

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

ESTUDO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *BYSSOCHLAMYS FULVA* EM POLPA  
DE MAMÃO: UMA ABORDAGEM INTEGRADA COM FENÔMENOS DE TRANSFERÊNCIA  
DE CALOR

TESE DE DOUTORADO

PAULO RICARDO SANTOS DA SILVA

PORTO ALEGRE

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

ESCOLA DE ENGENHARIA

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

ESTUDO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *BYSSOCHLAMYS FULVA* EM POLPA DE MAMÃO: UMA  
ABORDAGEM INTEGRADA COM FENÔMENOS DE TRANSFERÊNCIA DE CALOR

Paulo Ricardo Santos da Silva

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Engenharia.

Área de Concentração:

Fenômenos de Transporte e Operações Unitárias

Orientadora:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ligia Damasceno Ferreira Marczak

Co-orientadora:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Isabel Cristina Tessaro

Porto Alegre

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

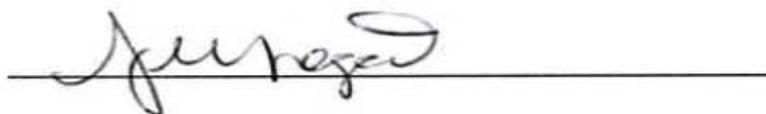
ESCOLA DE ENGENHARIA

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese intitulada “Estudo da cinética de crescimento de *Byssochlamys fulva* em polpa de mamão: uma abordagem integrada com fenômenos de transferência de calor”, elaborada por Paulo Ricardo Santos da Silva como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor em Engenharia.

Comissão Examinadora:



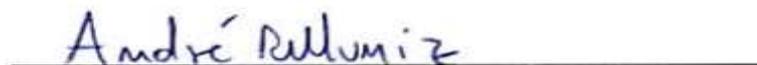
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gláucia Maria Falcão de Aragão



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jacqueline Biancon Copetti



Prof. Dr. Caciano Pelayo Zapata Noreña



Prof. Dr. André Rodrigues Muniz

*As lições mais importantes em minha vida  
não foram aprendidas na escola. Foram ensinadas  
por meus pais, a quem dedico este trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

A todos que contribuíram para a concretização deste trabalho. Em especial, à população brasileira que, ao pagar seus impostos, propiciam a existência de instituições públicas de ensino, nas quais realizei toda a minha formação escolar e acadêmica.

Às minhas orientadoras, professoras Lígia e Isabel, por acreditarem em mim, permitindo que eu conduzisse o trabalho de forma independente e, acima de tudo, pelas suas palavras decisivas nos momentos difíceis desta jornada.

À professora Sueli, por disponibilizar as instalações do Laboratório de Micologia Ambiental, onde parte deste trabalho foi realizado. À doutoranda Michele Mann, pela paciência em me ensinar métodos de ensaios microbiológicos e por ter dedicado parte de seu tempo para a realização deste estudo.

Aos meus coordenadores do MP/RS, por entenderem a importância deste curso para a minha formação profissional, e à instituição, por permitir meu afastamento parcial para realizar as disciplinas do curso.

Aos meus amigos, colegas de trabalho do MP/RS e da Unisinos, familiares, técnicos do DEQUI, colegas do PPGEQ e do Laboratório de Micologia Ambiental por participarem desta jornada, compartilhando dúvidas e incertezas ao longo da execução deste estudo.

Aos meus alunos, por também serem motivadores da busca pelo aprimoramento de meu conhecimento.

## RESUMO

O crescimento de fungos e de bactérias em alimentos representa riscos à saúde dos consumidores e gera perdas econômicas significativas. Seu controle pode ser alcançado com o ajuste correto das condições de operação e de armazenamento de produtos alimentícios. Neste contexto, a modelagem e a simulação de processos, integrando a cinética de crescimento microbiano ao equacionamento que descreve os fenômenos de transferência de calor e de massa em alimentos, é uma ferramenta útil para tal análise. No presente trabalho investigou-se o crescimento do fungo filamentosso *Byssochlamys fulva* em polpa de mamão. Foram desenvolvidos modelos matemáticos para avaliar o efeito da natureza do substrato e de condições dinâmicas de temperatura sobre o aumento de raio da colônia desse microrganismo durante o processo de resfriamento do produto.

Os resultados mostraram que a polpa de mamão favorece o desenvolvimento de *B. fulva*. Neste substrato, o valor médio encontrado para a taxa de aumento radial da colônia do microrganismo e para o tempo de duração da fase lag, predito pelo modelo Gompertz modificado a 28°C, foi 15,3 mm/dia e 38 horas, respectivamente. Pequenas oscilações de pH e de teor de glicose do meio de cultura apresentaram efeito pouco significativo sobre o comportamento desse fungo.

Em condições dinâmicas de temperatura, as simulações do processo de resfriamento da polpa indicaram que o abuso na temperatura inicial do produto (28°C), associado a condições que limitam a capacidade do sistema de refrigeração (velocidade do ar igual a 0,5 m/s), reduz de 103 horas para 32 horas o tempo necessário para o surgimento de colônias visíveis do fungo no alimento – tempo de vida útil do produto, no contexto deste trabalho. Nestas mesmas condições, o aumento na taxa de resfriamento da polpa de mamão, devido à aplicação dos mecanismos simultâneos de transferência de calor convectivo e evaporativo, apresentou efeito expressivo sobre o tempo de vida útil da polpa de mamão, aumentando-o em 70%, comparativamente ao resfriamento pelo mecanismo exclusivamente convectivo.

Este trabalho demonstrou que, embora o período transiente de resfriamento do alimento seja curto em relação ao tempo total de seu armazenamento, sua influência sobre a dinâmica de crescimento de *Byssochlamys fulva* em polpa de mamão é significativa.

## ABSTRACT

Spoilage of food by fungi and bacteria is an important subject both because of economic issues and because of questions of food safety. The correct adjustment of operational and storage conditions of the products can control the growth of microorganisms. In this context, integrating kinetic microbial models with heat and mass transfer equations to simulate the growth behavior of microorganisms in food is a useful tool to analyse and improve the food processing. In the present work, the growth of *Byssochlamys fulva* in papaya pulp was investigated. Mathematical models were developed to evaluate the effect of the kind of the substrate and the dynamic temperature conditions on the growth behavior of this mold during the cooling process of the product.

The results showed that papaya pulp is a favorable substrate to the growth of *B. fulva*. According to Gompertz model, at 28°C, the mean value for the radial growth rate and for lag phase time of this microorganism on this substrate was 15.3 mm/day and 38 hours, respectively. Small fluctuations in pH and in glucose content of the substrate have little effect on the growth behavior of the mould.

At dynamic temperature, the cooling process simulation of papaya pulp indicated that excessive initial temperature (28°C), associated with low capacity of refrigeration system (air stream velocity equal to 0.5 m/s), reduces the product's shelf-life from 103 hours to 32 hours. In this scenario, the shelf-life can be increased up to 70%, improving the convective heat transfer process by the evaporative cooling effect comparing to the mechanism of cooling purely convective.

Although the transient period of the cooling process of the food is short related to the total storage time, the transient period influences significantly the dynamic of the growth of *Byssochlamys fulva* in papaya pulp.

## LISTA DE TABELAS

Table 4.1 - Mean value of the pH, soluble solid content and moisture content of each sample of fruit pulp.....	61
Table 4.2 - Mean value and standard deviation for the growth rate ( $\mu$ ) and lag phase time ( $\lambda$ ) of <i>B. fulva</i> on each fruit pulp as predicted by the kinetics models, at 28°C. ....	63
Table 4.3 - Bias factor, accuracy factor (AF), and root mean square error (RMSE) evaluated for the growth kinetics models in each substrate and globally.....	64
Table 4.4 - Pearson correlation among the growth parameters ( $\mu$ and $\lambda$ ) and physical chemistry properties of the fruit pulps.....	66
Tabela 5.1 - Valores médios e desvios-padrão para a taxa de crescimento radial ( $\mu$ , em mm.dia <sup>-1</sup> ) e para a estimativa de tempo de duração da fase lag ( $\lambda$ , em h) obtidos para <i>B. fulva</i> nos diversos tratamentos empregados no estudo, segundo os modelos preditivos primários utilizados.....	82
Tabela 5.2 - Valores dos índices estatísticos obtidos para cada modelo preditivo primário, utilizados para comparar e selecionar o modelo que melhor ajustou-se aos dados experimentais.....	84
Tabela 5.3 - Efeito do pH, do teor de glicose e da interação pH x glicose sobre os parâmetros da curva de crescimento de <i>B. fulva</i> , preditos pelo modelo Gompertz modificado, em termos de valor-p.....	85
Tabela 5.4 - Valores dos parâmetros de ajuste e dos índices de desempenho dos modelos preditivos secundários.....	86
Tabela 5.5 – Faixa de valores do índice bias e do fator de exatidão (AF) obtidos para cada ensaio utilizado para a validação do modelo cinético global de crescimento microbiano. ....	88
Tabela 5.6 - Tempo de vida útil para a polpa de mamão, estimado pela aplicação do modelo cinético global desenvolvido neste estudo.....	89
Table 6.1 - Primary predictive models used to fit the experimental data.....	99
Table 6.2 - Secondary predictive models used to describe the effect of temperature on growth parameters.....	101
Table 6.3 - Dynamic temperature used in the validation stage.....	102
Table 6.4 - Values of the parameters for the mathematical models used in the simulations.....	105
Table 6.5 - Summary of the comparison of the primary predictive models using the statistical indices bias, AF, RMSE and BIC.....	106
Table 6.6 - Statistical indices and adjusted coefficient values for each secondary predictive model used to fit the behavior of maximum growth rate and lag phase duration as functions of the temperature. ....	108
Table 6.7 - Bias and accuracy factors for each validation curve at isothermal condition ....	109
Table 6.8 - Bias and accuracy factors (AF) for each non-isothermal validation test using the global kinetic model developed.....	111

Table 6.9 - Percentage of reduction in product's shelf-life as a function of initial product temperature ( $T_0$ ) and refrigeration air stream velocity ( $U_\infty$ ), taken the initial product temperature of 14°C as a reference.....	113
Tabela 7.1 - Valor da soma dos quadrados dos resíduos (RSS) para malhas de discretização com diferentes números de pontos (N) para o campo de temperatura, nos diversos cenários de operação estudados .....	129
Tabela 7.2 - Tempo para a superfície do produto atingir 14°C para diferentes condições de umidade relativa ( $\phi$ ), de temperatura inicial do produto ( $T_0$ ) e de velocidade da corrente do ar de refrigeração ( $U_\infty$ ).....	132

## LISTA DE QUADROS

Quadro 2.1 - Composição nutricional típica de 100 g do mamão maduro .....	7
Quadro 2.2 - Equação da difusão de calor em coordenadas cartesianas, cilíndricas e esféricas para material isotrópico e sem geração volumétrica de energia.....	23
Quadro 2.3 - Correlações para o cálculo do valor do coeficiente de transferência de calor convectivo médio em escoamento externo forçado sobre placa plana. ....	27
Quadro 2.4 - Questões de pesquisa estudadas neste trabalho e respectivos artigos científicos que foram desenvolvidos para tratar cada uma dessas questões. ....	36
Quadro 3.1 - Composição dos meios de cultura artificiais utilizados no estudo da influência da temperatura, do pH e do teor de glicose sobre o crescimento de <i>B. fulva</i> . ....	44
Quadro 3.2 - Relação dos índices estatísticos utilizados no processo de comparação e validação de modelos matemáticos.....	47
Quadro 5.1 - Níveis de temperatura, de pH e de teor de glicose utilizados nos experimentos .....	78
Quadro 5.2 - Valores dos fatores ambientais utilizados nos ensaios de validação do modelo cinético global.....	80
Quadro 7.1 - Cenários de operação do processo utilizados na validação do modelo numérico para a descrição do fenômeno de transferência de calor simplificado.....	127
Quadro 7.2 - Valores dos parâmetros utilizados nas simulações efetuadas com o modelo matemático desenvolvido neste estudo.....	128

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Morfologia externa e interna do mamão.....	7
Figura 2.2 - Fotografia de esporos de <i>B. fulva</i> em câmara de Neubauer obtida em microscópio ótico com aumento de 400 vezes (A) e da colônia desse fungo crescendo sobre polpa de mamão a 20°C (B). .....	10
Figura 2.3 - Categorias de assuntos relacionados com microbiologia preditiva tratados nos artigos publicados no número especial do periódico <i>International Journal of Food Microbiology</i> , v. 100, 2005.....	11
Figura 2.4 - Curvas típicas de crescimento para bactérias (I) e para fungos (II). Em II-a, não há fase lag; em II-b existe fase lag, mas não há fase estacionária, e a curva II-c assemelha-se àquela tipicamente encontrada em bactérias. ....	13
Figura 2.5 - Representação esquemática dos mecanismos de transferência de calor. ....	21
Figura 2.6 - Parede plana de espessura $2L$ , com temperatura inicial uniforme, subitamente submetida à condição de contorno convectiva.....	23
Figura 2.7 - Transferência de calor na interface gás-líquido durante o processo de resfriamento pelo efeito evaporativo.....	27
Figura 2.8 – Curvas de crescimento de <i>E. coli</i> , medido por densidade ótica (OD), em diferentes posições radiais da embalagem ( $r/R$ ), durante o processo de refrigeração a 12°C/12h (A), 5°C/12h (B) e 16°C/3h seguido de 5°C/9h (C). ....	31
Figura 2.9 – Curvas de crescimento de <i>L. innocua</i> preditas pelo modelo matemático (linhas) e observado experimentalmente (pontos) em diferentes condições de umidade relativa (RH) e de velocidade do ar ( $v$ ) durante o processo de secagem.....	32
Figura 2.10 – Curvas de crescimento de <i>C. perfringens</i> simuladas em três cenários de operação do processo de refrigeração. Em (A), mostram-se os três perfis temporais de temperatura testados para o produto no modelo. Em (B), (C) e (D), apresentam-se os resultados das simulações para os cenários (1), (2) e (3), respectivamente. ....	33
Figura 2.11 – Curvas de crescimento de <i>P. expansum</i> submetido à condição de 25°C/97h seguido de 5°C/191h (A) e à condição de oscilação cíclica de temperatura, constituída por 15°C/24h, 30°C/24h e 10°C/24h (B). ....	34
Figura 3.1 - Fluxograma das etapas que constituem o procedimento experimental global utilizado na tese.....	39
Figura 3.2 - Fotografia de uma colônia de <i>B. fulva</i> crescida sobre meio de cultura BDA ....	40
Figura 3.3 - Fotografia do processo de formação de esporos, durante microcultivo, obtida na ocular do microscópio ótico com aumento de 10x na ocular e de 40x na objetiva. No detalhe em vermelho, observam-se os esporos sendo formados e aderidos à estrutura micelial. ....	41
Figura 3.4 - Placas contendo meio de cultura alimentício (à esquerda); gabarito utilizado na marcação das placas (centro) e placa com marcação em sua base (à direita). ....	43
Figura 3.5 - Monitoramento do crescimento de <i>B. fulva</i> em polpa de abacaxi.....	46
Figure 4.1 - Growth curves of <i>B. fulva</i> in (♦) melon, (■) papaya, (▲) tomato, (○) peach, (●) strawberry and (x) pineapple pulps.....	62
Figure 4.2 - Box plot of the growth rate (A) and the lag phase time (B) predicted by the modified Gompertz model for each fruit pulp.....	65

Figura 5.1 - Curvas de crescimento de <i>B. fulva</i> em BDA com pH = 6,0 e com 10% de glicose, mostrando dados experimentais (o) e o ajuste do modelo Gompertz modificado (--), nas temperaturas de 20°C (azul), 28°C (vermelho) e 36°C (preto). .....	81
Figura 5.2 - Curvas de crescimento de <i>B. fulva</i> obtidas para cada um dos ensaios utilizados na validação do modelo cinético global desenvolvido (linha vermelha) comparado com dados experimentais (pontos azuis). .....	88
Figure 6.1 - Illustration of the physical system simulated in this study.....	102
Figure 6.2 - Behavior of maximum radial growth rate (A) and lag phase duration (B) as functions of temperature from experimental data (o) and from mathematical model (---)....	107
Figure 6.3 - Comparison between growth curves predicted by the kinetic model (red line) and experimental observations (blue points) at temperatures from 12°C to 36°C. ....	109
Figure 6.4 - Growth curves of <i>B. fulva</i> predicted by the global kinetic model (red line) compared with experimental data (blue points) under non-isothermal validation test 1 (graph A), 2 (graph B) and 3 (graph C). The green lines are the evolution of the temperature over time in each validation test.....	110
Figure 6.5 - Reduction in the time taken to reject products contaminated with <i>B. fulva</i> spores as a function of the refrigeration air stream velocity (U) and of the initial temperature of the product (T). .....	112
Figura 7.1 - Representação esquemática do sistema físico modelado matematicamente..	123
Figura 7.2 - Estrutura do algoritmo implementado no Matlab para efetuar as simulações e avaliar o efeito da temperatura inicial do produto, da velocidade e da umidade do ar sobre o tempo de vida útil do alimento. ....	126
Figura 7.3 - Comparação entre a evolução temporal da temperatura superficial determinada pela solução numérica (linha vermelha) e pela solução exata (pontos azuis) da equação de difusão de calor nos diferentes cenários de operação simulados. ....	130
Figura 7.4 - Comparação entre a evolução temporal da temperatura na superfície do alimento com o efeito evaporativo (linha vermelha) e sem esse efeito (linha azul), para diferentes cenários de operação, mantendo $\phi = 70\%$ . ....	131
Figura 7.5 - Curvas de crescimento de <i>B. fulva</i> em duas diferentes temperaturas iniciais do produto e em distintas condições de refrigeração. ....	133
Figura 7.6 - Efeito da temperatura inicial do produto, da velocidade e da umidade relativa do ar ( $\phi$ ) da corrente de refrigeração sobre o tempo para a colônia de fungos atingir o raio crítico. ....	134
Figura 7.7 - Aumento percentual no tempo de vida útil do produto em função de sua temperatura inicial (T) e da velocidade do ar de refrigeração (U), para $\phi = 50\%$ , em comparação com o resfriamento do alimento sem considerar o efeito evaporativo. ....	135
Figura 8.1 - Curvas de crescimento de <i>B. fulva</i> , a 20°C, 28°C e 36°C, em polpa de mamão inoculada com discos de micélio (linha preta), em polpa de mamão inoculada com esporos (linha vermelha) e em meio de cultura artificial inoculado com esporos do fungo (linha azul). .....	141
Figura 8.2 - Curvas de crescimento de <i>B. fulva</i> em condição isotérmica (A) e dinâmica de temperatura, sem considerar o efeito do resfriamento provocado pela evaporação da umidade superficial do produto (B) e inserindo-o na modelagem matemática (C).....	144

## NOMENCLATURA

### LISTA DE SÍMBOLOS

$a_i, a_{i,j}$	coeficientes do modelo polinomial
$A_A$	parâmetro de ajuste do modelo Arrhenius
$A_W$	atividade de água na superfície do produto
$b$	coeficiente do modelo raiz quadrada estendido
$Bi$	número de Biot
$c$	coeficiente do modelo raiz quadrada estendido ( $K^{-1}$ )
$C_i$	coeficientes do modelo Arrhenius-Davey
$C_{A,\infty}$	concentração de água no ar da corrente livre do sistema de refrigeração ( $gmol.m^{-3}$ )
$C_{A,S}$	concentração de água na superfície do produto ( $gmol.m^{-3}$ )
$C_n$	coeficientes dos termos do somatório que aparecem na equação Eq. 2.19
$C_p$	calor específico ( $kJ.kg^{-1}.K^{-1}$ )
$E_A$	energia de ativação, parâmetro do modelo Arrhenius ( $J.gmol^{-1}$ )
$Fo$	número de Fourier
$glic$	teor de glicose do meio de cultura
$h$	coeficiente de transferência de calor convectivo ( $W.m^{-2}.K^{-1}$ )
$k$	condutividade térmica do produto ( $W.m^{-1}.K^{-1}$ )
$k_C$	coeficiente de transferência de massa convectivo ( $m.s^{-1}$ )
$k_f$	condutividade térmica do fluido ( $W.m^{-1}.K^{-1}$ )
$L$	espessura da camada de produto (m)
$L_C$	comprimento característico da geometria em estudo (m)
$n$	número de observações feitas durante um experimento
$N_A''$	fluxo de evaporação de água a partir da superfície do produto ( $gmol.m^{-2}.s^{-1}$ )
$Nu$	número de Nusselt
$p$	número de parâmetros do modelo matemático
$pH$	concentração hidrogeniônica do meio de cultura

$Pr$	número de Prandtl
$P_{A,\infty}^0$	pressão de vapor da água no ar da corrente livre do sistema de refrigeração (Pa)
$P_{A,S}^0$	pressão de vapor da água na superfície do produto (Pa)
$q_1$	parâmetro do modelo hiperbólico
$q_2$	parâmetro do modelo hiperbólico
$q''_{COND.}$	fluxo de calor obtido pelo mecanismo condutivo ( $W.m^{-2}$ )
$q''_{CONV.}$	fluxo de calor obtido pelo mecanismo convectivo ( $W.m^{-2}$ )
$q''_{EVAP.}$	fluxo de energia associado ao fenômeno evaporativo ( $W.m^{-2}$ )
$\dot{q}_G$	taxa volumétrica de geração de calor ( $W.m^{-3}$ )
$r$	coordenada dos sistemas cilíndrico e esférico na direção radial (m)
$R$	constante universal dos gases ( $J.gmol^{-1}.K^{-1}$ )
$Re$	número de Reynolds
$Sc$	número de Schmidt
$Sh$	número de Sherwood
$t$	tempo (s)
$T$	temperatura (K)
$T_0$	temperatura inicial do produto (K)
$T_\infty$	temperatura do ar na corrente livre do sistema de refrigeração (K)
$T_{max}$	temperatura máxima de crescimento do fungo (K)
$T_{min}$	temperatura mínima de crescimento do fungo (K)
$T_S$	temperatura superficial do produto em contato com ar do sistema de refrigeração (K)
$T_t^{exato}$	temperatura do produto no instante $t$ , obtida pela solução exata do modelo térmico (K)
$T_t^{num}$	temperatura do produto no instante $t$ , obtida pela solução numérica do modelo térmico (K)
$u_{obs}$	valor do parâmetro observado experimentalmente
$u_{pred}$	valor do parâmetro predito por modelo matemático

$U_{\infty}$	velocidade do ar na corrente livre do sistema de refrigeração ( $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ )
$W$	comprimento da camada de produto (m)
$x$	coordenada cartesiana (m)
$X_i, X_j$	fatores ambientais considerados no modelo polinomial
$y$	raio da colônia de fungos (cm); coordenada cartesiana (m)
$y_0$	raio inicial da colônia de fungos (cm)
$y_{crit}$	raio crítico da colônia de fungos para a rejeição do produto (cm)
$y_{max}$	raio máximo da colônia de fungos (cm)
$y_o$	raio da colônia observado experimentalmente (cm)
$y_p$	raio da colônia predito pelo modelo matemático (cm)
$z$	parâmetro do modelo preditivo primário; coordenada cartesiana (m); coordenada do sistema cilíndrico, na direção axial (m)

#### LISTA DE SÍMBOLOS GREGOS

$\alpha$	difusividade térmica do produto ( $\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ )
$\mu$	taxa de crescimento radial da colônia ( $\text{mm}\cdot\text{dia}^{-1}$ )
$\mu_{MAX.}$	taxa máxima de crescimento radial da colônia ( $\text{mm}\cdot\text{dia}^{-1}$ )
$\phi$	umidade relativa do ar na corrente livre do sistema de refrigeração
$\lambda$	tempo de duração da fase lag (h)
$\nu$	viscosidade cinemática ou difusividade de quantidade de movimento ( $\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ )
$\rho$	massa específica ( $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ )
$\Delta H_{A,VAP}$	entalpia de vaporização da água ( $\text{J}\cdot\text{gmol}^{-1}$ )
$\theta$	coordenada do sistema esférico, na direção polar
$\varphi$	coordenada dos sistemas cilíndrico e esférico, na direção azimutal
$\xi_n$	raízes positivas da equação transcendental identificada como Eq. 2.21

#### LISTA DE ABREVIATURAS

AF	<i>accuracy factor</i> ou fator de exatidão
----	---

APT	<i>all purpose tryptone broth</i>
BDA	agar batata dextrose
BIAS	índice estatístico definido pela equação Eq. 3.2
BIC	critério da informação Bayesiana
CDC	<i>Centers of Disease Control and Prevention</i>
FAO	<i>Food Administration Organization</i>
MEA	ágar extrato de malte
PDA	<i>potato dextrose agar</i>
RMSE	<i>root mean square error</i> ou raiz quadrada do erro quadrático médio
RSS	<i>residual sum of squares</i> ou soma dos quadrados dos resíduos

## SUMÁRIO

<b>Resumo</b> .....	<b>v</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>vi</b>
<b>Lista de Tabelas</b> .....	<b>vii</b>
<b>Lista de Quadros</b> .....	<b>ix</b>
<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>x</b>
<b>Nomenclatura</b> .....	<b>xii</b>
<b>Capítulo 1 – Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.1 Contextualização, tema e justificativa .....	1
1.2 Objetivos.....	3
1.3 Limitações do trabalho .....	4
1.4 Estrutura da tese .....	5
<b>Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica e Fundamentos Teóricos</b> .....	<b>6</b>
2.1 Mamão.....	6
2.2 Fungos, deterioração de alimentos e <i>Byssochlamys fulva</i> .....	8
2.3 Microbiologia Preditiva: fundamentos .....	10
2.4 Microbiologia Preditiva: modelos cinéticos .....	12
2.4.1 Modelos Primários.....	13
2.4.1.1 Modelo Linear.....	14
2.4.1.2 Modelo Logístico .....	14
2.4.1.3 Modelo Gompertz modificado .....	15
2.4.1.4 Modelo Baranyi.....	16
2.4.2 Modelos Secundários .....	17
2.4.2.1 Modelo Belehrádek ou modelo do tipo raiz quadrada.....	18
2.4.2.2 Modelo Arrhenius .....	18
2.4.2.3 Modelo Arrhenius-Davey.....	19
2.4.2.4 Modelo Gibson .....	19
2.4.2.5 Modelos Polinomiais.....	19
2.4.2.6 Modelo Hiperbólico.....	20
2.5 Fundamentos de Transferência de Calor.....	21
2.5.1 Condução de calor .....	22
2.5.2 Convecção de calor.....	25
2.5.3 Resfriamento evaporativo .....	27
2.6 Integração entre modelos.....	29
2.6.1 Integração de modelos no processo de refrigeração.....	30
2.6.2 Integração de modelos no processo de secagem .....	31
2.6.3 Integração de modelos para avaliar falhas no processo de refrigeração .....	32
2.6.4 Integração de modelos para avaliar o crescimento de fungos .....	34
2.7 Considerações finais do capítulo .....	35
<b>Capítulo 3 – Materiais e Métodos</b> .....	<b>38</b>
3.1 Preparação da colônia matriz.....	38
3.2 Preparação do inóculo.....	40
3.2.1 Preparação do inóculo em meio BDA .....	40

3.2.2	Preparação do inóculo em meio MEA .....	41
3.3	Preparação dos substratos .....	42
3.3.1	Substrato alimentício .....	43
3.3.2	Substrato artificial .....	44
3.4	Inoculação dos substratos .....	45
3.5	Monitoramento do crescimento da colônia .....	45
3.6	Ajuste dos modelos primários .....	46
3.7	Seleção do modelo primário .....	47
3.8	Avaliação do efeito de fatores ambientais .....	49
3.9	Ajuste dos modelos secundários .....	49
3.10	Seleção do modelo secundário .....	49
3.11	Validação do modelo cinético global .....	49
3.12	Construção do modelo de transferência de calor .....	50
3.13	Integração dos modelos térmico e cinético microbiano .....	51
<b>Introdução aos Capítulos 4, 5, 6 e 7 .....</b>		<b>53</b>
<b>Capítulo 4 – Resultados e Discussão: artigo 1 .....</b>		<b>55</b>
4.1	Introduction .....	56
4.2	Material and Methods .....	58
4.2.1	Inoculum preparation .....	58
4.2.2	Preparation of fruit pulps .....	58
4.2.3	Physical chemistry properties of fruit pulps .....	59
4.2.4	Inoculation and growth monitoring .....	59
4.2.5	Mathematical model and statistical analysis .....	59
4.3	Results and Discussion .....	61
4.3.1	Physical chemistry properties of fruit pulps .....	61
4.3.2	Growth curves .....	62
4.3.3	Kinetics model comparison .....	64
4.3.4	Effect of the substrate on growth parameters .....	65
4.3.5	Correlation between physical chemistry properties and growth parameters .....	66
4.4	Conclusions .....	67
<b>Capítulo 5 – Resultados e Discussão: artigo 2 .....</b>		<b>73</b>
5.1	Introdução .....	74
5.2	Materiais e Métodos .....	76
5.2.1	Preparação do inóculo .....	76
5.2.2	Preparação dos meios de cultura .....	77
5.2.3	Inoculação e monitoramento do crescimento radial .....	77
5.2.4	Planejamento experimental .....	78
5.2.5	Ajuste dos modelos preditivos primários .....	78
5.2.6	Comparação entre os modelos preditivos primários .....	79
5.2.7	Influência dos fatores ambientais sobre os parâmetros do modelo primário .....	79
5.2.8	Ajuste dos modelos preditivos secundários .....	79
5.2.9	Validação dos modelos matemáticos .....	80
5.2.10	Aplicação do modelo cinético desenvolvido .....	81
5.3	Resultados e Discussão .....	81
5.3.1	Comparação entre modelos preditivos primários .....	83

5.3.2	Estudo dos efeitos dos fatores ambientais sobre os parâmetros do modelo Gompertz ..	84
5.3.3	Comparação entre os modelos preditivos secundários .....	86
5.3.4	Validação do modelo cinético global .....	87
5.3.5	Estimativa do tempo de vida útil de alimento .....	89
5.4	Conclusões .....	90
<b>Capítulo 6 – Resultados e Discussão: artigo 3 .....</b>		<b>94</b>
6.1	Introduction .....	95
6.2	Materials and methods .....	98
6.2.1	Inoculum preparation .....	98
6.2.2	Preparation of the substrate .....	98
6.2.3	Inoculation and growth monitoring .....	98
6.2.4	Kinetic microbial model .....	99
6.2.5	Validation of the kinetic model .....	101
6.2.6	Heat transfer model .....	102
6.2.7	Simulation of refrigeration scenarios .....	104
6.3	Results and discussion .....	105
6.3.1	Selection of the primary predictive model .....	105
6.3.2	Selection of the secondary predictive model .....	106
6.3.3	Validation of the kinetic microbial model .....	108
6.3.4	The influence of storage conditions on the growth of <i>B. fulva</i> .....	111
6.4	Conclusions .....	114
<b>Capítulo 7 – Resultados e Discussão: artigo 4 .....</b>		<b>118</b>
7.1	Introdução .....	119
7.2	Materiais e métodos .....	122
7.2.1	Modelo do crescimento microbiano .....	122
7.2.2	Modelo de transferência de calor .....	122
7.2.3	Integração entre os modelos cinético e térmico .....	125
7.2.4	Validação do modelo térmico .....	127
7.2.5	Simulações de condições de processo .....	127
7.3	Resultados e discussão .....	129
7.3.1	Validação do modelo térmico simplificado .....	129
7.3.2	Avaliação do efeito evaporativo na evolução de temperatura superficial do produto .....	130
7.3.3	Avaliação do efeito evaporativo no crescimento microbiano .....	132
7.3.4	Comparação entre as duas estratégias de processamento do alimento .....	135
7.4	Conclusões .....	136
<b>Capítulo 8 – Considerações Finais .....</b>		<b>140</b>
8.1	Discussão geral dos resultados .....	140
8.1.1	Natureza do substrato e parâmetros de crescimento .....	141
8.1.2	Efeito de condições dinâmicas de temperatura .....	143
8.2	Discussão das questões de pesquisa .....	145
8.3	Conclusões .....	146
8.4	Sugestões para trabalhos futuros .....	147
<b>Referências .....</b>		<b>149</b>
<b>ANEXO A .....</b>		<b>158</b>
<b>APÊNDICE A .....</b>		<b>160</b>

**APÊNDICE B.....172**  
**APÊNDICE C.....182**



# Capítulo 1

## Introdução

Neste capítulo introdutório, contextualiza-se e apresenta-se o tema de pesquisa da tese, justificando-o a partir de referenciais teóricos. O objetivo geral e os objetivos específicos são elencados, assim como as limitações do estudo. O capítulo encerra-se com o delineamento da estrutura da tese.

