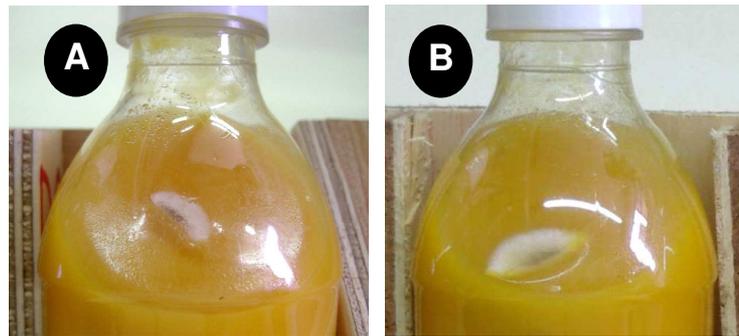
974

975

976

977

978



979

980

981

982

983

984

985

986

987

988

989

990

991

992

993

994
995
996
997
998
999
1000
1001
1002
1003
1004
1005
1006
1007
1008
1009
1010
1011
1012
1013
1014
1015
1016
1017
1018
1019
1020

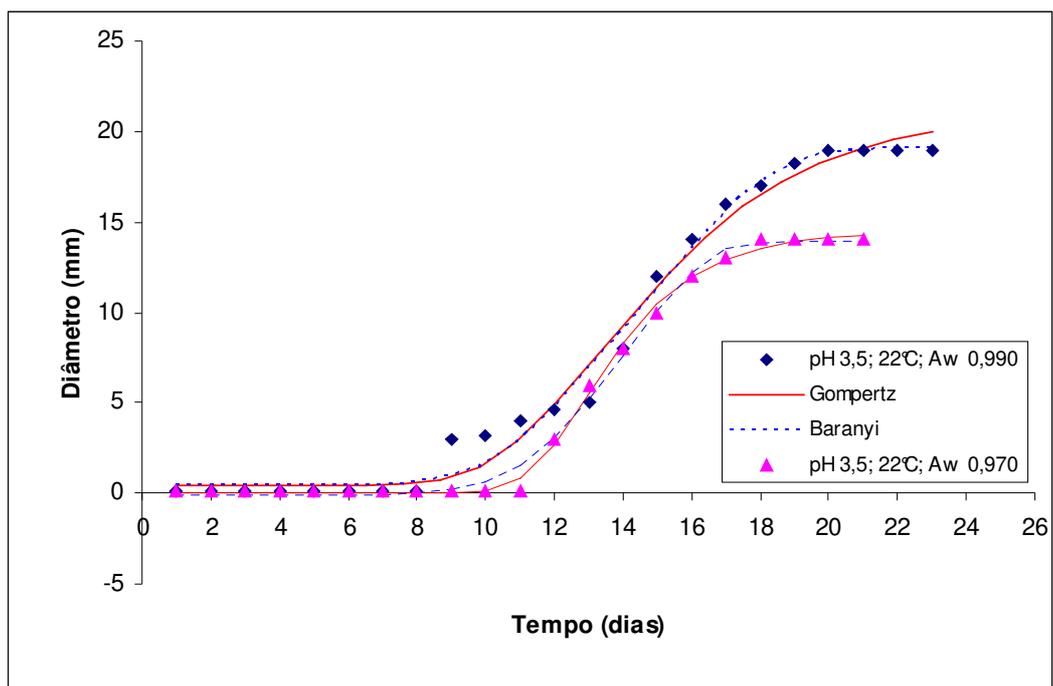
Alessandra Regina da Silva e Pilar Rodriguez de Massaguer

1021
1022
1023
1024
1025
1026
1027
1028
1029
1030
1031
1032
1033
1034
1035
1036
1037
1038
1039
1040
1041
1042
1043
1044
1045

FIGURA 4. *Deslocamento médio* da curva de crescimento de *Aspergillus niger*, em néctar de manga, com redução de A_w de 0,990 para 0,970 (ensaios 2 e 6 do primeiro planeamento, respectivamente), mantendo-se constantes temperatura e pH a 22°C e 3,5, respectivamente, com inóculo de $9,3 \times 10^3$ esporos/mL, modeladas por Gompertz modificado e Baranyi & Roberts.*

* Deslocamento médio obtido a partir de 3 curvas de crescimento de *A.niger* em néctar de manga para cada ensaio.

1046
1047
1048
1049
1050
1051
1052
1053
1054
1055



1056
1057
1058
1059
1060

1061
1062
1063
1064
1065
1066
1067
1068
1069
1070
1071
1072
1073
1074
1075
1076
1077
1078
1079
1080
1081
1082
1083
1084
1085
1086

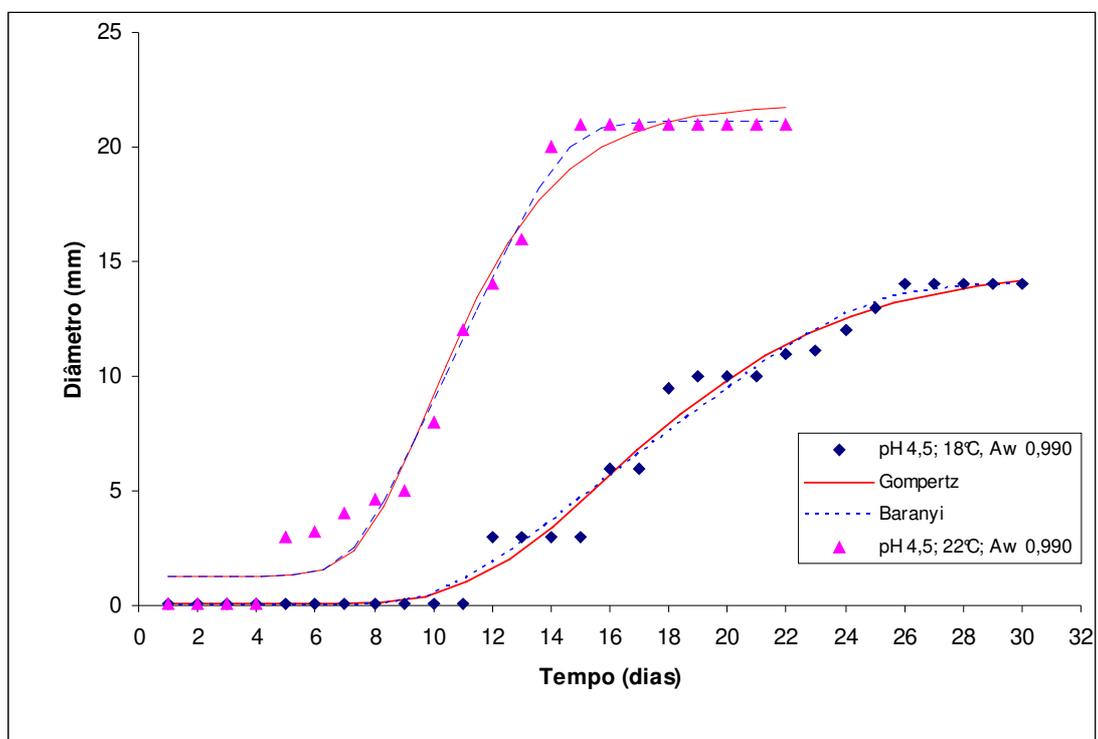
Alessandra Regina da Silva e Pilar Rodriguez de Massaguer

1087
1088
1089
1090
1091
1092
1093
1094
1095
1096
1097
1098
1099
1100
1101
1102
1103
1104
1105
1106
1107
1108
1109
1110
1111

FIGURA 5. *Deslocamento médio* da curva de crescimento de Aspergillus niger, em néctar de manga, com redução da temperatura de 22°C para 18°C (primeiro planejamento, ensaios 1 e 5, respectivamente) mantendo-se constantes Aw e pH a 0,990 e 4,5, respectivamente, com inóculo de $9,3 \times 10^3$ esporos/mL, modeladas por Gompertz modificado e Baranyi & Roberts.*

* Deslocamento médio obtido a partir de 3 curvas de crescimento de *A.niger*, em néctar de manga para cada ensaio.

1112
1113
1114
1115
1116
1117
1118



1119
1120
1121
1122
1123
1124
1125

1126

1127

1128

1129

1130

1131

1132

1133

1134 ***Alessandra Regina da Silva e Pilar Rodriguez de Massaguer***

1135

1136

1137

1138

1139

1140

1141

1142

1143

1144

1145

1146

1147

1148

1149

1150
1151
1152
1153
1154
1155
1156
1157
1158
1159
1160
1161
1162
1163
1164
1165
1166
1167
1168
1169
1170
1171
1172

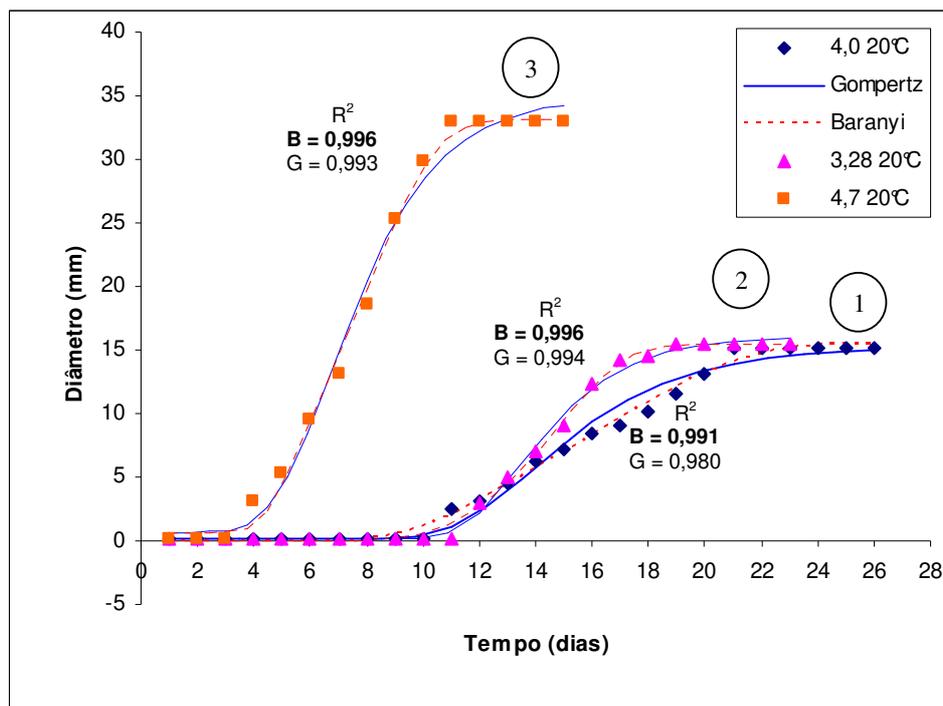
FIGURA 6. *Deslocamento médio* da curva de crescimento de Aspergillus niger, em néctar de manga, modeladas por Gompertz modificado e Baranyi & Roberts, nas seguintes condições: 1: pH 4,0 e 20°C, ensaio 7; 2: pH 3,28 e 20°C, ensaio 8; 3: pH 4,7 e 20°C, ensaio 10, com inóculo de $9,3 \times 10^3$ esporos/mL.*

* Deslocamento médio obtido a partir de 3 curvas de crescimento de *A.niger* em néctar de manga para cada ensaio.

1173

1174

1175



1176

1177

1178

1179

1180

1181

1182

1183

1184

1185

1186

1187

1188

1189

1190

1191

1192

1193

1194

1195

1196

Alessandra Regina da Silva e Pilar Rodriguez de Massaguer

1197

1198

1199

1200

1201

1202

1203

1204

1205

1206

1207

1208

1209

1210

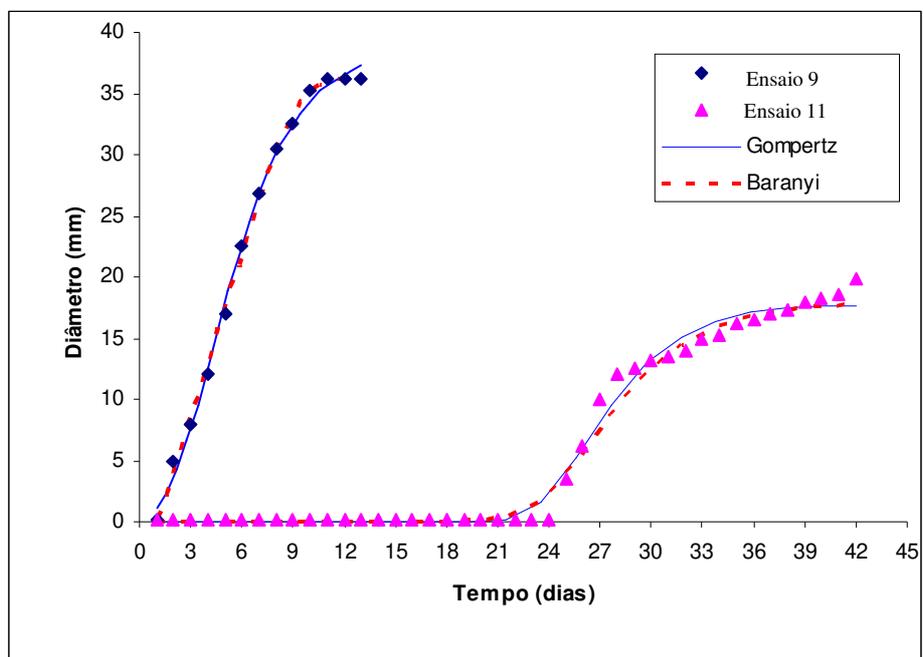
1211

1212
1213
1214
1215
1216
1217
1218
1219
1220
1221
1222
1223
1224
1225
1226
1227
1228
1229
1230
1231
1232
1233
1234
1235
1236

FIGURA 7. *Deslocamento médio* da curva de crescimento de Aspergillus niger, em néctar de manga, com redução de temperatura de 22,8°C a pH 4,0 (ensaio 9) para 17,2°C a pH 4,0 (ensaio 11), modeladas por Gompertz modificado e Baranyi & Roberts, com inóculo de 9.3×10^3 esporos/mL.*

* Deslocamento médio obtido a partir de 3 curvas de crescimento de *A.niger* em néctar de manga para cada ensaio.

1237
1238
1239
1240
1241
1242
1243



1244
1245
1246
1247
1248
1249
1250
1251

1252

1253

1254

1255

1256

1257

1258

1259

Alessandra Regina da Silva e Pilar Rodriguez de Massaguer

1260

1261

1262

1263

1264

1265

1266

1267

1268

1269

1270

Capítulo 03

Artigo formatado de acordo com as normas de submissão da revista

“International Journal of Food Microbiology”

1 ***Modelagem polinomial do tempo de adaptação e taxa de crescimento de***
2 ***Aspergillus niger em néctar de manga variedade ubá como função da***
3 ***temperatura e pH.***

4
5
6 ALESSANDRA REGINA DA SILVA² e PILAR RODRIGUEZ DE MASSAGUER

7
8
9
10 *Universidade Estadual de Campinas*

11 *Faculdade de Engenharia de Alimentos*

12 *Departamento de Ciência de Alimentos – Laboratório de Termobacteriologia*

13 *P.O.Box 6121, CEP 13083-862*

14 *Campinas, São Paulo - Brasil*

15
16
17
18
19

² Corresponding author: State University of Campinas, Faculty of Food Engineering, Department of Food Science, CP 6121, CEP 13083-862. Campinas, São Paulo, Brasil. Phone/Fax: 55-19-3289-4966. E-mail: marx@fea.unicamp.br.

20 **MODELAGEM POLINOMIAL DO TEMPO DE ADAPTAÇÃO E TAXA DE**
21 **CRESCIMENTO DE *Aspergillus niger* EM NÉCTAR DE MANGA VARIEDADE**
22 **UBA COMO FUNÇÃO DA TEMPERATURA E pH.**

23 A.R. Silva³, P.R. de Massaguer

24 Faculty of Food Engineering, Department of Food Science

25
26 **ABSTRACT**

27 In 2005 it was produced 850000 tons of mangoes in Brazil (1) and mango
28 nectar is the 3rd ranked in flavor preference. This product may be contaminated
29 with fungi able to survive pasteurization. Therefore, it is essential to study hurdle
30 factors affecting mold growth in such product. This research aimed to model the
31 effect of temperature and pH on time to observe visible colonies (λ ; days) and on
32 the growth rate (μ ; mm.dia⁻¹) of *A.niger*, the most heat-resistant mold isolated from
33 Brazilian mango nectar(2). *A.niger* was used as inoculum (9.3×10^3 spores/mL) in
34 PET bottles (230mL), with 0.041cc/Oxigen/m²/day. Initially 3 factors, temperature
35 (18-22°C), pH (3.5-4.5) and aw (0.970-0.990) were tested according to a central
36 composite design. As aw was not significant, in the range considered, temperature
37 (17.2-22.8°C), pH (3.28-4.70) at aw fixed 0.980 were tested by a central composite
38 design with three central points and four star points. Fungal growth was measured
39 as colony diameter on daily basis (3). Primary predictive models of Baranyi &
40 Roberts and modified Gompertz(4) were used to fit growth data and a secondary
41 polynomial model was developed to evaluate the influence of both factors.

³ Corresponding author: Fax. 55 19 3289-4966
E-mail address: marx@fea.unicamp.br (A.R.Silva).

42 Baranyi's model showed the best performance to describe results, with higher R²
43 values (0.998). The obtained model for adaptation time, with temperature,
44 (temperature)² and pH as significant factors (p<0.05),
45 was: $\lambda(days) = 7.176 - 1.676 * pH - 7.366 * T + 2.335 * T^2$. This model was verified with R²
46 0.981, 1.06 bias factor, 1.16 accuracy factor and F_{val}/F_{tab} 23.4. The statistical
47 analyses demonstrate that a decrease in pH of 0.5 unit could duplicate the product
48 shelf-life (from 10 to 20 days). The same effect was observed with reductions of
49 about 0.8°C in temperature. The maximum shelf life obtained (about 30 days) was
50 in pH 3.28 and 17.2°C.

51 The obtained model for growth rate, with pH, (pH)², temperature and
52 (temperature)² as significant factors was:

53
$$\mu(mm.day^{-1}) = 1,474998 + 0,679572 * pH + 1,365807 * pH^2 + 0,212507 * T + 1,245089 * T^2$$

54 This model was verified with R² 0.882, 1.06 bias factor, 1.16 accuracy factor and
55 F_{val}/F_{tab} 2.6. Statistical analysis showed a minimum growth rate at pH 4.0 and
56 temperature 20°C (1.33mm.day⁻¹). Thus, small reductions in pH and temperature
57 seem to contribute for fungal growth inhibition or product shelf-life extension.

58 **KEY WORDS**

59 *Aspergillus niger*; mango nectar; predictive microbiology.

60

61

62

63

64

65

INTRODUÇÃO

66

67

68

69

70

71

O mercado nacional dos sucos prontos para beber tem apresentado grande crescimento, com aumento de 20 vezes na produção nos últimos 10 anos, sendo que a produção nacional em 2004 chegou a 308 milhões de litros. Embora este crescimento seja marcante, ainda está distante do potencial total do país. Neste mercado, o néctar de manga ocupa 3º lugar no ranking mundial de preferência por sabor (Finetto, 2005).

72

73

74

75

76

77

78

79

80

81

82

83

84

85

86

Sucos de frutas como manga, goiaba, uva, maçã e pêra são altamente suscetíveis à infecção por fungos e até mesmo por toxinas produzidas por algumas linhagens. As linhagens que mais se destacam como contaminantes destes produtos são membros dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Condições impróprias de armazenamento e estocagem de sucos de frutas, como por exemplo, distribuição e venda a temperatura ambiente, considerando que o produto sofre apenas pasteurização, podem facilitar imensamente esta contaminação. Nestes sucos ou bebidas de frutas processadas, alguns isolados de fungos têm demonstrado habilidade de sobreviver ao tratamento térmico aplicado, podendo então deteriorar os produtos armazenados. Acredita-se ainda que a resistência destes microrganismos esteja relacionada com sua produção de esporos (Abdel-Sater *et al.*, 2001) ou a formas miceliais com resistência adquirida, como por exemplo, no caso de *Paecilomyces variotii*, que apresenta resistência térmica tanto associada às hifas quanto clamidósporos (Peña *et al.*, 2004). Assim sendo, os fungos vêm se tornando microrganismos emergentes na indústria de

87 alimentos, principalmente na indústria dos sucos, néctares e concentrados de
88 frutas, por serem produtores potenciais de micotoxinas e deteriorantes de
89 alimentos (Rosso & Robinson, 2001). Cabe ressaltar ainda que a microbiota mais
90 encontrada nestes produtos composta por linhagens de *Aspergillus* e *Penicillium*
91 se apresentam como altamente resistentes a preservantes químicos, geralmente
92 utilizados em sucos, como por exemplo, ácido sórbico e benzóico, podendo até
93 mesmo tolerar ambientes com alta acidez e baixos valores de aw (De Bôer &
94 Nielsen, 1995, citados por Battey *et al.*, 2001). Nesta linha, Shearer *et al.* (2002)
95 acrescentam que leveduras, bolores e bactérias ácido-tolerantes, associadas a
96 frutas cru, sucos concentrados ou ainda ao ambiente de processamento de sucos
97 são microrganismos deteriorantes preocupantes relacionados ao processamento
98 térmico adequado destes produtos, bem como sanitização de suas embalagens.

99 Muitos dos fungos contaminantes de alimentos apresentam baixa resistência
100 térmica, sendo geralmente associada à produção sexual de ascósporos, os quais
101 possuem provavelmente algum componente muito estável e crítico para a
102 germinação, além de parede celular relativamente mais resistente a penetração de
103 calor (Tournas, 1994). Sob este enfoque Blaszyk *et al.* (1998), citam Conner &
104 Beauchat, 1987 e Beachat, 1988, dizem que a composição nutricional,
105 temperatura e aw variáveis de extrema importância na determinação da
106 resistência térmica de esporos, sendo esta aumentada, por exemplo, em
107 condições de baixos valores de aw. Todavia, sabe-se que atualmente esta
108 resistência térmica já não está somente associada à produção de ascósporos,
109 pois, em alguns casos, linhagens produtoras de conídios têm se demonstrado
110 altamente resistentes ao calor, conforme relatado em pesquisa realizada por

111 Splittstoesser & Splittstoesser (1977), na qual estudaram a resistência térmica de
112 linhagens de *Aspergillus*, constatando sobrevivência da linhagem *Aspergillus* WR1
113 a 85°C por até 60 minutos, em suco de uva.

114 O crescimento de fungos pode ser influenciado por uma séria de fatores
115 intrínsecos e extrínsecos, como temperatura, tempo, agentes antimicrobianos
116 sintéticos e naturais, os quais vêm demonstrando importantes propriedades anti-
117 fúngicas (López-Malo *et al.*, 2000, citado por López-Malo *et al.*, 2005). Existem
118 ainda outras variáveis que podem ser utilizadas como barreira ao crescimento
119 destes bolores deteriorantes. Em pesquisa conduzida por Panagou *et al.* (2003)
120 foram estudados os efeitos de temperatura, pH e a_w sobre o crescimento de
121 *Monascus ruber*.

122 Uma ferramenta importante no estudo e predição do comportamento destas
123 variáveis são os modelos matemáticos gerados e utilizados pela microbiologia
124 preditiva, um ramo eminente da microbiologia que integra a quantificação de
125 microrganismos de alimentos e a tentativa de prever seu comportamento, quando
126 variáveis controladoras de crescimento são utilizadas e ou alteradas.

127 Tendo como base o exposto acima, esta pesquisa teve por objetivo
128 desenvolver um modelo preditivo que descreva os efeitos de temperatura e pH
129 sobre o tempo para se observar colônias visíveis (λ ; dias) de *Aspergillus niger* em
130 néctar de manga pasteurizado e submetido a abuso de temperatura, bem como
131 um modelo para sua taxa de crescimento (μ ; mm.dia⁻¹) em função dos mesmos
132 parâmetros. Estes modelos poderão predizer o tempo de vida de prateleira do
133 produto em função de alterações nas variáveis utilizadas.

MATERIAL E MÉTODOS

➤ **Microrganismo e preparo da suspensão de esporos**

Aspergillus niger, linhagem mais termoresistente (100°C / 15 minutos)

isolada a partir de néctar de manga (Silva & Massaguer, 2006), foi utilizada para o preparo da suspensão de esporos. Para tanto, o microrganismo foi primeiramente recuperado em placas de Petri com meio PDA (Potato Dextrose Agar), incubadas a 25-28°C por 7 dias. Decorrido o período de incubação o crescimento do bolor foi removido através da adição de 2mL de água destilada estéril em cada placa e raspagem do crescimento com bagueta de ponta esférica estéril. Desta suspensão, 0.5mL foi transferido, assepticamente, em capela de fluxo laminar, para garrafas de Roux contendo 200mL de meio MEA (Malt Extract Agar), as quais foram incubadas em BOD a 25-28°C por 30 dias ou até verificação da formação de esporos, mediante observação através de lâmina com coloração com Lacto-Fucsina 0,1% (Pitt & Hocking (1985)), em microscópio ótico Carl Zeiss Axiostar (com aumento de 400 vezes). Quando 70% da lâmina estava coberta por conídeos com parede rígida, foi realizada a remoção do crescimento, mediante colocação de, aproximadamente, 25mL de água destilada estéril/ garrafa, seguida de remoção do crescimento com auxílio de bagueta de ponta esférica estéril. A suspensão, filtrada em três camadas de gaze estéril, foi coletada em frascos estéreis, homogeneizada e submetida a processo de centrifugação a 11962.6 xg e 5°C, durante 15 minutos, com observações microscópicas a cada final de ciclo para se verificar a necessidade de nova centrifugação, sendo este processo repetido por, no máximo, três vezes, evitando-se assim danificações na parede celular do esporo. Após esse procedimento foi realizado ainda o processo de

158 ultrassom em banho de gelo, com temperatura de 0 a 4°C, por 3 minutos (tempo
159 necessário para obtenção de esporos livres) (Baglioni, 1998; Splittstoesser &
160 Splittstoesser, 1977). Esta suspensão final foi transferida para garrafa de vidro
161 com capacidade de 300mL, com aproximadamente 60 pérolas de vidro, sendo
162 este conjunto previamente esterilizado e mantida em geladeira a 4°C até o uso.

163 ➤ **Planejamento experimental**

164 Os efeitos de pH, variando de 3.5 a 4.5; temperatura, de 18 a 22°C e aw, de
165 0.970 a 0.990, sobre o tempo de adaptação de *A.niger*, foram testados mediante
166 um planejamento fatorial 2³, acrescido de 3 pontos centrais (TABELA 1),
167 objetivando-se, desta maneira, verificar qual das variáveis exerceria impacto
168 significativo (p<0.05) sobre o crescimento do bolor termoresistente.

169 Tabela 1

170 A seguir, considerando-se apenas as variáveis com impacto significativo
171 (p<0.05) sobre o crescimento do fungo, foi utilizado um planejamento composto
172 central 2², com 3 repetições no ponto central e 4 pontos axiais ou estrelas, visando
173 se obter maior variabilidade no planejamento (TABELA 2).

174 Tabela 2

175 Assim sendo, os valores para pH foram fixados no limite superior (+1) em
176 4.5, no inferior (-1) em 3.5, considerando a faixa de variação no pH do néctar de
177 manga ao longo da safra de produção; já nos pontos centrais (0) o pH foi fixado em
178 4.0 e nos extremos negativo (-√2) em 3.28 e positivo (+√2) em 4.7,
179 respectivamente, considerando ainda que, os ajustes nos valores de pH foram
180 realizados com solução NaOH 3N e solução de ácido tartárico 30% (p/v), sendo
181 medidos em pHmêtro comercial, Digimed, modelo DMpH-2 – Tecnal.

182 Para a faixa de temperatura utilizada foi a que representou a interface de
183 crescimento/não crescimento na etapa exploratória da pesquisa. Assim sendo, as
184 temperaturas foram, em valores reais e codificados, de 17.2°C (-√2); 18 (-1); 20 (0);
185 22 (+1) e 22.8°C (+√2), as quais se encontram dentro da faixa específica de
186 crescimento/desenvolvimento de *Aspergillus niger*, segundo López-Malo *et al.*
187 (1997).

188

189 ➤ **Inoculação e incubação**

190 Para cada ensaio, desenvolvido de acordo com os desenhos experimentais
191 apresentados nas TABELAS 1 e 2, foram inoculadas 3 garrafas PET de 250mL
192 cada (0.041cc/Oxigênio/m²/dia), higienizadas com ácido peracético 13.5% (v/v),
193 sendo utilizado na concentração de 0.3% (v/v) para garrafas e 0.05% (v/v) para as
194 tampas (Petrus, 2000), com 230mL de néctar de manga, em cada, previamente
195 esterilizado a 105°C por 10 minutos. Em cada garrafa foi inoculada uma
196 suspensão de *Aspergillus niger* com contagem final de 9.3x10³ esporos/mL de
197 néctar, previamente submetida ao binômio de 80°C por 30 minutos (Beuchat &
198 Pitt, 2001) acrescido do tempo de atraso térmico (5'10"), para ativação. O tempo
199 de atraso térmico foi obtido em tubos de rosca de 13x100mm, completados com
200 7.2mL de néctar de manga e 0.8mL de suspensão. Estas garrafas foram então
201 incubadas, em suportes em posição inclinada a 45°, nas temperaturas referentes a
202 cada ensaio por até 90 dias, considerando este como o tempo máximo para
203 aparecimento do microrganismo nas condições mais rígidas de estocagem.

228
229
230
231
232
233
234

$$y(t) = y_0 + (\mu_{m\acute{a}x} \cdot A(t)) - \ln\left(1 + \frac{e^{\mu_{m\acute{a}x} \cdot A(t)} - 1}{e^{y_{m\acute{a}x} - y_0}}\right)$$

Equação 1

Onde $y(t)$ = diâmetro final da colônia
 $\mu_{m\acute{a}x}$ = taxa máxima de crescimento
 y_0 = diâmetro inicial
 $y_{m\acute{a}x}$ = diâmetro máximo da colônia
 $A(t)$ = função de ajuste (Equação 2)

235

$$A(t) = t + \frac{\ln(e^{\mu_{m\acute{a}x} t} + e^{-y_0} - e^{-y_1 - y_0})}{\mu_{m\acute{a}x}}$$

Equação 2

236
237

Onde

238

$$y_0 = -\ln \alpha_0$$

239

O parâmetro α_0 é conhecido como estado fisiológico das células quando

240

$t=t_0$; m é o parâmetro de transição entre a curva de crescimento e a fase

241

estacionária e n é o parâmetro de curvatura posterior a fase de lag.

242

243

244

245

$$y = A \cdot e^{-e^{\left\{ \left[\frac{\mu_m \cdot e^{-(\lambda-t)}}{A} \right] + 1 \right\}}}$$

246

Onde

Equação 3

247

y = diâmetro final da colônia

248

A = função de ajuste

249

$\mu_{m\acute{a}x}$ = taxa máxima de crescimento

250

λ = tempo de adaptação

251

252

Como as colônias somente eram visíveis após atingirem diâmetro de

253

3.00mm, fixou-se o valor de 0.1mm para o diâmetro das colônias no tempo inicial

254

($t=0$), conforme critério adotado por Gibson *et al.* (1994).

255

256 ▪ **Modelagem polinomial de superfície de resposta**

257 A partir das estimativas dos parâmetros de crescimento para tempo de
258 adaptação (λ ; dias) e taxa de crescimento (μ ; mm.dia⁻¹) obtidos através da
259 modelagem primária de Baranyi *et al.* (1993) e Gompertz modificado (Zwietering *et*
260 *al.*, 1991), foram elaborados os modelos quadráticos polinomiais para descrição
261 dos efeitos, da temperatura e pH, variáveis consideradas significantes sobre o
262 crescimento do microrganismo, representados pelas equações 4 e 5.

263
$$\lambda = a_0 + a_1T + a_2T^2 + a_3pH + a_4pH^2 + a_5T * pH + \varepsilon$$

Equação 4

264

265 Onde: λ = tempo de adaptação (dias); T = temperatura de incubação (°C); $a_0...a_5$ = coeficientes do
266 modelo; ε = erro.

267

268
$$\mu = c_0 + c_1T + c_2T^2 + c_3pH + c_4pH^2 + c_5T * pH + \varepsilon$$

Equação 5

269

270 Onde: μ = taxa de crescimento (mm.dia⁻¹); T = temperatura de incubação (°C); $c_0...c_5$ =
271 coeficientes do modelo; ε = erro.

272

273 Os coeficientes pertinentes a cada variável significativa ($p < 0,05$) foram
274 calculados por intermédio do software Statistica™ (Statsoft™, Tulsa, USA) versão
275 6.0 para Windows. Os modelos desenvolvidos foram avaliados estatisticamente
276 através de análise de variância (ANOVA). Além disso, foram calculados também
os fatores bias e exatidão, conforme descrito por Ross (1996).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

➤ Modelagem primária do crescimento

Os parâmetros de crescimento de *Aspergillus niger* foram obtidos através da entrada, no programa DMFIT, dos dados do diâmetro de maior medida, objetivando-se assim a predição para o lado seguro. Além disso, para a função de Baranyi & Roberts foram ajustados os parâmetros de curvatura, m e n que caracterizam respectivamente, o parâmetro de transição entre a curva de crescimento e a fase estacionária e o parâmetro de curvatura posterior à fase de lag, sendo a faixa de variação para ajuste fixada entre 0 e 10 (Baranyi & Roberts, 1995). Este ajuste foi realizado até que se obtivesse o maior valor de R^2 . Quando se estudou o efeito de pH, temperatura e a_w sobre o crescimento de *A.niger*, (TABELA 1), observou-se que, na faixa de a_w estudada, de 0.970 a 0.990, a A_w não demonstrou influência significativa ($p < 0.05$) sobre o tempo de adaptação, taxa de crescimento de crescimento e diâmetro máximo da colônia do bolor. Entretanto, considerando-se temperatura e pH observa-se que ambos exerceram influência significativa sobre os parâmetros de crescimento estudados (tempo de adaptação e taxa de crescimento), com valores de $p < 0.05$ (TABELA 3). Nesta linha, os valores do tempo de adaptação e taxa de crescimento foram respectivamente para A_w de 0.970, 10.13 dias e 1.65 mm.dia^{-1} e para A_w de 0.990, 9.22 dias e 2.28 mm.dia^{-1} .

Tabela 3

Fixando-se a A_w no valor médio atingido pelo néctar de manga ao longo da safra de produção (0.980 ou 12°Brix) partiu-se para a modelagem do crescimento utilizando-se como variáveis apenas temperatura de abuso de refrigeração e pH, segundo desenho experimental apresentado na TABELA 2. Assim sendo, para os

301 ensaios 7, 8 e 10 (FIGURA 2), nota-se que para as curvas 1 (pH 4.0 e 20°C) e 2
302 (pH3,28 e 20°C), não foram notadas diferenças acentuadas entre o tempo de
303 adaptação, 10.5 dias em média e o diâmetro final das colônias, 15.3 mm em
304 média, entretanto, observou-se ligeiro aumento na taxa de crescimento de
305 *Aspergillus niger*, quando o pH aumentou de 3.28 para 4.0. Assim sendo pode-se
306 dizer que, após o microrganismo vencer a barreira, imposta pelo pH do néctar,
307 para seu crescimento e, considerando-se que o pH ótimo de crescimento de
308 *A.niger* situa-se entre pH 4.0 a 6.0 (Pitt & Hocking, 1985), após o final da fase
309 exponencial, o crescimento representado pelo Dmax se torna constante (Baranyi
310 *et al.*,1993), fazendo com que o microrganismo se comporte de maneira
311 semelhante em ambos os ensaios, independentemente dos valores das variáveis
312 controladoras do crescimento.

313 Figura 2

314 Já quando se considera a curva de crescimento 3, do ensaio 10 (pH 4.7 e
315 20°C) o tempo de adaptação de *A.niger* é reduzido de, aproximadamente, 11 para
316 3 dias, o que implica diretamente em um estreitamento do tempo de vida de
317 prateleira do produto. Por outro lado, o diâmetro final da colônia aumenta para,
318 até, aproximadamente, 33mm, demonstrando que esta condição é muito favorável
319 ao desenvolvimento do fungo.

320 Resultados semelhantes foram obtidos por Battey *et al.*(2001) em pesquisa
321 na qual modelaram o crescimento de *Aspergillus niger* e *Penicillium spinulosum*,
322 em sucos resfriados, prontos para beber, sendo que os autores constataram que o
323 pH destes sucos exerce efeitos altamente significativos sobre o crescimento
324 destas linhagens de fungos, ou seja, estas linhagens são capazes de sobreviver a

325 baixos valores de pH (2.8 a 3.8), entretanto, nestas condições, tem seu
326 crescimento reduzido. Assim sendo, cabe ressaltar que estas pequenas alterações
327 nos valores de pH, aliadas ao controle de temperatura, podem ser úteis para efeito
328 de prolongamento da vida de prateleira do néctar de manga, quando *A.niger*,
329 estiver presente.

330 Considerando-se condições extremas de abuso de temperatura de
331 estocagem, ensaios 9 (pH 4.0 e 22.8°C) e 11 (pH 4.0 e 17.2°C) , observou-se que
332 uma alteração nesta variável da ordem de 5,6°C, implica em aumento no tempo de
333 adaptação de 23 dias (FIGURA 3). Isto é de grande importância quando se
334 considera que a temperatura de 22,8°C está próxima a temperatura na qual o
335 produto é comercializado. Sob este enfoque, Pardo *et al.*(2005) desenvolveram
336 modelo polinomial considerando os efeitos da atividade de água e temperatura
337 sobre a germinação e crescimento de isolados de *Aspergillus ochraceus*,
338 ocratoxicogênicos, em meio sintético, obtendo como resultados que variações da
339 ordem de 20°C, aumentaram o tempo de adaptação, pré vio a germinação, de 140
340 para 650h, ou, de 5.8 para 27.08 dias.