### 1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO, TEMA E JUSTIFICATIVA

---

O crescimento de microrganismos em alimentos representa riscos à saúde dos consumidores e gera perdas econômicas significativas. Segundo dados do Centro de Controle e Prevenção de Doenças norteamericano, cerca de 48 milhões de pessoas sofrem algum tipo de doença de origem alimentar naquele país anualmente (CDC, 2013). Em termos econômicos, perde-se aproximadamente 25% da oferta mundial de alimentos pela ação microbiana (HUIS IN'T VELD, 1996). Esses números demonstram a importância dos estudos da relação microrganismo-alimento nos seus diversos aspectos.

Alimentos de origem vegetal, particularmente frutas e derivados, apresentam baixos valores de pH, o que inibe a ação de bactérias. Logo, a deterioração desses produtos é promovida com frequência por fungos. A ação desses microrganismos pode ser minimizada pelo ajuste adequado de variáveis operacionais durante o processamento e o armazenamento dos produtos alimentícios. Neste aspecto, a microbiologia preditiva surge como uma ferramenta útil, ao estabelecer o equacionamento que permite simular condições de operação e avaliar rapidamente seus efeitos sobre o crescimento microbiano.

Durante muitos anos, a microbiologia preditiva esteve focada em estudar o comportamento de bactérias, especialmente as patogênicas. Somente na última década, os trabalhos de microbiologia preditiva aplicada a fungos tornaram-se mais frequentes. Ainda assim, o foco desses estudos tem sido estabelecer relações matemáticas entre fatores ambientais (temperatura, pH, atividade de água, concentração de solutos) e seus efeitos sobre o crescimento microbiano. A inserção desses modelos em uma abordagem mais ampla, como no estudo do desempenho de operações industriais, é um tema incipiente.

Durante o processamento de um alimento, as condições ambientais podem variar ao longo do tempo e da posição no interior do produto. Os modelos que descrevem os fenômenos de transferência de calor e de massa são capazes de estimar os valores das variáveis ambientais no alimento, tais como a sua temperatura e a sua atividade de água, por exemplo. Por sua vez, o equacionamento utilizado em microbiologia preditiva permite prever como ocorreria o crescimento de determinado microrganismo em tais condições. Isto demonstra as potencialidades que surgem com a modelagem e a simulação de processos, integrando os conhecimentos de microbiologia preditiva e de engenharia de processos para avaliar de forma mais consistente as operações industriais em termos microbiológicos. Com tal abordagem é possível, inclusive, estabelecer as condições que minimizam o crescimento microbiano e, por consequência, reduzir as perdas econômicas associadas à contaminação de alimentos. No entanto, há poucos estudos na literatura que contemplam essa temática. A carência em tratar os modelos cinéticos de crescimento microbiano, integrados com modelos de engenharia de processos, foi apontada nos trabalhos de Mafart (2005), Lebert e Lebert (2006) e Gougouli e Koutsoumanis (2010).

Neste cenário insere-se o tema de pesquisa desta tese: a integração entre modelos de engenharia de processos e de microbiologia preditiva para estabelecer estratégias de processamento e de armazenamento de alimentos contaminados por esporos de fungos, visando controlar a sua deterioração.

Para tornar o estudo factível, foi necessário selecionar um microrganismo alvo, um alimento e um processo industrial específico. O microrganismo escolhido foi *Byssochlamys fulva*, um fungo filamentosamente produtor de esporos termorresistentes. Esta escolha justifica-se pelo fato de *B. fulva* ser um agente deteriorante típico em produtos à base de frutas, mesmo quando o número de esporos contaminantes é muito baixo (SANT'ANA *et al.*, 2010a); pela capacidade de crescer em ambientes com baixo teor de oxigênio e acidificados (CHAPMAN *et al.*, 2007; TANIWAKI *et al.*, 2010, PANAGOU *et al.*, 2010); por produzir micotoxinas, inclusive em concentrações superiores aos limites que representam riscos à saúde do

consumidor (SANT'ANA *et al.*, 2010b); por apresentar altos valores de taxa de crescimento radial em suas colônias (VALÍK, PIECKOVÁ; 2001), além da natural termorresistência acentuada de seus esporos (KOTZEKIDOU, 1997; FERREIRA *et al.*, 2011).

O alimento e o processo selecionados para servir como modelos ao estudo proposto foram a polpa de mamão e a refrigeração. A escolha do mamão deve-se ao fato de o Brasil ser o segundo maior produtor mundial dessa fruta (FAO, 2013). Além disso, o mamão é muito apreciado pela população devido às suas características sensoriais, sendo consumido *in natura* ou na forma minimamente processada e refrigerada (ROCHA *et al.*, 2005; RODOLFO JÚNIOR *et al.*, 2007; KRISHNA *et al.*, 2008). A refrigeração, por sua vez, é uma operação muito utilizada pelo setor alimentício para manter a qualidade de seus produtos desde o processamento até o consumo final. Contudo, condições impróprias de temperatura e de umidade durante o processo de refrigeração podem provocar perdas significativas de qualidade e comprometer a segurança dos alimentos. De acordo com o Instituto Internacional de Refrigeração, a perda de produção de frutas e de hortaliças devido às deficiências nos sistemas de refrigeração atinge o valor de 40% nos países em desenvolvimento (LAGUERRE *et al.*, 2013).

O tema de pesquisa desta tese foi delimitado a partir do objetivo geral e dos objetivos específicos estabelecidos para o estudo.

## 1.2 OBJETIVOS

---

O objetivo geral desta tese é contribuir para a compreensão do efeito da natureza do substrato e de condições transientes do processo de refrigeração sobre o comportamento de crescimento de fungos filamentosos pertencentes à espécie *Byssochlamys fulva*, a partir do equacionamento e da análise dos fenômenos envolvidos no resfriamento de alimentos contaminados com seus esporos.

Para alcançar esse objetivo geral, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- i. avaliar o crescimento de *Byssochlamys fulva* em polpa de mamão e compará-lo com o comportamento observado em substratos alimentícios semelhantes (polpas de melão, tomate, pêssego, abacaxi e morango), para verificar o quão suscetível esse alimento é à ação dessa espécie de fungos;

- 
- ii. equacionar e quantificar o efeito relativo da temperatura, do pH e do teor de glicose do meio de cultura sobre a taxa de crescimento e o tempo de duração da fase lag desse microrganismo;
  - iii. comparar o crescimento de *B. fulva* em polpa de mamão e em meio de cultura artificial, para verificar se um substrato constituído apenas por água destilada, ágar bacteriológico, glicose e com ajuste de pH pode reproduzir satisfatoriamente o comportamento observado para esse fungo na polpa dessa fruta;
  - iv. estabelecer o equacionamento para avaliar o efeito da temperatura inicial do alimento e da velocidade do ar do sistema de refrigeração sobre o tempo necessário para o surgimento de colônias visíveis de *B. fulva* em polpa de mamão minimamente processado, embalado imediatamente após as etapas de corte e de descascamento;
  - v. equacionar e avaliar o efeito do resfriamento provocado pela evaporação da água da superfície da polpa de mamão na dinâmica de crescimento do microrganismo alvo, para identificar em que condições justifica-se o emprego desta opção de processamento visando estender o tempo de vida útil do alimento; e, por fim,
  - vi. comparar, por meio de simulações, o crescimento desse fungo filamentososo em polpa de mamão submetido ao processo de resfriamento estritamente convectivo com o processo que conjugue os mecanismos de resfriamento convectivo e evaporativo.

### 1.3 LIMITAÇÕES DO TRABALHO

---

Como a maioria dos estudos de microbiologia preditiva, nesta tese foi utilizada uma única cepa de *Byssochlamys fulva*, o que restringe a generalização dos resultados aqui obtidos. Entende-se que isto subestima a variabilidade natural existente dentro de uma espécie de microrganismos.

Neste trabalho não foram investigados os efeitos das condições prévias à inoculação sobre o comportamento do microrganismo no meio de cultura. Foi adotada uma padronização nos experimentos, mantendo constante o estado fisiológico inicial. A literatura relata que, dependendo do histórico de estresse a que foram submetidos os esporos antes da inoculação, as respostas do microrganismo a um mesmo tratamento podem ser distintas.

As conclusões do estudo referem-se apenas aos substratos utilizados nos experimentos. Outros resultados podem ser obtidos para polpas de frutas em diferentes

---

estágios de maturação ou mesmo em meios de cultura artificial com composição distinta da utilizada neste trabalho.

Nos estudos envolvendo a integração de modelos de transferência de calor e de cinética microbiana, assume-se um comportamento determinístico para as variáveis analisadas. Entende-se que, na realidade industrial, há uma variabilidade natural nas propriedades termofísicas de um alimento e oscilações nas variáveis de processo (temperatura, umidade relativa do ar, velocidade da corrente de ar). O efeito dessa variabilidade sobre as respostas dos modelos não foi tratado nesta tese, uma vez que isso extrapolaria os objetivos estabelecidos para o trabalho. Ainda com relação ao modelo de transferência de calor, não foi inserido no equacionamento o termo referente à geração de calor associada aos fenômenos fisiológicos que ocorrem no alimento no período pós-colheita.

#### 1.4 ESTRUTURA DA TESE

---

Esta tese está estruturada em oito capítulos. No primeiro, busca-se caracterizar a problemática tratada no estudo a partir de sua contextualização e justificativa. Nele, apresentam-se o objetivo geral e os objetivos específicos, assim como as limitações da pesquisa.

No segundo capítulo, faz-se a revisão bibliográfica e apresentam-se os fundamentos conceituais necessários para que o leitor compreenda os trabalhos desenvolvidos no âmbito desta tese. Esse capítulo encerra-se com as considerações finais do autor sobre o assunto pesquisado, indicando as lacunas observadas, a partir das quais foram elaboradas as questões de pesquisa tratadas neste trabalho.

O terceiro capítulo contempla a descrição detalhada dos procedimentos utilizados na obtenção dos dados experimentais e em seu tratamento matemático e estatístico. Seguem-se outros quatro capítulos em que são apresentados os resultados obtidos no trabalho, na forma de artigos científicos.

No oitavo e último capítulo da tese, os resultados apresentados nos artigos científicos são confrontados e discutidos de forma articulada. Ainda, as questões de pesquisa são retomadas e respondidas. O capítulo encerra-se com o delineamento de conclusões gerais sobre o tema de pesquisa e a proposição de sugestões de estudos para dar continuidade a este trabalho.

## Capítulo 2

### Revisão Bibliográfica e Fundamentos Teóricos

Este capítulo foi estruturado para que o leitor obtenha as informações necessárias para entender os estudos realizados no âmbito desta tese. Inicia-se com uma breve descrição sobre o substrato alimentício utilizado neste trabalho – o mamão – e o microrganismo alvo – *Byssochlamys fulva*. Após, abordam-se os fundamentos da microbiologia preditiva e dos fenômenos de transferência de calor e de massa. Na sequência, apresenta-se a revisão sobre os estudos que contemplaram a integração entre os modelos cinéticos e de engenharia de processos para tratar a dinâmica de crescimento microbiano em alimentos. O capítulo é finalizado com as considerações do autor sobre o tema e a proposição de questões de pesquisa elaboradas a partir das lacunas evidenciadas na revisão bibliográfica.

#### 2.1 MAMÃO

---

O mamão é o fruto do mamoeiro (*Carica papaya* L.), pertencente à família Caricaceae. Originário da América Central, ele é uma das frutas mais cultivadas no mundo, principalmente em áreas de clima tropical e subtropical. Segundo dados da FAO (2013), Índia e Brasil são os principais produtores mundiais de mamão. Em 2011, a produção nacional de mamão foi de 1.854.340 toneladas, conferindo ao Brasil a segunda posição mundial na produção dessa fruta. O mamão é consumido *in natura* sendo apreciado pelo seu sabor adocicado e pela polpa levemente perfumada, com coloração que varia de amarelo a vermelho, como mostra a Figura 2.1 (SANTANA *et al.*, 2003, ROCHA *et al.*, 2005; ARAÚJO *et al.*, 2006; RODOLFO JÚNIOR *et al.*, 2007; KRISHNA *et al.*, 2008).



**Figura 2.1** – Morfologia externa e interna do mamão  
(Fonte: [www.brazilianfruit.org](http://www.brazilianfruit.org))

O mamão apresenta características físico-químicas, sensoriais e nutricionais que o destacam em relação a outras frutas. Dentre elas, citam-se o seu baixo valor calórico (32 kcal/100 g), elevados teores de vitaminas A e C, riboflavina, cálcio, tiamina, ferro, potássio e fibras. A presença de carotenos neste alimento contribui para prevenir os danos causados por radicais livres ao organismo.

O consumo regular de mamão garante o suprimento adequado de vitaminas A e C, essenciais para a saúde humana. A presença de papaína, uma enzima natural que favorece a digestibilidade de proteínas, confere a essa fruta a característica de auxiliar o processo digestivo (KRISHNA *et al.*, 2008). O Quadro 2.1 apresenta a composição nutricional típica do mamão maduro.

**Quadro 2.1** - Composição nutricional típica de 100 g do mamão maduro

Constituinte	Valor
Proteínas	0,6 g
Gorduras	0,1 g
Minerais	0,5 g
Fibras	0,8 g
Carboidratos	7,2 g
Teor energético	32 kcal
Carotenos totais	2.740 µg
Betacarotenos	888 µg

Fonte: adaptado de Krishna *et al.*, 2008

O pH do mamão situa-se na faixa de 4,50 a 6,00 devido ao seu baixo teor de ácidos orgânicos. Durante o amadurecimento da fruta, nota-se significativo aumento no seu teor de açúcares (SANTANA *et al.*, 2003). De acordo com Lima *et al.* (2009), a baixa acidez do mamão, quando comparada a outras frutas tropicais, é uma vantagem nutricional, pois permite o seu consumo por pessoas sensíveis a frutos ácidos. Contudo, isso representa um problema para os processadores desse fruto, uma vez que a baixa acidez favorece a atividade enzimática e o crescimento microbiano.

A ocorrência de fungos em alimentos de origem vegetal é uma questão que merece atenção. Além de causar perdas econômicas consideráveis, a presença desses microrganismos representa riscos à saúde dos consumidores devido a sua potencial capacidade de produzir micotoxinas. Tais aspectos são discutidos na seção seguinte, focando-se na espécie *Byssochlamys fulva*, tomada como microrganismo deteriorante e objeto de estudo deste trabalho.

## 2.2 FUNGOS, DETERIORAÇÃO DE ALIMENTOS E *Byssochlamys fulva*

---

O desenvolvimento de bactérias e de fungos em produtos alimentícios está condicionado às características inerentes ao alimento (atividade de água, acidez, disponibilidade de nutrientes) e às condições de armazenamento (temperatura, umidade relativa e composição da atmosfera). Neste aspecto, os fungos destacam-se por serem organismos tolerantes à presença de conservantes e a baixos valores de pH, de atividade de água e de temperatura. Adicionalmente, são seres vivos capazes de obter energia a partir de diferentes substratos (carboidratos, ácidos orgânicos, proteínas, lipídeos) e podem sintetizar micotoxinas, metabólitos secundários tóxicos aos animais vertebrados, mesmo em baixas concentrações (HUIS IN'T VELD, 1996; FILTENBORG *et al.*, 1996).

A deterioração de alimentos por fungos filamentosos é especialmente importante em frutas e produtos correlatos, pois seus baixos valores de pH inibem apenas o crescimento de bactérias (JAY, 2005). Dentre os diversos grupos de fungos existentes, os produtores de esporos termorresistentes são particularmente relevantes à indústria alimentícia, por terem a habilidade de resistir ao tratamento térmico tipicamente utilizado no processamento de produtos à base de frutas. Indivíduos das espécies *Byssochlamys fulva*, *Byssochlamys nivea*, *Neosartorya fischeri* e *Talaromyces flavus* são exemplos de microrganismos com essa característica (KOTZEKIDOU, 1997).

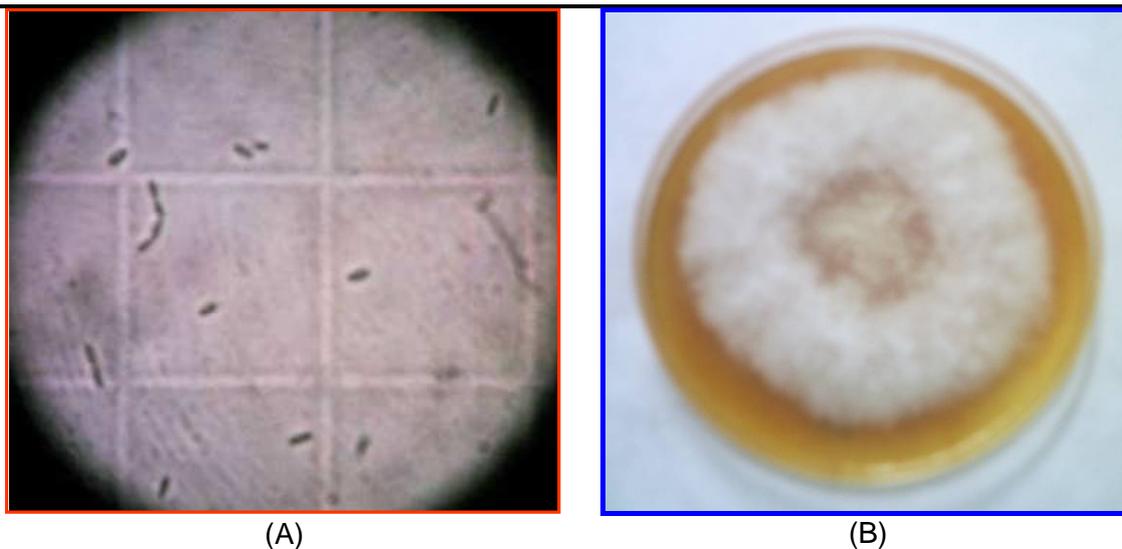
O trabalho desenvolvido por Kotzekidou (1997) revelou que, dentre as três espécies investigadas no estudo (*B. fulva*, *B. nivea*, *N. fischeri*), a cepa mais termorresistente pertencia à primeira espécie. Nesse estudo, os esporos de *B. fulva* foram capazes de tolerar o tratamento térmico de 90°C por 20 minutos em suco de tomate. Recentemente, o trabalho de Ferreira *et al.* (2011) mostrou que o tratamento térmico aplicado pela indústria a néctares de maracujá e de abacaxi não permitiria inativar os esporos de *B. fulva* e *B. nivea* das cepas selecionadas. De acordo com o estudo, esporos de *B. fulva* sobreviveram ao tratamento térmico de 103°C por 15 minutos em néctar de maracujá, enquanto esporos de *B. nivea* resistiram, em polpa de abacaxi, ao tratamento de 103°C por 7 minutos.

Além da termorresistência, o trabalho de Sant'Ana *et al.* (2010b) mostrou que *B. fulva* produziu patulina em suco de maçã em concentrações superiores ao limite máximo tolerável estabelecido pelo *Codex Alimentarius* e FDA (*Food and Drug Administration*). Sant'Ana *et al.* (2010a) também demonstraram que 5 esporos de *B. fulva* em 100 mL de suco de maçã clarificado, armazenado por 100 horas a 30°C, eram suficientes para degradar mais de 90% das amostras de produtos contaminados.

Dois outros aspectos ratificam a relevância de considerar fungos da espécie *B. fulva* em estudos sobre o processamento de alimentos: a capacidade de crescer sob condições de anaerobiose facultativa (TANIWAKI *et al.*, 2009) ou em atmosfera modificada (TANIWAKI *et al.*, 2010); e a elevada taxa de crescimento de suas colônias, atingindo 20,2 mm.dia<sup>-1</sup>, em ágar sabouraud com pH igual a 6 e 0,994 de atividade de água, a 25°C (VALÍK, PIECKOVÁ; 2001).

Além das características relatadas acima, Panagou *et al.* (2010) citaram que fungos do gênero *Byssochlamys* podem produzir enzimas pectinolíticas, alterando a textura de frutas sobre as quais eles se desenvolvem. Por fim, esporos de *Byssochlamys* são frequentemente encontrados em frutas frescas, principalmente aquelas que se desenvolvem em contato com ou próximo ao solo, como o morango, o abacaxi, a ameixa e o maracujá (VALÍK, PIECKOVÁ, 2001; CHAPMAN *et al.*, 2007). A Figura 2.2 mostra a forma dos esporos de *B. fulva* e o aspecto da colônia desse microrganismo crescendo sobre polpa de mamão.

O estudo do comportamento microbiano, sob a ótica da modelagem matemática, permite identificar as condições que favorecem e que inibem o crescimento de fungos e de bactérias. Tal abordagem é o foco da microbiologia preditiva, cujos fundamentos são apresentados e discutidos a seguir.



**Figura 2.2** - Fotografia de esporos de *B. fulva* em câmara de Neubauer obtida em microscópio óptico com aumento de 400 vezes (A) e da colônia desse fungo crescendo sobre polpa de mamão a 20°C (B).

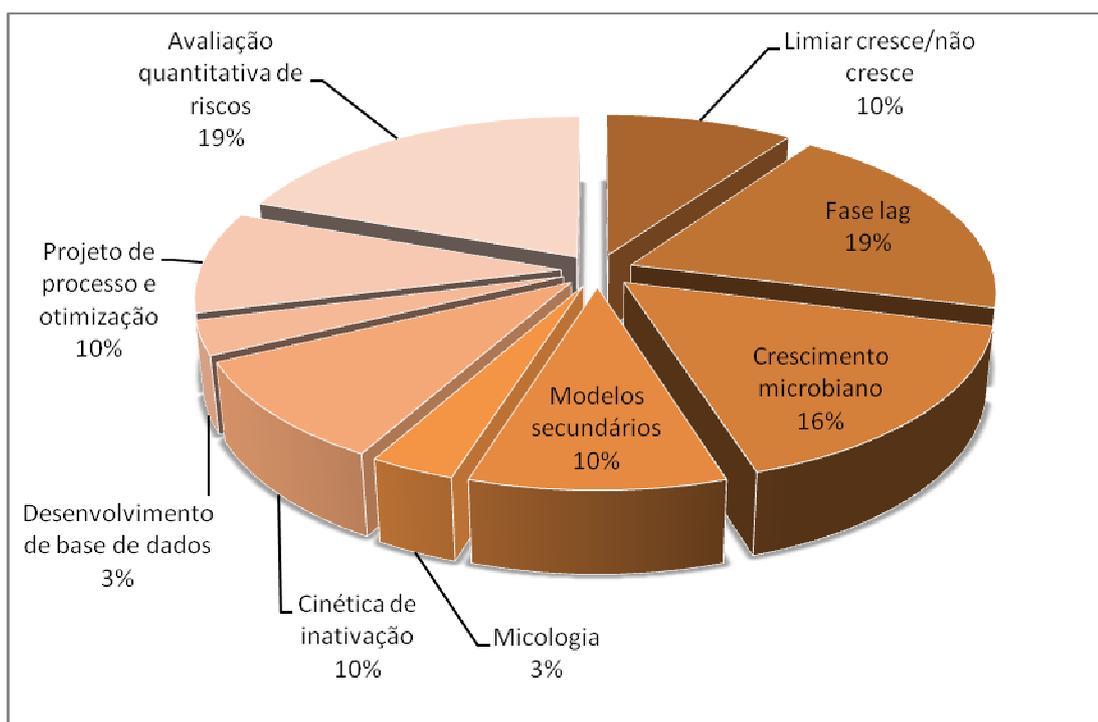
### 2.3 MICROBIOLOGIA PREDITIVA: FUNDAMENTOS

A microbiologia preditiva é a ciência que estuda o comportamento de microrganismos com o objetivo de desenvolver modelos capazes de descrever a resposta de bactérias e de fungos (crescimento/inativação) frente a mudanças em condições intrínsecas e extrínsecas de produtos alimentícios. A utilização de modelos matemáticos para entender e descrever o comportamento microbiano não é algo recente. De acordo com McMeekin *et al.* (2002), o conceito de microbiologia preditiva foi utilizado pela primeira vez por Scott em 1937, segundo o qual:

“O conhecimento das taxas de crescimento de certos microrganismos em diferentes temperaturas é essencial para estudar a deterioração de carnes bovinas refrigeradas. Desta forma, é possível prever as mudanças que populações de vários organismos podem sofrer durante a refrigeração inicial deste produto.”

Entretanto, o interesse da comunidade científica pela microbiologia preditiva tornou-se maior somente a partir dos anos 80. Nessa época, o aumento na incidência de surtos alimentares e a conscientização de que os métodos microbiológicos clássicos eram pouco preditivos, aliado à facilidade de acesso a computadores, impulsionaram o desenvolvimento deste campo do conhecimento.

A microbiologia preditiva apresenta diversas áreas de aplicação. Segundo Nakashima *et al.* (2000), o desenvolvimento de produtos, o planejamento laboratorial, o controle de qualidade, a avaliação de riscos e a educação são áreas que podem se beneficiar com a utilização de modelos preditivos. McMeekin *et al.* (2007) fizeram uma breve avaliação sobre os temas abordados em trabalhos de microbiologia preditiva, agrupando-os em categorias, como mostra a Figura 2.3.