341 Figura 3

342 A sensibilidade de *A.niger* em néctar de manga pode estar associada ao
343 fato desta ser uma linhagem resistente ao calor com binômio de sobrevivência
344 (100°C / 15 minutos) significativamente maior que a maioria das linhagens do
345 gênero (85°C / 60 minutos (Splittstoesser & Splitts toesser, 1977)). Além disso, em
346 pesquisa anterior, foi constatado que esta linhagem de *A.niger*, não apresenta
347 crescimento em temperaturas $\leq 15^{\circ}\text{C}$ (Silva & de Massaguer, 2006). Cabe ressaltar

348 ainda que, não existem relatos na literatura de uma linhagem de *A.niger*, com
349 estas características de resistência.

350 Através da Tabela 4 pode-se observar que os desvios das médias, para os
351 parâmetros de crescimento calculados pelos modelos, são baixos o que indica alta
352 repetibilidade dos resultados.

353 Tabela 4

354 Considerando-se a redução de pH dos ensaios 4 (pH 4.5 a 22°C) e ensaio
355 3 (pH 3.5 e 22°C), observa-se que o tempo de adaptação passa de 1.50 para 5.06
356 dias. Cabe ressaltar que a variação de 1 unidade no valor de pH pode ocorrer
357 durante a produção e a temperatura de 22°C também é próxima da ambiente
358 na qual o produto é mantido antes da abertura para consumo. Neste enfoque,
359 Gock *et al.*, obtiveram que em situação de redução de pH em uma unidade (5.5
360 para 4.5), a 37°C e aw 0.920, *Aspergillus penicillioides*, apresentou uma redução
361 de 6 dias em seu tempo de adaptação (2 para 8 dias), fato que se assemelha aos
362 resultados obtidos.

363 Ao se considerar a taxa de crescimento (μ ; mm.dia⁻¹) observa-se que
364 reduções na temperatura de 2.8°C (22.8°C, ensaio 9 para 20°C, ensaio 6), a pH
365 constante em 4.0 (natural do produto), implicam em reduções na taxa de
366 crescimento de 2.87 mm.dia⁻¹, ou seja, aproximadamente 63.92%. Resultados
367 semelhantes foram obtidos por López-Malo *et al.*(1997), em pesquisa na qual
368 observaram que reduções da ordem de 5°C na temperatura de incubação, a pH
369 4,0, em meio PDA, acarretaram reduções na taxa de crescimento de *Aspegillus*
370 *niger* de até 64,44%, o que condiz com os resultados encontrados. Assim, pode-

371 se dizer que a temperatura de incubação exerce influência altamente significativa
372 sobre a taxa de crescimento do microrganismo.

373 Por outro lado, quando o pH é reduzido de 4.5 a 22°C (ensaio 4) para 3.5, a
374 22°C (ensaio 3), observa-se que a taxa de crescimento passa de 5.08 para 3.30
375 mm/dia, ou seja, esta redução implicou em diminuição de 35.06% na taxa de
376 crescimento de *Aspergillus niger*. Sob este enfoque, Panagou *et al.*(2003),
377 desenvolveram pesquisa na qual modelaram os efeitos combinados da
378 temperatura, pH e aw sobre a taxa de crescimento de *Monascus ruber*,
379 constatando que reduções de pH do meio sintético MEA (Malt Extract Agar), de
380 4.5 para 3.5, a temperatura de 20°C e aw 0.970, implicaram em redução de
381 19.24% na taxa de crescimento do bolor termoresistente.

382 Por fim, considerando-se o diâmetro máximo das colônias de *A.niger* em
383 néctar de manga, pode-se observar que tanto a temperatura quanto o pH
384 exerceram influência sobre o diâmetro final das colônias. Quando os ensaios 10
385 (pH 4.7 e 20°C) e 8 (pH 3.28 e 20°C) são comparados , observa-se que redução no
386 pH de 1.42 unidade diminuiu em 17.59mm o diâmetro máximo das colônias.
387 Reduções semelhantes são observadas quando se considera a variável
388 temperatura, comparando-se os ensaios 9 (22.8°C e pH 4.0) e 7 (20°C e pH 4.0),
389 observando-se que a diminuição de, aproximadamente, 3°C na temperatura
390 culminou em uma diminuição de 19 mm no diâmetro máximo das colônias. Estes
391 resultados são concordantes com os obtidos por Batey *et al.* (2001) em pesquisa
392 na qual estudaram a influência de fatores como pH sobre o crescimento de
393 bolores deteriorantes, dentre eles, *A.niger*, em bebidas resfriadas prontas para
394 beber; constatando que o pH exerceu influência significativa sobre o crescimento

395 do bolor, sendo que este não ocorreu a pH inferior a 2.8. Além disso, os autores
396 ainda citam Banwart (1979), que afirmam que, apesar de *A.niger* ser resistente a
397 baixos valores de pH, em valores inferiores a 3.0, seu crescimento é inibido.

398 Considerando-se ainda a Tabela 4, pode-se observar que o modelo de
399 crescimento de Baranyi obteve melhor performance no ajuste dos dados resultado
400 que também foi obtido em pesquisa realizada por López *et al.* (2004), na qual
401 avaliaram estatisticamente modelos matemáticos que descrevem o crescimento
402 microbiano. Nesta avaliação compararam as funções não lineares de Gompertz
403 modificada, Baranyi & Roberts e logística, dentre outros, sendo que para tanto,
404 conduziram a pesquisa avaliando 21 curvas de crescimento de bactérias e fungos
405 com dados obtidos por densitometria ótica e 34 curvas com dados obtidos por
406 contagem de unidades formadoras de colônias. Como resultados constataram que
407 o modelo de crescimento de Baranyi & Roberts (1995) demonstrou melhor
408 performance no ajuste dos dados e que, além disso, foi o modelo que melhor
409 expressou o comportamento das curvas de crescimento estudadas em função do
410 critério de aquisição de dados utilizado.

411 ➤ **Modelagem polinomial de superfície de resposta**

412 A partir dos parâmetros de crescimento (λ e μ) de *Aspergillus niger* em
413 néctar de manga, obtidos através da modelagem primária e apresentados na
414 Tabela 4, bem como a partir das variáveis independentes pH e temperatura, foram
415 elaborados os modelos polinomiais, mediante regressão não linear, para tempo de
416 adaptação (λ ; dias), Equação 6, e taxa de crescimento (μ ; mm.dia⁻¹), Equação 7.
417 Para tanto, os dados utilizados estão apresentados na Tabela 5.

418

Tabela 5

419

▪ **Modelagem do tempo de adaptação de *Aspergillus niger***

420

421

422

423

Para o tempo de adaptação, utilizando valores codificados para as variáveis, foi gerado um modelo polinomial tendo como fatores significativos (TABELA 6), a $p < 0.05$, temperatura (linear e quadrática) e pH (linear) apresentado na equação 6.

424

Tabela 6

425

$$\lambda = 7,17581 - 1,67650 * pH - 7,36576 * T + 2,33521 * T^2$$

426

$$R^2 = 0.98082$$

427

Equação 6

428

Onde λ - tempo de adaptação em dias.

429

430

431

432

433

434

435

436

437

438

439

Considerando-se a Equação 6 pode-se observar que o pH exerce influência significativa sobre o tempo de adaptação de *A.niger*, mas esta influência é pequena quando comparada a influência da temperatura, pois este fator exerce tanto uma influência linear quanto quadrática sobre o parâmetro em estudo, o que também pode ser verificado através do diagrama de Pareto, apresentado na FIGURA 4, onde se verifica que o valor absoluto da temperatura linear é maior. Os efeitos padronizados demonstrados no diagrama de Pareto são definidos como o coeficiente estimado dividido pelo erro padrão. Sendo assim, qualquer outro efeito que exceda a linha vertical, que representa $p < 0,05$, deve ser considerado como relevante (Peña, 2005).

440

Figura 4

441 Sob este enfoque, Pardo *et al.* (2005), estudaram o efeito de temperatura e
442 aw sobre o tempo de germinação de 3 subespécies de *Aspergillus ochraceus*,
443 constatando que em duas delas a temperatura linear e quadrática exerceu
444 influência significativa sobre o tempo de germinação. Na FIGURA 5 está
445 apresentado o comportamento dos valores preditos *versus* observados em função
446 de uma linha de igualdade. Através desta figura pode-se observar que cada valor
447 predito mostrou-se aleatoriamente distribuído, não apresentando assim, tendência
448 sistemática nas predições. Este fato também é elucidado quando se consideram
449 os valores obtidos para os parâmetros de performance do modelo, ou seja, para
450 os fatores bias e exatidão.

451 **Figura 5**

452 Assim sendo, o fator de bias obtido foi de 1.06, ou seja, o modelo
453 apresenta-se 6% na região insegura e 94% na região segura da predição. Este
454 índice é considerado ótimo já que, há na literatura relatos de modelos de
455 crescimento para bactérias com valores para o fator bias de 1.14 e 1.73 (Giffel &
456 Zwietering, 1999) e 1.82 (McElroy *et al.*, 2000), estes modelos citados encontram-
457 se 14, 73 e 82% na região insegura da predição, este fato pode acontecer em
458 decorrência da grande variabilidade dos dados de resposta microbiana a variação
459 de fatores ambientais ou ainda a erros experimentais.

460 Para o fator exatidão obteve-se valor de 1.16. Como o fator exatidão atesta
461 a variação dos valores preditos em torno de uma média, pode-se dizer então que
462 estes variam em 16%. Cabe ressaltar que existem relatos na literatura de modelos
463 para taxa de crescimento com fator exatidão de 1.106, para *Byssochlamys fulva*
464 (Valík & Piecková, 2001) e 1.26 para *S.aureus* (Ross, 1996).

465 O modelo foi ainda verificado, estatisticamente através da relação
466 $F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}}$ ($F_{\text{cal}}/F_{\text{tab}}$), que apresentou um valor de 27.43 e do valor do
467 coeficiente de correlação (R^2) que foi de 0.981. Estes valores indicam que o
468 modelo além de ser significativo apresenta bom ajuste dos dados experimentais.
469 Resultados semelhantes foram obtidos por Valík & Piecková (2001), em pesquisa
470 na qual modelaram o crescimento de fungos termoresistentes em diferentes
471 condições de a_w , obtendo um valor de F tabelado, aproximadamente, 4 vezes
472 maior que o de F calculado.

473 A superfície de resposta para o modelo quadrático apresentado na equação
474 6, está demonstrado na Figura 6.

475 **Figura 6**

476 Através da análise estatística do modelo observa-se que, a temperatura de
477 17.2°C e pH 3.28 o tempo de adaptação é de 30 dias. Quando se considera, por
478 exemplo, a mesma temperatura, mas o pH natural do néctar de manga (4.0),
479 obtém-se que este período é de, aproximadamente, 10 dias, entretanto quando se
480 reduz o pH para 3.5 (variação que ocorre ao longo da safra) o tempo de
481 adaptação passa para, aproximadamente 20 dias. Assim sendo, no caso do
482 produto estar sujeito a abuso de temperatura de refrigeração, durante a
483 distribuição e estocagem, o indicado seria que o mesmo apresentasse pH
484 reduzido em pelo menos 0.5 unidade para que assim sua vida de prateleira fosse
485 estendida, compensando o efeito contrário do abuso de temperatura. De maneira
486 similar, incrementos na temperatura da ordem de 0.8°C, com o néctar a pH 4.0,
487 implicam em diminuição do tempo de adaptação do microrganismo de

511 mostra-se aleatoriamente distribuído próximo à linha de igualdade, demonstrando
512 que não há tendência sistemática nas predições.

513 Figura 8

514 Esta afirmação é fortalecida quando são considerados os fatores de
515 verificação de modelos, bias e exatidão, que foram respectivamente de 1.006 e
516 1.0943. Considerando-se o fator bias, pode-se dizer que o modelo se encontra na
517 região insegura da predição em apenas 1% dos casos. Já quando se considera o
518 ajuste dos dados preditos em relação aos observados, em apenas 9% dos casos
519 este ajuste apresenta algum desvio que possa invalidar o modelo. Cabe salientar
520 que na literatura existem valores publicados, para modelos preditivos de
521 crescimento de *Listeria monocytogenes* em alimentos, com fator de bias de 1.03
522 ou 1.56, dependendo do modelo de crescimento utilizado e fator exatidão de 1.84
523 e 2.82 (Giffel & Zwietering, 1999), ou seja, uma grande variação entre os valores
524 preditos e observados. Através de análise de variância do modelo, obteve-se uma
525 relação $F_{calculado}/F_{tabelado}$ (F_{cal}/F_{tab}) de 2.6 e R^2 de 0.882, o que valida o
526 modelo sobre o aspecto matemático. Resultados similares foram obtidos por Valík
527 & Piecková (2001), em pesquisa na qual modelaram o crescimento de *B.fulva*,
528 obtendo uma relação F_{tab}/F_{cal} de 2.09.

529 A superfície de resposta para o modelo quadrático, representativo da taxa
530 de crescimento, está apresentada na FIGURA 9.

531 Figura 9

532 Através de análise da superfície de resposta pode-se observar que o ponto
533 de inflexão, ou seja, de menor taxa de crescimento, está situado em pH 4.0 e
534 temperatura de 20°C e não no menor valor de temperatura e pH utilizados (17.2°C

535 e 3.28). Isto pode ser justificado quando são consideradas as enzimas produzidas
536 por *A.niger*, poligalacturonase e pectinametilesterase, que possuem pH ótimo de
537 atividade de aproximadamente 4.0 e temperatura de maior atividade próxima a
538 20°C (Nikolic & Mojovic, 2006), ou seja, em pH 4.0 e 20°C, estas enzimas causam
539 sedimentação no néctar de manga e juntamente com esta ocorre também a
540 sedimentação de nutrientes, causando um ambiente adverso para
541 desenvolvimento do microrganismo; como esta sedimentação foi notada ao longo
542 do experimento, a atividade destas enzimas pode ser considerado como um dos
543 fatores que explicam esta menor taxa de crescimento.

544 Considerando-se o modelo para taxa de crescimento representado pela
545 Equação 7, observa-se que, ao se substituir na equação os pontos em pH 4.0 e
546 20°C (0 e 0 em pontos codificados) obtém-se uma taxa de crescimento de,
547 aproximadamente, 1.47mm.dia⁻¹, o que condiz com o real, que é de
548 aproximadamente, 1.32mm.dia⁻¹. Sendo assim, tanto a superfície quanto o modelo
549 são convergentes e o modelo prediz para o lado seguro.

550 Entretanto é essencial se observar que nesta condição o
551 crescimento/desenvolvimento do microrganismo somente é retardado, mas não
552 impedido. Sendo assim é indispensável que se realize o controle rígido de
553 temperatura de refrigeração, já que em temperaturas ≤15°C não é notado o
554 crescimento de *A.niger* (Silva & de Massaguer, 2006).

555

556

557

558

559

560

CONCLUSÕES

561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584

Por intermédio da presente pesquisa pôde-se concluir que:

- Apesar da aw ser descrita como um fator relevante sobre o comportamento de fungos, dentro da faixa de variação pertinente ao produto e considerando a temperatura de abuso de refrigeração, sua influência sobre o crescimento de *A.niger*, não foi significativa a $p<0.05$;
- Os fatores com influência significativa ($p<0.05$) sobre o crescimento de *A.niger*, foram temperatura e pH;
- Para a modelagem primária, o modelo de crescimento de Baranyi obteve melhor performance no ajuste dos dados;
- Considerando-se a modelagem polinomial de superfície de resposta, observou-se que, para o tempo de adaptação, as variáveis de maior efeito foram a temperatura linear e quadrática. Já, para a taxa de crescimento, as variáveis de maior efeito foram pH quadrático e temperatura quadrática;
- Como conclusões práticas, a análise da superfície de resposta para tempo de adaptação demonstra que variações no pH da ordem de 0.72 unidades, em condição de temperatura de 17.2°C, são capazes de reduzir em até 3 vezes o tempo de adaptação do microrganismo (vida de prateleira do produto), sendo que o ponto de maior tempo de adaptação é o de 17.2°C e pH 3.28;
- A superfície de resposta da taxa de crescimento demonstrou ponto de inflexão em pH 4.0 e 20°C;
- A utilização do pH e temperatura, na faixa estudada nesta pesquisa, como barreira ao crescimento de *A.niger*, em néctar de manga, somente retarda o

585 crescimento e/ou desenvolvimento do bolor, não o impedindo, sendo que,
586 após estas barreiras serem vencidas o crescimento ocorre de maneira
587 semelhante ao que ocorreria em situações sem barreiras;

588 ➤ A partir destes resultados é fundamental que se atente para o controle
589 rígido do pH, se possível optando-se, em caso de variações, por reduções,
590 mesmo que pequenas, no valor natural do produto, bem como se atente
591 para a temperatura de estocagem do produto já que variações de menos de
592 1°C são capazes de mudar completamente o comportamento do
593 microrganismo, visto que estas medidas são menos onerosas sob o
594 aspecto financeiro.

595

596

597

598

599

600

601

602

603

604

605

606

607

608

609

610

611

612

613

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

614

615 ABDEL-SATER, M.A.; ZOHRI, A.A.; ISMAL, M.A. Natural contamination of some
616 egyptian fruit juices and beverages by mycoflora and mycotoxins. **Journal of**
617 **Food Science Technology**. V.38, n.04. p.407-411. 2001.

618

619 BAGLIONI, F. Estudo da ocorrência de fungos filamentosos termoresistentes em
620 polpa de tomate envasada assepticamente. Capinas, 1998. 94p. Tese de
621 Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade
622 Estadual de Campinas.

623

624 BARANYI, J.*et al.* A non-autonomous differential equation to model bacterial
625 growth. **Food Microbiology**. V.10, p.43-59. 1993.

626

627 BATTEY, A.S. *et al.* Modelling mold spoilage in cold-filled ready-to-drink
628 beverages by *Aspergillus niger* e *Penicillium spinulosum*. **Food Microbiology**.
629 V.18, p.521-529. 2001.

630

631 BEUCHAT, L.R.; Hocking, A.D. Some considerations when analysing foods for the
632 presence of xerophilic fungi. **Journal of Food Protection**, v. 53. p.984-989.
633 1990.

634

635 BLASZYK, M. *et al.* Reduced water activity during sporogenesis in selected
636 penicillia: impact on spore quality. **Food Research International**. V.31, n.6-7,
637 p.503-509. 1998.

638

639 DANTIGNY, P.; GUILMART, A.; RADOI, F.; BENSOUSSAN, M.; ZWIETERING, M.
640 Modelling the effect of ethanol on growth rate of food spoilage moulds.
641 **International Journal of Food Microbiology**. V. 98, p.261-269, 2005.

642

643 FINETTO, M. Suco pronto é artigo básico para muita gente. **Correio Popular**.
644 20/01/2005.

645

646 GIFFEL, M.C.; ZWIETERING, M.H. Validation of predictive models describing the
647 growth. **International Journal of Food**. V.46, p135-149. 1999.

648

649 GOCK, M.A., HOCKING, A.D., PITT, J.I., POULOS, P.G. Influence of
650 temperature, water activity and pH on growth of some xerophilic fungi.
651 **International Journal of Food Microbiology**. V.2481, p.11-19. 2002.

652

653 LÓPEZ-MALO, A.; ALZAMORA, S.M.; PALOU, E. *Aspergillus flavus* growth in the
654 presence of chemical preservatives and naturally occurring antimicrobial
655 compounds. **International Journal of Food Microbiology**, v.99, p.119-128.
656 2005.

657

658 LÓPEZ-MALO, A.; ALZAMORA, S.M.; ARGALIZ, A. Effect of vanillin
659 concentration, pH and incubation temperature on *Aspergillus flavus*, *Aspergillus*
660 *niger*, *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus parasiticus* growth. **Food**
661 **Microbiology**, v.14, p.117-124. 1997.

662

663 McELROY, D.M. *et al.* Validations and analysis of modeled predictions of growth
664 of *Bacillus cereus* spores in boiled rice. **Journal of Food Protection**. V.63, n.02,
665 p.268-272. 2000.

666

667 NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos.**
668 **Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria.** 2^aed., Campinas, SP,
669 Brasil: Editora Unicamp. 401p. 2002.

670

671 NIKOLIC, M.V.; MOJOVIC, L. Hydrolysis of apple pectin by the coordinate activity
672 of pectic enzymes. **Food Chemistry**. 2006. *In Press*.

673

674 PANAGOU, E.Z.; SKANDAMIS, P.N.; NYCHAS, G.J.E. Modelling the combined
675 effect of temperature, pH and aw on the growth rate of *Manascus ruber*, a heat-
676 resistant fungus isolated from green table olives. **Journal of Applied**
677 **Microbiology**, v.94, p.146-156. 2003.

678

679 PEÑA, W.E.L. Uso de modelos preditivos no crescimento e inativação de esporos
680 de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de laranja e maçã. Campinas, 2005.

681 360p. Tese de Doutorado apresentada a Faculdade de Engenharia de Alimentos.
682 Universidade Estadual de Campinas.

683

684 PEÑA, W.L.; FARIA, J.A.; de MASSAGUER, P.R. Development of a predictive
685 model on the growth of the spoilage mould, *Paecilomyces variotii*, in pineapple
686 juice. **Fruit Processing**, p. 420-426, November/December 2004.

687

688 PARDO, E.; RAMOS, A.J.; SANCHIS, V., MARÍN, S. Modelling of effects of water
689 activity and temperature on germination and growth of ochratoxigenic isolates of
690 *Aspergillus ochraceus* on green coffee-based medium. **International Journal of**
691 **Food Microbiology**, v. 98, p.1-9. 2005.

692

693 PETRUS, R.R. Desenvolvimento de processo e avaliação de estabilidade de
694 bebida isotônica acondicionada em garrafa plástica asséptica. Campinas, 2000.
695 122p. Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de
696 Alimentos. Universidade Estadual de Campinas.

697

698 PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. London: Blackie
699 Academic & Professional. 1985.

700

701 ROOS, T. Indices for performance evaluation of predictive models food
702 microbiology. **Journal of Applied Bacteriology**, V.81p. 501-508, 1996.

703

704 ROSSO, L.; ROBINSON, T.P. A cardinal model to describe the effect of activity on
705 the growth of moulds. **International Journal of Food Microbiology**, v.63, p.265-
706 273. 2001.

707

708 SILVA, A.R.; de MASSAGUER, P.R. Seleção do bolor mais termoresistente em
709 néctar de manga e modelagem de seu crescimento radial, frente à aw, pH e
710 temperatura, em embalagens PET. In: Modelagem do crescimento de *Aspergillus*
711 *niger* frente a pH e temperatura. Campinas, 2006. Dissertação de mestrado
712 apresentada a faculdade de engenharia de alimentos. Universidade Estadual de
713 Campinas.

714

715 SHEARER, A.E.H. *et al.* Heat resistance of juice spoilage microorganisms.
716 **Journal of Food Protection**. V.65, n.8, p.1271-1275. 2002.

717

718 SPLITTSTOESSER, D.F.; SPLITTSTOESSER, C.M. Ascospores of
719 *Byssochlamys fulva* compared with those of a heat resistant *Aspergillus*. **Journal**
720 **of Food Science**. V.42, n.3. 1977.

721

722 TOURNAS V. Heat-Resistant Fungi of Importance to food and beverage industry.
723 **Critical Reviews in Microbiol.** V. 20, n. 4, p. 243-263. 1994.

724

725 VALÍK, L.; PIECKOVÁ, E. Growth modelling of heat-resistant fungi: effect of water
726 activity. **International Journal of Food Microbiology**, v.63, p.11-17. 2001.

727

728 ZWIETERING, M.H. *et al.* Modeling of bacterial growth as a function of
729 temperature. **Applied and Environmental Microbiology.** V.57, n.04, p.1094-
730 1101. 1991.

731

AGRADECIMENTOS

732 Os autores agradecem à EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa
733 Agropecuária) e à CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Ensino
734 Superior) pelo suporte financeiro.

735

736

737

738

739

740

741

742

743

744

745

746

747

748

749

750

751

752

753

754

755

756

757

758

759

760

761

762 **FIGURA 1.** *Metodologia de medição das colônias de Aspergillus niger em néctar de*
763 *manga.*

764

765

766

767

768

769

770

771

772

773

774

775

776

777

778

779

780

781

782



783

784

785

786

787

788

789

790

791

792

793

794

795

796

797

798

799

800

801 ***Alessandra Regina da Silva e Pilar Rodriguez de Massaguer***

802

803

804

805

806

807

808

809

810

811

812

813

814

815

816

817

818

819

820

821

822

823

824

825 **FIGURA 2.** *Deslocamento médio** da curva de crescimento de *Aspergillus niger*, em
826 *néctar de manga*, modeladas por Gompertz modificado e Baranyi & Roberts,
827 nas seguintes condições: **1:** pH 4,0 e 20°C, ensaio 7; **2:** pH 3,28 e 20°C,
828 ensaio 8; **3:** pH 4,7 e 20°C, ensaio 10, conforme planejamento da Tabela 2.

829

830

831

832

833

* Deslocamento médio obtido a partir de 3 curvas de crescimento de *A.niger* em néctar de manga para cada ensaio.

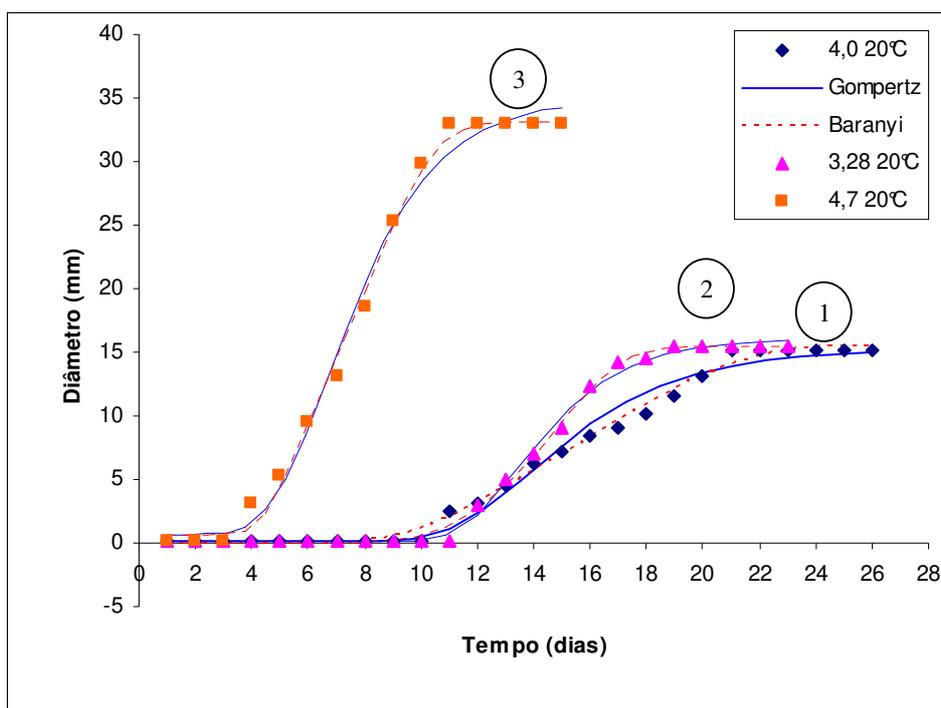
834

835

836

837

838



839

840

841

842

843

844

845

846

847

848

849

850

851

852

853

854

855

856

857

858

859

860 ***Alessandra Regina da Silva e Pilar Rodriguez de Massaguer***

861

862

863

864

865

866

867

868

869

870

871

872

873

874

875

876

877

878

879

880

881

882

883

884 **FIGURA 3.** *Deslocamento médio* da curva de crescimento de *Aspergillus niger*, em*
885 *néctar de manga, com redução de temperatura ensaio 9 (22,8°C e pH 4,0) e*
886 *ensaio 11 (17,2°C e pH 4,0) modeladas por Gompertz modificado e Baranyi &*
887 *Roberts, conforme planejamento da Tabela 2.*

888

889

890

891

892

893

* Deslocamento médio obtido a partir de 3 curvas de crescimento de *A.niger* em néctar de manga para cada ensaio.

894

895

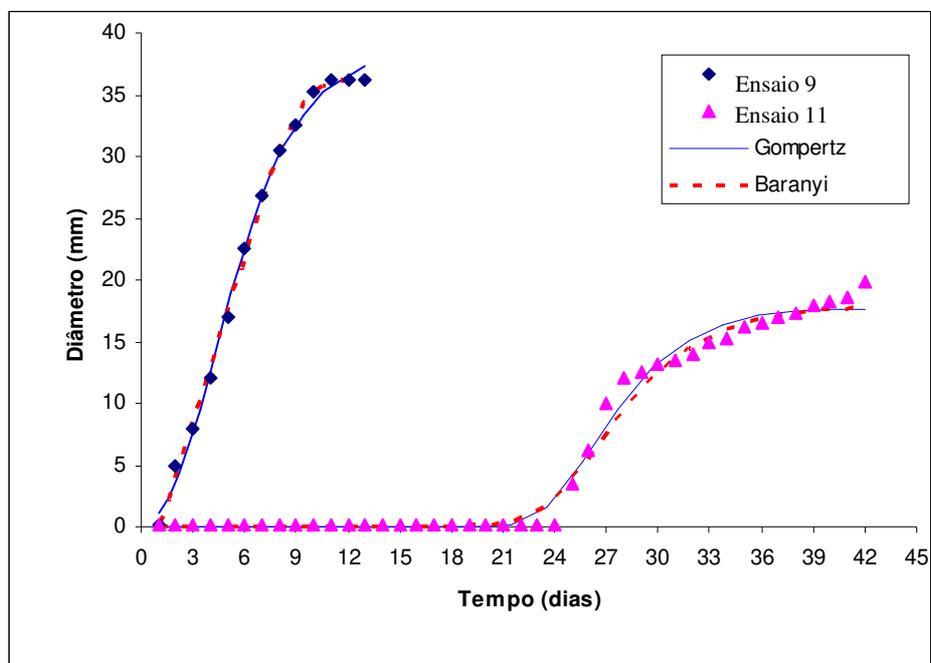
896

897

898

899

900



901

902

903

904

905

906

907

908

909

910

911

912

913

914

915

916

917

918

919

920

921

922

923

924 ***Alessandra Regina da Silva e Pilar Rodriguez de Massaguer***

925

926

927

928

929

930

931

932

933

934

935

936

937

938

939

940

941

942

943

944

945

946

947 **FIGURA 4.** *Diagrama de Pareto para análise dos efeitos dos parâmetros sobre o*
948 *tempo de adaptação de A.niger em néctar de manga.*

949

950

951

952

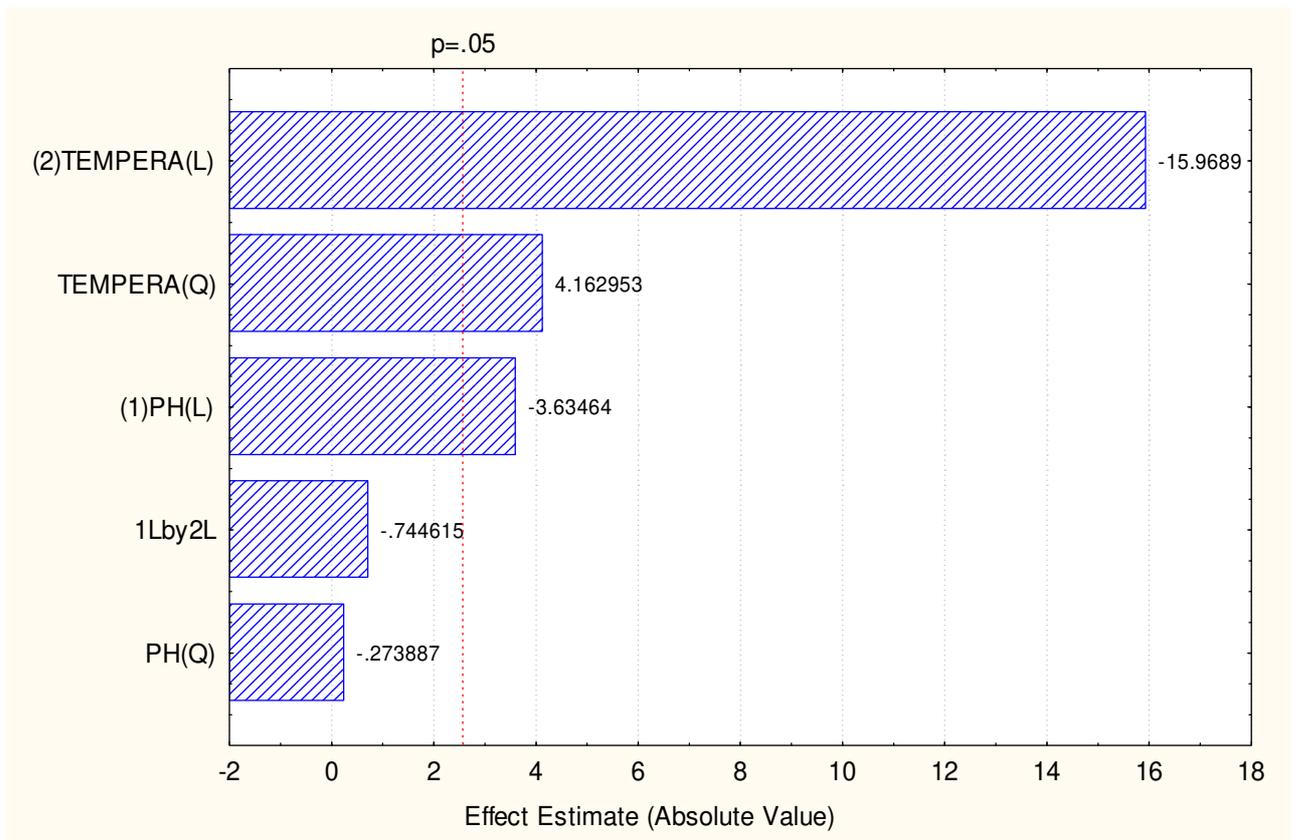
953

954

955

956

957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980



981

982

983

984

985

986

987

988

989

990 ***Alessandra Regina da Silva e Pilar Rodriguez de Massaguer***

991

992

993

994

995

996

997

998

999

1000

1001

1002

1003

1004

1005

1006

1007

1008

1009

1010

1011

1012

1013 **FIGURA 5.** *Valores Preditos versus observados para tempo de adaptação para*