**Figura 2.3** - Categorias de assuntos relacionados com microbiologia preditiva tratadas nos artigos publicados no número especial do periódico *International Journal of Food Microbiology*, v. 100, 2005  
(Fonte: Adaptado de McMeekin *et al.*, 2007)

A análise da Figura 2.3 evidencia que, na época, poucos trabalhos investigavam a aplicação da microbiologia preditiva a fungos. Nesse mesmo período, Dantigny *et al.* (2005) afirmaram que, por mais de 20 anos, esse campo do conhecimento esteve focado no estudo do comportamento de bactérias patogênicas de importância em alimentos. O trabalho de Garcia *et al.* (2009), por sua vez, mostrou que, a partir de 2005, o número de publicações sobre esse tema apresentou aumento significativo.

Como todo segmento de estudo, a microbiologia preditiva também apresenta limitações que necessitam ser superadas. Ross e McMeekin (1994) apresentaram uma discussão a esse respeito. Dentre as limitações elencadas pelos autores, destaca-se o fato de que em um alimento as condições ambientais são dinâmicas, principalmente no que se refere à temperatura do meio, embora muitos modelos preditivos tenham sido desenvolvidos

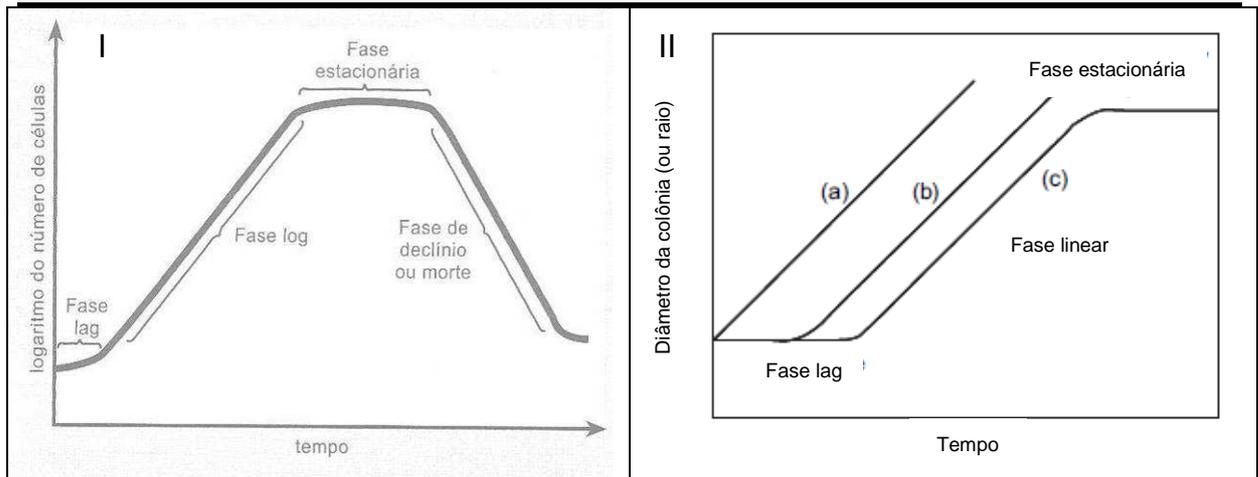
para condições estáticas. Assim, esses modelos podem não ser aplicáveis em situações de processamento e armazenamento reais. Para suprir essa lacuna, recentemente tem-se observado a integração entre modelos preditivos e modelos que descrevem a variação espacial e temporal das propriedades de um alimento. Esse assunto será retomado com mais detalhes na Seção 2.6 desta tese.

## 2.4 MICROBIOLOGIA PREDITIVA: MODELOS CINÉTICOS

---

Os modelos cinéticos são expressões matemáticas que descrevem o comportamento de determinada variável ao longo do tempo. Eles permitem avaliar a taxa ou o tempo necessário para que a resposta particular de um processo seja atingida (ROSS, MCMEEKIN, 1994; GIL *et al.*, 2006). Quando se trata de microrganismos, os modelos cinéticos são utilizados para prever a sua taxa de crescimento e de destruição. Segundo Gibson e Hocking (1997), além de modelos cinéticos, o comportamento microbiano pode ser estudado também a partir de modelos probabilísticos, ou seja, equações que permitem prever a possibilidade de que um determinado evento ocorra, sem informar o tempo necessário para que isso seja atingido. Como exemplo, cita-se a formação de uma toxina. Neste trabalho serão discutidos somente os modelos cinéticos, enfatizando-se a sua aplicação no estudo do crescimento de fungos.

Os modelos cinéticos de crescimento microbiano descrevem o aumento da população de microrganismos ao longo do tempo. Tradicionalmente, a curva de crescimento apresenta o formato sigmoidal, sendo constituída por quatro regiões distintas: fase lag, fase log ou exponencial, fase estacionária e fase de declínio, como mostra a Figura 2.4(I). A fase lag é um período de adaptação do microrganismo ao meio de cultura, sendo caracterizada pelo seu tempo de duração ( $\lambda$ ). Durante esse período, não se observa aumento no número de indivíduos. A fase log ou exponencial, por sua vez, é caracterizada por um aumento significativo do número de indivíduos no meio, pois o suprimento de nutrientes é superior às necessidades dos microrganismos. Essa fase é a mais importante no crescimento microbiano, sendo caracterizada pela taxa específica de crescimento ( $\mu$ ). Já na fase estacionário, observa-se uma estabilização no número de indivíduos, devido ao acúmulo de metabólitos tóxicos, esgotamento de nutrientes ou de O<sub>2</sub>. Essa etapa é sucedida pela fase de declínio, em que há uma contínua redução no número de indivíduos no meio de cultura (BORZANI *et al.*, 2001).



**Figura 2.4** - Curvas típicas de crescimento para bactérias (I) e para fungos (II). Em II-a, não há fase lag; em II-b existe fase lag, mas não há fase estacionária, e a curva II-c assemelha-se àquela tipicamente encontrada em bactérias.

(Fonte: Borzani *et al.* (2001) e adaptação de Garcia *et al.* (2009))

Para fungos, a curva de crescimento pode apresentar algumas peculiaridades, como a inexistência da fase lag (Figura 2.4-II, caso a) ou da fase estacionária (Figura 2.4-II, casos a e b). Dantigny *et al.* (2005) atribuíram esse comportamento ao fato de que, enquanto as bactérias multiplicam-se por sucessivas divisões binárias, o desenvolvimento de fungos envolve um mecanismo distinto, constituído pela germinação de esporos e pelo crescimento longitudinal de suas hifas. Por isso, inclusive, o crescimento de fungos não é avaliado pelo aumento no número de indivíduos e sim por métodos alternativos, como o aumento do raio da colônia (DANTIGNY *et al.*, 2006; GARCIA *et al.*, 2009).

No âmbito da microbiologia preditiva, é comum dividir os modelos cinéticos em duas categorias, conforme a proposta de Whiting e Buchanan (1993): modelos primários e modelos secundários. Os modelos primários descrevem como o número de microrganismos varia ao longo do tempo, em condições ambientais fixas. São caracterizados basicamente por dois parâmetros cinéticos: a taxa de crescimento do microrganismo ( $\mu$ ) e o tempo de duração da fase lag ( $\lambda$ ). Os modelos secundários, por sua vez, são equações que descrevem como esses parâmetros dos modelos primários respondem a variações nas condições ambientais (temperatura, pH, atividade de água).

#### 2.4.1 Modelos Primários

Na literatura há uma vasta gama de modelos preditivos primários. Contudo, neste trabalho serão abordados os principais modelos: linear, logístico, Gompertz modificado e Baranyi simplificado.

### 2.4.1.1 Modelo Linear

O modelo linear estabelece uma relação retilínea entre o tamanho da colônia de fungos e o tempo, após a finalização da fase lag. Desta maneira, a taxa instantânea de crescimento radial ( $\frac{dy}{dt}$ ) é constante durante o desenvolvimento do microrganismo. Trata-se de um modelo simples, cujos valores de seus parâmetros ( $\mu$  e  $\lambda$ ) podem ser estimados a partir de regressão linear em um gráfico relacionando as medidas de raio da colônia *versus* tempo. Por esse motivo, ele tem sido empregado em muitos trabalhos científicos, tais como os estudos conduzidos por Cuppers *et al.* (1997), Parra e Magan (2004); Baert *et al.* (2007), Lahlali *et al.* (2007), Lee e Magan (2010), Gougouli *et al.* (2011) e Huchet *et al.* (2013). Matematicamente, o modelo linear é expresso pela Equação (2.1).

$$y = y_0 + \mu(t - \lambda) \quad (\text{Eq. 2.1})$$

onde  $y$  é o raio da colônia no instante  $t$ ,  $y_0$  é o raio inicial da colônia,  $\mu$  é a taxa de crescimento radial da colônia e  $\lambda$  é o tempo de duração da fase lag.

Tipicamente, a taxa específica de crescimento microbiano é expressa em unidades de tempo<sup>-1</sup>. A análise dimensional da Equação (2.1), contudo, evidencia que a taxa de crescimento radial apresenta dimensões de comprimento/tempo. Tal fato é uma particularidade dos trabalhos que envolvem o estudo de crescimento de fungos, pois ao invés de se medir número de indivíduos, como ocorre com bactérias, mede-se o diâmetro da colônia, durante o seu desenvolvimento.

Para Garcia *et al.* (2009), esse modelo cinético é útil quando se deseja efetuar comparações entre diversos tratamentos de crescimento de fungos. Dantigny *et al.* (2005) destacaram a precisão alcançada pelo modelo, que frequentemente apresenta coeficiente de determinação ( $r^2$ ) superior a 0,99. Contudo, Marín *et al.* (2008) advertiram para o fato de que, em estudos envolvendo o crescimento de fungos em condições subótimas, a avaliação pode tornar-se subjetiva devido à necessidade de efetuar a seleção manual da parte linear da curva.

### 2.4.1.2 Modelo Logístico

No modelo logístico, também considerado um modelo primário, assume-se que a taxa instantânea de crescimento radial ( $\frac{dy}{dt}$ ) é proporcional ao raio da colônia ( $y$ ) naquele instante. Devido à limitação nas fontes de nutrientes disponíveis e à presença de

metabólitos inibidores produzidos pelos próprios microrganismos, a colônia de fungos não cresce indefinidamente. Portanto, seu raio tende a um valor máximo a ser alcançado após determinado intervalo de tempo (CORRADINI, PELEG; 2007). Matematicamente, o modelo logístico é expresso pela Equação (2.2).

$$y = y_0 + \frac{y_{MAX}}{1 + \exp\left[\left(\frac{4\mu_{MAX}}{y_{MAX}}\right)(\lambda - t) + 2\right]} \quad (\text{Eq. 2.2})$$

onde  $y$  é o raio da colônia no instante  $t$ ,  $y_0$  é o raio inicial da colônia,  $y_{MAX}$  é raio máximo alcançado pela colônia,  $\mu_{MAX}$  é a máxima taxa específica de crescimento radial da colônia e  $\lambda$  é o tempo de duração da fase lag.

Como exemplos de trabalhos em que o modelo logístico ou variações desse modelo cinético foram utilizados, citam-se os estudos conduzidos por Fujikawa *et al.* (2003), Liu *et al.* (2003), Fujikawa *et al.* (2004), Hamidi-Esfahani *et al.* (2004), van de Lagemaat e Pyle (2005), Sant'Ana *et al.* (2010a), Fujikawa (2011) e Zimmermann *et al.* (2011).

#### 2.4.1.3 Modelo Gompertz modificado

O modelo primário de Gompertz modificado baseia-se na hipótese de que a taxa instantânea de crescimento do microrganismo ( $\frac{dN}{dt}$ ) é uma função logarítmica do tamanho da população ( $N$ ) naquele instante de tempo. Na forma integrada, origina uma função exponencial dupla que descreve o formato de uma curva sigmoideal assimétrica, muito utilizada no estudo de cinética microbiana (BARANYI, ROBERTS, 1995; NAKASHIMA *et al.*, 2000; LEBERT, LEBERT, 2006). O modelo original de Gompertz, empregado em outras áreas do conhecimento, foi reparametrizado por Zwietering *et al.* (1990) visando adaptá-lo para o estudo de microrganismos. Para isso, eles incluíram na equação alguns parâmetros com significado microbiológico, tais como o tempo de duração da fase lag ( $\lambda$ ), a máxima taxa específica de crescimento ( $\mu_{MAX}$ ), o tamanho inicial da população ( $N_0$ ) e o tamanho máximo da população ( $N_{MAX}$ ).

O modelo Gompertz modificado foi adaptado para o estudo da cinética de crescimento de fungos, assumindo a forma dada pela Equação (2.3). Neste caso, houve a substituição dos parâmetros  $N_0$  e  $N_{MAX}$  da equação original pelos valores de raio inicial da colônia ( $y_0$ ) e raio máximo da colônia ( $y_{MAX}$ ).

$$y = y_0 + y_{MAX} \exp\left\{-\exp\left[\frac{\mu_{MAX} \exp(1)}{y_{MAX}}(\lambda - t) + 1\right]\right\} \quad (\text{Eq. 2.3})$$

Os trabalhos realizados por Pardo *et al.* (2004), Marín *et al.* (2008), Cheng *et al.* (2010), Galati *et al.* (2011) e Gougouli e Koutsoumanis (2012) são exemplos de estudos recentemente publicados na literatura em que esse modelo foi utilizado para descrever a cinética de crescimento de fungos filamentosos.

Embora bastante empregado e capaz de descrever satisfatoriamente as diversas fases de crescimento de um microrganismo, o modelo Gompertz modificado recebe críticas na literatura. A inexistência de bases biológicas para o seu desenvolvimento, o que por vezes dificulta a interpretação física de seus parâmetros, é uma das principais limitações destacadas pelos pesquisadores (MCDONALD, SUN, 1999). Tal fato impulsionou o desenvolvimento de modelos fundamentados em aspectos microbiológicos, como o modelo Baranyi.

#### 2.4.1.4 Modelo Baranyi

O modelo Baranyi foi desenvolvido a partir de uma nova abordagem que procura descrever o crescimento microbiano com base em princípios biológicos. Neste modelo primário, considera-se que a taxa instantânea de crescimento da população ( $\frac{dN}{dt}$ ) é proporcional ao tamanho da população ( $N$ ) naquele instante de tempo e depende significativamente do estado fisiológico inicial das células no momento da inoculação. Por sua vez, o estado fisiológico é função de uma substância crítica existente na célula (enzima, RNA ou DNA específico), cuja cinética de formação segue o modelo de Michaelis-Menten. A concentração dessa substância na célula é considerada um gargalo para o início do crescimento (BARANYI, ROBERTS, 1995; BARANYI *et al.*, 1995; BELLARA *et al.*, 2000, VAN IMPE *et al.*, 2005). O modelo Baranyi, originalmente desenvolvido para descrever o comportamento de bactérias, foi adaptado para ser utilizado em estudos com fungos, assumindo a forma final expressa pela Equação (2.4).

$$y = y_0 + \mu_{MAX} A - \ln\left\{1 + \frac{[\exp(\mu_{MAX} A) - 1]}{\exp(y_{MAX} - y_0)}\right\} \quad (\text{Eq. 2.4})$$

$$\text{onde } A = t + \left(\frac{1}{\mu_{MAX}}\right) \ln[\exp(-\mu_{MAX} t) + \exp(-\mu_{MAX} \lambda) - \exp(-\mu_{MAX} t - \mu_{MAX} \lambda)]$$

Na Equação (2.4),  $y$  é o raio da colônia no instante  $t$ ,  $y_0$  é o raio inicial da colônia,  $y_{MAX}$  é raio máximo alcançado pela colônia,  $\mu_{MAX}$  é a máxima taxa específica de crescimento radial da colônia e  $\lambda$  é o tempo de duração da fase lag.

Os trabalhos de Valík *et al.* (1999), Marín *et al.* (2008), Panagou *et al.* (2010) e Mousa *et al.* (2011) são exemplos de estudos em que o modelo Baranyi foi empregado para descrever o crescimento de fungos.

Garcia *et al.* (2009) propuseram uma simplificação nesse modelo ao utilizá-lo para descrever o comportamento de fungos filamentosos. Segundo os pesquisadores, o micélio está em constante crescimento na região periférica da colônia, onde o meio de cultura pode ser caracterizado como novo. Não há, portanto, limitação ao desenvolvimento do fungo. Desta forma, o termo logarítmico da primeira parte da Equação (2.4) pode ser omitido e o modelo torna-se bifásico, descrevendo apenas as fases lag e logarítmica (Figura 2.4.II.b).

Os modelos preditivos primários descritos nesta seção utilizam diferentes números de parâmetros para ajustarem-se aos dados experimentais. Enquanto o modelo linear e o modelo Baranyi simplificado necessitam de apenas dois parâmetros de ajuste ( $\mu$  e  $\lambda$ ), o modelo Gompertz modificado e o modelo logístico fazem uso de três parâmetros ( $\mu$ ,  $\lambda$  e  $y_{MAX}$ ). Este aspecto é revelante quando se deseja comparar o desempenho de diferentes modelos primários ao ajustarem-se aos dados experimentais. Geralmente, modelos com mais parâmetros apresentam melhor desempenho do que modelos mais simples.

Além dos modelos preditivos primários, o equacionamento da cinética de crescimento de microrganismo utiliza modelos secundários, para relacionar o aumento da população de bactérias e de fungos com as condições ambientais (temperatura, pH, atividade de água) do meio em que se encontram. A seção a seguir apresenta a discussão sobre os diferentes modelos secundários encontrados na literatura.

#### 2.4.2 Modelos Secundários

O número de modelos preditivos secundários encontrados na literatura também é bastante amplo. Neste trabalho serão apresentados apenas os modelos mais frequentes, a saber: modelo do tipo raiz quadrada, modelo Arrhenius e Arrhenius-Davey, modelo Gibson, modelos polinomiais e modelo hiperbólico.

### 2.4.2.1 Modelo Belehrádek ou modelo do tipo raiz quadrada

O modelo Belehrádek descreve a influência da temperatura sobre a taxa de crescimento microbiano, conforme mostra a Equação (2.5). Ele foi desenvolvido a partir das observações experimentais feitas por Ohta e Hirahara (1977) segundo as quais a raiz quadrada da taxa de degradação de nucleotídeos de carne de peixe era proporcional à temperatura. Contudo, foram Ratkowsky e colaboradores que o introduziram em estudos microbiológicos (ROSS, MCMEEKIN; 1994).

$$\sqrt{\mu} = b(T - T_{\min.}) \quad (\text{Eq. 2.5})$$

onde  $\mu$  é a taxa de crescimento microbiano,  $T$  é a temperatura,  $b$  e  $T_{\min.}$  são parâmetros do modelo.

O modelo do tipo raiz quadrada é particularmente útil para estudar o comportamento de bactérias em produtos refrigerados (LEBERT, LEBERT; 2006) e para descrever o crescimento bacteriano em condições subótimas de temperatura (GRIJSPEERDT, DE REU; 2005). Segundo Ross e McMeekin (1994), são encontradas versões estendidas desse modelo, visando utilizá-lo para descrever o comportamento microbiano em condições superótimas de temperatura. Neste caso, ele assume a forma expressa pela Equação (2.6).

$$\sqrt{\mu} = b (T - T_{\min.}) \{1 - \exp[c(T - T_{\max.})]\} \quad (\text{Eq. 2.6})$$

onde  $c$  e  $T_{\max.}$  são parâmetros do modelo do tipo raiz quadrada estendido.

### 2.4.2.2 Modelo Arrhenius

Tradicionalmente, o modelo Arrhenius é empregado para descrever a influência da temperatura sobre a constante da expressão da taxa de reações químicas, em cinética química. Na área de cinética microbiana, o modelo Arrhenius é utilizado na forma linearizada, descrita pela Equação (2.7).

$$\ln(\mu) = \ln(A_A) - \frac{E_A}{RT} \quad (\text{Eq. 2.7})$$

onde  $\mu$  é a taxa de crescimento microbiano,  $T$  é a temperatura absoluta,  $A_A$  é um parâmetro de ajuste do modelo,  $R$  é a constante universal dos gases e  $E_A$  pode ser interpretado como a energia de ativação da reação que limita o crescimento microbiano (ROSS, MCMEEKIN; 1994).

### 2.4.2.3 Modelo Arrhenius-Davey

O modelo secundário Arrhenius-Davey é uma extensão da equação de Arrhenius linearizada e foi proposto por Davey (1989) para avaliar o efeito da temperatura de incubação sobre a taxa de crescimento de bactérias (SAMAPUNDO *et al.*, 2005). O modelo Arrhenius-Davey assume a forma expressa pela Equação (2.8).

$$\ln(\mu) = C_0 + \frac{C_1}{T} + \frac{C_2}{T^2} \quad (\text{Eq. 2.8})$$

onde  $C_0$ ,  $C_1$  e  $C_2$  são parâmetros de ajuste do modelo matemático.

Versões estendidas do modelo Arrhenius-Davey são encontradas na literatura, buscando descrever o efeito do pH e da atividade de água sobre a taxa de crescimento, como ocorreu no trabalho de Panagou *et al.* (2003).

### 2.4.2.4 Modelo Gibson

Gibson *et al.* (1994) estudaram o efeito da atividade de água sobre a taxa de crescimento de quatro espécies de fungos do gênero *Aspergillus*: *A. flavus*, *A. nomius*, *A. oryzae* e *A. parasiticus*. A partir do estudo, eles estabeleceram o modelo secundário descrito pela Equação (2.9) que, na opinião de Garcia *et al.* (2009), merece especial atenção por ter sido o primeiro equacionamento desenvolvido especificamente para avaliar o crescimento de fungos.

$$\ln(\mu) = C_0 + C_1 \sqrt{(1 - A_w)} + C_2 (1 - A_w) \quad (\text{Eq. 2.9})$$

onde  $A_w$  é a atividade de água do meio de crescimento do fungo;  $C_0$ ,  $C_1$  e  $C_2$  são parâmetros de ajuste do modelo matemático.

Os trabalhos conduzidos por Valík *et al.* (1999) e Patriarca *et al.* (2001) são exemplos de estudos em que o modelo Gibson foi utilizado para descrever o comportamento de fungos em função da atividade de água do meio de cultura.

### 2.4.2.5 Modelos Polinomiais

Os modelos polinomiais são equações puramente empíricas, construídas a partir de análise de regressão linear múltipla, em que se busca descrever a influência de cada fator ambiental ( $T$ ,  $pH$ ,  $A_w$ ) e suas interações sobre as variáveis de resposta ( $\mu$  e  $\lambda$ ). A Equação

(2.10) mostra a expressão geral para os modelos polinomiais (ROSS, MCMEEKIN, 1994; GARCIA *et al.*, 2009).

$$z = a_0 + \sum_{i=1}^n a_i X_i + \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m a_{i,j} X_i X_j \quad (\text{Eq. 2.10})$$

onde  $z$  é a variável de resposta do modelo ( $\mu$  ou  $\lambda$ ),  $X_i$  e  $X_j$  são os fatores ambientais modelados ( $T, pH, A_w$ ),  $a_0$ ,  $a_i$  e  $a_{i,j}$  são os parâmetros de ajuste do modelo.

Embora existam críticas a este modelo, principalmente pela falta de fundamentos biológicos em seu desenvolvimento, a revisão sobre o tema feita por Garcia *et al.* (2009) mostrou que modelos polinomiais foram adotados em 62% das referências bibliográficas pesquisadas.

Os modelos matemáticos descritos nas Seções 2.4.2.1 a 2.4.2.5 enfatizaram o efeito de variáveis ambientais sobre a taxa de crescimento microbiano ( $\mu$ ). Eles também podem ser empregados para ajustar o comportamento do tempo de duração da fase lag ( $\lambda$ ) em função de fatores ambientais. Dentre os equacionamentos especificamente desenvolvidos para o parâmetro  $\lambda$ , cita-se o modelo hiperbólico.

#### 2.4.2.6 Modelo Hiperbólico

O modelo hiperbólico foi desenvolvido por Zwietering e colaboradores para descrever o efeito da temperatura ( $T$ ) sobre o tempo de duração da fase lag –  $\lambda$  (VAN IMPE *et al.*, 1992). Ele é expresso pela Equação (2.11).

$$\ln(\lambda) = \frac{\rho}{T - q} \quad (\text{Eq. 2.11})$$

onde  $\rho$  e  $q$  são parâmetros de ajuste do modelo matemático.

Como já foi mencionado, além dos modelos primários e secundários apresentados acima, existem outras equações propostas na literatura. Para informações complementares sobre esses e outros modelos, assim como sua aplicação ao estudo de bactérias, sugere-se ao leitor a consulta aos trabalhos de Ross e McMeekin (1994), Rosso *et al.* (1995), Van Impe *et al.* (2005) e Lebert e Lebert (2006).

## 2.5 FUNDAMENTOS DE TRANSFERÊNCIA DE CALOR

Nesta seção são abordados os aspectos relevantes relacionados com os fenômenos de transferência de calor, enfatizando sua aplicação a meios alimentícios. Para a elaboração deste texto, foram utilizados como referências os trabalhos de Incropera e De Witt (1998) e Çengel (1998), os quais foram complementados com estudos recentemente publicados na literatura que abordaram essa temática.

Os fenômenos de transferência de calor estão presentes em diversas operações da indústria de alimentos, como a secagem, a evaporação, a pasteurização, a refrigeração e o congelamento. O aquecimento do alimento é realizado com o objetivo de reduzir a sua população de microrganismos, inativar enzimas, reduzir a umidade do produto e modificar a funcionalidade de certos componentes. Já o seu resfriamento visa reduzir ou evitar a ocorrência de reações químicas e enzimáticas, além de inibir o crescimento microbiano (WELTI-CHANES *et al.*, 2005).

A transferência de calor resulta da existência de gradientes de temperatura no interior do alimento ou entre ele e a sua vizinhança. Há três mecanismos físicos para descrever esses fenômenos (condução, convecção e radiação), os quais são representados esquematicamente na Figura 2.5.



**Figura 2.5** - Representação esquemática dos mecanismos de transferência de calor.

(Fonte: adaptado de

[www.physics.louisville.edu/cldavis/phys298/notes/heat\\_transfer\\_mech.html](http://www.physics.louisville.edu/cldavis/phys298/notes/heat_transfer_mech.html))

As seções seguintes tratarão com mais detalhes os mecanismos de transferência de calor, enfatizando a condução e a convecção, frequentemente empregadas em trabalhos que integram modelos de transferência de calor e de cinética microbiana.

### 2.5.1 Condução de calor

A condução é o mecanismo de transferência de calor em nível microscópico presente em sólidos e fluidos estagnados devido à diferença no estado energético de seus átomos e moléculas. Quando a superfície de um corpo sólido é aquecida, as partículas dessa região do material passam a apresentar maior nível de energia vibracional que é transmitida para as partículas vizinhas, promovendo a transferência de calor. Em metais, além da ação das ondas vibracionais, essa transferência de energia é devida, também, à translação dos elétrons livres que intensificam o processo de condução de calor.

A equação fenomenológica que relaciona o gradiente de temperatura aplicado ( $\vec{\nabla}T$ ) com o fluxo de calor produzido por condução ( $\vec{q}_{COND.}$ ) é conhecida como lei de Fourier, expressa pela Equação (2.12).

$$\vec{q}_{COND.} = -k \cdot \vec{\nabla}T \quad (\text{Eq. 2.12})$$

onde  $k$  é a condutividade térmica do material.

Um dos principais objetivos da análise de condução de calor em um alimento durante o seu processamento térmico é determinar a evolução temporal do campo de temperatura (distribuição de temperatura nesse meio), resultante da imposição de condições de contorno em suas fronteiras. Isto é possível a partir da resolução da equação da difusão do calor, expressa pela Equação (2.13).

$$\vec{\nabla} \cdot (k \vec{\nabla}T) + \dot{q}_G = \rho C_p \frac{\partial T}{\partial t} \quad (\text{Eq. 2.13})$$

onde  $\dot{q}_G$  é a taxa volumétrica de geração de energia;  $\rho$  e  $C_p$  são a massa específica e o calor específico do material, respectivamente; e  $t$  é o tempo.

Desconsiderando o termo de geração de energia e assumido que o material é isotrópico, a Equação (2.13) resume-se a:

$$\frac{\partial T}{\partial t} = \alpha \cdot \nabla^2 T \quad (\text{Eq. 2.14})$$

onde  $\nabla^2 T$  é o Laplaciano da temperatura e  $\alpha$  é a difusividade térmica do material, expressa pela Equação (2.15). A difusividade térmica representa a razão entre a capacidade de um material conduzir calor e sua capacidade de armazenar energia.

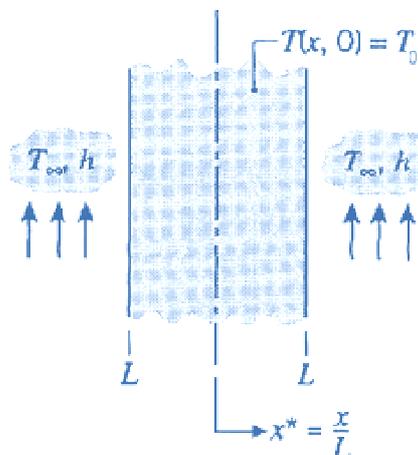
$$\alpha = \frac{k}{\rho C_p} \quad (\text{Eq. 2.15})$$

O Quadro 2.2 apresenta a Equação (2.14) expressa para o sistema de coordenadas cartesianas, cilíndricas e esféricas. A adoção de um desses sistemas de coordenadas para um caso particular depende da geometria do problema em questão.