1014 *A.niger em néctar de manga.*

1015

1016

1017

1018

1019

1020

1021

1022

1023

1024

1025

1026

1027

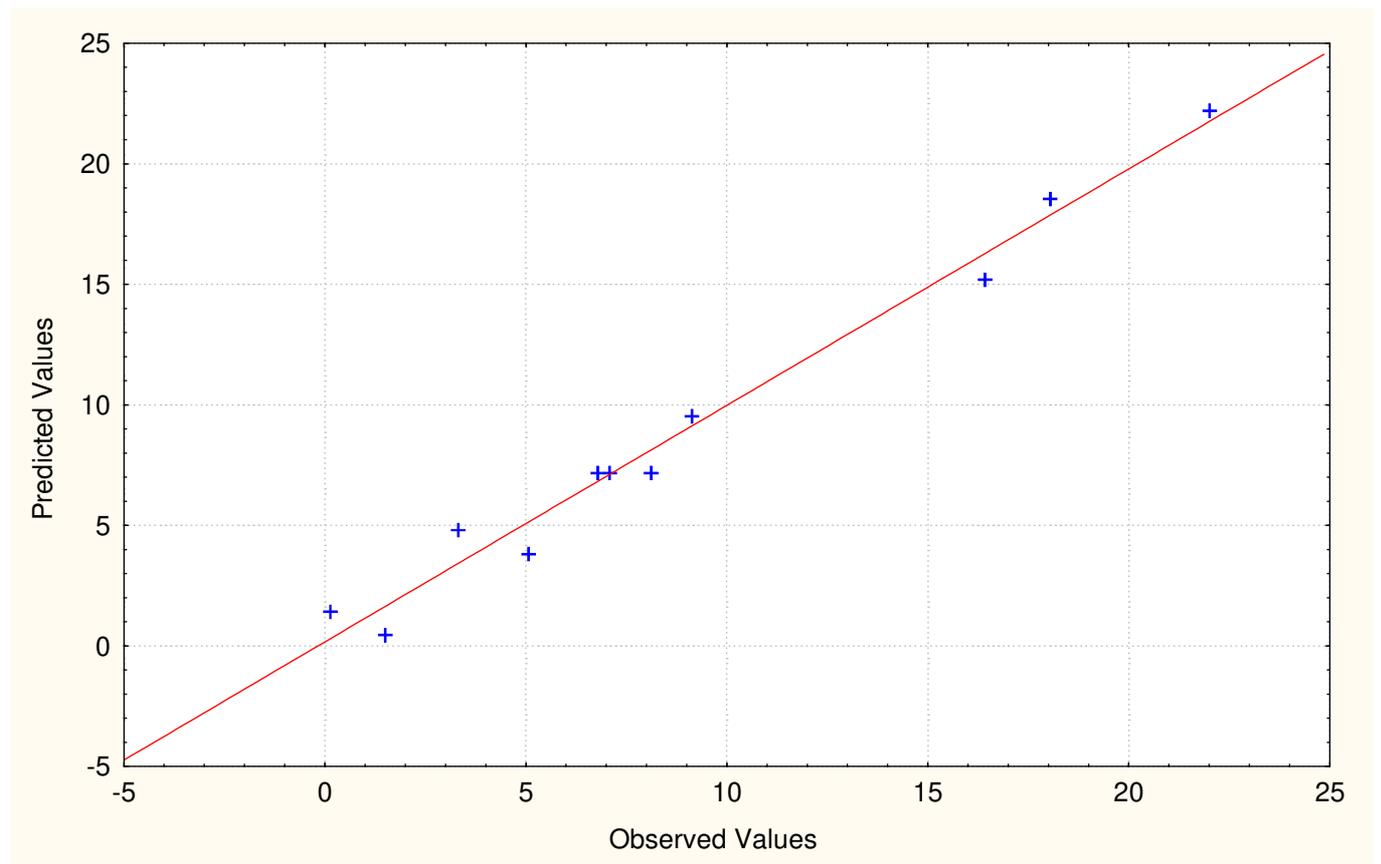
1028

1029

1030

1031

1032



1033

1034

1035

1036

1037

1038

1039

1040

1041

1042

1043

1044

1045

1046

1047

1048

1049 ***Alessandra Regina da Silva e Pilar Rodriguez de Massaguer***

1050

1051

1052

1053

1054

1055

1056

1057

1058

1059

1060

1061

1062

1063

1064

1065

1066

1067

1068

1069

1070

1071

1072

FIGURA 6. *Superfície de resposta para tempo de adaptação (dias).*

1073

1074

1075

1076

1077

1078

1079

1080

1081

1082

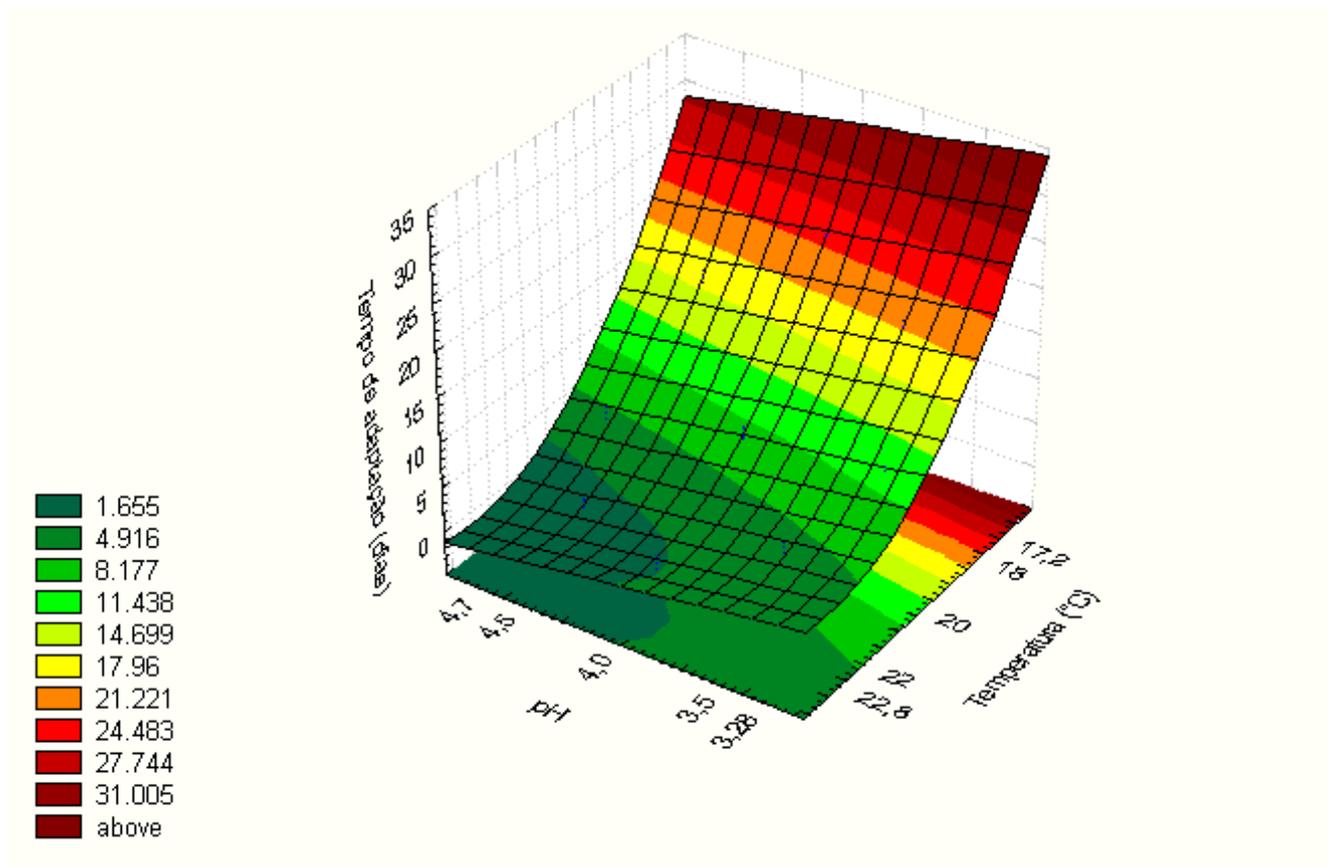
1083

1084

1085

1086

1087



1088

1089

1090

1091

1092

1093

1094

1095

1096

1097

1098

1099

1100

1101

1102

1103

1104

1105

1106 ***Alessandra Regina da Silva e Pilar Rodriguez de Massaguer***

1107

1108

1109

1110

1111

1112

1113

1114

1115

1116

1117

1118

1119

1120

1121

1122

1123

1124

1125

1126

1127

1128

1129

1130

1131 **FIGURA 7.** *Diagrama de Pareto para análise dos efeitos dos parâmetros sobre a*

1132 *taxa de crescimento de A.niger em néctar de manga.*

1133

1134

1135

1136

1137

1138

1139

1140

1141

1142

1143

1144

1145

1146

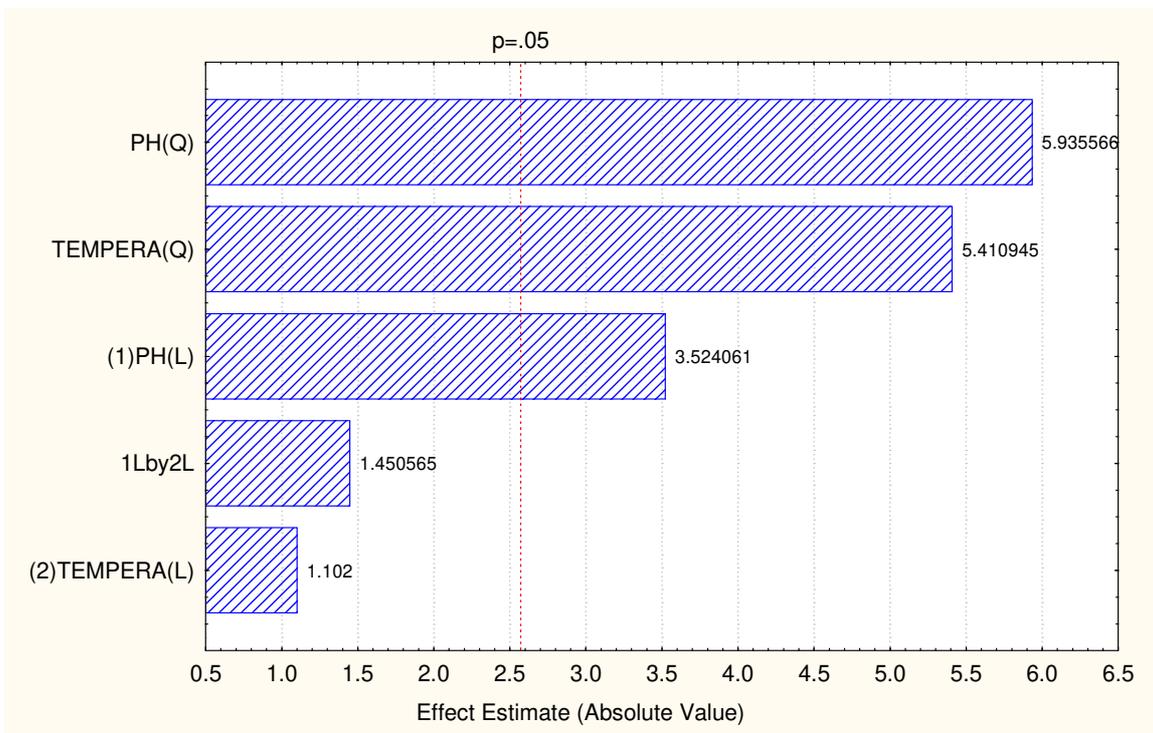
1147

1148

1149

1150

1151



1152

1153

1154

1155

1156

1157

1158

1159

1160

1161

1162

1163

1164

1165

1166 ***Alessandra Regina da Silva e Pilar Rodriguez de Massaguer***

1167

1168

1169

1170

1171

1172

1173

1174

1175

1176

1177

1178

1179

1180

1181

1182

1183

1184

1185

1186

1187

1188

1189

1190

1191 **FIGURA 8.** *Valores Preditos versus observados para taxa de crescimento de*

1192 *A.niger em néctar de manga.*

1193

1194

1195

1196

1197

1198

1199

1200

1201

1202

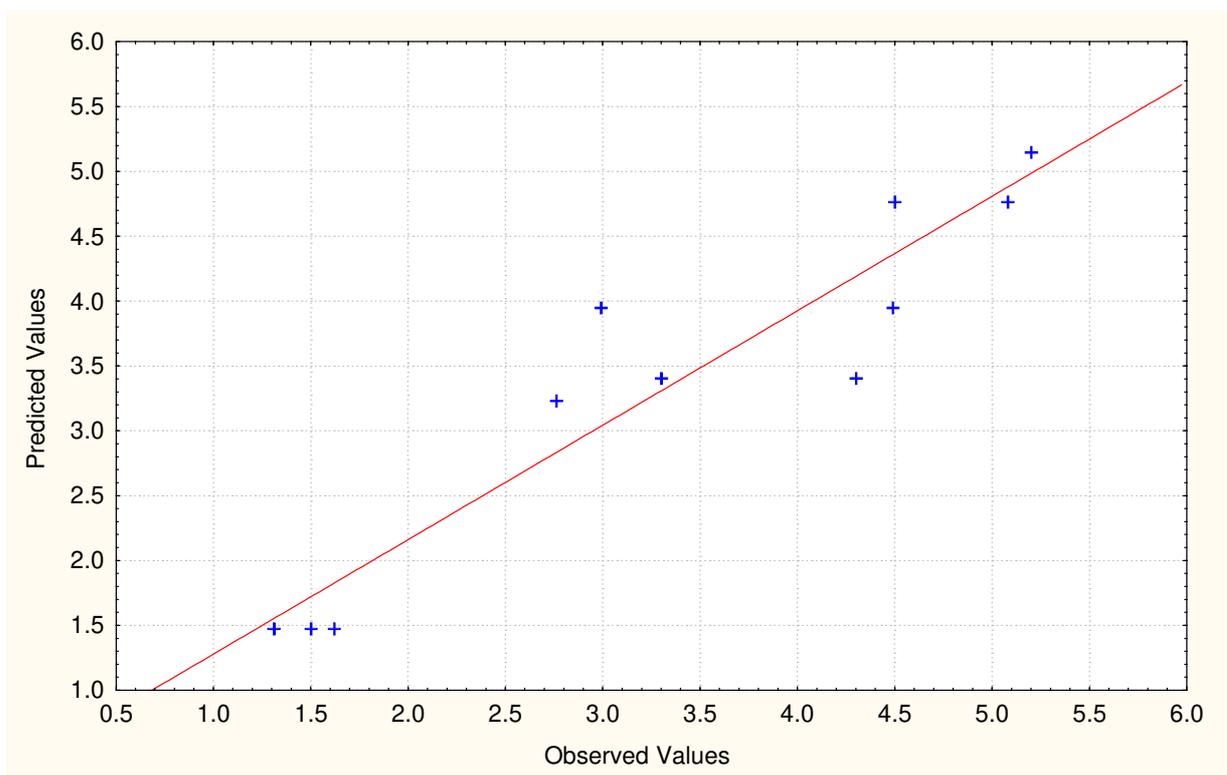
1203

1204

1205

1206

1207
1208
1209
1210
1211
1212
1213
1214



1215
1216
1217
1218

1219

1220

1221

1222

1223

1224

1225

1226

1227

1228 ***Alessandra Regina da Silva e Pilar Rodriguez de Massaguer***

1229

1230

1231

1232

1233

1234

1235

1236

1237

1238

1239

1240

1241

1242

1243

1244

1245

1246

1247

1248

1249

1250

1251

1252 **FIGURA 9.** *Superfície de resposta para taxa de crescimento (mm.dia^{-1}) de*

1253 *Aspergillus niger em néctar de manga.*

1254

1255

1256

1257

1258

1259

1260

1261

1262

1263

1264

1265

1266

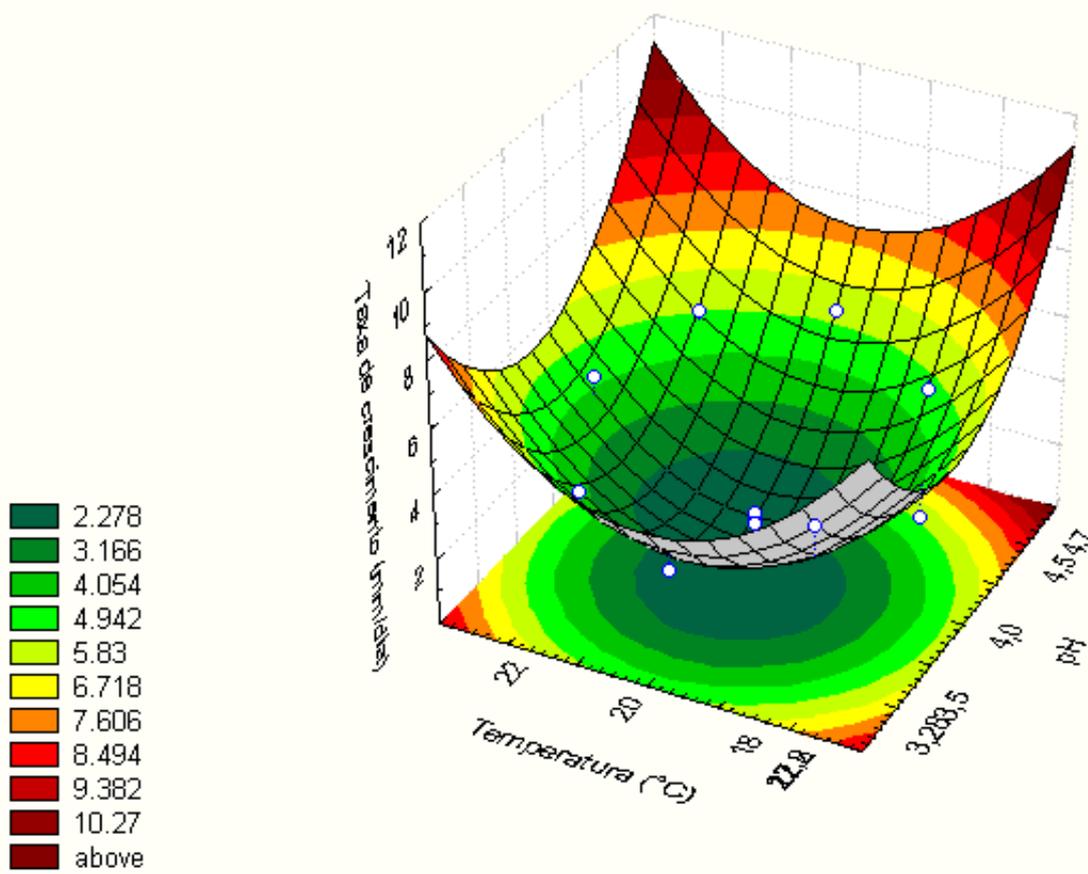
1267

1268

1269

1270

1271



1272

1273

1274

1275

1276

1277

1278

1279

1280

1281

1282

1283

1284

1285

1286

1287

1288

1289 ***Alessandra Regina da Silva e Pilar Rodriguez de Massaguer***

1290

1291

1292

1293

1294

1295

1296

1297

1298

1299

1300

1301

1302

1303

1304

1305

1306

1307

1308

1309 **TABELA 1.** *Planejamento experimental para estudo do impacto de pH,*
1310 *temperatura e aw sobre o crescimento de Aspergillus niger em néctar*
1311 *de manga.*

Ensaio	Valores codificados			Valores experimentais		
	pH	Temperatura	Aw	pH	Temperatura (°C)	Aw
1	+1	+1	+1	4,5	22	0,990
2	-1	+1	+1	3,5	22	0,990
3	+1	-1	+1	4,5	18	0,990
4	-1	-1	+1	3,5	18	0,990
5	+1	+1	-1	4,5	22	0,970
6	-1	+1	-1	3,5	22	0,970
7	+1	-1	-1	4,5	18	0,970
8	-1	-1	-1	3,5	18	0,970
9	0	0	0	4,0	20	0,980
10	0	0	0	4,0	20	0,980
11	0	0	0	4,0	20	0,980

1312

1313

1314

1315

1316

1317

1318

1319

1320

1321

1322

1323 **TABELA 2.** *Planejamento experimental para estudo do crescimento de Aspergillus*
1324 *niger em néctar de manga, a aw 0,980.*

Ensaio	Valores codificados		Valores experimentais	
	pH	Temperatura	pH	Temperatura (°C)
1	-1	-1	3,5	18
2	+1	-1	4,5	18
3	-1	+1	3,5	22
4	+1	+1	4,5	22
5	0	0	4,0	20
6	0	0	4,0	20
7	0	0	4,0	20
8	$-\sqrt{2}$	0	3,28	20
9	0	$+\sqrt{2}$	4,0	22,8
10	$+\sqrt{2}$	0	4,7	20
11	0	$-\sqrt{2}$	4,0	17,2

1325

1326

1327

1328

1329

1330

1331

1332

1333

1334

1335

1336

1337

1338

1339
1340
1341
1342
1343
1344
1345
1346
1347
1348
1349
1350
1351
1352
1353
1354
1355
1356
1357
1358
1359
1360
1361

TABELA 3. *Análise de significância para estudo da influência de pH, temperatura e aw sobre parâmetros de crescimento de A.niger em néctar de manga.*

Variável	Valores de p*		
	λ (dias)	μ (mm.dia ⁻¹)	Dmax (mm)
pH	0,0191	0,004	0,0352
Temperatura	0,0173	0,0005	0,0134
Aw	0,9269	0,3471	0,2888

* valores de p calculados a intervalo com 95% de probabilidade, sendo significativos valores de p<0,05.

1362 **TABELA 4.** *Parâmetros de crescimento de Aspergillus niger em néctar de manga,*
 1363 *sendo obtidos por modelagem de Gompertz modificado (G) e Baranyi*
 1364 *& Roberts (B), segundo ensaios da Tabela 2.*

Ensaio	Modelo de crescimento	Tempo de adaptação (λ ; dias)	Parâmetros		Diâmetro máximo (mm)	Coeficiente de ajuste (R^2)
			Tempo de adaptação observado (dias)**	Taxa de Crescimento (μ ; mm.dia ⁻¹)		
1	B	18,04 ± 1,86*	19	4,3 ± 1,322	16,17 ± 2,758	0,997
	G	17,3 ± 0,276		1,75 ± 0,127	20,9 ± 1,541	0,959
2	B	16,42 ± 0,282	16	4,5 ± 1,209	22,76 ± 1,959	0,995
	G	15,35 ± 0,227		2,58 ± 0,127	24,9 ± 0,339	0,972
3	B	5,06 ± 0,510	6,3	3,3 ± 0,257	20,29 ± 0,796	0,996
	G	6,27 ± 0,436		3,95 ± 0,456	20,78 ± 1,037	0,992
4	B	1,5 ± 0,831	2,3	5,08 ± 0,592	32,99 ± 0,405	0,997
	G	1,99 ± 0,823		6,02 ± 0,748	35,79 ± 1,621	0,993
5	B	8,11 ± 1,06	10,7	1,5 ± 0,159	19,26 ± 1,750	0,992
	G	8,64 ± 1,16		1,6 ± 0,235	21,93 ± 3,366	0,985
6	B	6,78 ± 0,864	8,7	1,62 ± 0,305	18,49 ± 0,529	0,988
	G	7,33 ± 0,968		2,11 ± 0,512	22,48 ± 2,302	0,984
7	B	7,08 ± 0,839	9,7	1,31 ± 0,076	18,92 ± 1,756	0,991
	G	7,56 ± 1,409		1,89 ± 0,320	21,09 ± 3,218	0,980
8	B	9,12 ± 0,748	10,7	2,76 ± 0,381	15,6 ± 0,114	0,996
	G	9,26 ± 0,597		2,84 ± 0,349	16,48 ± 0,201	0,994
9	B	0,13 ± 0,803	1,7	4,49 ± 0,035	37,94 ± 0,815	0,998
	G	0,61 ± 0,781		5,31 ± 0,101	40,55 ± 0,928	0,996
10	B	3,31 ± 0,021	3,7	5,2 ± 0,637	33,19 ± 1,209	0,996
	G	3,62 ± 0,190		6,11 ± 0,611	34,95 ± 1,783	0,993
11	B	22,01 ± 0,961	24	2,99 ± 0,233	21,14 ± 2,171	0,990
	G	21,64 ± 0,038		2,15 ± 0,572	18,72 ± 0,658	0,993

1365

1366

1367

1368

1369

1370

1371

1372

** Tempo de adaptação médio de 3 repetições

* Desvio Padrão calculado a partir de 3 repetições.

1373

1374

1375

1376 **TABELA 5.** *Dados experimentais do tempo de adaptação (λ ; dias) e da taxa de*

1377 *crescimento (μ ; mm.dia⁻¹) para *Aspergillus niger*, em néctar de manga,*

1378 *utilizados para ajuste do modelo polinomial quadrático.*

Ensaio	pH	Temperatura	λ (dias)	μ (mm.dia⁻¹)
1	3,5	18	18,04	4,30
2	4,5	18	16,42	4,50
3	3,5	22	5,06	3,30
4	4,5	22	1,50	5,08
8	3,28	20	9,12	2,76
9	4,0	22,8	0,13	4,49
10	4,7	20	3,31	5,20
11	4,0	17,2	22,01	2,99
4	4,0	20	8,11	1,50
5	4,0	20	6,78	1,62
6	4,0	20	7,08	1,31

1379

1380

1381

1382

1383

1384

1385

1386

1387

1388

1389

1390

1391

1392

1393 **TABELA 6.** *Coeficientes significativos ($p < 0,05$) para a modelagem polinomial do*1394 *tempo de adaptação (λ ; dias) e da taxa de crescimento (μ ; mm.dia⁻¹)*1395 *de A.niger em néctar de manga.*

a. λ (dias)			
Parâmetros	Regressão	Erro padrão	p
Intercepto/média	7,17581	0,491209	0,000002
pH linear	-1,67650	0,413644	0,004852
Temperatura linear	-7,36576	0,413644	0,000000
Temperatura quadrática	2,33521	0,472168	0,001664
b. μ (mm.dia⁻¹)			
Parâmetros	Regressão	Erro padrão	p
Intercepto/média	1,474998	0,314430	0,005380
pH linear	0,679572	0,192838	0,016846
pH quadrático	1,365807	0,230106	0,001937
Temperatura linear	0,212507	0,192838	0,320659
Temperatura quadrática	1,245089	0,230106	0,002916

1396

CONCLUSÕES GERAIS

Por meio da presente pesquisa pode-se concluir que:

- ∅ O nível de contaminação médio do néctar de manga pasteurizado por bolores termoresistentes foi de $7,4 \times 10^3$ esporos/mL;
- ∅ Apesar de não existirem relatos na literatura de linhagens de *Aspergillus niger* com elevado grau de termoresistência, a partir do néctar de manga foi isolada uma cepa com resistência térmica de 100°C / 15 minutos, sendo esta uma linhagem diferenciada;
- ∅ Mesmo a a_w sendo descrita como um fator de importância sobre o comportamento de fungos, na faixa estudada e sob condições de temperatura de abuso de refrigeração e nível de inóculo de 10^3 esporos/mL esta variável não apresentou significância a $p < 0,05$;
- ∅ Os fatores de maior influência sobre o crescimento de *A.niger* em néctar de manga foram pH e temperatura, sendo que, para a taxa de crescimento o pH quadrático apresentou maior efeito enquanto que, para o tempo de adaptação, a temperatura linear foi o parâmetro de maior efeito;
- ∅ Para a modelagem primária do crescimento, o modelo de Baranyi & Roberts obteve melhor performance no ajuste dos dados;
- ∅ Considerando-se a modelagem polinomial de superfície de resposta para tempo de adaptação observou-se que o maior valor para esta variável é notado a pH 3,28 e 17,2°C;

∅ Já considerado-se a modelagem polinomial para taxa de crescimento, observou-se que o menor valor para esta variável foi notado em pH 4,0 e 20°C;

∅ Variações na temperatura da ordem de 0,8°C a pH 4,0 implicam em reduções de até 2 vezes no tempo de adaptação do microrganismo, ou seja, estreitamento da vida de prateleira do produto;

∅ As condições de pH e temperatura utilizadas somente retardam o crescimento/desenvolvimento de *A.niger* em néctar de manga não o impedindo, para tanto seria necessário que o mesmo fosse estocado a temperaturas $\leq 15^{\circ}\text{C}$ pois estas não permitem o crescimento/desenvolvimento do microrganismo, independentemente do nível de contaminação inicial ser de 10^0 ou 10^3 esp./mL.

APÊNDICE 1

MEIOS DE CULTURA E REAGENTES

CYA : Czapeck yeast (autolysate) extract Agar (identificação de fungos)

NaNO ₃	3,0 g
K ₂ HPO ₄	1,0 g
KCl.....	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,5 g
FeSO ₄ . 7H ₂ O.....	0,01g
Extrato de levedura.....	5g
Sacarose.....	30 g
Agar.....	15
Água destilada.....	1000 mL

MEA : Agar Extrato de Malte (Identificação dos fungos)

Extrato de malte.....	6g
Glicose.....	6g
Ágar bacteriológico.....	6g
Peptona bacteriológica.....	0,3g
Água destilada.....	300mL

G25-N (25% Glycerol Nitrate Agar)

K ₂ HPO ₄	0,75 g
Czapeck concentrado.....	7,5mL
Extrato de levedura em pó.....	3,7g
Glicerol.....	250mL
Ágar Bacteriológico.....	12g
Água destilada.....	750mL

Concentrado Czapeck

NaNO ₃	3,0 g
K ₂ HPO ₄	1,0 g
KCl.....	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,5 g
FeSO ₄ . 7H ₂ O.....	0,01g
Água destilada.....	100mL

Corante Lacto-fucsina 0,1%

Ácido fucsínico.....	0,1g
Ácido Láctico 85% de pureza.....	100mL

APÊNDICE 2 – Dados do diâmetro experimental e calculado das colônias de *A.niger* em néctar de manga obtidos pelos modelos de Gompertz modificado e Baranyi & Roberts. **Planejamento 2³ com 3 pontos centrais.**

Ensaio 01				Ensaio 02				Ensaio 03			
tempo (dias)	Dexp. (mm)	DG (mm)	DB (mm)	tempo (dias)	Dexp. (mm)	DG (mm)	DB (mm)	tempo (dias)	Dexp. (mm)	DG (mm)	DB (mm)
0	0,1	1,302885	1,254706	0	0,1	0,423512	0,435467	0	0,1	0,046833	0,0085
1	0,1	1,302885	1,254706	1	0,1	0,423512	0,435467	1	0,1	0,046833	0,0085
2	0,1	1,302885	1,255046	2	0,1	0,423512	0,435686	2	0,1	0,046834	0,008656
3	0,1	1,302887	1,256869	3	0,1	0,423512	0,436407	3	0,1	0,046873	0,009401
4	3	1,303462	1,266616	4	0,1	0,423517	0,438782	4	0,1	0,048044	0,012955
5	3,2	1,324789	1,317957	5	0,1	0,423846	0,446588	5	0,1	0,061633	0,02977
6	4	1,538469	1,569804	6	0,1	0,430884	0,472104	6	0,1	0,139806	0,106149
7	4,6	2,414049	2,512695	7	0,1	0,491863	0,554046	7	0,1	0,405162	0,402429
8	5	4,362351	4,545524	8	3	0,762881	0,803435	8	0,1	1,011631	1,170858
9	8	7,230351	7,21074	9	3,2	1,498552	1,46302	9	0,1	2,043153	2,365699
10	12	10,43181	10,04669	10	4	2,888078	2,798098	10	0,1	3,451442	3,730156
11	14	13,40568	12,89985	11	4,6	4,900702	4,764521	11	0,1	5,084952	5,136696
12	16	15,85256	15,68334	12	5	7,303053	7,073318	12	3	6,764524	6,549909
13	20	17,71144	18,18791	13	8	9,794689	9,508486	13	3	8,344426	7,957609
14	21	19,0516	19,96689	14	12	12,12881	11,96462	14	3	9,736223	9,345503
15	21	19,98522	20,78928	15	14	14,16022	14,35166	15	3	10,9045	10,68089
16	21	20,6212	21,04328	16	16	15,83667	16,47549	16	6	11,85093	11,89123
17	21	21,04812	21,10773	17	17	17,16813	17,98191	17	6	12,59786	12,8571
18	21	21,33196	21,12312	18	18,2	18,19678	18,71198	18	9,5	13,17613	13,48296
19	21	21,51951	21,12674	19	19	18,97582	18,96054	19	10	13,61755	13,8034
20	21	21,64292	21,12759	20	19	19,55742	19,03108	20	10	13,95104	13,94063
21	21	21,7239	21,12779	21	19	19,98715	19,04988	21	10	14,20107	13,99398

Planejamento 2³ com 3 pontos centrais, continuação.

Ensaio 03			
tempo (dias)	Dexp. (mm)	DG (mm)	DB (mm)
22	11	-	-
23	11,1	-	-
24	12	-	-
25	13	-	-
26	14	-	-
27	14	-	-
28	14	-	-
29	14	-	-
30	14	-	-

Planejamento 2³ com 3 pontos centrais, continuação.

Ensaio 04				Ensaio 05				Ensaio 06			
tempo (dias)	Dexp. (mm)	DG (mm)	DB (mm)	tempo (dias)	Dexp. (mm)	DG (mm)	DB (mm)	tempo (dias)	Dexp. (mm)	DG (mm)	DB (mm)
0	SC	SC	SC	0	0,1	0,008934	-0,01829	0	0,1	0,05522	-0,09511
1	SC	SC	SC	1	0,1	0,008934	-0,01829	1	0,1	0,05522	-0,09511
2	SC	SC	SC	2	0,1	0,008939	-0,01807	2	0,1	0,05522	-0,09491
3	SC	SC	SC	3	0,1	0,009276	-0,01683	3	0,1	0,05522	-0,09436
4	SC	SC	SC	4	0,1	0,015926	-0,00985	4	0,1	0,05522	-0,0929
5	SC	SC	SC	5	0,1	0,070556	0,02882	5	0,1	0,05522	-0,08898
6	SC	SC	SC	6	0,1	0,304962	0,224036	6	0,1	0,05522	-0,07851
7	SC	SC	SC	7	0,1	0,927039	0,927338	7	0,1	0,05522	-0,05066
8	SC	SC	SC	8	0,1	2,085762	2,306427	8	0,1	0,055223	0,022583
9	SC	SC	SC	9	0,1	3,750631	4,005429	9	0,1	0,057377	0,209492
10	SC	SC	SC	10	3,6	5,729702	5,779896	10	0,1	0,145363	0,654132
11	SC	SC	SC	11	4,8	7,779124	7,565212	11	0,1	0,828918	1,573812
12	SC	SC	SC	12	5,6	9,699156	9,342317	12	3	2,723758	3,115175
13	SC	SC	SC	13	6,5	11,37205	11,08802	13	6	5,499578	5,189886
14	SC	SC	SC	14	7,6	12,75505	12,74438	14	8	8,264288	7,570658
15	SC	SC	SC	15	9	13,85578	14,18114	15	10	10,4546	10,03483
16	SC	SC	SC	16	12	14,70816	15,21414	16	12	11,9721	12,22745
17	SC	SC	SC	17	12,6	15,35527	15,77918	17	13	12,94457	13,48944
18	SC	SC	SC	18	14	15,83958	16,01918	18	14	13,54025	13,84712
19	SC	SC	SC	19	14,6	16,19831	16,10684	19	14	13,89572	13,91096
20	SC	SC	SC	20	14,6	16,46206	16,13682	20	14	14,10468	13,92097
21	SC	SC	SC	21	15,6	16,65493	16,14683	21	14	14,22646	13,92251

Onde: SC – sem crescimento

Planejamento 2³ com 3 pontos centrais, continuação.

Ensaio 05			
tempo (dias)	Dexp. (mm)	DG (mm)	DB (mm)
22	16,2	-	-
23	16,2	-	-
24	16,2	-	-
25	16,2	-	-
26	16,2	-	-
27	16,2	-	-
28	16,2	-	-

Planejamento 2³ com 3 pontos centrais, continuação.

Ensaio 07				Ensaio 08				Ensaio 09			
tempo (dias)	Dexp. (mm)	DG (mm)	DB (mm)	tempo (dias)	Dexp. (mm)	DG (mm)	DB (mm)	tempo (dias)	Dexp. (mm)	DG (mm)	DB (mm)
0	0,1	0,036653	0,042857	0	SC	SC	SC	0	0,1	0,195392	0,175692
1	0,1	0,036653	0,042857	1	SC	SC	SC	1	0,1	0,195392	0,175692
2	0,1	0,036654	0,042973	2	SC	SC	SC	2	0,1	0,195392	0,175883
3	0,1	0,036669	0,043344	3	SC	SC	SC	3	0,1	0,195393	0,176599
4	0,1	0,036956	0,044529	4	SC	SC	SC	4	0,1	0,195479	0,179278
5	0,1	0,039747	0,048304	5	SC	SC	SC	5	0,1	0,197862	0,189276
6	0,1	0,055875	0,060277	6	SC	SC	SC	6	0,1	0,223453	0,226166
7	0,1	0,117423	0,097709	7	SC	SC	SC	7	0,1	0,359817	0,35699
8	0,1	0,286226	0,209789	8	SC	SC	SC	8	0,1	0,790613	0,766808
9	0,1	0,642298	0,509172	9	SC	SC	SC	9	0,1	1,713169	1,733575
10	0,1	1,252241	1,143927	10	SC	SC	SC	10	0,1	3,19461	3,285431
11	0,1	2,138294	2,136138	11	SC	SC	SC	11	2,5	5,118495	5,153781
12	0,1	3,268206	3,349767	12	SC	SC	SC	12	2,9	7,25606	7,130889
13	0,1	4,568225	4,656127	13	SC	SC	SC	13	3,3	9,374416	9,132621
14	3	5,947378	5,992574	14	SC	SC	SC	14	4,5	11,30528	11,11833
15	3,5	7,319835	7,332153	15	SC	SC	SC	15	5,2	12,96093	13,02852
16	4	8,618527	8,65395	16	SC	SC	SC	16	6,5	14,31869	14,72231
17	4,5	9,799631	9,919511	17	SC	SC	SC	17	8	15,39655	15,9629
18	5	10,84079	11,04607	18	SC	SC	SC	18	11	16,23218	16,63077
19	5,7	11,73631	11,90543	19	SC	SC	SC	19	12	16,86893	16,89725
20	6,2	12,49184	12,4206	20	SC	SC	SC	20	13	17,34808	16,9864
21	8	13,11965	12,66136	21	SC	SC	SC	21	14	17,70535	17,01415

Onde: SC – sem crescimento

Planejamento 2³ com 3 pontos centrais, continuação.

Ensaio 07				Ensaio 09			
tempo (dias)	Dexp. (mm)	DG (mm)	DB (mm)	tempo (dias)	Dexp. (mm)	DG (mm)	DB (mm)
22	9	-	-	22	16,2	-	-
23	11	-	-	23	16,8	-	-
24	12	-	-	24	16,8	-	-
25	12,3	-	-	25	16,8	-	-
26	12,3	-	-	26	16,8	-	-
27	12,3	-	-	27	16,8	-	-
28	12,3	-	-	28	16,8	-	-

Planejamento 2³ com 3 pontos centrais, continuação.

Ensaio 10				Ensaio 11			
tempo (dias)	Dexp. (mm)	DG (mm)	DB (mm)	tempo (dias)	Dexp. (mm)	DG (mm)	DB (mm)
0	0,1	-0,04146	0,082082	0	0,1	0,1	0,021001
1	0,1	-0,04146	0,082082	1	0,1	0,1	0,021001
2	0,1	-0,02553	0,082279	2	0,1	0,1	0,02116
3	0,1	0,02462	0,083487	3	0,1	0,1	0,021866
4	0,1	0,149709	0,090895	4	0,1	0,100004	0,024997
5	0,1	0,406913	0,135161	5	0,1	0,100354	0,038802
6	0,1	0,857632	0,365944	6	0,1	0,107909	0,097997
7	0,1	1,549634	1,127914	7	0,1	0,171745	0,325997
8	0,1	2,502102	2,42017	8	0,1	0,443223	0,974552
9	3	3,699939	3,898001	9	0,1	1,142611	2,122809
10	3,2	5,098218	5,412023	10	0,1	2,394333	3,532924
11	4,5	6,633179	6,931091	11	3,2	4,116094	5,021924
12	5,6	8,234903	8,448593	12	4,1	6,075876	6,528871
13	6	9,837889	9,960379	13	4,6	8,023549	8,036767
14	7,5	11,38782	11,45885	14	5,6	9,780305	9,537017
15	8,2	12,84452	12,92759	15	6,9	11,25897	11,01629
16	8,5	14,18194	14,33243	16	7,8	12,44373	12,44519
17	9,8	15,38643	15,61031	17	8,5	13,36032	13,76243
18	10,6	16,45412	16,67033	18	9,6	14,05196	14,86636
19	12,9	17,38826	17,43475	19	10,9	14,56471	15,65571
20	16	18,19681	17,90258	20	12,3	14,94008	16,11926
21	17,6	18,89048	18,15055	21	14,6	15,21244	16,34808

Planejamento 2³ com 3 pontos centrais.