**Quadro 2.2** - Equação da difusão de calor em coordenadas cartesianas, cilíndricas e esféricas para material isotrópico e sem geração volumétrica de energia.

Sistema de coordenadas	Equação da difusão de calor	Número da equação
Retangulares	$\frac{\partial T}{\partial t} = \alpha \cdot \left( \frac{\partial^2 T}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 T}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 T}{\partial z^2} \right)$	(Eq. 2.16)
Cilíndricas	$\frac{\partial T}{\partial t} = \alpha \cdot \left[ \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left( r \frac{\partial T}{\partial r} \right) + \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial \varphi} \left( \frac{\partial T}{\partial \varphi} \right) + \frac{\partial}{\partial z} \left( \frac{\partial T}{\partial z} \right) \right]$	(Eq. 2.17)
Esféricas	$\frac{\partial T}{\partial t} = \alpha \cdot \left[ \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left( r^2 \frac{\partial T}{\partial r} \right) + \frac{1}{r^2 \sin^2 \theta} \frac{\partial}{\partial \varphi} \left( \frac{\partial T}{\partial \varphi} \right) + \frac{1}{r^2 \sin \theta} \frac{\partial}{\partial \theta} \left( \sin \theta \frac{\partial T}{\partial \theta} \right) \right]$	(Eq. 2.18)

A solução da equação de difusão de calor depende da condição inicial e das condições de contorno do problema. Para situações particulares, como a parede plana mostrada na Figura 2.6, há solução analítica.



**Figura 2.6** - Parede plana de espessura  $2L$ , com temperatura inicial uniforme, subitamente submetida à condição de contorno convectiva. (Fonte: adaptado de Incropera e De Witt, 1998)

A evolução temporal do campo de temperatura na parede plana de espessura  $2L$ , com temperatura inicial uniforme ( $T_0$ ), subitamente imersa em um fluido à temperatura  $T_\infty \neq T_0$ , é expressa pela Equação (2.19). Essa equação é válida se a espessura da parede for pequena, comparada a sua altura e largura.

$$\frac{T - T_\infty}{T_0 - T_\infty} = \sum_{n=1}^{\infty} C_n \exp(-\xi_n^2 Fo) \cos(\xi_n x^*) \quad (\text{Eq. 2.19})$$

Na Equação (2.19),  $x^*$  é a posição adimensional no interior do material onde se deseja determinar a evolução temporal de temperatura. Os valores dos coeficientes  $C_n$ , por sua vez, são calculados pela Equação (2.20).

$$C_n = \frac{4 \operatorname{sen} \xi_n}{2 \xi_n + \operatorname{sen}(2 \xi_n)} \quad (\text{Eq. 2.20})$$

e os valores discretos de  $\xi_n$  são as raízes positivas da seguinte equação transcendental

$$\xi_n \operatorname{tg}(\xi_n) = Bi \quad (\text{Eq. 2.21})$$

Nas Equações (2.19) e (2.21), os parâmetros  $Fo$  e  $Bi$  são, respectivamente, os números adimensionais de Fourier e de Biot, expressos pelas Equações (2.22) e (2.23).

$$Fo \equiv \frac{\alpha t}{L_c^2} \quad (\text{Eq. 2.22})$$

$$Bi \equiv \frac{h L_c}{k} \quad (\text{Eq. 2.23})$$

Nas Equações (2.22) e (2.23),  $L_c$  é o comprimento característico que, para o problema em questão, corresponde à metade da espessura da parede. Cabe destacar que a solução analítica apresentada anteriormente também se aplica à parede plana de espessura  $L$  isolada termicamente em uma das faces e submetida à condição de contorno convectiva na outra face. Isto é possível, pois o problema original é simétrico em relação ao plano central, no qual o fluxo de calor é nulo.

A solução exata apresentada acima foi empregada no estudo conduzido por Ben Yaghene *et al.* (2009) para avaliar o efeito da espessura do produto, do coeficiente de transferência de calor convectivo e da temperatura da corrente convectiva sobre a

distribuição de temperatura observada na superfície e na posição central de um produto em formato de placa plana.

As soluções analíticas para problemas de transferência de calor em estado transiente são restritas a geometrias e a condições de contorno específicas. Quando tais condições não se aplicam, é necessário resolver o problema por meio de métodos numéricos, como elementos finitos, volumes finitos e diferenças finitas. Segundo Wang e Sun (2003), este último método é facilmente aplicável para resolver numericamente as equações de transporte bi e tridimensionais, principalmente para geometrias simples como placas, cilindros e esferas. Esses autores listaram diversos exemplos de trabalhos em que o método de diferenças finitas foi empregado para resolver modelos de transferência de calor e de massa em processos térmicos da indústria alimentícia, tais como cocção e fritura, secagem e refrigeração. No âmbito da microbiologia preditiva e a sua integração com fenômenos de transferência de calor, os métodos numéricos foram utilizados nos trabalhos conduzidos por Silva e Silva (1997), Bellara *et al.* (1999), Bellara *et al.* (2000), Plazl *et al.* (2006) e Gil *et al.* (2006).

### 2.5.2 Convecção de calor

A convecção é o mecanismo de transferência de calor que ocorre entre uma superfície sólida (ou fluido estagnado), à temperatura  $T_s$ , e um fluido adjacente em movimento, na temperatura  $T_\infty$ , desde que  $T_\infty \neq T_s$ . Compreende o efeito combinado de condução e de advecção. A condução está presente como mecanismo de troca térmica exclusivamente estabelecido entre a superfície sólida e a camada de fluido imediatamente adjacente. A advecção é resultante do movimento do fluido que promove o deslocamento coletivo de um grande número de moléculas, possibilitando o contato entre frações de fluido quente e de fluido frio de forma aleatória e, por consequência, intensificando a troca térmica.

De acordo com a natureza da força motriz para o deslocamento do fluido, tem-se a convecção forçada e a convecção livre ou natural. No primeiro caso, o escoamento do fluido é promovido por forças externas, como uma bomba ou um ventilador. Na segunda situação, o movimento do fluido é induzido por forças de empuxo, causadas pela diferença de densidade que resulta de variações de temperatura no fluido.

A equação que permite calcular o fluxo de calor em função da diferença de temperatura entre o fluido e a superfície é conhecida como lei de resfriamento de Newton, expressa pela Equação (2.24).

$$q''_{CONV.} = h (T_s - T_\infty) \quad (\text{Eq. 2.24})$$

onde  $q''_{CONV.}$  é o fluxo de calor convectivo,  $T_s$  é a temperatura da superfície sólida,  $T_\infty$  é a temperatura do fluido em movimento e  $h$  é o coeficiente de transferência de calor por convecção. O valor do parâmetro  $h$  é fortemente influenciado pela geometria da superfície, pela natureza do escoamento, pela velocidade do fluido e pelas propriedades termodinâmicas e de transporte do fluido (condutividade térmica, viscosidade cinemática e calor específico).

O coeficiente de transferência de calor por convecção pode ser estimado experimentalmente ou a partir da utilização de correlações matemáticas desenvolvidas analítica ou empiricamente. Tais correlações apresentam a forma geral expressa pela Equação (2.25), quando se trata de convecção forçada.

$$Nu = \frac{h L_c}{k_f} = C Re_L^m Pr^n \quad (\text{Eq. 2.25})$$

onde  $Nu$  é o número adimensional de Nusselt,  $L_c$  é o comprimento característico da geometria em estudo (comprimento da placa ou diâmetro de uma partícula esférica, por exemplo),  $k_f$  é a condutividade térmica do fluido,  $Re$  é o número adimensional de Reynolds,  $Pr$  é o número adimensional de Prandtl,  $C$ ,  $m$  e  $n$  são parâmetros da equação.

Os números adimensionais de Reynolds e de Prandtl, por sua vez, são expressos pelas Equações (2.26) e (2.27), respectivamente.

$$Re \equiv \frac{U_\infty L_c}{\nu} \quad (\text{Eq. 2.26})$$

$$Pr \equiv \frac{\nu}{\alpha} \quad (\text{Eq. 2.27})$$

onde  $U_\infty$  é a velocidade de escoamento livre do fluido,  $\nu$  e  $\alpha$  são a difusividade de quantidade de movimento e a difusividade térmica do fluido, respectivamente.

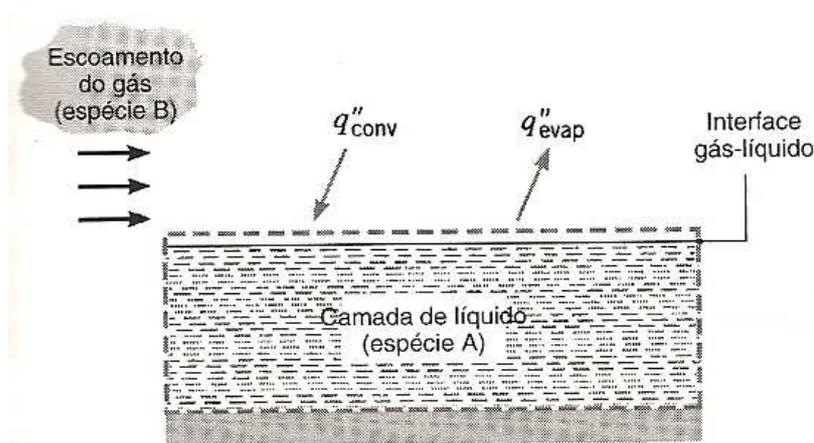
O Quadro 2.3 apresenta as correlações clássicas para o cálculo do coeficiente de transferência de calor convectivo médio para placa plana, em regime de convecção forçada. A aplicação de cada uma dessas correlações pressupõe que sejam satisfeitas algumas restrições que também são mostradas nesse quadro.

**Quadro 2.3** - Correlações para o cálculo do valor do coeficiente de transferência de calor convectivo médio em escoamento externo forçado sobre placa plana.

Correlação	Restrições	Número da equação
$\bar{Nu}_L \equiv \frac{\bar{h} \cdot L_c}{k_f} = 0,664 Re_L^{1/2} Pr^{1/3}$	Regime exclusivamente laminar Escoamento paralelo $Re_L \leq 1.10^5$ $Pr \geq 0,6$	(Eq. 2.28)
$\bar{Nu}_L \equiv \frac{\bar{h} L_c}{k_f} = 0,037 Re_L^{4/5} Pr^{1/3}$	Regime inteiramente turbulento Escoamento paralelo $5.10^5 \leq Re_L \leq 10^7$ $0,6 \leq Pr \leq 60$	(Eq. 2.29)
$\bar{Nu}_L = \left(0,037 Re_L^{4/5} - 871\right) Pr^{1/3}$	Regime de escoamento misto Escoamento paralelo $5.10^5 \leq Re_L \leq 10^8$ $0,6 < Pr < 60$ $Re_{transição} = 5.10^5$	(Eq. 2.30)

### 2.5.3 Resfriamento evaporativo

O termo resfriamento evaporativo, na área de Refrigeração, apresenta uma conotação diferente da utilizada neste trabalho. Nesta tese, denomina-se como resfriamento evaporativo, ou simplesmente efeito evaporativo, o fenômeno que envolve a transferência simultânea de calor e de massa. Ocorre quando um gás escoia sobre a superfície de um líquido e há um fluxo de um componente da fase líquida (geralmente vapor d'água) para a fase gasosa (frequentemente ar) devido à diferença de potencial químico dessa espécie química entre as duas fases, como mostra esquematicamente a Figura 2.7.



**Figura 2.7** - Transferência de calor na interface gás-líquido durante o processo de resfriamento pelo efeito evaporativo.

(Fonte: adaptado de Incropera e De Witt, 1998)

A energia necessária para evaporar a água nestas circunstâncias é fornecida pela própria fase líquida e, eventualmente, pela fase gasosa. Como resultado, ambas as fases são resfriadas durante esse processo. O princípio da conservação de energia, aplicado ao sistema mostrado na Figura 2.7, estabelece que, em uma unidade de área superficial e no estado estacionário,

$$\bar{q}''_{CONV} = \bar{q}''_{EVAP} \quad (\text{Eq. 2.31})$$

onde  $\bar{q}''_{CONV}$  é o fluxo de calor transferido da vizinhança para o sistema por convecção e  $\bar{q}''_{EVAP}$  é o fluxo de energia transferido do sistema para a vizinhança devido à evaporação do líquido A. O valor do fluxo de energia associado ao efeito evaporativo, por sua vez, pode ser obtido a partir da Equação (2.32).

$$\bar{q}''_{EVAP} = \bar{N}''_A \Delta H_{VAP,A} \quad (\text{Eq. 2.32})$$

onde  $\bar{N}''_A$  é o fluxo de massa do componente A estabelecido entre a interface líquido-gás e a fase gasosa e  $\Delta H_{VAP,A}$  é a entalpia de vaporização da substância A, avaliada na temperatura da interface líquido-gás.

O resfriamento evaporativo é particularmente importante no processo de refrigeração de alimentos, uma vez que a evaporação da água a partir da superfície do produto acelera a sua taxa de redução de temperatura. Segundo Chuntranuluck *et al.* (1998a), a perda de 1% de umidade do produto é responsável por 25% da energia que deve ser removida do alimento para reduzir a sua temperatura da ordem de 30°C. O efeito do resfriamento evaporativo no processo de redução de temperatura de alimentos foi considerado nos trabalhos de Chuntranuluck *et al.* (1998a,b,c), Simpson *et al.* (2004), Ferrua e Singh (2009) e Moraga *et al.* (2012). Contudo, nesses estudos, tal abordagem esteve focada apenas no comportamento térmico de alimentos, sem investigar seus efeitos sobre eventual crescimento microbiano. Esse aspecto, por sua vez, foi tratado nos estudos conduzidos por Amézquita *et al.* (2005) e Cepeda *et al.* (2013). Em ambos os casos, o modelo térmico, contemplando o efeito do resfriamento evaporativo, foi integrado a modelos cinéticos para avaliar o crescimento de bactérias em produtos alimentícios.

A integração entre modelos fenomenológicos de transferência de calor e de massa com modelos cinéticos de crescimento microbiano para analisar estratégias de processamento de alimentos é um tema relativamente recente na literatura, como será discutido na próxima seção desta tese.

---

## 2.6 INTEGRAÇÃO ENTRE MODELOS

---

Durante o processamento de um alimento, há variações espaciais e temporais em suas propriedades físico-químicas. Na pasteurização ou resfriamento, há mudanças na temperatura do produto; ao longo de um processo fermentativo, ocorre diminuição do pH do meio; na secagem, a atividade de água do alimento diminui. Como consequência, é inevitável o surgimento de perfis de temperatura, de pH e de atividade de água no produto. Neste cenário, apenas os modelos cinéticos de crescimento microbiano não são suficientes para avaliar o efeito dessas variáveis sobre a dinâmica de crescimento populacional.

A integração dos conhecimentos de microbiologia preditiva e de engenharia de processos para obter um melhor conhecimento dos fenômenos envolvidos nas operações da indústria alimentícia é um tema relativamente recente. Tal abordagem foi tratada nos trabalhos de Bellara *et al.* (2000), Amézquita *et al.* (2005), Mafart (2005), Gil *et al.* (2006), Lebert e Lebert (2006), Mackey *et al.* (2006), Valdramidis *et al.* (2006) e Ben Yaghlene *et al.* (2009).

Nota-se, contudo, que os trabalhos que tratam dessa abordagem interdisciplinar estão focados no estudo do comportamento de bactérias, frequentemente, durante o processo de inativação. De fato, Mafart (2005) afirmou que a microbiologia preditiva aplicada ao estudo do crescimento de microrganismos é mais recente e está desconectada da perspectiva de processos. Além disso, existem limitações que necessitam ser superadas ao integrar modelos matemáticos desses dois campos do conhecimento. Segundo Mafart (2005) essas restrições estão associadas:

- à idealização das condições para as quais os modelos de engenharia de processos foram desenvolvidos, como, por exemplo, a validade da solução exata das equações que descrevem os fenômenos de transferência de calor apenas para sistemas com geometrias simples (placa infinita, cilindro infinito, esfera);
- ao desconhecimento ou dificuldades em avaliar os valores de parâmetros de modelos fenomenológicos, como o coeficiente de transferência de calor por convecção;
- à hipótese de uniformidade das condições de processamento, quando se sabe, por exemplo, que os valores do coeficiente de transferência de calor por convecção podem variar desde 16 até 74  $W.m^{-2}.K^{-1}$  em um túnel de resfriamento de carcaças de animais abatidos;
- à complexidade dos mecanismos envolvidos no crescimento de microrganismos, além da natural variabilidade entre indivíduos dentro de uma mesma espécie. Isto torna

pouco provável que existam modelos cinéticos simples e precisos, capazes de contemplar todos esses aspectos.

Para superar essas dificuldades, Mafart (2005) propôs como alternativa a adoção de uma abordagem simplificadora em que é preferível empregar modelos simples, com poucos parâmetros e possíveis de serem mensurados, em detrimento de modelos mais sofisticados, que procuram detalhar a descrição dos fenômenos físicos. Exemplificou que, sob essa ótica, o modelo linear é mais conveniente de ser integrado em um modelo global do que o modelo Baranyi.

A seguir são descritos os estudos mais representativos publicados recentemente na literatura, em que a integração entre modelos preditivos microbianos e de engenharia de processos foi tema de pesquisa.

#### 2.6.1 Integração de modelos no processo de refrigeração

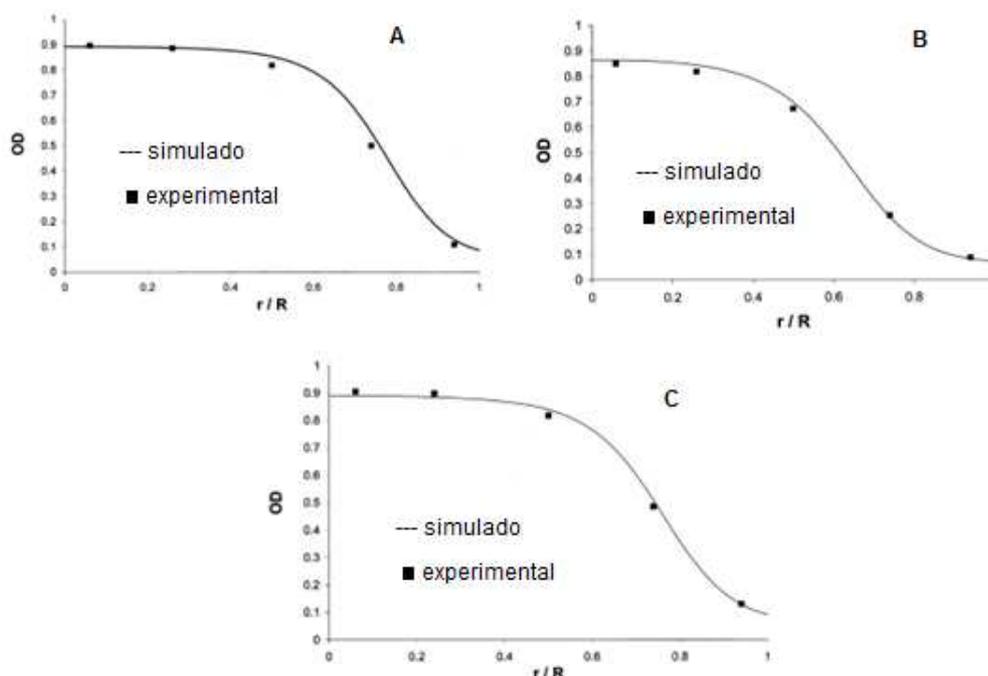
Bellara *et al.* (2000) propuseram um modelo matemático para estudar o crescimento de bactérias durante o processo de refrigeração. Eles combinaram modelos preditivos e de transferência de calor puramente difusivo para descrever o crescimento de *Escherichia coli* em função da temperatura no interior de uma embalagem cilíndrica, preenchida com ágar APT.

O aumento da população em função do tempo, medido de forma indireta por densidade ótica (*optical density* – OD), foi ajustado pelo modelo primário de Baranyi. Já o efeito da temperatura na taxa de crescimento do microrganismo foi avaliado pelo modelo da raiz quadrada de Ratkowsky. O perfil de temperatura no interior da embalagem, durante o processo de refrigeração, foi obtido a partir da resolução da equação de difusão do calor em coordenadas cilíndricas pelo método numérico de diferenças finitas.

Para validar o modelo, foram empregados três cenários de refrigeração distintos: 12°C/12h, 5°C/12h e 16°C/3h seguido de 5°C/9h. Ao final de cada tratamento, comparou-se o crescimento de *E. coli* predito pelo modelo com o valor obtido experimentalmente em diversas posições radiais na embalagem ( $r/R$ ), todas situadas à meia altura. Os resultados mostraram boa aproximação entre os valores experimentais e os preditos a partir da modelagem matemática, como ilustram os gráficos da Figura 2.8.

Estudos similares a esse foram conduzidos por Ben Yaghlene *et al.* (2009) e Fujikawa (2011). Em particular no primeiro trabalho citado, os autores consideraram uma condição de contorno convectiva na fronteira do sistema modelado. Com isso, investigaram

o efeito do coeficiente de transferência de calor convectivo, além da espessura do produto e da temperatura do ar de refrigeração, sobre a dinâmica de crescimento de *E. coli*.



**Figura 2.8** – Curvas de crescimento de *E. coli*, medido por densidade ótica (OD), em diferentes posições radiais da embalagem ( $r/R$ ), durante o processo de refrigeração a 12°C/12h (A), 5°C/12h (B) e 16°C/3h seguido de 5°C/9h (C).  
(Fonte: adaptado de Bellara *et al.*, 2000)

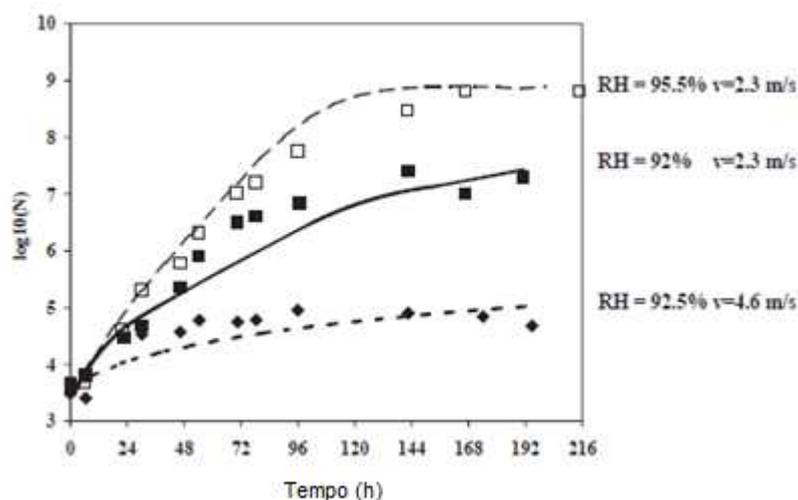
### 2.6.2 Integração de modelos no processo de secagem

Lebert *et al.* (2005) propuseram a integração entre modelos preditivos microbiológicos e de transferência de massa para prever o crescimento *Listeria innocua* na superfície de um meio sólido (gelatina gel) submetido ao processo de secagem. O crescimento microbiano ao longo do tempo foi previsto a partir de dados da literatura. Usando o modelo secundário cardinal proposto por Augustin (1999), foram obtidos os valores da taxa de crescimento e do tempo de duração da fase lag para o microrganismo em questão, em determinadas condições de estudo. A partir desses valores, empregando o modelo primário logístico de Rosso, Lebert *et al.* (2005) obtiveram a curva de crescimento de *L. innocua*.

Já o modelo de transferência de massa (água) desenvolvido pelos pesquisadores baseou-se na proposta de Baucour (2000), o qual é capaz de prever o teor de água na superfície de um produto sujeito ao processo de secagem. Segundo o modelo, a transferência de água no interior do produto foi descrita pela 2ª Lei de Fick para a difusão de

massa com uma condição de contorno convectiva na interface produto/ar de secagem. Posteriormente, conhecendo o teor de água na superfície do produto, os autores utilizaram um modelo termodinâmico (UNIFAC) para relacionar essa variável com a atividade de água.

O modelo matemático obtido a partir da integração desses modelos parciais foi resolvido numericamente pelo método de diferenças finitas. Ele foi validado em diferentes cenários de secagem, como mostra a Figura 2.9.



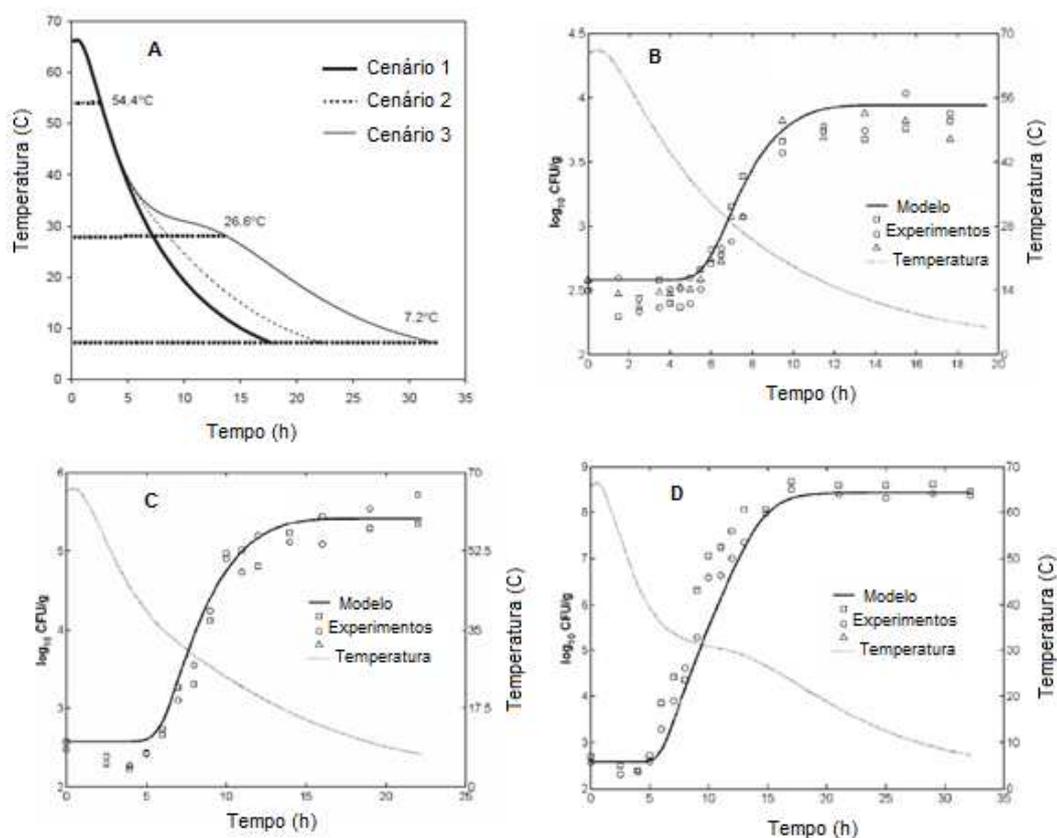
**Figura 2.9** – Curvas de crescimento de *L. innocua* previstas pelo modelo matemático (linhas) e observado experimentalmente (pontos) em diferentes condições de umidade relativa (RH) e de velocidade do ar ( $v$ ) durante o processo de secagem. (Fonte: adaptado de Lebert *et al.*, 2005)

### 2.6.3 Integração de modelos para avaliar falhas no processo de refrigeração

Amézquita *et al.* (2005) conduziram um estudo para modelar o crescimento de *Clostridium perfringens* durante a refrigeração de presunto cozido, em condições de estado transiente. Para isso, foi desenvolvido um modelo de transferência de calor para o produto com formato elipsoidal, submetido à temperatura inicial não homogênea e à condição de contorno que combinava diferentes mecanismos de transferência de calor (troca convectiva, por radiação e evaporativa). Nesse modelo, considerou-se que as propriedades termofísicas do produto eram função da temperatura.

No estudo, foi empregado o modelo preditivo primário de Baranyi e o modelo secundário do tipo raiz quadrada de Ratkowsky para descrever o crescimento do microrganismo em condições dinâmicas de temperatura. O modelo matemático integrado foi validado a partir de experimentos realizados em três cenários de operação do sistema de refrigeração, como mostra a Figura 2.10. No cenário 1, utilizou-se o procedimento de

refrigeração padrão, estabelecido pelo serviço de inspeção e segurança alimentar local. Nos demais cenários, foram simuladas as condições de falhas no sistema de refrigeração por 1 hora (cenário 2) e 6 horas (cenário 3).



**Figura 2.10** – Curvas de crescimento de *C. perfringens* simuladas em três cenários de operação do processo de refrigeração. Em (A), mostram-se os três perfis temporais de temperatura testados para o produto no modelo. Em (B), (C) e (D), apresentam-se os resultados das simulações para os cenários (1), (2) e (3), respectivamente.