Ensaio 11			
tempo (dias)	Dexp. (mm)	DG (mm)	DB (mm)
22	15,9	-	-
23	15,9	-	-
24	15,9	-	-
25	15,9	-	-
26	15,9	-	-
27	15,9	-	-
28	15,9	-	-

Planejamento 2³ com 3 pontos centrais e 4 axiais (planejamento final).

Ensaio 01 (m=10; n=10)				Ensaio 02 (m=10; n=10)				Ensaio 03 (m=10; n=10)			
tempo (dias)	Dexp. (mm)	DG (mm)	DB (mm)	tempo (dias)	Dexp. (mm)	DG (mm)	DB (mm)	tempo (dias)	Dexp. (mm)	DG (mm)	DB (mm)
0	0,1	-0,16027	0,078908	0	0,1	0,373766	-0,18013	0	0,1	0,092279	-0,02372
1	0,1	-0,16027	0,078908	1	0,1	0,373766	-0,18013	1	0,1	0,092279	-0,02372
2	0,1	-0,16008	0,078908	2	0,1	0,373766	-0,17973	2	0,1	0,092279	-0,02335
3	0,1	-0,15963	0,078908	3	0,1	0,373766	-0,17886	3	0,1	0,092279	-0,02114
4	0,1	-0,15855	0,078908	4	0,1	0,373766	-0,17698	4	0,1	0,092559	-0,00811
5	0,1	-0,156	0,078908	5	0,1	0,373766	-0,17291	5	0,1	0,110668	0,067063
6	0,1	-0,14992	0,078908	6	0,1	0,373766	-0,16409	6	0,1	0,34548	0,453993
7	0,1	-0,1355	0,078908	7	0,1	0,373766	-0,14503	7	4,2	1,402176	1,789723
8	0,1	-0,10147	0,078908	8	0,1	0,373775	-0,1039	8	6	3,761498	4,210602
9	0,1	-0,02199	0,078908	9	0,1	0,374473	-0,01555	9	9,8	7,089555	7,066178
10	0,1	0,159172	0,078908	10	0,1	0,389539	0,172378	10	13,2	10,57886	10,00796
11	0,1	0,551201	0,078917	11	0,1	0,51343	0,564165	11	15,3	13,60528	12,93402
12	0,1	1,320042	0,101455	12	0,1	1,020058	1,349162	12	18,9	15,93264	15,73216
13	0,1	2,615204	0,826278	13	0,1	2,269577	2,813264	13	20,2	17,59144	18,09027
14	0,1	4,441379	3,612431	14	0,1	4,411087	5,256096	14	20,2	18,71848	19,52991
15	0,1	6,64441	7,119063	15	0,1	7,239772	8,796748	15	20,2	19,46153	20,08414
16	0,1	8,974504	9,638172	16	0,1	10,34377	13,22656	16	20,2	19,94226	20,23729
17	0,1	10,85623	11,02782	17	3	13,33018	17,66725	17	20,2	20,2496	20,27445
18	0,1	11,58193	11,70751	18	5,5	15,94831	19,72948	18	20,2	20,44464	20,28315
19	0,1	11,70063	12,02247	19	8,5	18,09778	19,9817	19	20,2	20,56783	20,28517
20	3	11,71455	12,16495	20	12	19,78272	19,9979	20	-	20,64542	20,28564
21	5	11,71609	12,22872	21	15	21,06119	19,99883	21	-	20,6942	20,28575

Planejamento 2³ com 3 pontos centrais e 4 axiais (planejamento final), continuação.

Ensaio 01 (m=10; n=10)				Ensaio 02 (m=10; n=10)			
tempo (dias)	Dexp. (mm)	DG (mm)	DB (mm)	tempo (dias)	Dexp. (mm)	DG (mm)	DB (mm)
22	7	-	-	22	18	-	-
23	8,5	-	-	23	20	-	-
24	10	-	-	24	20	-	-
25	11,3	-	-	25	20	-	-
26	12	-	-	26	20	-	-
27	12,2	-	-	27	20	-	-
28	12	-	-	28	-	-	-
29	12	-	-	29	-	-	-
30	12	-	-	30	-	-	-
31	12	-	-	31	-	-	-

Planejamento 2³ com 3 pontos centrais e 4 axiais (planejamento final), continuação.

Ensaio 04 (m=10; n=10)				Ensaio 05 (m=10; n=10)				Ensaio 06 (m=10; n=10)			
tempo (dias)	Dexp. (mm)	DG (mm)	DB (mm)	tempo (dias)	Dexp. (mm)	DG (mm)	DB (mm)	tempo (dias)	Dexp. (mm)	DG (mm)	DB (mm)
0	0,1	0,533719	0,415223	0	0,1	0,1	-0,00284	0	0,1	0,082082	-0,04146
1	0,1	0,533719	0,415223	1	0,1	0,1	-0,00284	1	0,1	0,082082	-0,04146
2	0,1	0,534579	0,415861	2	0,1	0,1	-0,0027	2	0,1	0,082279	-0,02553
3	0,1	0,552885	0,422304	3	0,1	0,1	-0,0022	3	0,1	0,083487	0,02462
4	3	0,704273	0,486122	4	0,1	0,1	-0,0004	4	0,1	0,090895	0,149709
5	6	1,332842	1,016578	5	0,1	0,1	0,006104	5	0,1	0,135161	0,406913
6	9,2	2,913945	3,131037	6	0,1	0,100033	0,029345	6	0,1	0,365944	0,857632
7	15,3	5,681175	6,433326	7	0,1	0,102273	0,109781	7	0,1	1,127914	1,549634
8	20	9,411749	9,963489	8	0,1	0,139378	0,361603	8	0,1	2,42017	2,502102
9	26,3	13,58364	13,51469	9	0,1	0,370708	0,981198	9	3	3,898001	3,699939
10	29	17,66664	17,05603	10	0,1	1,096419	2,042313	10	3,2	5,412023	5,098218
11	32	21,30098	20,5603	11	0,1	2,504314	3,379028	11	4,5	6,931091	6,633179
12	32	24,32523	23,95534	12	3,2	4,4609	4,822146	12	5,6	8,448593	8,234903
13	32	26,72442	27,05707	13	4	6,6218	6,296874	13	6	9,960379	9,837889
14	32	28,56442	29,52104	14	5	8,660874	7,777367	14	7,5	11,45885	11,38782
15	32	29,94217	31,05055	15	5,5	10,38922	9,251169	15	8,2	12,92759	12,84452
16	-	30,95646	31,76598	16	6,4	11,7511	10,70234	16	8,5	14,33243	14,18194
17	-	31,69428	32,03899	17	8,3	12,77237	12,09721	17	9,8	15,61031	15,38643
18	-	32,22646	32,13333	18	9,5	13,51294	13,36641	18	10,6	16,67033	16,45412
19	-	32,60802	32,1647	19	10,5	14,0379	14,40008	19	12,9	17,43475	17,38826
20	-	32,88043	32,175	20	12	14,40433	15,10461	20	16	17,90258	18,19681
21	-	33,07434	32,17836	21	12,8	14,65746	15,49492	21	17,6	18,15055	18,36773

Planejamento 2³ com 3 pontos centrais e 4 axiais (planejamento final), continuação.

Ensaio 06 (m=10; n=10)			
tempo (dias)	Dexp. (mm)	DG (mm)	DB (mm)
22	17,6	-	-
23	17,6	-	-
24	17,6	-	-
25	17,6	-	-
26	17,6	-	-

Planejamento 2³ com 3 pontos centrais e 4 axiais (planejamento final), continuação.

Ensaio 07 (m=10; n=10)				Ensaio 08 (m=10; n=10)				Ensaio 09 (m=10; n=10)			
tempo (dias)	Dexp. (mm)	DG (mm)	DB (mm)	tempo (dias)	Dexp. (mm)	DG (mm)	DB (mm)	tempo (dias)	Dexp. (mm)	DG (mm)	DB (mm)
0	0,1	0,1	0,006373	0	0,1	0,08766	-0,04693	0	0,1	1,14687	-0,24377
1	0,1	0,1	0,006373	1	0,1	0,08766	-0,04693	1	0,1	1,14687	-0,24377
2	0,1	0,1	0,00654	2	0,1	0,08766	-0,04669	2	5	2,398417	2,424059
3	0,1	0,1	0,007249	3	0,1	0,08766	-0,046	3	8	4,235775	5,091692
4	0,1	0,1	0,010255	4	0,1	0,08766	-0,04407	4	12	6,627875	7,758929
5	0,1	0,100005	0,022925	5	0,1	0,08766	-0,0386	5	17	9,455704	10,42535
6	0,1	0,100884	0,075179	6	0,1	0,08766	-0,0232	6	22,5	12,5494	13,09006
7	0,1	0,125919	0,273547	7	0,1	0,087661	0,01989	7	26,8	15,72995	15,75126
8	0,1	0,33559	0,862801	8	0,1	0,088402	0,138355	8	30,5	18,84079	18,40519
9	0,1	1,096419	1,998119	9	0,1	0,133068	0,449363	9	32,6	21,76425	21,04421
10	0,1	2,656482	3,477893	10	0,1	0,597219	1,183082	10	35,3	24,42502	23,65284
11	2,5	4,831566	5,076392	11	0,1	2,197702	2,606915	11	36,2	26,78538	26,20076
12	3,2	7,174459	6,704135	12	3	4,951098	4,761556	12	36,2	28,83666	28,63173
13	4,6	9,300905	8,333033	13	5	8,032136	7,404526	13	36,2	30,59024	30,85244
14	6,3	11,02459	9,945369	14	7	10,6878	10,24695	14	-	32,0697	32,73767
15	7,2	12,32167	11,50758	15	9	12,64553	12,94323	15	-	33,3048	34,17644
16	8,5	13,25124	12,94149	16	12,3	13,96069	14,74316	16	-	34,32723	35,14407
17	9,1	13,89646	14,105	17	14,2	14,79694	15,3246	17	-	35,1679	35,72166
18	10,2	14,33503	14,86576	18	14,6	15,3117	15,42759	18	-	35,8554	36,03666
19	11,6	14,62909	15,25035	19	15,5	15,62259	15,44265	19	-	36,4152	36,1989
20	13,1	14,82449	15,40962	20	15,5	15,80824	15,44478	20	-	36,86946	36,27981
21	15,2	14,95358	15,4689	21	15,5	15,91837	15,44508	21	-	37,23704	36,31949

Planejamento 2³ com 3 pontos centrais e 4 axiais (planejamento final), continuação.

Ensaio 07 (m=10; n=10)			
tempo (dias)	Dexp. (mm)	DG (mm)	DB (mm)
22	15,2	-	-
23	15,2	-	-
24	15,2	-	-
25	15,2	-	-
26	15,2	-	-

Planejamento 2³ com 3 pontos centrais e 4 axiais (planejamento final), continuação.

Ensaio 10 (m=10; n=10)				Ensaio 11 (m=1; n=19)			
tempo (dias)	Dexp. (mm)	DG (mm)	DB (mm)	tempo (dias)	Dexp. (mm)	DG (mm)	DB (mm)
0	0,1	0,701013	0,671014	0	0,1	-0,27321	0,029729
1	0,1	0,701013	0,671014	1	0,1	-0,27321	0,029729
2	0,1	0,701691	0,671582	2	0,1	-0,27296	0,029729
3	0,1	0,715456	0,676272	3	0,1	-0,2723	0,02973
4	3,2	0,82982	0,714524	4	0,1	-0,27058	0,029732
5	5,3	1,321242	1,001728	5	0,1	-0,2661	0,029746
6	9,6	2,61962	2,413517	6	0,1	-0,25446	0,02982
7	13,2	5,019726	5,39037	7	0,1	-0,22434	0,030208
8	18,6	8,437188	8,930754	8	0,1	-0,14711	0,032263
9	25,3	12,46155	12,55712	9	0,1	0,046332	0,043123
10	29,8	16,59089	16,1867	10	0,1	0,504838	0,100052
11	32,9	20,42625	19,79361	11	0,1	1,475194	0,386646
12	32,9	23,74138	23,32918	12	0,1	3,184267	1,594899
13	32,9	26,46207	26,66365	13	0,1	5,615817	4,692372
14	32,9	28,61307	29,51052	14	0,1	8,523966	8,734103
15	32,9	30,26857	31,49441	15	0,1	11,63355	12,10935
16	-	31,51831	32,53664	16	0,1	14,60447	14,44125
17	-	32,44872	32,9644	17	0,1	16,6973	15,92286
18	-	33,1345	33,11708	18	0,1	17,46906	16,82193
19	-	33,63636	33,16848	19	0,1	17,62664	17,35264
20	-	34,00172	33,18543	20	0,1	17,65248	17,66076
21	-	34,26672	33,19098	21	0,1	17,65653	17,83788

Planejamento 2³ com 3 pontos centrais e 4 axiais (planejamento final), continuação.

Ensaio 11 (m=1; n=19)			
tempo (dias)	Dexp. (mm)	DG (mm)	DB (mm)
22	0,1	-	-
23	0,1	-	-
24	0,1	-	-
25	3,5	-	-
26	6,2	-	-
27	10	-	-
28	12	-	-
29	12,5	-	-
30	13,2	-	-
31	13,5	-	-
32	14	-	-
33	15	-	-
34	15,2	-	-
35	16,2	-	-
36	16,5	-	-
37	17	-	-
38	17,3	-	-
39	17,9	-	-
40	18,2	-	-
41	18,5	-	-
42	19,8	-	-
43	19,8	-	-

APÊNDICE 3

Modelagem primária do crescimento de *A. niger* em néctar de manga.

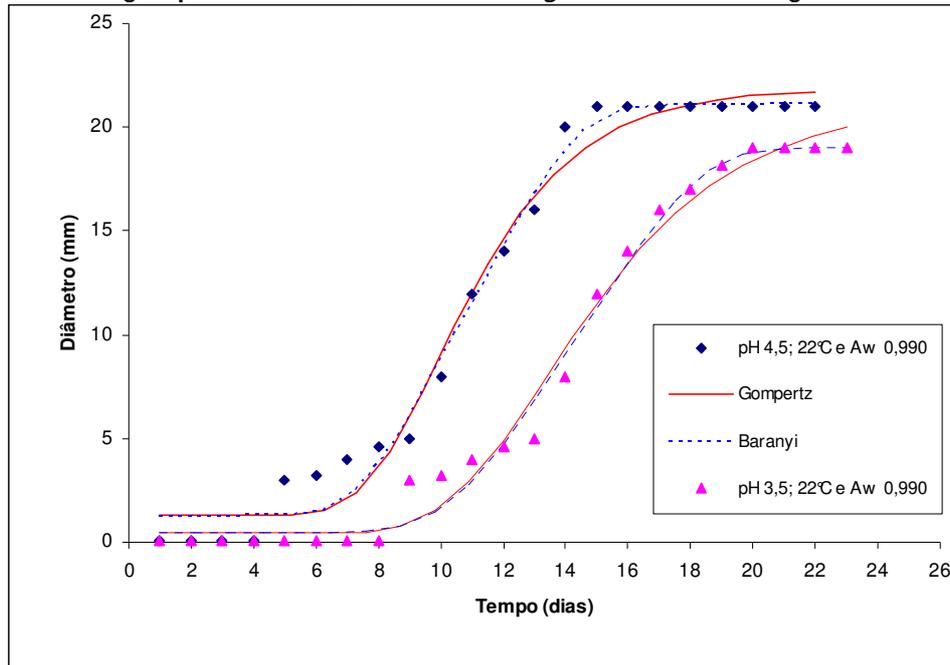


Figura 01. Deslocamento da curva de crescimento de *Aspergillus niger*, em néctar de manga, com redução do pH de 4,5 para 3,5, mantendo-se constantes temperatura e Aw a 22°C e 0,990, respectivamente, modeladas por Gompertz modificado e Baranyi & Roberts.

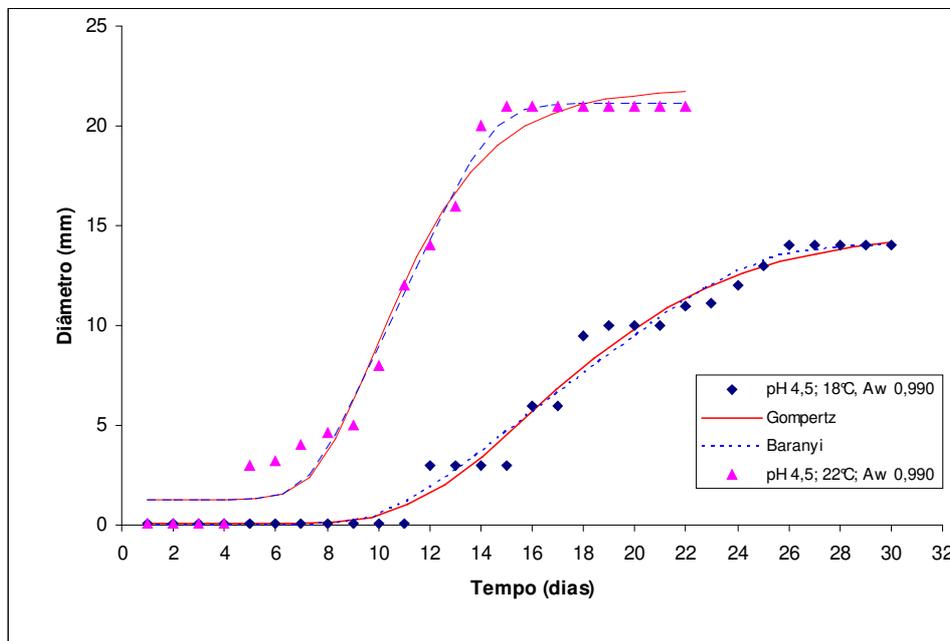


Figura 2. Deslocamento da curva de crescimento de *Aspergillus niger*, em néctar de manga, com redução da temperatura de 22°C para 18°C, mantendo-se constantes Aw e pH a 0,990 e 4,5, respectivamente, modeladas por Gompertz modificado e Baranyi & Roberts.

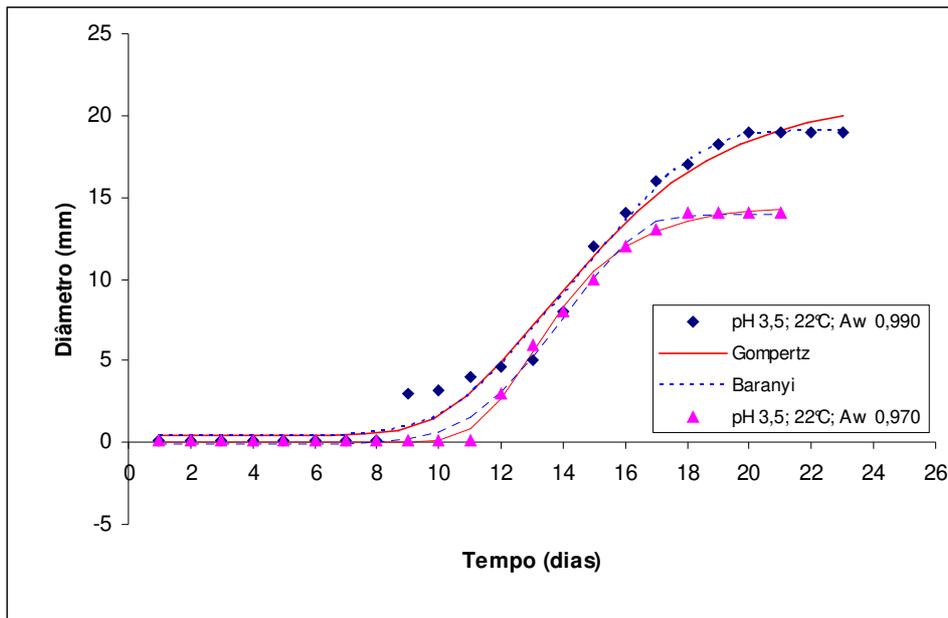


Figura 3. Deslocamento da curva de crescimento de *Aspergillus niger*, em néctar de manga, com redução de A_w de 0,990 para 0,970, mantendo-se constantes temperatura e pH a 22°C e 3,5, respectivamente, modeladas por Gompertz modificado e Baranyi & Roberts.