(Fonte: adaptado de Amézquita *et al.*, 2005)

Os pesquisadores concluíram que o modelo desenvolvido conseguiu descrever satisfatoriamente o comportamento de *C. perfringens* em presunto cozido submetido a cada um dos cenários de operação avaliados. Contudo, enquanto nos cenários (1) e (2), o modelo superestimou o crescimento do microrganismo (falha segura), no cenário (3), o resultado foi subestimado, gerando uma condição de falha insegura.

Cepeda *et al.* (2013) realizaram um estudo semelhante ao de Amézquita *et al.* (2005). Contudo, nesse caso, o alimento foi analisado tridimensionalmente e apresentava formato irregular. O modelo de Cepeda *et al.* (2013) foi validado em condições reais de

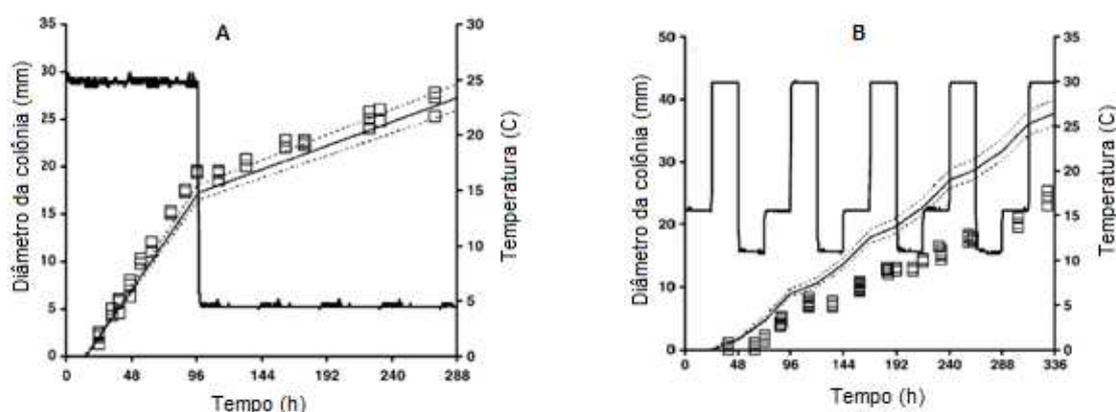
processamento e o trabalho apresentou uma breve discussão sobre os fatores que afetam o processo de resfriamento pelo efeito evaporativo.

#### 2.6.4 Integração de modelos para avaliar o crescimento de fungos

Gougouli e Koutsoumanis (2010) realizaram um estudo para avaliar o efeito de oscilações na temperatura sobre o tempo de vida útil de iogurte durante o seu transporte, distribuição e armazenamento. Argumentaram que fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são os contaminantes encontrados com maior frequência nesse alimento e, por isso, o estudo foi conduzido com cepas de *A. niger* e *P. expansum*. O meio de cultura utilizado no trabalho foi ágar extrato de malte (MEA), com pH ajustado para 4,2, procurando reproduzir o pH do produto real.

O modelo linear foi utilizado para prever o crescimento do diâmetro da colônia de fungos ao longo do tempo. Para avaliar o efeito da temperatura sobre os parâmetros desse modelo preditivo primário, foi empregado o modelo cardinal de Rosso.

A validação do modelo matemático desenvolvido por Gougouli e Koutsoumanis (2010) foi realizada a partir da condução de experimentos independentes em que o crescimento dos microrganismos selecionados foi investigado para vários perfis de temperatura. Nestas avaliações, mudanças de temperatura foram efetuadas antes e após a finalização da fase lag. A Figura 2.11 mostra os resultados de alguns dos testes de validação.



**Figura 2.11** – Curvas de crescimento de *P. expansum* submetido à condição de 25°C/97h seguido de 5°C/191h (A) e à condição de oscilação cíclica de temperatura, constituída por 15°C/24h, 30°C/24h e 10°C/24h (B).

(Fonte: adaptado de Gougouli e Koutsoumanis, 2010)

Os autores concluíram que mudanças de temperatura próxima ou fora da zona de crescimento produziram predições menos exatas. Contudo, salientaram que as falhas nas predições encontravam-se na condição segura.

Estudos similares a esse foram conduzidos para avaliar o efeito de condições dinâmicas de temperatura sobre o percentual de germinação de esporos de *P. expansum* e *A. niger* (GOUGOULI, KOUTSOUMANIS, 2012) e para determinar o tempo de vida útil do iogurte sob influência da temperatura e do tamanho do inóculo, considerando doze espécies de fungos (GOUGOULI *et al.*, 2011).

## 2.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS DO CAPÍTULO

---

Neste capítulo, evidenciou-se a existência de modelos matemáticos bem estabelecidos na literatura para estudar o crescimento de microrganismos (Seção 2.4). Também foram abordados aspectos clássicos de transferência de calor, enfatizando-se o uso de equações que permitem determinar o perfil de temperatura em um produto em diversas condições de operação (Seção 2.5). Contudo, demonstrou-se que a integração entre modelos desses dois ramos do conhecimento é um tema pouco explorado na literatura e muito incipiente quando se trata do estudo de crescimento de fungos. Em contrapartida, tal abordagem permitiria avaliar de forma mais realista os fenômenos que ocorrem em um alimento durante o seu processamento e armazenamento. Com tal tratamento, seria possível investigar vários cenários de operação e identificar aqueles que minimizam o desenvolvimento de fungos. Em termos práticos, tal abordagem apresenta aplicação direta na avaliação do tempo de vida útil de produtos alimentícios.

Mostrou-se, ainda, que as frutas são substratos sensíveis à deterioração causada por fungos, devido às propriedades intrínsecas desse grupo de alimentos, como o seu baixo pH. Dentre as diversas espécies de fungos filamentosos de interesse na área de processamento de alimentos, destacaram-se os indivíduos da espécie *Byssochlamys fulva*, pelos motivos discutidos na Seção 2.2. Apontou-se, também, que o mamão apresenta características sensoriais e nutricionais que tornam essa fruta bastante apreciável pelos consumidores. Quando se encontra em estado adequado de maturação, essa fruta não apresenta valores de pH muito baixos, comparativamente a alimentos similares. Na forma minimamente processada, sua polpa é exposta diretamente ao ambiente. Todos esses fatores, aliados às questões de mercado apresentadas na Seção 2.1, motivaram a seleção desse alimento para ser o substrato para o estudo do crescimento de *B. fulva* em uma abordagem que integre modelos preditivos microbianos e modelos de transferência de calor.

Adicionalmente, a refrigeração é uma operação muito utilizada para conservar produtos alimentícios, principalmente frutas. Desta forma, é natural que a modelagem matemática seja utilizada para investigar a relação existente entre as variáveis de processo e o tempo de vida útil da polpa de mamão minimamente processado e refrigerado, contaminada com esporos de *B. fulva*. Com isso, é possível explorar diferentes estratégias de processamento e verificar qual é a forma mais conveniente para reduzir a perecibilidade desse alimento.

Paralelamente, mostrou-se que muitos estudos foram conduzidos com o uso meios de cultura artificiais. É necessário que o comportamento de crescimento de fungos e, em particular, de *Byssochlamys fulva*, seja analisado em meios alimentícios reais ou que, ao menos, comprove-se que o meio de cultura artificial reproduz satisfatoriamente o comportamento observado para o microrganismo no alimento real.

Em vista de todos esses aspectos, o Quadro 2.4 apresenta as questões de pesquisa que foram elaboradas a partir das lacunas identificadas neste capítulo e que serão respondidas nesta tese. Ainda, nesse quadro referenciam-se os artigos produzidos no presente trabalho em que cada uma dessas questões de pesquisa foi objeto de estudo.

**Quadro 2.4** - Questões de pesquisa estudadas neste trabalho e respectivos artigos científicos que foram desenvolvidos para tratar cada uma dessas questões.

Questão de pesquisa	Artigo
1. A taxa de crescimento de <i>B. fulva</i> em polpa de mamão é maior do que em polpas de melão, tomate, pêssogo, abacaxi e morango, devido à sua constituição química e, particularmente, ao seu pH moderado? 2. Que modelo preditivo melhor descreve o comportamento de crescimento de <i>B. fulva</i> em diferentes polpas de frutas?	Artigo 1 EVALUATING THE GROWTH KINETICS MODEL FOR <i>BYSSOCHLAMYS FULVA</i> IN FRUIT PULPS
3. O pH do substrato tem efeito significativo no crescimento de <i>Byssochlamys fulva</i> em condições de temperatura ótima (36°C) ou subótima (28°C)? 4. Que modelos preditivos primários e secundários melhor descrevem o comportamento de crescimento de <i>B. fulva</i> em meio de cultura artificial em função do seu pH e do seu teor de açúcar (em termos de glicose) em diferentes temperatura de armazenamento?	Artigo 2 MODELO PREDITIVO PARA AVALIAR O EFEITO DA TEMPERATURA, DO PH E DO TEOR DE GLICOSE SOBRE A CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE <i>BYSSOCHLAMYS FULVA</i>
5. O abuso na temperatura inicial de armazenamento de polpa de mamão contaminada com esporos de <i>B. fulva</i> pode ser compensado pelas condições de refrigeração a que é submetido o produto, sem comprometer seu tempo de vida útil?	Artigo 3 INTEGRATING A KINETIC MICROBIAL MODEL WITH A HEAT TRANSFER MODEL TO PREDICT <i>BYSSOCHLAMYS FULVA</i> GROWTH IN REFRIGERATED PAPAYA PULP.

(continua)

**Quadro 2.4** - Questões de pesquisa estudadas neste trabalho e respectivos artigos científicos que foram desenvolvidos para tratar cada uma dessas questões (continuação)

Questão de pesquisa	Artigo
<p>6. Qual é o efeito da temperatura inicial do produto e da velocidade do ar da corrente de refrigeração sobre o tempo de vida útil da polpa de mamão refrigerada e contaminada com esporos de <i>B. fulva</i>?</p>	<p>Artigo 3</p> <p>INTEGRATING A KINETIC MICROBIAL MODEL WITH A HEAT TRANSFER MODEL TO PREDICT <i>BYSSOCHLAMYS FULVA</i> GROWTH IN REFRIGERATED PAPAYA PULP.</p>
<p>7. Se houver abuso na temperatura inicial de armazenamento da polpa de mamão contaminada com esporos de <i>Byssochlamys fulva</i> e o sistema de refrigeração for limitado quanto à transferência de calor por convecção, o tempo de vida útil do produto poderá não ser comprometido, se forem propiciadas condições para ocorrer o efeito do resfriamento provocado pela evaporação da água superficial em complementação ao resfriamento estritamente convectivo na superfície do alimento?</p> <p>8. Comparando o processo de resfriamento do alimento exclusivamente por convecção com o processo que conjugue os efeitos convectivo e evaporativo, qual é o ganho no tempo de vida útil do alimento?</p>	<p>Artigo 4</p> <p>MODELAGEM E SIMULAÇÃO DO CRESCIMENTO DE <i>BYSSOCHLAMYS FULVA</i> EM POLPA DE MAMÃO SUBMETIDO AO PROCESSO DE RESFRIAMENTO COM EFEITO EVAPORATIVO</p>

No próximo capítulo desta tese, serão descritos os procedimentos utilizados para a obtenção dos dados experimentais que permitiram responder as questões de pesquisa elaboradas neste estudo.

## Capítulo 3

### Materiais e Métodos

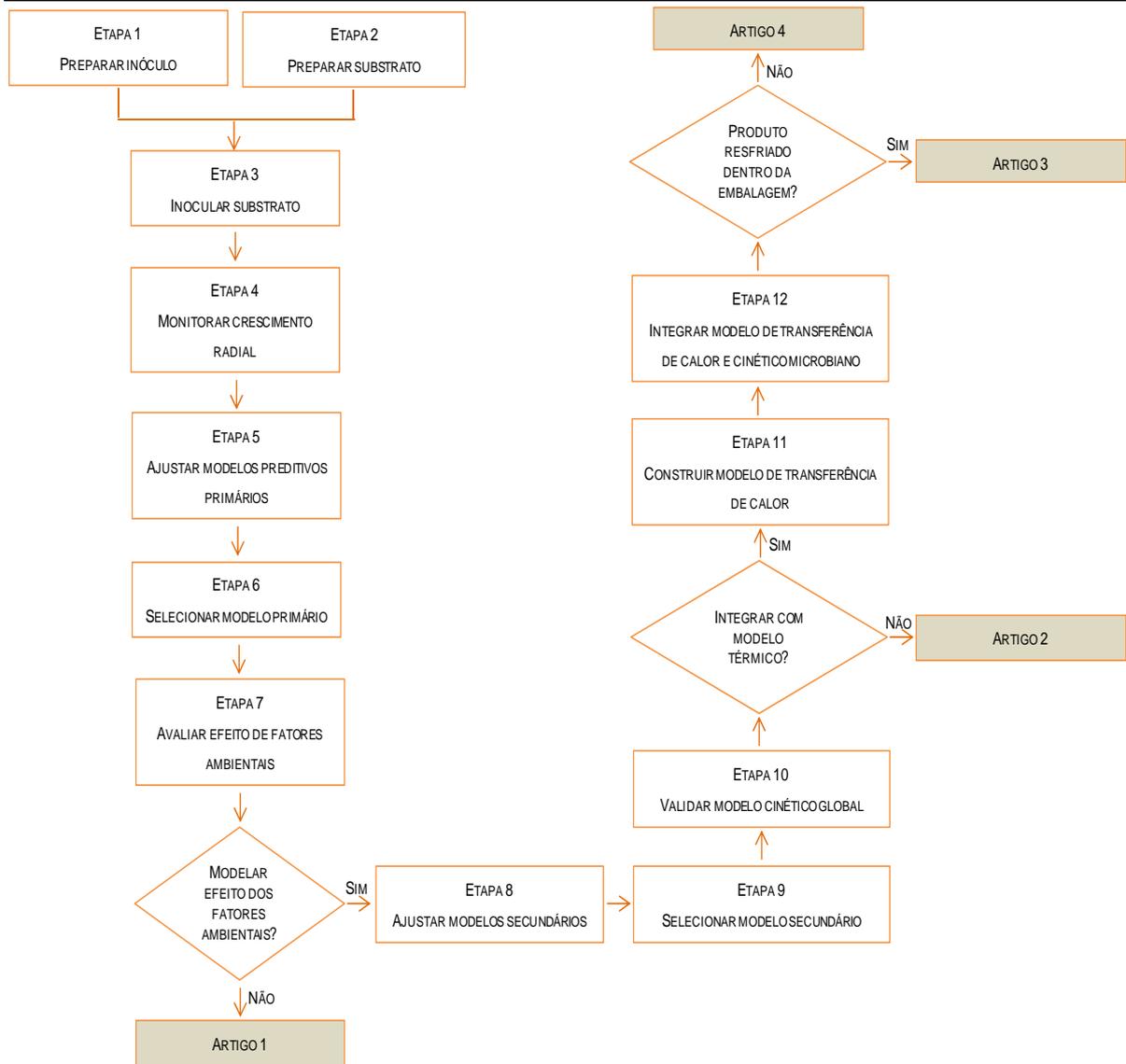
O procedimento experimental utilizado para responder às questões de pesquisa tratadas nesta tese é esquematicamente representado na Figura 3.1. Vale ressaltar que, para a condução de alguns estudos, foi necessária a execução parcial desse procedimento, como ocorreu nos ensaios realizados para a elaboração dos artigos 1 e 2.

A seguir, descrevem-se detalhadamente as etapas utilizadas nos experimentos. Elas serão sucintamente retomadas nos artigos científicos propostos nos Capítulos 4, 5, 6 e 7 deste trabalho. Caso o leitor julgue conveniente, pode seguir diretamente para essas seções. Havendo dúvidas nos artigos sobre os ensaios experimentais, sugere-se que ele retorne a esta parte do texto para esclarecê-las.

#### 3.1 PREPARAÇÃO DA COLÔNIA MATRIZ

---

Esporos liofilizados de *Byssochlamys fulva* Olliver et Smith teleomórfico (ATCC® 10099™), cepa NRRL 1125 (ver anexo A), isolados a partir de frutas, foram adquiridos da Coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello (Campinas, SP). No laboratório, a ampola contendo esse material foi desinfetada com gaze embebida em solução hidroalcoólica a 70% (v/v). Após, a ampola foi aberta em câmara de fluxo laminar e próximo à chama do bico de Bunsen. Com o auxílio de uma pinça, removeu-se o tampão de algodão que havia em seu interior para proteger os esporos. Com o uso de uma pipeta automática, 0,2 mL de água estéril foi adicionado à ampola, visando promover a reidratação e a suspensão dos esporos. O sistema foi mantido em repouso por 30 minutos.



**Figura 3.1** - Fluxograma das etapas que constituem o procedimento experimental global utilizado na tese.

Posteriormente, a suspensão obtida foi vertida sobre placa de Petri contendo meio ágar batata dextrose (BDA), sendo em seguida levada para estufa bacteriológica Biopar, ajustada para a temperatura de 28°C, onde permaneceu por 12 dias.

Após esse período, observou-se que a superfície do meio de cultura havia sido totalmente coberta pela colônia de *B. fulva*, como mostra a Figura 3.2. Essa placa constituiu a geração F1 do microrganismo (colônia matriz), tendo sido reservada e armazenada sob refrigeração, a 10°C, durante toda a fase experimental. A cada novo ensaio, fragmentos da colônia matriz eram retirados dessa placa e inoculados novamente, dando origem à geração F2, utilizada nos diversos experimentos promovidos neste trabalho.



**Figura 3.2** - Fotografia de uma colônia de *B. fulva* crescida sobre meio de cultura BDA

### 3.2 PREPARAÇÃO DO INÓCULO

Nos estudos conduzidos nesta tese, dois substratos foram utilizados como meios de cultura para o crescimento do inóculo: ágar batata dextrose (BDA) e ágar extrato de malte (MEA). O BDA foi empregado no experimento em que houve a inoculação do microrganismo na fase micelial (artigo 1). Já o MEA foi utilizado nos ensaios em que a inoculação foi realizada a partir de esporos de *B. fulva* (artigos 2, 3 e 4). Isto ocorreu porque se verificou que em BDA esse microrganismo apresentava pouca formação de esporos. Além disso, MEA foi o meio de cultura utilizado nos estudos tomados como referência, tais como Kotzekidou (1997) e Panagou *et al.* (2010).

Ambos os substratos foram preparados com água destilada e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos. O BDA foi vertido em placa de Petri, devido à aplicação que seria dada a ele, enquanto o MEA foi preparado em tubo de ensaio inclinado. Os meios de cultura sempre foram preparados entre um e dois dias antes de sua utilização nos experimentos, evitando-se assim o seu ressecamento, eventuais contaminações ou, ainda, a sua degradação.

#### 3.2.1 Preparação do inóculo em meio BDA

A placa contendo a colônia matriz foi aberta em capela de fluxo laminar e seus fragmentos foram transferidos para o centro da placa contendo BDA. Essa placa foi, então, armazenada em estufa bacteriológica, a 28°C, por 28 dias, para a obtenção de colônia bem desenvolvida. Após, com o uso de um tubo metálico com 8 mm de diâmetro interno, previamente esterilizado na chama do bico de Bunsen, foram preparados vários discos de

BDA contendo a colônia de *B. fulva*. Esses discos foram inoculados nos substratos alimentícios imediatamente após a sua preparação.

### 3.2.2 Preparação do inóculo em meio MEA

Em capela de fluxo laminar e próximo à chama do bico de Bunsen, a placa contendo a colônia matriz foi aberta e seus fragmentos foram transferidos para tubo de ensaio contendo MEA inclinado. Com auxílio de alça de platina, previamente flambada, esses fragmentos foram espalhados sobre a superfície do meio de cultura, para propiciar o crescimento uniforme da colônia. O tubo de ensaio foi fechado com chumaço de algodão e levado para estufa bacteriológica, a 28°C, onde permaneceu pelo período de 21 dias para a obtenção de colônia esporulada.

Nos trabalhos de referência utilizados nesta etapa do procedimento experimental – Kotzekidou (1997) e Panagou *et al.* (2010), os valores citados para o tempo de crescimento da colônia foram 30 dias e 10 dias, respectivamente. Contudo, durante os experimentos conduzidos no presente estudo, verificou-se que em 10 dias de cultivo havia pouca produção de esporos na colônia e eles encontravam-se firmemente aderidos às hifas, como mostra a fotografia apresentada na Figura 3.3.



**Figura 3.3** - Fotografia do processo de formação de esporos, durante microcultivo, obtida na ocular do microscópio ótico com aumento de 10x na ocular e de 40x na objetiva. No detalhe em vermelho, observam-se os esporos sendo formados e aderidos à estrutura micelial.

Com 21 dias de cultivo, verificou-se que havia mais esporos e eles estavam livres. Por esse motivo e por questão de otimização do tempo de cada ensaio, foi adotado 21 dias como o padrão de tempo de cultivo do inóculo neste trabalho.

Finalizado o tempo de cultivo, o tubo de ensaio foi aberto na câmara de fluxo laminar, próximo à chama do bico de Bunsen. A superfície da colônia foi lavada com duas alíquotas de solução aquosa de Tween-20 a 5% (v/v), previamente preparada, esterilizada e armazenada sob refrigeração até o momento de uso. Fez-se leve movimento manual com o tubo de ensaio para que toda a superfície tivesse contato com a solução aquosa de Tween-20, armazenando-se posteriormente essas alíquotas em um tubo falcon.

Diferentemente dos trabalhos de referência, neste estudo não foi efetuada a raspagem da superfície da colônia com bastão de vidro estéril. Por consequência, não foi observada a necessidade de filtrar em gaze estéril a suspensão preparada, pois a análise microscópica da suspensão de esporos não mostrou a presença de micélio. A exclusão da etapa de raspagem da superfície da colônia visou reproduzir no procedimento experimental o que de fato ocorre na natureza. O autor entende que os esporos responsáveis pela contaminação do alimento são aqueles que estão livres e não aqueles firmemente aderidos à colônia.

Após a preparação da suspensão de esporos, fez-se a sua contagem e padronização, com o auxílio de câmara de Neubauer espelhada, analisada em microscópio ótico (Nikon Alphaphot-2 YS2, Japão). A visualização dos esporos na câmara de Neubauer foi mostrada na Figura 2.2(a).

Assim como nos trabalhos de Panagou *et al.* (2010) e Gougouli e Koutsoumanis (2010), a suspensão de esporos obtida foi inoculada imediatamente após a preparação. Neste estudo, como nos referidos trabalhos, não foi efetuado qualquer tratamento de ativação dos esporos. Isto visa tornar o procedimento experimental o mais próximo possível do que se observaria em uma situação real de contaminação de alimento que não sofre tratamento térmico prévio, objeto dos estudos de aplicação desta tese.

### 3.3 PREPARAÇÃO DOS SUBSTRATOS

---

Nesta tese, foram utilizados dois tipos de meio de cultura para estudar o crescimento de *B. fulva*: um substrato alimentício constituído de polpa de frutas e um substrato artificial, à base de caldo de batata dextrose. A seguir, descreve-se o procedimento adotado na preparação de cada substrato.

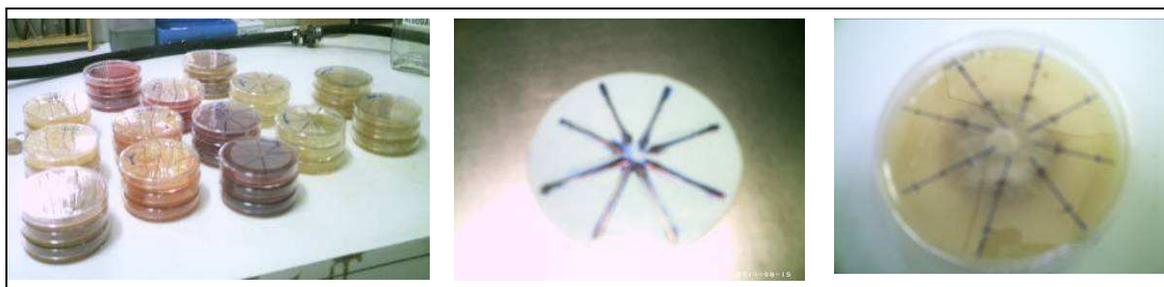
### 3.3.1 Substrato alimentício

Os substratos alimentícios utilizados neste trabalho são polpas de seis variedades de frutas tipicamente consumidas pela população regional: melão espanhol, mamão papaia, tomate longa vida, morango, pêsego e abacaxi pérola. Além do aspecto mercadológico, utilizou-se como critério para a seleção dessas frutas a sua proximidade com o solo durante o seu desenvolvimento. *B. fulva* é um fungo de solo e, portanto, quanto mais próximo desse meio estiver o alimento, mais susceptível ele será à contaminação por esse microrganismo.

O procedimento de preparação das polpas consistiu na aquisição de exemplares em estágio de maturação próprio para consumo imediato; sua limpeza e descascamento, quando necessário; trituração com auxílio de Ultra mixer (Britânia, Brasil) até a total desintegração da polpa; dosagem de ágar bacteriológico na proporção de 0,5% (m/v), para a obtenção de meio de cultivo com consistência semissólida; e esterilização em autoclave, a 121°C por 15 minutos. Devido à acidez das polpas de abacaxi e de morango, a dosagem de ágar teve que ser aumentada para 1,5% (m/v). Segundo Huang *et al.* (2010), o aumento na dosagem de ágar de 2,5 a 12,5% (m/m) não é suficiente para alterar o tempo necessário para a germinação de esporos de fungos. Por esse motivo, conclui-se que esse pequeno aumento na dosagem de ágar nas polpas de abacaxi e de morango não interferiria nos resultados obtidos.

Após a esterilização, as polpas foram vertidas em placas de petri descartáveis com 90 mm de diâmetro, em capela de fluxo laminar. A borda das placas foi recoberta com filme de PVC transparente para minimizar a perda de água e evitar contaminações durante seu armazenamento. Inicialmente, as placas foram mantidas por 24 horas em estufa bacteriológica e, após, armazenadas sob refrigeração até o momento da inoculação.

Para auxiliar o monitoramento do aumento do raio da colônia de fungos, previamente à inoculação, cada placa foi marcada com linhas perpendiculares em sua base, utilizando-se um gabarito, como é ilustrado na Figura 3.4.



**Figura 3.4** - Placas contendo meio de cultura alimentício (à esquerda); gabarito utilizado na marcação das placas (centro) e placa com marcação em sua base (à direita).

### 3.3.2 Substrato artificial

Para estudar o efeito da temperatura, do pH e do teor de glicose sobre o crescimento de *B. fulva* (artigo 2), foi preparado um meio de cultura artificial dissolvendo-se 2% (m/v) de caldo de batata dextrose em água destilada. A esse meio basal, foram adicionadas diferentes massas de glicose anidra para ajustar o teor de glicose. Gotas de solução aquosa de ácido clorídrico 1 M e de hidróxido de sódio 1 M foram adicionadas para ajustar o pH do meio, conforme previsto no planejamento experimental específico. O monitoramento do pH foi efetuado em pHmetro digital de bancada da marca ION Ph B500. À solução obtida, foram adicionadas, ainda, massas de ágar bacteriológico em teores distintos, conforme o pH do meio de cultura. A composição dos substratos artificiais é mostrada no Quadro 3.1. Novamente, a solução preparada foi esterilizada a 121°C por 15 minutos. Após a esterilização, o meio de cultura foi vertido em placas de petri com 90 mm de diâmetro.

**Quadro 3.1** - Composição dos meios de cultura artificiais utilizados no estudo da influência da temperatura, do pH e do teor de glicose sobre o crescimento de *B. fulva*.

Teor de glicose	pH		
	4	5	6
0 %	60 mL de água destilada 1,2 g de caldo de batata dextrose 1,08 g de ágar bacteriológico	60 mL de água destilada 1,2 g de caldo de batata dextrose 0,84 g de ágar bacteriológico	
5 %	60 mL de água destilada 1,2 g de caldo de batata dextrose 3 g de glicose anidra 1,08 g de ágar bacteriológico	60 mL de água destilada 1,2 g de caldo de batata dextrose 3 g de glicose anidra 0,84 g de ágar bacteriológico	
10 %	60 mL de água destilada 1,2 g de caldo de batata dextrose 6 g de glicose anidra 1,08 g de ágar bacteriológico	60 mL de água destilada 1,2 g de caldo de batata dextrose 6 g de glicose anidra 0,84 g de ágar bacteriológico	

Da mesma forma que as placas contendo o substrato alimentício, as placas com o meio de cultura artificial tiveram a sua lateral recoberta com filme de PVC transparente, foram mantidas em estufa bacteriológica a 28°C durante 24 horas e depois, armazenadas sob refrigeração até o momento da inoculação. Elas também tiveram a sua base marcada com o gabarito mostrado na Figura 3.4 para permitir o melhor monitoramento do crescimento da colônia.

---

### 3.4 INOCULAÇÃO DOS SUBSTRATOS

---

Todo o procedimento de inoculação das placas foi realizado em capela de fluxo laminar. O inóculo constituído por discos contendo a colônia de *B. fulva*, preparados conforme descrito na Seção 3.2.1, foi colocado no ponto centro das placas de Petri em posição invertida, para que a colônia estivesse em contato direto com o meio de cultura. As placas foram fechadas, seladas com filme de PVC e armazenadas em estufa bacteriológica, na condição de temperatura estabelecida no planejamento experimental específico.

Para o inóculo constituído por esporos de *B. fulva*, o ponto central de cada placa recebeu uma alíquota da suspensão de esporos (Seção 3.2.2), visando atingir a concentração entre  $10^3$  e  $10^4$  esporos/placa. De acordo com Sant'Ana *et al.* (2010a), esta concentração de esporos é tipicamente recomendada para testes microbiológicos. Além deste aspecto, o trabalho de Shinagawa (2009) apontou a presença de  $6.10^3$  UFC/g para esporos de fungos filamentosos em polpa de mamão. A transferência dessa alíquota foi realizada com auxílio de pipeta automática. As placas foram seladas com filme de PVC e armazenadas em estufa bacteriológica, nas condições previstas no planejamento experimental específico.

---

### 3.5 MONITORAMENTO DO CRESCIMENTO DA COLÔNIA

---

O monitoramento do crescimento da colônia de *B. fulva* durante os experimentos consistiu em medir periodicamente o diâmetro alcançado pela colônia em cada uma das linhas perpendiculares traçadas na base das placas. Na Figura 3.5, ilustra-se o resultado da aplicação deste procedimento para um dos ensaios realizados.

Quando toda a superfície do meio de cultura estava coberta pela colônia do fungo filamentoso, os experimentos eram finalizados e realizava-se a leitura das marcações de diâmetro da colônia com régua. Na construção dos modelos matemáticos foram empregados os valores de raio da colônia *versus* tempo. Para isso, primeiro foram calculados os valores médios dos diâmetros lidos em um mesmo instante e, em um segundo momento, determinou-se o raio associado a essa medida. Os dados desse monitoramento de crescimento da colônia de *B. fulva* nos diversos ensaios experimentais efetuados neste trabalho são apresentados nos apêndices A, B e C.



**Figura 3.5** - Monitoramento do crescimento de *B. fulva* em polpa de abacaxi

### 3.6 AJUSTE DOS MODELOS PRIMÁRIOS

Inicialmente, os dados experimentais de raio da colônia *versus* tempo foram analisados em gráficos, visando verificar o formato da curva obtida. Esses gráficos foram traçados com o auxílio da planilha eletrônica Excel do pacote Microsoft Office 2010<sup>®</sup>.

Após, os modelos cinéticos de crescimento descritos na Seção 2.4.1 foram ajustados aos dados experimentais, visando determinar os valores da taxa de crescimento radial ( $\mu$ ) e do tempo de duração da fase lag ( $\lambda$ ) para cada curva. Para a construção do modelo linear foi utilizada a planilha eletrônica Excel. Neste caso, os dados de raio da colônia *versus* tempo passaram por análise de regressão linear simples, cujo coeficiente angular forneceu a estimativa para o parâmetro  $\mu$ . Por sua vez, a partir do coeficiente linear, obteve-se a estimativa para o parâmetro  $\lambda$ . No caso específico da avaliação de crescimento de *B. fulva* utilizando como inóculo discos de micélio do fungo, a fase lag foi calculada a partir da interseção entre a reta de ajuste dos pontos experimentais e a posição  $y = 4$  mm, correspondente ao raio inicial da colônia ( $y_0$ ). Nos experimentos em que o inóculo foi constituído por suspensão de esporos, a fase lag era determinada pela interseção entre a parte linear da curva e o eixo das abscissas. Durante a análise de regressão linear, procurou-se não descartar nenhum ponto da curva. Quando se evidenciava que um ponto apresentava um distanciamento notável do comportamento linear, esse ponto não era considerado no ajuste do modelo matemático aos dados experimentais.

Os demais modelos cinéticos de crescimento são equações não-lineares e, por isso, seu ajuste foi realizado aplicando-se um algoritmo desenvolvido no *software* Matlab 5.3 da Mathworks®. Tal rotina baseia-se na função interna do aplicativo denominada de *lsqnonlin*.

### 3.7 SELEÇÃO DO MODELO PRIMÁRIO

Em todos os estudos, foi utilizada mais de uma equação para descrever o comportamento do microrganismo observado experimentalmente. Desta forma, tornou-se necessário comparar estatisticamente o desempenho desses modelos preditivos. Para isso, foram utilizados os índices estatísticos propostos nos trabalhos de Giffel e Zwietering (1999), López *et al.* (2004) e van Boekel e Zwietering (2007), os quais estão compilados no Quadro 3.2.

**Quadro 3.2** - Relação dos índices estatísticos utilizados no processo de comparação e validação de modelos matemáticos

Índice estatístico	Definição	Interpretação	Equação
Soma dos quadrados dos resíduos ( <i>Residual sum of squares</i> – RSS)	$RSS = \sum_{i=1}^n (u_{obs,i} - u_{pred,i})^2$	Medida da discrepância entre o valor experimental e o valor predito pelo modelo matemático. Quanto menor o valor de RSS, melhor o modelo ajusta-se aos dados experimentais.	(Eq. 3.1)
Fator BIAS	$BIAS = 10 \frac{\sum_{i=1}^n \log(u_{pred,i}) - \log(u_{obs,i})}{n}$	Indicador do desvio médio relativo existente entre os valores preditos pelo modelo matemático e os valores observados experimentalmente. Informa se os valores preditos pelo modelo matemático estão sub ou superestimados. Se o ajuste fosse perfeito, BIAS seria igual a 1.	(Eq. 3.2)
Fator de exatidão ( <i>Accuracy Factor</i> – AF)	$AF = 10 \frac{\sum_{i=1}^n  \log(u_{pred,i}) - \log(u_{obs,i}) }{n}$	Medida de discrepância entre valores experimentais e valores preditos por modelos matemáticos. Ele indica como os valores experimentais espalham-se em torno dos valores preditos. Assume valor maior ou igual a 1. Quanto maior o valor de AF, menos exato é o modelo matemático ao descrever o comportamento dos dados experimentais.	(Eq. 3.3)

(continua)

**Quadro 3.2** - Relação dos índices estatísticos utilizados no processo de comparação e validação de modelos matemáticos (continuação)

Índice estatístico	Definição	Interpretação	Equação
Critério de informação Bayesiana – BIC	$BIC = n \cdot \ln\left(\frac{RSS}{n}\right) + p \cdot \ln(n)$	Índice utilizado para comparar o desempenho de diferentes modelos matemáticos empregados para descrever o comportamento de valores experimentais. Este índice introduz uma penalidade aos modelos que apresentam maior número de parâmetros de ajuste. Quanto menor o valor de BIC, melhor é o desempenho do modelo ao descrever o comportamento dos dados experimentais.	(Eq. 3.4)
Raiz quadrada do erro quadrático médio ( <i>Root mean square error</i> – RMSE)	$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (u_{pred,i} - u_{obs,i})^2}{n - p}}$	Índice que avalia o desvio médio existente entre dados experimentais e valores preditos por modelos matemáticos, também penalizando aqueles que utilizam maior quantidade de parâmetros para efetuar o ajuste aos dados experimentais. Quanto menor o valor de RMSE, melhor é o desempenho do modelo ao descrever o comportamento dos dados experimentais.	(Eq. 3.5)

Nas Equações (3.1) a (3.5),  $u_{obs}$  e  $u_{pred}$  são os valores observados experimentalmente e preditos pelo modelo matemático analisado, respectivamente;  $n$  é o número total de observações feitas no experimento e  $p$  é o número de parâmetros do modelo matemático em questão.

Entende-se que modelos com mais parâmetros de ajuste têm desempenho substancialmente melhor em relação a equações com menos parâmetros. Neste aspecto, os dois últimos índices estatísticos apresentados no Quadro 3.2 diferenciam-se dos demais, pois eles penalizam os modelos matemáticos constituídos por mais parâmetros.

Em cada estudo conduzido nesta tese, o modelo que apresentou o melhor desempenho para a maioria dos índices estatísticos foi selecionado para a utilização nas etapas seguintes.

---

### 3.8 AVALIAÇÃO DO EFEITO DE FATORES AMBIENTAIS

---

Para avaliar o efeito dos fatores ambientais (temperatura, pH, teor de glicose, teor de umidade do substrato, teor de sólidos solúveis) sobre cada parâmetro de ajuste dos modelos primários ( $\mu$ ,  $\lambda$  e  $y_{MAX}$ ) foi empregada a técnica estatística conhecida como análise de variância (*Analysis of Variance* – ANOVA). Em complementação à ANOVA, e quando necessário, foi utilizado o teste de Tukey para estabelecer os grupos estatisticamente diferentes. Em todas as análises estatísticas, foi adotado o nível de significância ( $\alpha$ ) igual a 0,05.

Por meio da avaliação proposta nesta etapa, foi possível identificar quais parâmetros dos modelos primários eram efetivamente dependentes das condições ambientais testadas. Isto permitiu direcionar a construção dos modelos preditivos secundários.

---

### 3.9 AJUSTE DOS MODELOS SECUNDÁRIOS

---

Esta etapa foi realizada nos estudos que contemplavam o desenvolvimento de expressões matemáticas capazes de descrever o efeito dos fatores ambientais sobre os parâmetros dos modelos preditivos primários. Para isso, foram utilizados os modelos matemáticos apresentados na Seção 2.4.2.

Na construção desses modelos, foram utilizados os valores médios para os parâmetros dos modelos primários ( $\mu$  e  $\lambda$ ), obtidos nas mesmas condições experimentais. Novamente, nesta etapa foi utilizado o algoritmo desenvolvido em Matlab, citado anteriormente.

---

### 3.10 SELEÇÃO DO MODELO SECUNDÁRIO

---

Os índices estatísticos listados no Quadro 3.2 foram utilizados nesta etapa para comparar o desempenho dos modelos secundários e selecionar aquele que melhor ajustou-se ao comportamento observado para o microrganismo a partir dos dados experimentais.

---

### 3.11 VALIDAÇÃO DO MODELO CINÉTICO GLOBAL

---

Após a construção e a seleção dos modelos preditivos (primário e secundário) que melhor descreveram o comportamento de crescimento de *B. fulva* nos diferentes experimentos realizados neste estudo, procedeu-se a etapa de validação. Para validar o

equacionamento desenvolvido, ensaios independentes foram conduzidos em condições distintas daquelas utilizadas na construção dos modelos matemáticos. O crescimento do microrganismo observado nesses experimentos foi comparado com aquele predito pelos modelos cinéticos. A única informação fornecida aos modelos cinéticos eram as condições ambientais em que o experimento havia sido realizado e, automaticamente, a curva de crescimento de *B. fulva* era traçada.

A comparação entre os valores preditos e os experimentais foi realizada graficamente e por meio de índices estatísticos (RSS, BIAS e AF). Para as situações em que se dispunha de muitas curvas cinéticas de crescimento para a mesma condição experimental, escolheu-se aleatoriamente algumas curvas para serem utilizadas na construção dos modelos matemáticos e as demais foram reservadas para a etapa de validação.

Para a validação dos modelos cinéticos em condições dinâmicas de temperatura, alguns experimentos foram conduzidos de forma a modificar a temperatura do substrato durante o crescimento de *B. fulva*. Os perfis temporais de temperatura estabelecidos tiveram por objetivo avaliar a capacidade do modelo matemático em prever o crescimento microbiano em condições de mudança suave, brusca e cíclica de temperatura. O desempenho dos modelos cinéticos foi monitorado graficamente e por meio dos referidos índices estatísticos. A utilização dos modelos preditivos primários nos testes de validação em condições dinâmicas de temperatura exigiu que eles fossem rescritos em sua forma dinâmica, como é apresentado no Apêndice C.4.

### 3.12 CONSTRUÇÃO DO MODELO DE TRANSFERÊNCIA DE CALOR

---

Nesta tese, o perfil temporal de temperatura aplicado ao alimento para avaliar o crescimento microbiano foi obtido a partir da resolução do equacionamento que descreve os fenômenos de transferência de calor no produto de interesse. Investigou-se o crescimento de *B. fulva* em fatias de mamão, que foram aproximadas pela geometria de placa plana. Portanto, para a construção desse modelo foi utilizada a Equação 2.16, apresentada na Seção 2.5.1.

No estudo conduzido para avaliar o efeito da temperatura inicial do produto e da velocidade do ar do sistema de refrigeração sobre o tempo de vida útil do alimento (artigo 3), as condições de contorno estabelecidas permitiram utilizar a solução exata para o problema de transferência de calor, conforme discutido na Seção 2.5.1. Como uma das condições de

contorno envolvia o mecanismo de transferência de calor por convecção forçada, foi necessário estimar o valor médio do coeficiente de troca térmica convectiva. Para isso, foram empregadas as correlações matemáticas apresentadas no Quadro 2.3.

Para o estudo em que o resfriamento da polpa de mamão foi analisado com o produto não embalado (artigo 4), foi necessário complementar o equacionamento do problema de transferência de calor, considerando o fenômeno do resfriamento com efeito evaporativo. Desta forma, a condição para a aplicação da solução exata do fenômeno de transferência de calor para placa plana deixou de ser satisfeita. Por isso, o equacionamento desenvolvido foi resolvido numericamente pelo método de diferenças finitas explícitas. Neste caso, o tempo de vida útil da polpa de mamão minimamente processado e refrigerado foi avaliado em função da temperatura inicial do produto e das condições da corrente de ar do sistema de refrigeração (velocidade e umidade relativa).

### 3.13 INTEGRAÇÃO DOS MODELOS TÉRMICO E CINÉTICO MICROBIANO

---

A integração entre o equacionamento que descreve os fenômenos de transferência de calor e de massa no alimento com o modelo cinético de crescimento microbiano foi estabelecida da seguinte forma:

- i. para determinadas condições de processamento (temperatura inicial do produto, velocidade e umidade relativa do ar do sistema de refrigeração), avaliou-se a evolução temporal da temperatura na superfície do alimento;
- ii. esse perfil de temperatura foi empregado para calcular os valores da taxa de crescimento radial ( $\mu$ ) e do tempo de duração da fase lag ( $\lambda$ ) do microrganismo ao longo do processo de refrigeração, conforme a relação estabelecida pelo modelo secundário selecionado;
- iii. os valores de  $\mu$  e de  $\lambda$  foram utilizados no modelo preditivo primário para estabelecer o perfil temporal de aumento do raio da colônia e determinar o tempo para que o microrganismo atingisse o raio crítico. Este tempo, no contexto desta tese, foi denominado de tempo de vida útil do produto.

É importante salientar que o modelo preditivo primário selecionado previamente, conforme discutido na Seção 3.7, teve de ser rescrito na forma diferencial ao ser integrado com o equacionamento de transferência de calor, pela natureza dinâmica do problema físico. A forma diferencial desses modelos é apresentada no Apêndice C.4.

Os resultados obtidos a partir da aplicação do procedimento descrito acima são apresentados nos próximos quatro capítulos desta tese na forma de artigos científicos. Antes, porém, faz-se uma breve introdução a esses capítulos, em que são descritos os objetivos e os principais resultados alcançados em cada estudo. Ainda, busca-se demonstrar ao leitor a relação existente entre os trabalhos e a forma como evoluiu a pesquisa ao longo da realização da tese.

## Introdução aos Capítulos 4, 5, 6 e 7

Nesta tese, o tradicional capítulo de resultados e discussão será apresentado na forma de artigos científicos, desmembrando-o em quatro capítulos parciais. Tal estrutura foi adotada porque o autor entende que desta forma organizam-se melhor os resultados obtidos em cada etapa do estudo, facilitando a compreensão do leitor.

O Capítulo 4 compreende as etapas do estudo que compuseram o artigo 1 – *Evaluating the growth kinetics model for Byssochlamys fulva in fruit pulps*. O objetivo desse trabalho foi investigar a suscetibilidade da polpa de mamão à deterioração causada por esse fungo filamentoso, comparativamente a outras polpas de frutas (melão, tomate, pêssigo, abacaxi, morango). Os resultados indicaram que a polpa de mamão é um substrato que favorece o desenvolvimento deste fungo, embora não tenha sido o alimento em que seu crescimento foi mais rápido. O estudo mostrou, ainda, uma correlação moderada entre a taxa de crescimento radial da colônia e o pH do meio de cultura, o que motivou o desenvolvimento do estudo apresentado no artigo seguinte.

No artigo 2 – Modelo preditivo para avaliar o efeito da temperatura, do pH e do teor de glicose sobre o crescimento de *Byssochlamys fulva* – apresentado no Capítulo 5, investigou-se como fatores intrínsecos (pH e teor de açúcar, em termos de glicose) e extrínsecos (temperatura) interferem na cinética de crescimento desse fungo filamentoso. Como objetivo secundário, identificaram-se os modelos preditivos primários e secundários que melhor descrevem o comportamento desse microrganismo em termos dos fatores ambientais estudados. Os resultados mostraram que o pH, o teor de glicose e a temperatura influenciam o comportamento de crescimento de *B. fulva*. A forte influência da temperatura sobre o crescimento desse fungo filamentoso justificou a necessidade de estudar o comportamento desse microrganismo em condições dinâmicas de temperatura.

O Capítulo 6 contempla as etapas do estudo que constituíram o artigo 3 – *Integrating a kinetic microbial model with a heat transfer model to predict Byssochlamys fulva growth in refrigerated papaya pulp*. Neste trabalho, investigou-se o efeito do abuso de temperatura inicial do produto e da velocidade do ar do sistema de refrigeração sobre o tempo necessário para que as colônias desse fungo filamentososo atingissem o raio crítico (visível a olho nu). O estudo mostrou que, se a temperatura inicial da polpa de mamão for elevada e se houver limitações na capacidade do sistema de refrigeração (baixos valores de velocidade de ar), a redução no tempo de vida útil do alimento pode ser superior a 76%, comparativamente ao produto mantido isotermicamente a baixas temperaturas. Nesta análise, considerou-se que o resfriamento do alimento ocorre dentro da embalagem. Assim, o modelo de transferência de calor para a fronteira do sistema foi constituído apenas pelo mecanismo convectivo. No entanto, o produto poderia ser resfriado fora da embalagem e, nesta situação, o efeito do resfriamento provocado pela evaporação da umidade superficial do produto tornar-se-ia importante para a análise. Isto motivou o desenvolvimento do próximo trabalho.

No artigo 4 – Modelagem e simulação do crescimento de *Byssochlamys fulva* em polpa de mamão submetido ao processo de resfriamento com efeito evaporativo – apresentado no Capítulo 7, avaliou-se o ganho no tempo de vida útil da polpa de mamão, quando o produto é submetido ao resfriamento com efeito evaporativo, relativamente aos valores obtidos no resfriamento exclusivamente convectivo. O estudo mostrou que essa estratégia de produção gera resultados apreciáveis apenas em condições de abuso de temperatura inicial do produto ( $T_0 > 24^{\circ}\text{C}$ ) e em sistemas que propiciam baixa capacidade de transferência de calor por convecção ( $U_{\infty} < 1 \text{ m/s}$ ). Nestas circunstâncias, o tempo de vida útil do alimento aumentou 70% em relação ao produto resfriado apenas pelo mecanismo convectivo.

## Capítulo 4

### Resultados e Discussão: artigo 1

No primeiro artigo desta tese, foram tratadas as seguintes questões de pesquisa:

- i. a taxa de crescimento de *Byssochlamys fulva* em polpa de mamão é maior do que em polpas de melão, tomate, pêssago, abacaxi e morango, devido à sua constituição química, particularmente ao seu pH moderado?
- ii. que modelo preditivo primário melhor descreve o comportamento de crescimento de *B. fulva* em diferentes polpas de frutas?

No apêndice A, apresentam-se os dados experimentais utilizados neste estudo. Nesse apêndice, mostram-se também as curvas de ajuste dos modelos primários aos dados experimentais e os valores de seus parâmetros de ajuste.

Este artigo será submetido para publicação em periódico internacional – qualis A na área de Engenharias II.

---

## EVALUATING THE GROWTH KINETICS MODEL FOR *BYSSOCHLAMYS FULVA* IN FRUIT PULPS

Paulo Ricardo Santos da Silva<sup>1\*</sup>, Michele Bertoni Mann<sup>2</sup>, Sueli Teresinha Van Der Sand<sup>2</sup>,  
Isabel Cristina Tessaro<sup>1</sup>, Ligia Damasceno Ferreira Marczak<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Tecnologia e Processamento de Alimentos – Departamento de Engenharia  
Química – UFRGS – Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Micologia Ambiental – Departamento de Microbiologia, Imunologia e  
Parasitologia – Instituto de Ciências Básicas da Saúde – UFRGS – Brasil

### Abstract

Using predictive modeling techniques and statistical analysis, the growth kinetics for *Byssochlamys fulva* in different fruit pulps was studied in this work. Four primary models (linear, logistic, modified Gompertz, Baranyi) was fitted to the measured colony radius. A statistical comparison was performed to identify the model that best describes the mold growth in melon, papaya, tomato, pineapple, strawberry, and peach pulps at 28°C. The influence of the substrate on the radial growth rate and the lag phase time predicted by this model was investigated and correlated with the physical chemistry properties of the fruit pulps. As a result, it was verified that the modified Gompertz model best described the growth behavior of *B. fulva*. The radial growth rate and the lag phase time were both influenced by the substrate. The fastest radial growth rate of 22.3 mm.day<sup>-1</sup> was observed in melon pulp. In terms of the lag phase time, the largest value was detected in peach pulp; microorganisms required 48.7 hours to start to grow. The growth behavior of the mold in different fruit pulps was associated with the pH of the pulp, and the Pearson correlation was 0.84.

Keywords: growth kinetics model – fruit pulp – fungi – comparison

---

## 4.1 INTRODUCTION

Mold spoilage is an issue of great concern for the food industry because it means significant economic losses. Molds can change the sensory characteristics and modify the appearance of product, producing off-odors and disintegrating the food structure, which lead to consumer rejection (GIBSON, HOOKING, 1997; DANTIGNY *et al.*, 2002; DANTIGNY *et al.*, 2005; PANAGOU *et al.*, 2007; SANT'ANA *et al.*, 2010a). In addition, they are able to produce mycotoxins, metabolites that when ingested, inhaled, or absorbed through the skin can cause illness or death in human and animals. Some mycotoxins commonly produced by

these microorganisms are aflatoxins, ochratoxins, and patulin. Patulin affects hepatic and renal functions (PANAGOU *et al.*, 2007; WELKE *et al.*, 2009; GARCIA *et al.*, 2009).

Among the several fungi groups relevant in food technology, the heat-resistant species belonging to *Byssochlamys*, *Neosartorya*, and *Talaromyces* genera deserve special attention (CHAPMAN *et al.*, 2007; SANT'ANA *et al.*, 2010a). They are widely distributed in the environment, especially in the soil, and are able to produce ascospores that can resist the heat treatments normally applied to hot-packed canned products in the food industry (TOURNAS, 1994; KOTZEKIDOU, 1997; PANAGOU *et al.*, 2010). In the study developed by Kotzekidou (1997), spores of *B. fulva* germinated in double-concentrated tomato paste, causing spoilage of the product, even after intense heat treatment (90°C/20 minutes). This ability is an intrinsic feature of this fungi species. In addition, Chapman *et al.* (2007) and Taniwaki *et al.* (2010) pointed out that species of the *Byssochlamys* genus have a particular ability to grow under low oxygen levels (e.g., with a slow leakage of air through TetraPak™ seals). Moreover, they are capable of producing high concentrations of mycotoxins in food products (SANT'ANA *et al.*, 2010b). Therefore, food technologists should pay special attention to this type of microorganism, especially in fruit processing, because these molds often spoil those types of products (CHAPMAN *et al.*, 2007; SANT'ANA *et al.*, 2010a; PANAGOU *et al.*, 2010).

According to Garcia *et al.* (2009), the most effective way to prevent mycotoxins in food is avoiding mold growth throughout the entire production chain. Therefore, it is important to study the environmental variables that can affect microorganism growth in foods. The development of growth kinetics models is a convenient way to better understand the growth behavior of microorganisms and their responses to environmental changes, which is the aim of predictive microbiology (ROSS, MCMEEKIN, 1994).

According to Whitting and Buchanan (1993), primary predictive models are related to the increase/decrease of microorganisms over time. Many primary models have been applied to fit mold growth: namely, linear (CUPPERS *et al.*, 1997; PARRA, MAGAN, 2004; BAERT *et al.*, 2007; LAHLALI *et al.*, 2007; LEE, MAGAN, 2010; GOUGOULI *et al.*, 2011), logistic (LIU *et al.*, 2003; HAMIDI-ESFAHANI *et al.*, 2004; VAN DE LAGEMAAT, PYLE, 2005; SANT'ANA *et al.*, 2010a; FENG *et al.*, 2010; ZIMMERMANN *et al.*, 2011), modified Gompertz (PARDO *et al.*, 2004; CHENG *et al.*, 2010; GALATI *et al.*, 2011; GOUGOULI, KOUTSOUMANIS, 2012), and Baranyi models (VALÍK, PIECKOVÁ, 2001; PATRIARCA *et al.*, 2001; SAMAPUNDO *et al.*, 2005; PANAGOU *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2010; MOUSA *et al.*, 2011). Usually, a kinetics model is chosen without performing a comparison to identify

which of the models best fits the experimental data. Only few studies have employed this approach (LÓPEZ *et al.*, 2004; MARÍN *et al.*, 2008, LONGHI *et al.*, 2013).

Although the composition of the substrate can have effects on the kinetics of mold growth and on mycotoxin production (DANTIGNY, NANGUY; 2009), to the best of our knowledge, no study has investigated this issue, especially for *B. fulva* in different foodstuffs. A single study was found in which the researchers studied the effect of the substrate on the growth of *Penicillium brevicompactum* using five artificial culture media (MEMBRÉ, KUBACZKA; 2000).

Therefore, the goal of this study is to address the issues mentioned above by (i) identifying the primary predictive model (linear, logistic, modified Gompertz, or Baranyi) that best describes the growth kinetics of *B. fulva* in different fruit pulps (melon, papaya, tomato, pineapple, strawberry, and peach), (ii) comparing the growth rate and lag phase time predicted by the model to identify the substrates that are more susceptible to spoilage by this microorganism, and (iii) correlating the growth behavior with the physical chemistry properties of the substrate (pH, soluble solid content, moisture content).

## 4.2 MATERIAL AND METHODS

---

### 4.2.1 Inoculum preparation

Lyophilized spores of *B. fulva* were acquired from the Andre Tosello Tropical Culture Collection (Campinas, SP, Brazil), which were identified as the NRRL 1125 strain. The spores were rehydrated in sterile water by following a specific protocol provided by the supplier. Next, they were poured into Petri dishes containing PDA culture media (Himedia, Curitiba, Paraná, Brazil) and incubated in a bacteriological chamber (Biopar, Londrina, Paraná, Brazil), at 28°C for 12 days. At the end of this period, a mold fragment was transferred to another Petri dish containing PDA. The same growth conditions were used for an additional 28 days, and then, this material was used in the experiments. From this dish, disks of colonies of *B. fulva* 8 mm in diameter were removed using a special device. These disks were used as the inoculum in the experiment.

### 4.2.2 Preparation of fruit pulps

Six varieties of fruits (melon, papaya, tomato, pineapple, strawberry, peach) frequently consumed by southern Brazilian people were selected. They were purchased in a local market in Porto Alegre, Brazil, and were washed, peeled, and ground. Next, agar-agar

(0.5% w/v) was added to the ground pulp to jelly the culture medium. In the pineapple and strawberry pulps, a higher agar-agar proportion (1.5% w/v) was used because of their low pH. Then, the fruit pulps were sterilized in a batch autoclave Phoenix Model AV50 (Phoenix, Araraquara, São Paulo, Brazil) at 121°C for 15 min, poured into Petri dishes, and refrigerated until the moment of inoculation. For each fruit pulp, three Petri dishes were prepared.

#### 4.2.3 Physical chemistry properties of fruit pulps

Before sterilization, the pH and soluble solid content of each fruit pulp were measured using a Tecnal Tc-3MP digital pH meter (Tecnal, Piracicaba, São Paulo, Brazil) and a refractometer (Carl Zeiss, Jena, Germany), respectively. Moreover, the pulp moisture was analyzed according to a specific drying method (Brasil, 1981).

#### 4.2.4 Inoculation and growth monitoring

The underside of the dishes was marked with perpendicular lines to enable consistent measuring of the colony diameter. A small mold disk 8 mm in diameter was placed in the center of each Petri dish. These disks were obtained from the inoculum preparation, as described previously. The dishes were kept in a bacteriological chamber at 28°C for a maximum of seven days. The colony diameter was measured in four distinct directions daily, using the perpendicular lines as a reference. For modeling purposes, the mean value of the four daily measurements was used.