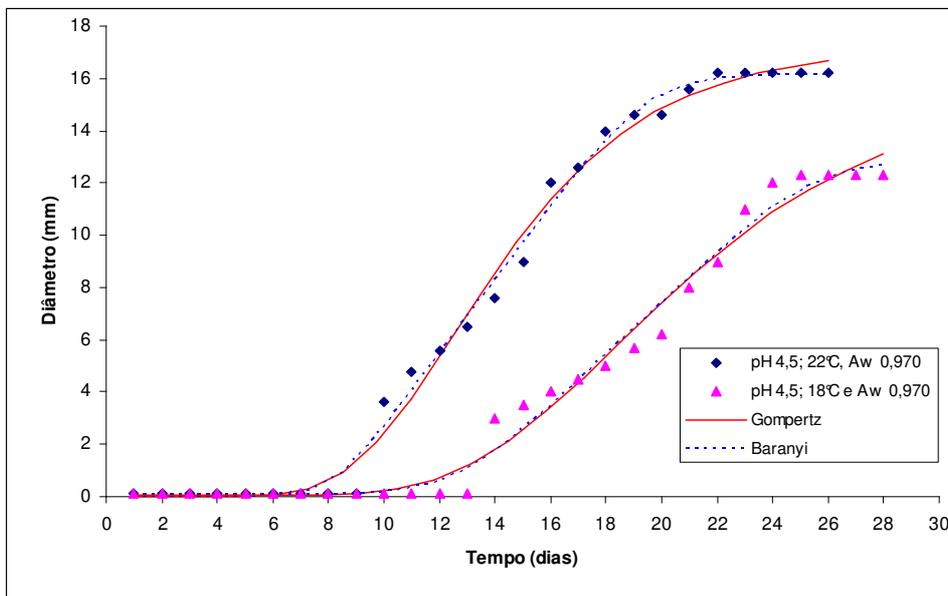


Figura 4. Deslocamento da curva de crescimento de *Aspergillus niger*, em néctar de manga, com redução de temperatura de 22°C para 18°C, mantendo-se constantes A_w e pH a 0,970 e 4,5, respectivamente, modeladas por Gompertz modificado e Baranyi & Roberts.

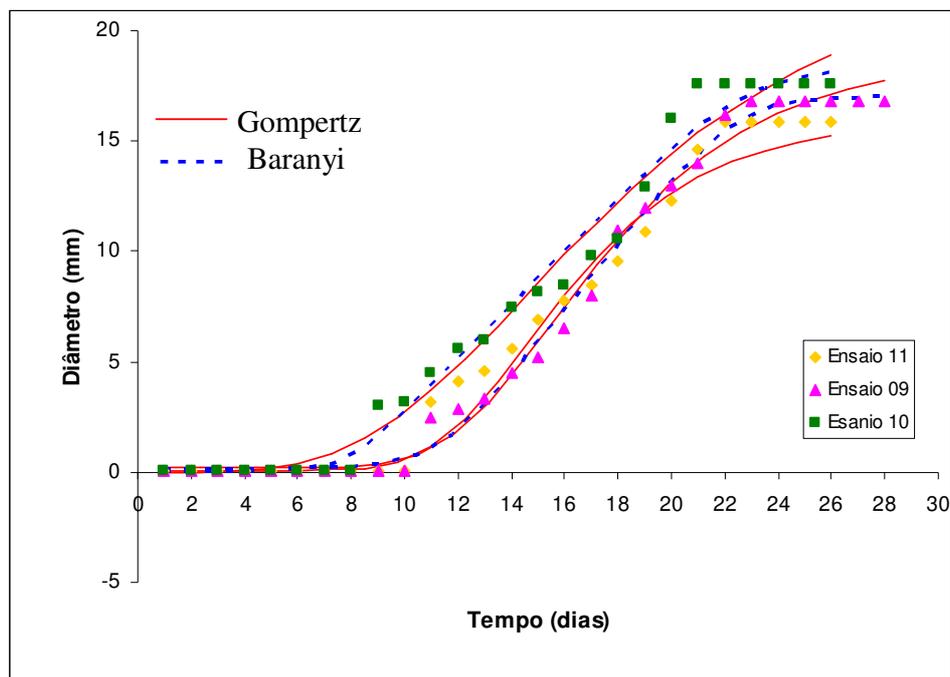


Figura 5. Curva de crescimento de *Aspergillus niger*, em néctar de manga, a pH 4.0; 20°C e A_w 0.980 (pontos centrais) modeladas por Gompertz modificado e Baranyi & Roberts.

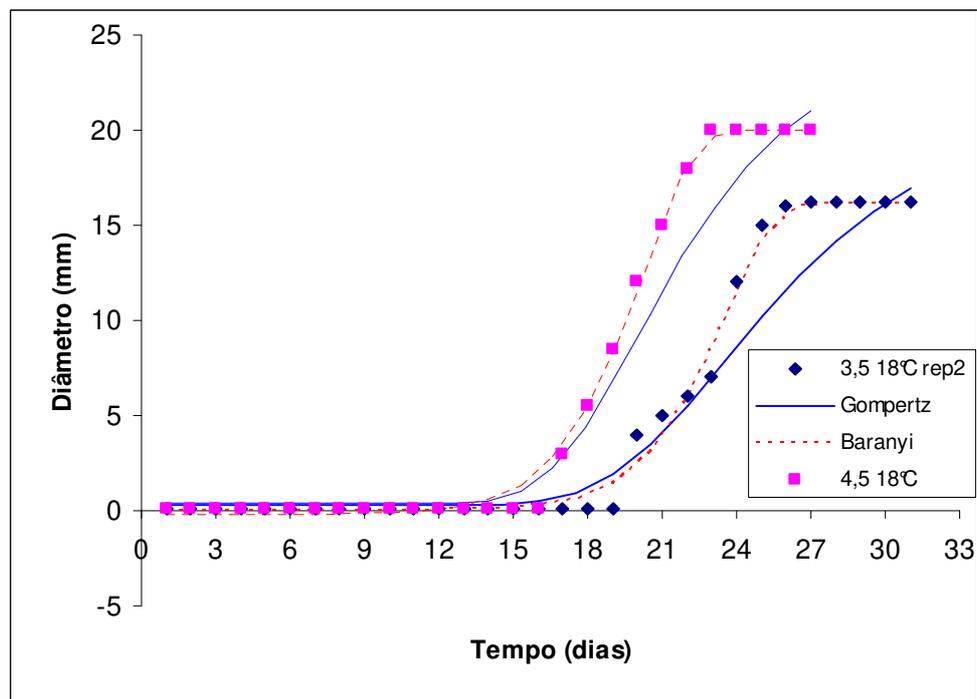


Figura 6. Deslocamento da curva de crescimento de *Aspergillus niger*, em néctar de manga, com redução de pH de 4.5 para 3.5, fixando-se a temperatura em 18°C, modeladas por Gompertz modificado e Baranyi & Roberts.

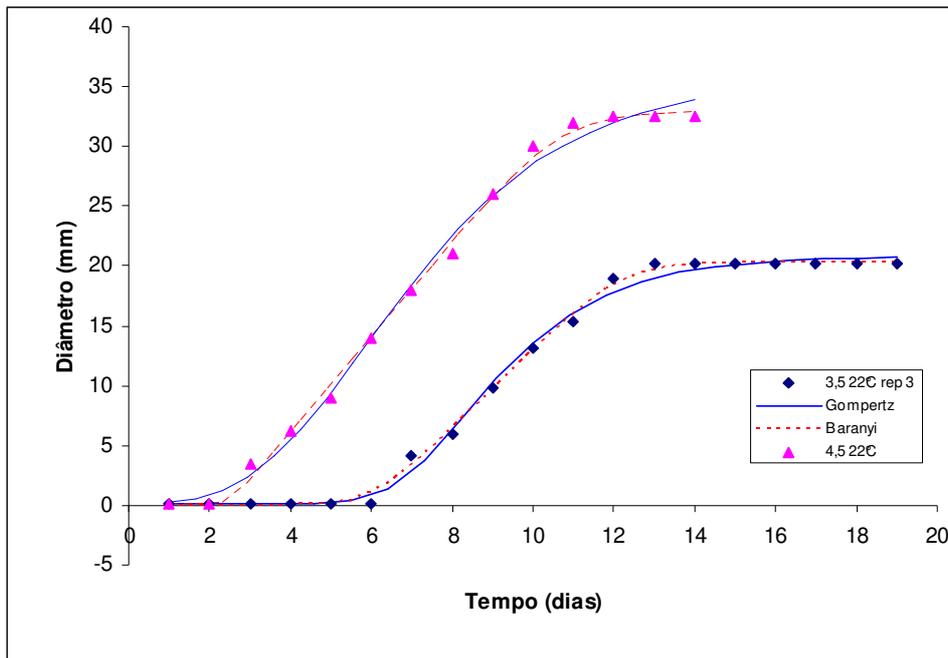


Figura 7. Deslocamento da curva de crescimento de *Aspergillus niger*, em néctar de manga, com redução de pH de 4.5 para 3.5, fixando-se a temperatura em 22°C, modeladas por Gompertz modificado e Baranyi & Roberts.

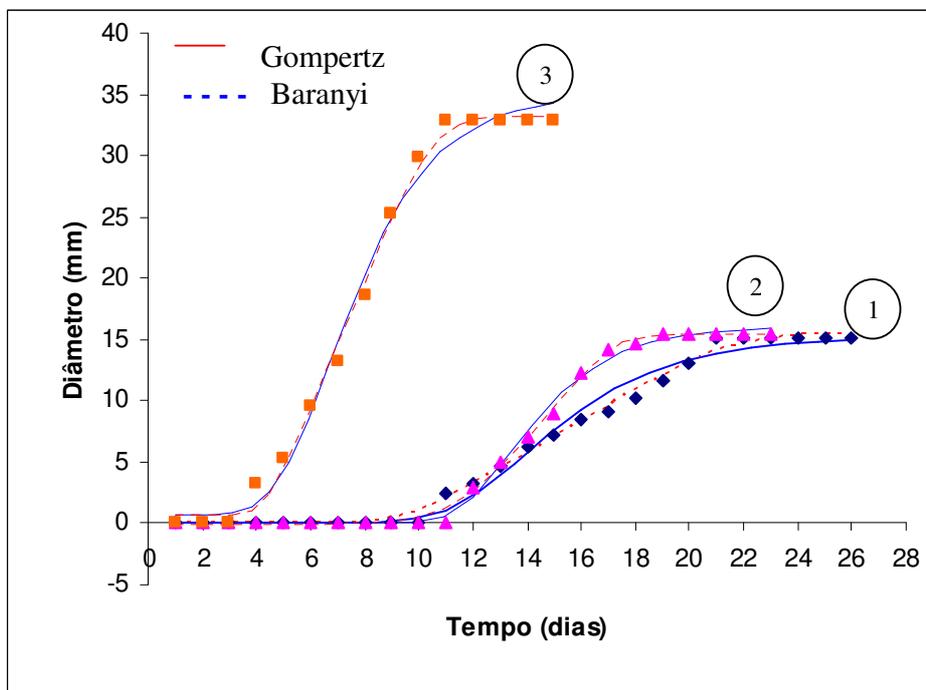


Figura 8. Deslocamento da curva de crescimento de *Aspergillus niger*, em néctar de manga, modeladas por Gompertz modificado e Baranyi & Roberts, nas seguintes condições: 1: pH 4.0; 2: pH 3.28; 3: pH 4.7, a temperatura de 20°C.

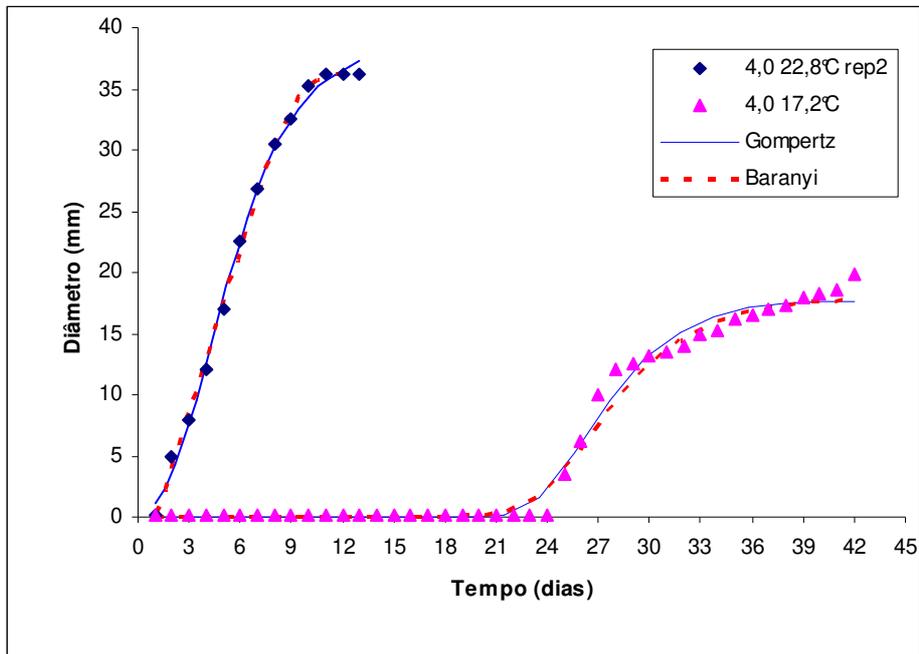


Figura 9. Deslocamento da curva de crescimento de *Aspergillus niger*, em néctar de manga, com redução de temperatura de 22.8 para 17.2°C, a pH constante fixado em 4.0, modeladas por Gompertz modificado e Baranyi & Roberts.

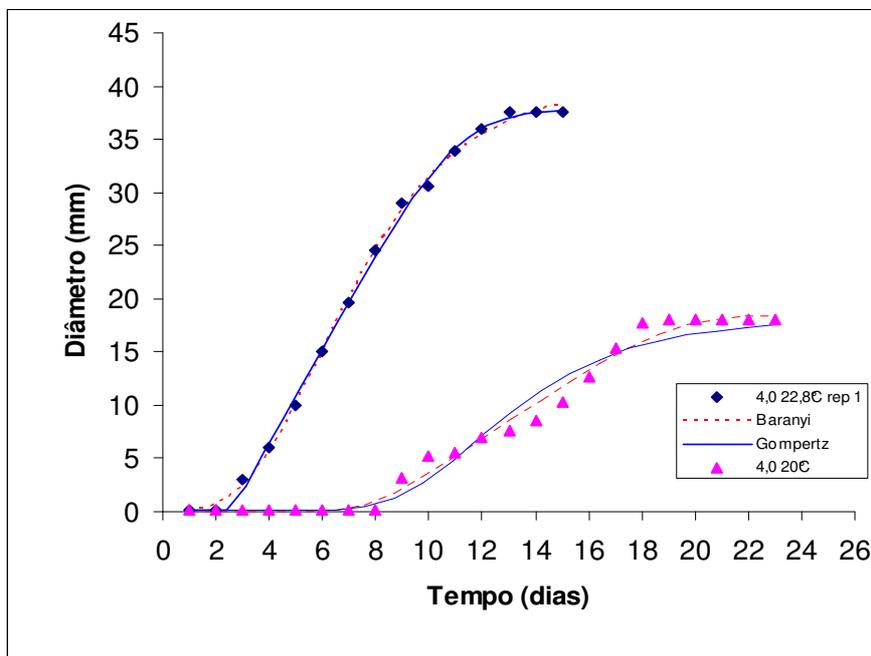


Figura 10. Deslocamento da curva de crescimento de *Aspergillus niger*, em néctar de manga, com redução de temperatura de 22.8°C para 20°C, a pH constante fixado em 4.0, modeladas por Gompertz modificado e Baranyi & Roberts.

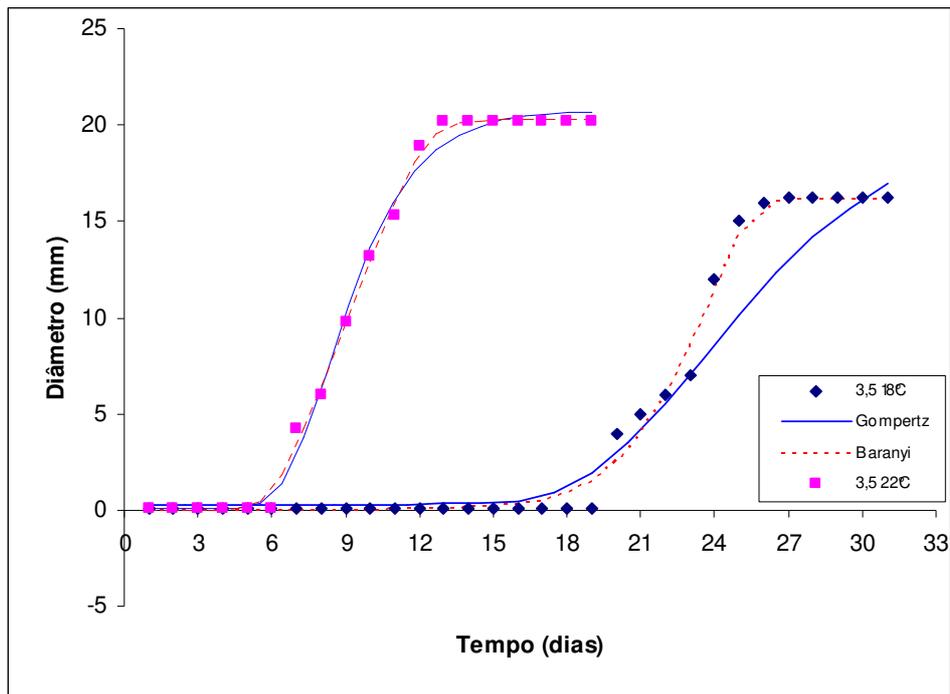


Figura 11. Deslocamento da curva de crescimento de *Aspergillus niger*, em néctar de manga, com redução de temperatura de 22°C para 18°C, a pH constante fixado em 4,0, modeladas por Gompertz modificado e Baranyi & Roberts.