#### 4.2.5 Mathematical model and statistical analysis

For each Petri dish, the colony radius ( $y$ , in mm) was plotted against time ( $t$ , in hours). Four growth kinetics models were fitted to the experimental data, namely: linear (Eq. 4.1), logistic (Eq. 4.2), modified Gompertz (Eq. 4.3), and Baranyi (Eq. 4.4).

$$y = y_0 + \mu(t - \lambda) \quad (\text{Eq. 4.1})$$

$$y = y_0 + \frac{y_{\max}}{\left[1 + \exp\left(\frac{4\mu}{y_{\max}}(\lambda - t) + 2\right)\right]} \quad (\text{Eq. 4.2})$$

$$y = y_0 + y_{\max} \exp\left\{-\exp\left[\left(\frac{\mu \exp(1)}{y_{\max}}\right)(\lambda - t) + 1\right]\right\} \quad (\text{Eq. 4.3})$$

$$y = y_0 + \mu A - \ln \left\{ 1 + \frac{[\exp(\mu A) - 1]}{\exp(y_{MAX} - y_0)} \right\} \quad (\text{Eq. 4.4})$$

$$\text{where } A = t + \left( \frac{1}{\mu} \right) \ln [\exp(-\mu t) + \exp(-\mu \lambda) - \exp(-\mu t - \mu \lambda)]$$

In equations (4.1) to (4.4),  $y_0$  is the initial colony radius,  $y_{\max}$  refers to the maximum colony radius,  $\mu$  is the radial growth rate, and  $\lambda$  refers to the lag phase time. In all models, the initial colony radius ( $y_0$ ) was 0.4 mm once the inoculum disk was 0.8 mm in diameter.

The linear model was adjusted using Microsoft Excel 2010. The remaining models were fitted using an algorithm developed in Matlab version 5.3 by MathWorks using its internal lsqnonlin function, which is based on the Levenberg-Marquardt method. In the linear model, the radial growth rate was obtained from the slope of the straight line. The lag phase time was estimated from the intersection between the straight line and the line parallel to the t axis indicating the initial colony radius.

To identify the growth kinetics model that best described the behavior of the experimental data, some statistical indices were used: namely, the root mean square error – RMSE (Eq. 4.5), the bias factor (Eq. 4.6), and the accuracy factor – AF (Eq. 4.7).

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_{pred,i} - y_{obs,i})^2}{n - p}} \quad (\text{Eq. 4.5})$$

$$BIAS = 10 \frac{\sum_{i=1}^n \frac{\log(y_{pred,i}) - \log(y_{obs,i})}{n}}{n} \quad (\text{Eq. 4.6})$$

$$AF = 10 \frac{\sum_{i=1}^n \frac{|\log(y_{pred,i}) - \log(y_{obs,i})|}{n}}{n} \quad (\text{Eq. 4.7})$$

According to Giffel and Zwietering (1999), the bias factor (BIAS) indicates the structural deviations of a model, and it makes it possible to verify the fail-safe or fail-dangerous status of a model prediction. Similar to the AF index, the larger the value, the less accurate the average estimate. An accuracy factor of 2 indicates that the prediction is either half as large or twice as large as the observed value.

After choosing the mathematical model, the obtained values of  $\mu$  and  $\lambda$  were analyzed statistically, to verify any significant differences and the influence of the substrate. Analysis of variance (ANOVA) was applied to perform this evaluation. In addition, Tukey's

test was selected to identify groups of substrates in which microorganisms behaved differently (CALLEGARI-JACQUES, 2003; MONTGOMERY *et al.*, 2004). Statistical analyses were carried out using the software BioEstat 5.0 with a significance level ( $\alpha$ ) equal to 0.05.

To explain the mold behavior in terms of the substrate properties, the growth parameters were correlated to pH, soluble solid content, and pulp moisture using the Pearson correlation test.

### 4.3 RESULTS AND DISCUSSION

#### 4.3.1 Physical chemistry properties of fruit pulps

Table 4.1 shows the mean value of the pH, soluble solid content and moisture content of fruit pulps. The fruit pulps can be clustered into three groups according to their pH values. Pineapple and strawberry pulps have the lowest pH; tomato and peach pulps have intermediate pH values; and melon and papaya pulps have the highest pH. This is a relevant feature because mold growth can be influenced by the pH of the substrate.

**Table 4.1** - Mean value of the pH, soluble solid content and moisture content of each sample of fruit pulp

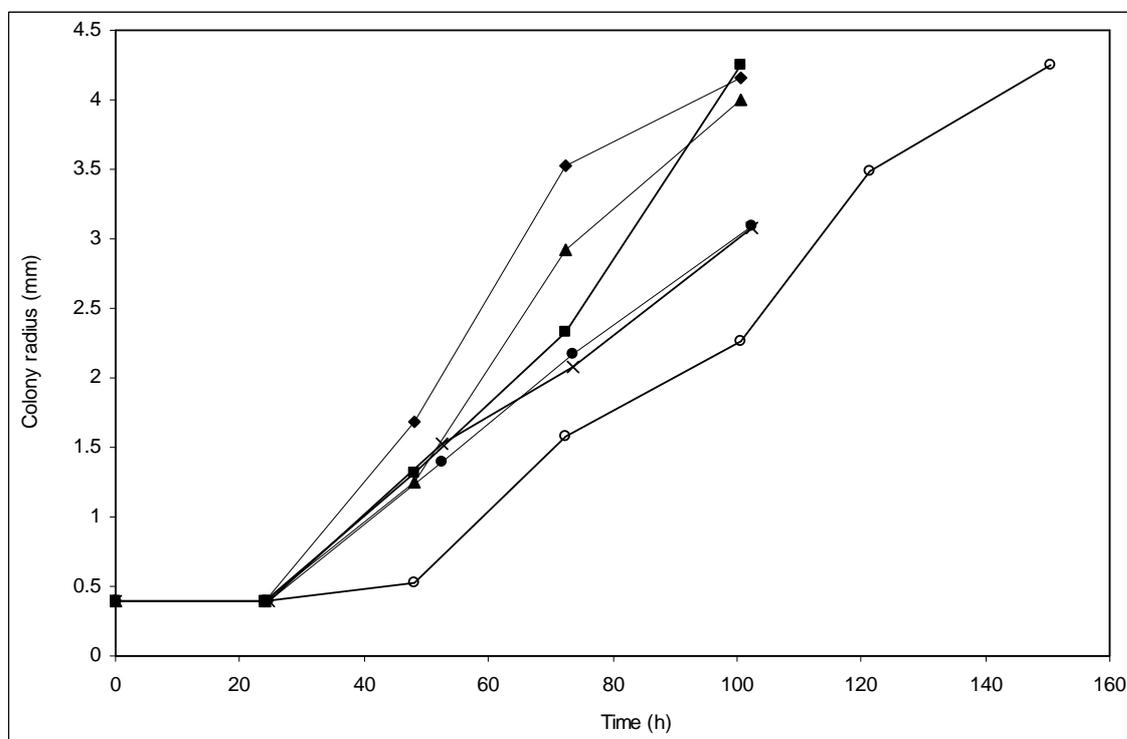
Fruit pulps	pH	Soluble solid content (%)	Moisture content (%)
Melon	6.0	9	93.61
Papaya	5.1	11	90.56
Tomato	4.3	12	96.05
Peach	4.3	12	88.81
Pineapple	3.8	14.5	88.51
Strawberry	3.5	6.5	94.51

Regarding the soluble solids content, a physical assay has shown that papaya, tomato, and peach have similar pulps, whereas strawberry and pineapple pulps have the lowest and the highest soluble solids content, respectively.

In the same way, by considering the moisture content, fruit pulps can be classified into two groups. Peach, pineapple, and papaya are pulps with the lowest moisture, while melon, strawberry, and tomato have the highest values. In food, moisture content and its availability for the metabolism of the microorganism is an important factor that can control fungi growth.

### 4.3.2 Growth curves

Figure 4.1 shows the increase of colony radius over time for *B. fulva* growing on various substrates. Solid lines were used to join the experimental data in order to better understand their behavior on this figure. The growth curves are typical for filamentous fungi, and they consist of a lag phase and a linear phase without an upper limiting condition. In the present work, 18 curves were obtained, and all of them are quite similar to Figure 4.1. This figure illustrates that the growth pattern of *B. fulva* in peach pulp is noticeably different from the growth in melon pulp because in the former, the lag phase time is longer and the growth rate is slower than the values observed in the latter. In contrast, the growth behavior of *B. fulva* in strawberry and pineapple pulps is almost the same.



**Figure 4.1** - Growth curves of *B. fulva* in (♦) melon, (■) papaya, (▲) tomato, (○) peach, (●) strawberry and (x) pineapple pulps

From each curve, growth parameters ( $\mu$  and  $\lambda$ ) were found according to the procedure described in section 4.2.5. Table 4.2 presents the mean value and the standard deviation for these parameters as predicted by the kinetics models for each substrate.

The growth rate predictions obtained in this work are comparable with literature data. For another strain of *B. fulva* growing in malt extract agar at 30°C, Panagou *et al.* (2010) achieved values ranging from 1.44 to 23.15 mm.day<sup>-1</sup>, using Baranyi model. Valík and

Piecková (2001) reported an optimum growth rate value of 20.23 mm.day<sup>-1</sup> also using Baranyi model.

**Table 4.2** - Mean value and standard deviation for the growth rate ( $\mu$ ) and lag phase time ( $\lambda$ ) of *B. fulva* on each fruit pulp as predicted by the kinetics models, at 28°C.

Substrate	LIN	LOG	GOM	BAR
	$\mu$ (mm/dia)			
Melon	9.79 ± 1.21	22.15 ± 0.70	22.27 ± 0.92	29.22 ± 0.95
Papaya	13.33 ± 0.18	17.01 ± 0.14	15.31 ± 0.57	15.98 ± 0.55
Tomato	12.25 ± 0.43	18.85 ± 0.14	17.58 ± 0.26	23.79 ± 0.92
Peach	8.97 ± 0.18	11.73 ± 0.83	10.75 ± 0.77	10.73 ± 0.60
Pineapple	7.62 ± 0.11	10.78 ± 0.20	10.00 ± 0.22	10.13 ± 0.13
Strawberry	8.05 ± 0.46	12.20 ± 0.70	11.26 ± 0.91	13.94 ± 5.68
$\lambda$ (h)				
Melon	8.84 ± 5.63	34.15 ± 0.86	33.45 ± 0.94	38.96 ± 0.67
Papaya	32.00 ± 1.96	41.41 ± 2.72	37.97 ± 4.31	42.45 ± 2.70
Tomato	24.40 ± 4.72	36.92 ± 2.80	33.93 ± 2.62	41.84 ± 3.06
Peach	41.69 ± 1.84	53.86 ± 5.79	48.67 ± 4.40	56.27 ± 2.50
Pineapple	17.27 ± 0.76	32.17 ± 0.28	28.56 ± 0.24	37.51 ± 0.85
Strawberry	20.50 ± 4.74	35.19 ± 0.87	31.92 ± 0.25	41.52 ± 1.85

LIN = linear model, LOG = logistic model, GOM = modified Gompertz model, BAR = Baranyi model

According to the results shown in Table 4.2, the variability in the lag phase time prediction was larger than in the growth rate prediction for all substrates. This is in agreement with the literature. Gougouli and Koutsoumanis (2010) studied the growth behavior of *Penicillium expansum* and *Aspergillus niger* and achieved coefficients of variation from 7% to 24%. In the present study, the coefficients of variation are in the range of 0.78% (on strawberry by Gompertz model) to 63.69% (on melon by linear model) for the lag phase parameter.

Another remarkable aspect of this analysis is related to the high growth rate of *B. fulva* in melon and tomato pulp predicted by the models compared with other molds. In this study, the growth rate predicted is larger than the values cited in the literature by other molds growing in similar substrates. Baert *et al.* (2007), studying the growth of *Penicillium expansum* in apple puree, achieved 17 mm.day<sup>-1</sup>. Pose *et al.* (2009), working with *Alternaria alternata* growing in tomato paste, achieve 8.3 mm.day<sup>-1</sup>. These results indicate that fruit products contaminated with *B. fulva* will rapidly spoil and be rejected by the consumer when compared with the outcomes of contamination by other molds.

### 4.3.3 Kinetics model comparison

Table 4.3 presents a comparison of the model performances in fitting the experimental data, considering the indices bias, accuracy factor (AF), and root mean square error (RMSE). According to the bias factor (BIAS), the growth behavior of *B. fulva* on all substrates was best described by a modified Gompertz equation, except in peach pulp, for which the linear model was superior. The bias factor was also greater than 1, which means the predicted colony radius is larger than the observed one. Therefore, the prediction of this model can be considered a safe failure. Taking into account the suggestion made by Mellefont *et al.* (2003), a model adjustment is good if the bias factor is in the range of 0.90 to 1.05. This rule reinforces the superiority of the modified Gompertz equation in fitting the growth of *B. fulva* in fruit pulps because it was the only model whose global bias was in that range.

**Table 4.3** - Bias factor, accuracy factor (AF), and root mean square error (RMSE) evaluated for the growth kinetics models in each substrate and globally

Substrate	BIAS				AF				RMSE			
	LIN	LOG	GOM	BAR	LIN	LOG	GOM	BAR	LIN	LOG	GOM	BAR
Melon	1.21	1.07	1.01	1.06	1.27	1.09	1.01	1.08	0.47	0.14	0.02	0.14
Papaya	1.22	1.09	1.05	1.08	1.26	1.15	1.09	1.11	0.51	0.19	0.13	0.18
Tomato	1.04	1.08	1.03	1.04	1.07	1.11	1.03	1.08	0.19	0.16	0.06	0.18
Peach	1.02	1.05	1.03	1.07	1.06	1.12	1.08	1.14	0.16	0.23	0.19	0.29
Pineapple	1.09	1.10	1.06	1.10	1.11	1.18	1.11	1.16	0.15	0.26	0.19	0.26
Strawberry	1.05	1.08	1.03	1.10	1.07	1.12	1.05	1.13	0.12	0.16	0.09	0.25
Global performance	1.096	1.077	1.034	1.073	1.132	1.127	1.063	1.117	0.301	0.199	0.137	0.231

The same pattern of fitting performance was observed for the accuracy factor. In this case, the results indicated that the modified Gompertz model can describe the growth of *B. fulva* with accuracy in the range of 89% (pineapple) to 99% (melon).

Root mean square error (RMSE) is another index adopted in this work because it imposes a disadvantage for models that use many parameters to fit experimental data. Considering the RMSE index, again, the modified Gompertz model yielded the best results for almost all substrates individually and also globally.

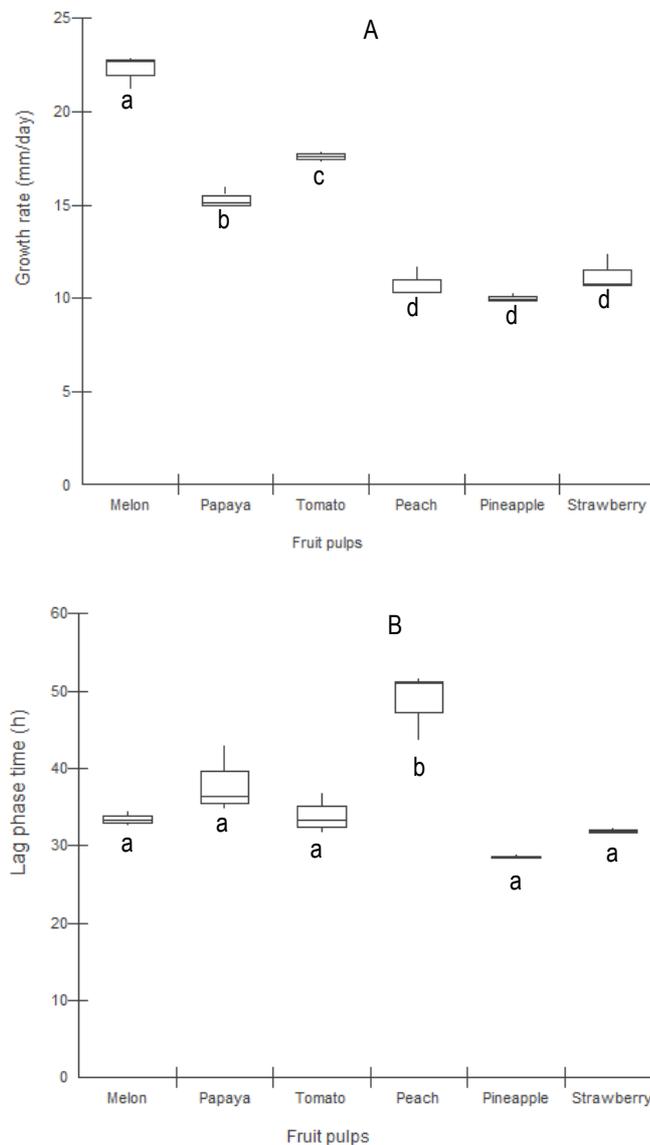
A similar study has pointed out the superiority of the modified Gompertz equation in describing the growth behavior of fungi. Zimmerman *et al.* (2011) chose this model over the logistic model to predict the growth of *Neosartorya fischeri* in pineapple juice. In contrast, Marín *et al.* (2008) have compared the linear, Gompertz, and Baranyi models in fitting the growth data for fourteen food spoilage fungal species on malt extract agar. They concluded

that the Gompertz equation led to overestimated parameters, and Baranyi's model was chosen because it gave better estimations for growth parameters.

The reasonable goodness-of-fit of the modified Gompertz model in describing the growth behavior of *B. fulva* in different substrates led to its selection for the next steps of the study. The global comparison performed among the models contributed to this decision.

#### 4.3.4 Effect of the substrate on growth parameters

The study of the effect of the substrate on the radial growth rate and the lag phase time was carried out using a box plot graph, as shown in Figure 4.2.



**Figure 4.2** - Box plot of the growth rate (A) and the lag phase time (B) predicted by the modified Gompertz model for each fruit pulp.

In the Figure 4.2, box plot with the same letters in the same picture means that they are not statistically different from Tukey's test ( $p$ -value  $< 0.05$ ). By examining the box plot for the radial growth rate (Figure 4.2 A), the substrates can be classified into three groups: melon pulp promotes fast growth for *B. fulva*; papaya and tomato pulp allowed intermediate growth rates; and peach, pineapple, and strawberry are disfavored substrates for the development of this microorganism. In terms of the lag phase time (Figure 4.2 B), the fungi behavior is noticeable different from the others substrates only in peach pulp. These comments were statistically confirmed using the ANOVA test for the radial growth rate ( $p$ -value =  $2.10^{-11}$ ) and the lag phase time ( $p$ -value =  $1.10^{-5}$ ), which was complemented by Tukey's test.

#### 4.3.5 Correlation between physical chemistry properties and growth parameters

To identify any relationships between the mold growth behavior and the physical chemistry properties of the substrates, a statistical correlation analysis was conducted. The average growth rate for each pulp predicted by the modified Gompertz equation was plotted against pH, soluble solid content, and moisture content. The Pearson correlation test was applied to each case. As a result, a moderate correlation was observed between the growth rate and pH, whereas for the others physical chemistry properties, a weak correlation was achieved, as demonstrated in Table 4.4. For the lag phase time, all tested correlations were very weak. It should be noted that for the lag phase time, the behavior of the microorganism was statistically different only in peach pulp, comparing to the other fruit pulps.

**Table 4.4** - Pearson correlation among the growth parameters ( $\mu$  and  $\lambda$ ) and physical chemistry properties of the fruit pulps

Growth parameter	pH	Soluble solid content	Moisture content
$\mu$	0.84	0.24	0.59
$\lambda$	0.01	0.14	-0.54

These findings suggest that pH is responsible for the difference in growth rate in those substrates. According to Dantigny and Nanguy (2009), pH, water activity, and temperature are environmental variables whose effects on fungi growth are frequently studied. In this context, the work of Panagou *et al.* (2007) has demonstrated that, among these variables, pH has a significant effect on the growth rate of *Monascus ruber*, a heat-resistant fungus, only in optimum or suboptimum conditions for temperature and water activity.

Complementarily, Massaguer (2006) has proposed that for heat-resistant molds, such as *B. fulva*, the optimum temperature range for growth is 30 – 37°C. The temperature used in the present study (28°C) can be considered sub-optimum, therefore supporting the hypothesis that the pH values of the substrates explain the mold growth behavior observed in this work. A more detailed study evaluating the effect of pH on the growth rate of *B. fulva* needs to be carried out to test this hypothesis.

#### 4.4 CONCLUSIONS

---

The development of growth kinetics models is a convenient way to better understand the behavior of microorganisms in food. In this study, the growth of *B. fulva* in different fruit pulps was investigated and modeled mathematically. All models tested satisfactorily described the growth pattern of the mold, particularly the modified Gompertz equation, for which a high accuracy factor was achieved.

The statistical analysis demonstrated the influence of the substrate on the growth parameters of this model. A moderate correlation was found between the growth rate and pH, suggesting the hypothesis that this physical chemistry property explains the growth pattern observed experimentally.

The results showed that substrates with a high pH are more susceptible to mold formation, and so melon, papaya, and tomato fruit pulps require special attention for industrial food processing.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) for providing financial support for this research.

#### REFERENCES

Baert, K., Valero, A., De Meulenaer, B., Samapundo, S., Ahmed, M.M., Debevere, J., Devlieghere, F., 2007. Modeling the effect of temperature on the growth rate and lag phase of *Penicillium expansum* in apples. *Int. J. Food Microbiol.*, 118, 139-150.

BRASIL, 1981. Ministério da Agricultura. Laboratório de Referência Animal. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos animais e seus ingredientes. Brasília, v.2 – Métodos físicos e químicos.

Callegari-Jacques, S.M., 2003. Bioestatística – Princípios e Aplicações, Artmed, São Paulo.

Chapman, B., Winley, E., Fong, A.S.W., Hocking, A.D., Stewart, C.M., Buckle, K.A., 2007. Ascospore inactivation and germination by high pressure processing is affected by ascospore age. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 8, 531-534.

Cheng, K.-C., Demirci, A., Catchmark, J.M., Puri, V.M., 2010. Modeling of pullulan fermentation by using a color variant strain of *Aureobasidium pullulans*. *J. Food Eng.*, 98, 353-359.

Cuppers, H.G.A.M., Oomes, S., Brul, S., 1997. A model for combined effects of temperature and salt concentration on growth rate of food spoilage molds. *Appl. Environ. Microb.*, 63, 3764-3769.

Dantigny, P., Guilmart, A., Bensoussan, M., 2005. Basis of predictive mycology. *Int. J. Food Microbiol.* 100, 187-196.

Dantigny, P., Mansur, C.S., Sautour, M., Tchobanov, I., Bensoussan, M., 2002. Relationship between spore germination kinetics and lag time during growth of *Mucor racemosus*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 35, 395-398.

Dantigny, P., Nanguy, S.P.-M., 2009. Significance of the physiological state of fungal spores. *Int. J. Food Microbiol.*, 134, 16-20.

Feng, Y.-L., Li, W.-Q., Wu, X.-Q., Cheng, J.-W., Ma, S.-Y., 2010. Statistical optimization of media for mycelial growth and exo-polysaccharide production by *Lentinus edodes* and a kinetic model study of two growth morphologies. *Biochem. Eng. J.*, 49, 104-112.

Galati, S., Giannuzzi, L., Giner, S.A., 2011. Modelling the effect of temperature and water activity on the growth of *Aspergillus parasiticus* on irradiated Argentinian flint maize. *J. Stored Prod. Res.*, 47, 1-7.

Garcia, D., Ramos, A.J., Sanchis, V., Marín, S., 2009. Predicting mycotoxins in foods: A review. *Food Microbiol.*, 26, 757-769.

Gibson, A.M., Hocking, A.D., 1997. Advances in the predictive modeling of fungal growth in food, *Trends Food Sci. Technol.*, 8, 353-358.

Giffel, M.C., Zwietering, M.H., 1999. Validation of predictive models describing the growth of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.*, 46, 135-149.

Gougouli, M., Kalantzi, K., Beletsiotis, E., Koutsoumanis, K.P., 2011. Development and application of predictive models for fungal growth as tools to improve quality control in yogurt production. *Food Microbiol.*, 28, 1453-1462.

Gougouli, M., Koutsoumanis, K.P., 2012. Modeling germination of fungal spores at constant and fluctuating temperature conditions. *Int. J. Food Microbiol.*, 152, 153-161.

Gougouli, M., Koutsoumanis, K.P., 2010. Modelling growth of *Penicillium expansum* and *Aspergillus niger* at constant and fluctuating temperature conditions. *Int. J. Food Microbiol.*, 140, 254-262.

Hamidi-Esfahani, Z., Shojaosadati, S.A., Rinzema, A., 2004. Modelling of simultaneous effect of moisture and temperature on *A. niger* growth in solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.*, 21, 265-272.

Kotzekidou, P., 1997. Heat resistance of *Byssoschlamys nivea*, *Byssoschlamys fulva* and *Neosartorya fischeri* isolated from canned tomato paste. *J. Food Sci.*, 62, 410-437.

Lahlali, R., Serrhini, M.N., Friel, D., Jijakli, M.H., 2007. Predictive modelling of temperature and water activity (solutes) on the in vitro radial growth of *Botrytis cinerea* Pers. *Int. J. Food Microbiol.*, 114, 1-9.

Lee, H.B., Magan, N., 2010. The influence of environmental factors on growth and interactions between *Embellisia allii* and *Fusarium oxysporum* f. sp. cepae isolated from garlic. *Int. J. Food Microbiol.*, 138, 238-242.

Liu, J.-Z., Weng, L.-P, Zhang, Q.-L., Xu, H., Ji, L.-N., 2003. A mathematical model for gluconic acid fermentation by *Aspergillus niger*. *Biochem. Eng. J.*, 14, 137-141.

Longhi, D.A., Dalcanton, F., Aragão, G.M.F., Carciofi, B.A.M., Laurindo, J.B., 2013. Assessing the prediction ability of different mathematical models for the growth of *Lactobacillus plantarum* under non-isothermal conditions. *J. Theor. Biol.*, 335, 88-96.

López, S., Prieto, M., Dijkstra, J., Dhanoa, M.S., France, J., 2004. Statistical evaluation of mathematical models for microbial growth. *Int. J. Food Microbiol.*, 96, 289-300.

Marín, S., Cuevas, D., Ramos, A.J., Sanchis, V., 2008. Fitting of colony diameter and ergosterol as indicators of food borne mould growth to know growth models in solid medium. *Int. J. Food Microbiol.*, 121, 139-149.

Massaguer, P.R., 2006. *Microbiologia dos Processos Alimentares*, Varela, São Paulo.

Mellefont, L.A., McMeekin, T.A., Ross, T., 2003. Performance evaluation of model describing the effects of temperature, water activity, pH and lactic acid concentration on the growth of *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.*, 82, 45-58.

Membré, J.-M., Kubaczka, M., 2000. Predictive modelling approach applied to spoilage fungi: growth of *Penicillium brevicompactum* on solid media. *Lett. Appl. Microbiol.*, 31, 247-250.

Montgomery, D.C., Runger, G.C., Hubele, N.F., 2004. *Estatística Aplicada à Engenharia*, LTC, Rio de Janeiro.

Mousa, W., Ghazali, F.M., Jinap, S., Ghazali, H.M., Radu, S., 2011. Modelling the effect of water activity and temperature on growth rate and aflatoxin production by two isolates of *Aspergillus flavus* on paddy, *J. Appl. Microbiol.*, 111, 1262-1274.

Panagou, E.Z., Chelonas, S., Chatzipavlidis, I., Nychas, G.E., 2010. Modelling the effect of temperature and water activity on the growth rate and growth/no growth interface of *Byssoschlamys fulva* and *Byssoschlamys nivea*, *Food Microbiol.*, 27, 618-627.

Panagou, E.Z., Kodogiannis, V., Nychas, G.J., 2007. Modelling fungal growth using radial basis function neural networks: the case of the ascomycetous fungus *Monascus ruber* van Tieghem. *Int. J. Food Microbiol.*, 117, 276-286.

Pardo, E., Marín, S., Solsona, A., Sanchis, V., Ramos, A.J., 2004. Modeling of germination and growth of ochratoxigenic isolates of *Aspergillus ochraceus* as affected by water activity and temperature on a barley-based medium. *Food Microbiol.*, 21, 267-274.

Parra, R., Magan, N., 2004. Modelling the effect of temperature and water activity on growth of *Aspergillus niger* strains and applications for food spoilage moulds. *J. Appl. Microbiol.*, 97, 429-438.

Patriarca, A., Vaamond, G., Pinto, V.F., Comerio, R., 2001. Influence of water activity and temperature on growth of *Wallemia sebi*: application of a predictive model. *Int. J. Food Microbiol.*, 68, 61-67.

Pose, G., Patriarca, A., Kyanko, V., Pardo, A., Pinto, V.F., 2009. Effect of water activity and temperature on growth of *Alternaria alternata* on a synthetic tomato medium. *Int. J. Food Microbiol.*, 135, 60-63.

Ross, T., McMeekin, T.A., 1994. Predictive microbiology. *Int. J. Food Microbiol.*, 23, 241-264.

Samapundo, S., Devlieghere, F., De Meulenaer, B., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F., Debevere, J.M., 2005. Predictive modelling of the individual and combined effect of water activity and temperature on the radial growth of *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* on corn. *Int. J. Food Microbiol.*, 105, 35-52.

Sant'Ana, A.S., Dantigny, P., Tahara, A.C., Rosenthal, A., Massaguer, P.R., 2010a. Use of a logistic model to assess spoilage by *Byssoschlamys fulva* in clarified apple juice. *Int. J. Food Microbiol.*, 137, 299-302.

Sant'Ana, A.S., Simas, R.C., Almeida, C.A.A., Cabral, E.C., Rauber, R.H., Mallmann, C.A., Eberlin, M.N., Rosenthal, A., Massaguer, P.R., 2010b. Influence of package, type of apple juice and temperature on the production of patulin by *Byssoschlamys nivea* and *Byssoschlamys fulva*. *Int. J. Food Microbiol.*, 142, 156-163.

Silva, A.R., Sant'Ana, A.S., Massaguer, P.R., 2010. Modelling the lag time and growth rate of *Aspergillus* section *Nigri* IOC 4573 in mango nectar as a function of temperature and pH. *J. App. Microbiol.*, 109, 1105-1116.

Taniwaki, M.H., Hocking, A.D., Pitt, J.I., Fleet, G.H., 2010. Growth and mycotoxin production by fungi in atmospheres containing 80% carbon dioxide and 20% oxygen. *Int. J. Food Microbiol.*, 143, 218-225.

Tournas, V., 1994. Heat resistant fungi of importance to the food and beverage industry. *Crit. Rev. Microbiol.*, 20, 243-263.

Valík, L., Piecková, E., 2001. Growth modelling of heat-resistant fungi: the effect of water activity. *Int. J. Food Microbiol.*, 63, 11-17.

---

van de Lagemaat, J., Pyle, D.L., 2005. Modeling the uptake and growth kinetics of *Penicillium glabrum* in a tannic acid containing solid state fermentation for tannase production. *Process Biochem.*, 40, 1773-1782.

Welke, J.E., Hoeltz, M., Dottori, H.A., Noll, I.B., 2009. Ocorrência de fungos termorresistentes em suco de maçã. *Braz. J. Food Technol.*, IISSA, 78-83.

Whitting, R.C., Buchanan, R.L., 1993. A classification of models in predictive microbiology – a reply to K.R. Davey. *Food Microbiol.*, 10, 175-177.

Zimmermann, M., Miorelli, S., Massaguer, P.R., Aragão, G.M.F., 2011. Modeling the influence of water activity and ascospore age on the growth of *Neosartorya fischeri* in pineapple juice. *LWT – Food Sci. Technol.*, 44, 239-243.

## Capítulo 5

### Resultados e Discussão: artigo 2

No artigo 2 da tese, foram abordadas as seguintes questões de pesquisa:

- i. o pH do substrato tem efeito significativo no crescimento de *Byssochlamys fulva* em condições de temperatura ótima (36°C) ou subótima (28°C)?
- ii. que modelo preditivo primário e secundário melhor descreve o comportamento de crescimento de *B. fulva* em meio de cultura artificial em função do seu pH e do seu teor de açúcar (em termos de glicose) em diferentes temperaturas de armazenamento?

No apêndice B, apresentam-se os dados experimentais utilizados neste estudo, as curvas de ajuste dos modelos primários aos dados experimentais e os valores dos parâmetros de ajuste de cada um desses modelos.

Este artigo será submetido para publicação em periódico internacional – qualis A na área de Engenharias II.

## MODELO PREDITIVO PARA AVALIAR O EFEITO DA TEMPERATURA, DO PH E DO TEOR DE GLICOSE NA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *BYSSOCHLAMYS FULVA*

Paulo Ricardo Santos da Silva, Isabel Cristina Tessaro, Ligia Damasceno Ferreira Marczak  
Laboratório de Tecnologia e Processamento de Alimentos – Departamento de Engenharia  
Química – UFRGS – Brasil

### Resumo

Neste trabalho fez-se a modelagem matemática para quantificar o efeito da temperatura (20, 28 e 36°C), do pH (4, 5 e 6) e do teor de glicose (0%, 5% e 10% m/v) sobre a cinética de crescimento de *Byssochlamys fulva* em meio de cultura batata dextrose modificado. Foram testados diferentes modelos preditivos primários (linear, logístico, Gompertz modificado e Baranyi simplificado) e secundários (polinomial e Gibson) para identificar qual deles melhor descreve o efeito dos fatores ambientais sobre o comportamento de crescimento desse microrganismo. Como resultado, obteve-se que o equacionamento constituído pelos modelos Gompertz modificado, polinomial e Gibson apresentou melhor desempenho, em termos dos índices bias, fator de exatidão, RMSE e BIC. Verificou-se que a temperatura, o pH e o teor de glicose influenciam o comportamento de crescimento do fungo filamentoso, na faixa de valores testados, com predominância da temperatura. O modelo foi utilizado para estimar o tempo de vida útil da polpa de mamão. Os resultados encontrados mostraram que, ao aumentar a temperatura do substrato de 20°C para 30°C, há redução no tempo de vida útil estimado do alimento de 29 horas para 11 horas.

Palavras-chave: microbiologia preditiva – crescimento – fungo – tempo de vida útil

### 5.1 INTRODUÇÃO

Durante a colheita, o processamento e o armazenamento, os alimentos podem ser contaminados por uma ampla variedade de bactérias e fungos. O tipo de microrganismo que colonizará esse meio e a extensão de seu crescimento dependem das características do produto e de fatores ambientais (HUIS IN'T VELD, 1996).

Fungos são microrganismos capazes de metabolizar uma maior variedade de substratos, sendo mais tolerantes a baixos valores de pH, de atividade de água e de temperatura. Ao crescerem sobre um alimento, eles promovem mudanças sensoriais, tais como o surgimento de pigmentos em sua superfície, a formação de limosidade, a produção de metabólitos secundários (ácidos, gases ou alcoóis) que geram odores e sabores desagradáveis e, conseqüentemente, o descarte do produto. Desta forma, o crescimento de fungos em alimentos causa sérias perdas econômicas (HUIS IN'T VELD, 1996; DANTIGNY *et al.*, 2005). Adicionalmente, os fungos são capazes de sintetizar toxinas prejudiciais à

saúde humana, tais como aflatoxinas, ocratoxinas e ácido bissoclâmico (PANAGOU *et al.*, 2007; WELKE *et al.*, 2009; GARCIA *et al.*, 2009). Portanto, o controle do crescimento desses microrganismos em alimentos, além de evitar perdas econômicas, também se insere como uma questão de saúde pública.

Dentre as diversas espécies de fungos filamentosos de interesse no processamento de alimentos, *Byssochlamys fulva* merece especial atenção pelos seguintes aspectos: produzem esporos termorresistentes (KOTZEKIDOU, 1997); crescem em ambientes com baixa concentração de oxigênio ou em atmosferas modificadas (CHAPMAN *et al.*, 2007; TANIWAKI *et al.*, 2010); são capazes de produzir micotoxinas em concentrações superiores aos limites que representam riscos à saúde do consumidor (SANT'ANA *et al.*, 2010) e apresentam elevada taxa de crescimento da colônia, podendo atingir até 20 mm.dia<sup>-1</sup> (VALÍK, PIECKOVÁ, 2001).

Neste contexto, a microbiologia preditiva representa uma alternativa para estabelecer estratégias para o controle do crescimento de microrganismos. Nesse campo do conhecimento, é comum estruturar os modelos matemáticos em dois níveis principais: modelos primários, que descrevem variações do tamanho da população de microrganismos ao longo do tempo; e modelos secundários, os quais avaliam como os parâmetros dos modelos primários (taxa de crescimento, tempo de duração da fase lag) são influenciados por fatores ambientais, tais como temperatura, pH, atividade de água e presença de inibidores (WHITING, BUCHANAN; 1993).

A modelagem matemática do efeito de fatores ambientais sobre a cinética de crescimento de fungos tem sido tema de trabalhos publicados na literatura. Cuppers *et al.* (1997) estudaram o efeito da temperatura e da concentração de cloreto de sódio sobre o crescimento de *Penicillium roqueforti*, *Trichoderma harzianum*, *Paecilomyces variotti*, *Aspergillus niger* e *Emmericella nidulans*. Parra e Magan (2004) avaliaram o efeito da temperatura e da atividade de água sobre o crescimento de *Aspergillus niger*. Mousa *et al.* (2011) também modelaram o efeito desses fatores ambientais, porém sobre o crescimento de *Aspergillus flavus*. Silva *et al.* (2010) estudaram o efeito do pH e da temperatura sobre o crescimento de *Aspergillus* section *Nigri* IOC 4573. O efeito da temperatura e do tamanho do inóculo sobre a taxa de crescimento radial de um conjunto de fungos isolados em ambiente de produção de iogurte foi avaliado por Gougouli *et al.* (2011). Especificamente em relação ao *B. fulva*, Panagou *et al.* (2010) analisaram a influência da temperatura e da atividade de água sobre o desenvolvimento desse microrganismo e de *B. nivea*.

Nota-se que o pH e o teor de glicose são fatores pouco explorados no estudo do crescimento de fungos filamentosos, em particular para *B. fulva*. A glicose é um monossacarídeo presente em frutas e pode ser utilizada como fonte energética pelos microrganismos. Por outro lado, o aumento no teor de glicose de um alimento diminui a sua atividade de água, o que desfavorece o crescimento de fungos. Portanto, justifica-se o estudo do efeito desses fatores sobre a cinética de crescimento do microrganismo em questão.

Verifica-se, ainda, que os trabalhos têm-se focado no estudo do efeito de fatores ambientais apenas sobre a taxa de crescimento radial, desprezando a sua influência sobre o tempo de duração da fase lag. Além disso, normalmente, adotam-se modelos primários e secundários previamente selecionados sem que seja efetuada uma ampla comparação para identificar que modelo matemático de fato melhor descreve o comportamento do microrganismo.

Considerando essas limitações, os objetivos deste estudo foram: i) avaliar o efeito do pH e do teor de glicose do substrato sobre a cinética de crescimento de *B. fulva* em condições de temperatura ótima e subótima; ii) identificar o modelo preditivo primário e secundário que melhor descreve o comportamento desse microrganismo em termos desses fatores ambientais; iii) validar os modelos selecionados em condições distintas daquelas utilizadas em sua elaboração; e iv) aplicar o modelo desenvolvido para estimar o tempo de vida útil da polpa de diferentes variedades de mamão.

## 5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 5.2.1 Preparação do inóculo

Esporos liofilizados de *B. fulva*, isolados a partir de frutas, foram adquiridos da Coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello (Campinas, SP), identificados como cepa NRRL 1125. No laboratório, foram reidratados em água estéril, seguindo protocolo específico encaminhado pelo fornecedor. Após, foram vertidos em placa contendo meio de cultura ágar batata dextrose (BDA), previamente esterilizado, e incubados em estufa bacteriológica (Biopar, Brasil), a 28°C por 12 dias para a formação de colônia, seguido de armazenamento sob refrigeração até a sua utilização no experimento em questão. Fragmentos dessa colônia foram repicados em tubos de ensaio contendo meio de cultura ágar extrato de malte (MEA), mantendo-os novamente em estufa bacteriológica a 28°C, pelo período de 21 dias.

Em capela de fluxo laminar, a superfície da colônia de *B. fulva* que cresceu sobre o meio MEA foi lavada com duas alíquotas de 1 mL de solução aquosa de Tween-20 a 5% (v/v) previamente esterilizada, armazenando-a em um tubo falcon. A suspensão de esporos obtida foi homogeneizada e padronizada para a concentração de  $3 \cdot 10^6$  esporos/mL. Essa suspensão foi utilizada imediatamente após o seu preparo para inocular as placas e, por isso, não foi submetida ao tratamento térmico para ativação dos esporos, seguindo-se procedimento similar ao descrito por Panagou *et al.* (2010).

### 5.2.2 Preparação dos meios de cultura

O meio de cultura basal utilizado nos experimentos foi preparado dissolvendo-se 2% (m/v) de caldo de batata dextrose em água destilada. A seguir, foram adicionadas massas de glicose anidra, conforme o planejamento experimental. Fez-se o ajuste de pH para a faixa desejada, adicionando-se gotas de ácido clorídrico 1 M ou hidróxido de sódio 1 M. O pH da solução foi medido em pHmetro digital (Ion Ph B500, Brasil). Por fim, adicionou-se ágar bacteriológico para a obtenção de um meio sólido. A dosagem de ágar variou de 1,4% a 1,8% (m/v), em virtude de o pH do meio interferir na capacidade de gelificação desse agente.

A solução obtida foi esterilizada em autoclave (Phoenix modelo AV 50, Brasil), a 121°C por 15 minutos, e vertida em placa de Petri de 90 mm de diâmetro, em cabine de fluxo laminar. As placas foram mantidas em estufa a 28°C por 24 horas, visando detectar eventual contaminação. Após, o material foi armazenado em refrigeração até o seu uso no experimento.

### 5.2.3 Inoculação e monitoramento do crescimento radial

Com o auxílio de uma pipeta automática, cada placa foi inoculada no ponto central com 2  $\mu$ L da suspensão de esporos. O conjunto de placas foi dividido em três porções, armazenando-as em estufas nas condições previstas no planejamento experimental. As placas tiveram sua borda fechada com filme de PVC transparente para não haver perda de água do meio de cultura e para evitar contaminações durante o experimento.

Foi efetuado o monitoramento diário das placas, marcando-se o diâmetro alcançado pela colônia em quatro direções distintas até que toda a superfície do meio de cultura estivesse coberta pela colônia. Ao final do experimento, foram realizadas as leituras das medições dos diâmetros das colônias com o auxílio de uma régua, obtendo-se os dados de raio *versus* tempo, utilizados na modelagem matemática. Para os cálculos, foi considerado o

raio médio obtido a partir das quatro medidas de diâmetros feitas em um determinado momento.

#### 5.2.4 Planejamento experimental

O delineamento experimental utilizado neste estudo foi o projeto fatorial completo para três fatores (temperatura, pH e teor de glicose), com triplicata em cada tratamento. O Quadro 5.1 apresenta os níveis avaliados para cada um dos fatores.

**Quadro 5.1** - Níveis de temperatura, de pH e de teor de glicose utilizados nos experimentos

Fatores	Níveis
Temperatura (°C)	20 – 28 – 36
pH	4 – 5 – 6
Teor de glicose (% m/v)	0 – 5 – 10

#### 5.2.5 Ajuste dos modelos preditivos primários

Com o auxílio da planilha eletrônica Excel da Microsoft Office 2010, fez-se a regressão linear dos dados experimentais de raio da colônia *versus* tempo para obter os parâmetros do modelo linear (Eq. 5.1). A inclinação da reta encontrada corresponde ao valor da taxa de crescimento radial ( $\mu$ ), enquanto a sua interseção com o eixo das abscissas fornece a estimativa de tempo de duração da fase lag ( $\lambda$ ). Para a estimação dos parâmetros de ajuste dos demais modelos primários – Logístico (Eq. 5.2), Gompertz modificado (Eq. 5.3) e Baranyi simplificado (Eq. 5.4) – foi utilizado um algoritmo desenvolvido no *software* Matlab (versão 5.3) da MathWorks, baseado na função interna *lsqnonlin*. Em todos os modelos, considerou-se  $y_0$  igual a zero.

$$y = y_0 + \mu(t - \lambda) \quad (\text{Eq. 5.1})$$

$$y = y_0 + \frac{y_{\max}}{\left[1 + \exp\left(\frac{4\mu}{y_{\max}}(\lambda - t) + 2\right)\right]} \quad (\text{Eq. 5.2})$$

$$y = y_0 + y_{\max} \exp\left\{-\exp\left[\left(\frac{\mu \exp(1)}{y_{\max}}\right)(\lambda - t) + 1\right]\right\} \quad (\text{Eq. 5.3})$$

$$y = y_0 + \mu \left\{ t + \frac{1}{\mu} \ln[\exp(-\mu t) + \exp(-\mu \lambda) - \exp(-\mu t - \mu \lambda)] \right\} \quad (\text{Eq. 5.4})$$

### 5.2.6 Comparação entre os modelos preditivos primários

Para identificar qual modelo preditivo primário melhor ajustou-se aos dados experimentais, foram empregados neste estudo os índices estatísticos de desempenho propostos por Giffel e Zwietering (1999), López *et al.* (2004) e van Boekel e Zwietering (2007), a saber: fator bias (BIAS), fator de exatidão (AF), raiz quadrada do erro quadrático médio (RMSE) e critério de informação Bayesiana (BIC). A definição de cada um desses índices estatísticos é apresentada nas equações (5.5) a (5.8). Na equação (5.8), RSS representa a soma dos quadrados dos resíduos.

$$BIAS = 10 \frac{\sum_{i=1}^n \log(y_{pred,i}) - \log(y_{obs,i})}{n} \quad (\text{Eq. 5.5})$$

$$AF = 10 \frac{\sum_{i=1}^n |\log(y_{pred,i}) - \log(y_{obs,i})|}{n} \quad (\text{Eq. 5.6})$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_{pred,i} - y_{obs,i})^2}{n - p}} \quad (\text{Eq. 5.7})$$

$$BIC = n \ln\left(\frac{RSS}{n}\right) + p \ln(n) \quad (\text{Eq. 5.8})$$

Os dois últimos índices (RMSE e BIC) merecem especial atenção. Eles penalizam os modelos matemáticos que utilizam parâmetros em excesso para realizar o ajuste da curva aos dados experimentais.

### 5.2.7 Influência dos fatores ambientais sobre os parâmetros do modelo primário

Previamente ao desenvolvimento dos modelos preditivos secundários, fez-se a análise de variância (ANOVA) para verificar que fatores ambientais apresentavam efeito significativo sobre os parâmetros do modelo primário. As avaliações foram conduzidas no *software* BioEstati 5.0, adotando-se o nível de significância ( $\alpha$ ) igual a 0,05. A ANOVA foi estratificada por níveis de temperatura, pois um dos objetivos do estudo era avaliar o efeito do pH e do teor de glicose sobre o crescimento do fungo em condições de temperatura ótima e subótima.

### 5.2.8 Ajuste dos modelos preditivos secundários

Os valores médios dos parâmetros do modelo preditivo primário, em cada tratamento, foram ajustados por meio de modelos preditivos secundários capazes de

relacioná-los com a temperatura (T), o pH e o teor de glicose (glic). Os modelos testados neste trabalho foram:

- modelo polinomial de 2ª ordem

$$z = a_0 + a_1.T + a_2.T^2 + a_3.pH + a_4.pH^2 + a_5.glic + a_6.glic^2 + a_7.pH.glic \quad \text{Eq. (5.9)}$$

- modelo Gibson, baseado em Cuppers *et al.* (1997) e Tassou *et al.* (2007)

$$\ln(z) = a_0 + a_1.T + a_2.T^2 + a_3.\sqrt{glic} + a_4.glic + a_5.\sqrt{pH} + a_6.pH + a_7.pH.glic \quad \text{Eq. (5.10)}$$

Nas Equações (5.9) e (5.10), z refere-se à taxa de crescimento radial ( $\mu$ ), ao inverso do tempo de duração da fase lag ( $\lambda$ ) e ao raio máximo da colônia de fungos ( $y_{\max}$ ), quando cada um desses parâmetros dos modelos primários foi equacionado com os fatores ambientais individualmente.

A determinação do valor dos coeficientes de ajuste dos modelos preditivos secundários foi efetuada utilizando-se a planilha eletrônica Excel. Novamente, para comparar o desempenho dos dois modelos, foram utilizados os índices estatísticos descritos pelas equações (5.5) a (5.8).

#### 5.2.9 Validação dos modelos matemáticos

A validação do modelo cinético global, constituído pelo modelo preditivo primário e secundário selecionados nas etapas anteriores, consistiu em comparar as curvas de crescimento de *B. fulva*, preditas pelo equacionamento matemático, com dados obtidos em experimentos independentes. O Quadro 5.2 apresenta os valores dos fatores ambientais utilizados nos experimentos de validação. Para quantificar o desempenho do modelo cinético, foram utilizados os índices BIAS e AF.

**Quadro 5.2** - Valores dos fatores ambientais utilizados nos ensaios de validação do modelo cinético global

Ensaio de validação	T (°C)	pH	Teor de glicose (% m/v)	Número de curvas utilizadas
(I)	24	4,5	8	5
(II)	24	5,5	8	5
(III)	20	6	0	3
(IV)	28	4	0	2
(V)	28	6	10	2

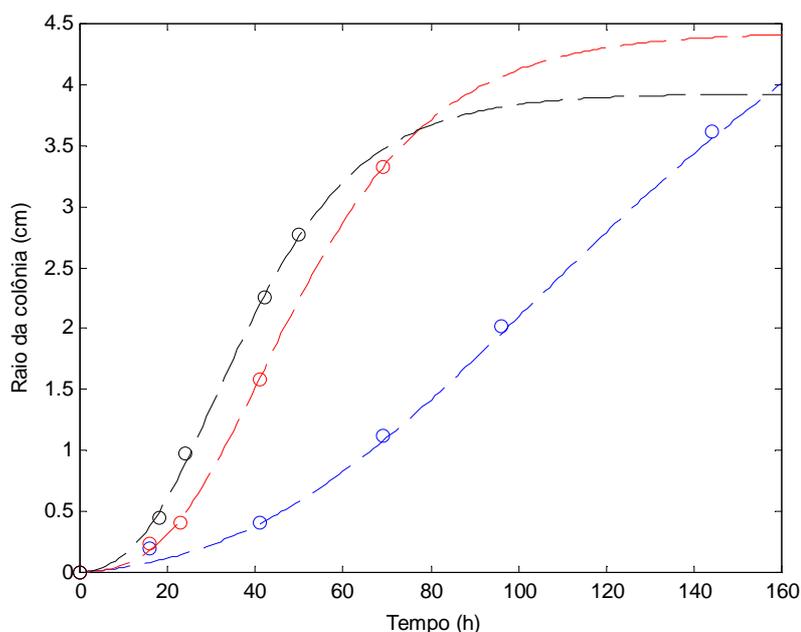
### 5.2.10 Aplicação do modelo cinético desenvolvido

O modelo cinético desenvolvido neste trabalho foi utilizado para estimar o tempo decorrido entre a contaminação do alimento com esporos de *B. fulva* e o surgimento dos primeiros sinais de deterioração. De acordo com Gibson *et al.* (1994), quando o raio da colônia atinge 1,5 mm, ela torna-se visível a olho nu. Por consequência, o consumidor rejeita o alimento. Neste trabalho, esse intervalo de tempo foi denominado de tempo de vida útil do produto.

Para efetuar a avaliação, buscou-se na literatura dados típicos de pH e de teor de glicose de variedades de mamão. Tais informações foram utilizadas para gerar a curva de crescimento do fungo, em diferentes temperaturas. Com base nessa curva, determinou-se o tempo para que o raio da colônia atingisse o valor proposto por Gibson *et al.* (1994).

## 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 5.1 mostra as curvas de crescimento de *B. fulva* em substrato artificial com pH igual a 6,0 e com 10% de glicose, para as temperaturas de 20°C (pontos azuis), 28°C (pontos vermelhos) e 36°C (pontos pretos). Observa-se que temperaturas mais altas promoveram o aumento na taxa de crescimento do microrganismo, dentro da faixa avaliada neste estudo.



**Figura 5.1** - Curvas de crescimento de *B. fulva* em BDA com pH = 6,0 e com 10% de glicose, mostrando dados experimentais (o) e o ajuste do modelo Gompertz modificado (--), nas temperaturas de 20°C (azul), 28°C (vermelho) e 36°C (preto).

Durante os procedimentos experimentais, foram obtidas 78 curvas de cinética de crescimento deste fungo em diferentes condições de temperatura de incubação, de pH e de teor de glicose do meio de cultura, semelhantes àquelas mostradas na Figura 5.1. Nenhuma das curvas experimentais apresentou tendência à formação de assíntota superior.

Na Tabela 5.1, são apresentados os valores médios e os desvios-padrão dos parâmetros de ajuste das curvas de crescimento do fungo descritas por cada modelo preditivo primário testado. A análise dos resultados obtidos mostra maior variabilidade para o parâmetro  $\lambda$  do que para o parâmetro  $\mu$ , dentro de cada tratamento e para todos os modelos testados.

**Tabela 5.1** - Valores médios e desvios-padrão para a taxa de crescimento radial ( $\mu$ , em mm.dia<sup>-1</sup>) e para a estimativa de tempo de duração da fase lag ( $\lambda$ , em h) obtidos para *B. fulva* nos diversos tratamentos empregados no estudo, segundo os modelos preditivos primários utilizados.

T (°C)	pH	% glicose	MODELO LINEAR		MODELO LOGÍSTICO		MODELO GOMPERTZ		MODELO BARANYI		
			$\mu$	$\lambda$	$\mu$	$\lambda$	$\mu$	$\lambda$	$\mu$	$\lambda$	
20	4	0	7,26 ± 0,23	28,39 ± 4,30	9,61 ± 0,35	43,53 ± 4,53	8,24 ± 0,26	36,27 ± 4,66	8,49 ± 0,56	43,95 ± 6,61	
		5	7,55 ± 0,35	28,72 ± 2,61	10,31 ± 0,80	43,84 ± 2,46	9,26 ± 1,22	38,31 ± 4,75	8,47 ± 0,10	40,90 ± 2,58	
		10	7,41 ± 0,33	31,22 ± 6,80	10,42 ± 0,58	47,09 ± 6,72	9,04 ± 0,49	40,51 ± 7,19	8,72 ± 0,79	46,93 ± 10,1	
	5	0	7,32 ± 0,07	29,59 ± 0,61	9,13 ± 0,11	43,20 ± 0,20	8,12 ± 0,10	38,38 ± 0,41	8,56 ± 0,07	45,12 ± 0,46	
		5	8,29 ± 0,47	34,04 ± 2,62	10,97 ± 0,95	47,98 ± 5,75	9,72 ± 0,55	43,20 ± 2,93	10,76 ± 1,28	52,54 ± 1,63	
		10	7,41 ± 0,06	29,51 ± 2,70	10,07 ± 0,50	44,72 ± 3,81	8,55 ± 0,43	37,21 ± 4,03	8,61 ± 0,30	44,56 ± 4,68	
6	0	7,17 ± 0,08	31,66 ± 0,45	8,84 ± 0,12	47,28 ± 0,57	7,93 ± 0,07	39,81 ± 0,56	8,14 ± 0,05	45,97 ± 0,79		
	5	8,27 ± 0,37	32,27 ± 0,12	11,12 ± 0,50	47,38 ± 0,03	9,44 ± 0,44	40,07 ± 0,03	9,65 ± 0,35	46,95 ± 1,01		
	10	7,40 ± 0,11	32,32 ± 1,98	9,57 ± 0,07	47,34 ± 2,34	8,33 ± 0,04	41,17 ± 2,71	8,95 ± 0,09	50,29 ± 3,71		
28	4	0	13,56 ± 0,28	13,75 ± 0,32	19,57 ± 0,88	22,73 ± 0,45	16,20 ± 0,56	19,10 ± 0,63	17,36 ± 0,25	25,36 ± 1,41	
		5	13,81 ± 0,57	7,10 ± 2,90	20,85 ± 1,33	15,43 ± 2,82	18,39 ± 0,82	12,16 ± 2,62	14,67 ± 1,18	10,85 ± 4,85	
		10	13,16 ± 0,48	14,55 ± 2,08	28,31 ± 5,26	21,66 ± 1,37	16,67 ± 0,84	18,63 ± 1,68	18,07 ± 0,92	29,84 ± 2,10	
	5	0	14,57 ± 0,92	12,35 ± 0,94	20,30 ± 2,04	20,86 ± 1,07	17,04 ± 1,41	17,23 ± 0,96	17,72 ± 1,06	20,49 ± 3,14	
		5	13,23 ± 0,82	21,88 ± 0,79	17,36 ± 1,11	34,28 ± 1,82	15,90 ± 1,34	31,19 ± 2,75	16,40 ± 1,16	34,10 ± 0,93	
		10	13,51 ± 0,24	12,36 ± 1,32	19,64 ± 0,77	20,91 ± 1,54	16,23 ± 0,52	16,95 ± 1,55	16,50 ± 0,59	22,32 ± 2,41	
	6	0	14,09 ± 1,28	13,84 ± 0,49	20,55 ± 3,34	21,09 ± 1,97	18,01 ± 1,58	17,59 ± 1,57	13,77 ± 5,43	14,28 ± 8,11	
		5	14,16 ± 0,25	11,34 ± 0,95	18,26 ± 0,27	17,94 ± 1,08	16,07 ± 0,23	14,65 ± 1,12	16,30 ± 0,61	18,62 ± 1,67	
		10	14,52 ± 0,11	14,30 ± 0,31	22,10 ± 0,48	23,40 ± 0,35	17,84 ± 0,31	19,37 ± 0,32	18,20 ± 0,14	24,90 ± 0,29	
	36	4	0	17,24 ± 1,61	8,12 ± 3,0	20,55 ± 1,20	12,00 ± 2,92	18,89 ± 1,29	10,14 ± 2,95	19,90 ± 2,87	13,55 ± 4,35
			5	19,47 ± 0,51	11,39 ± 1,12	23,95 ± 1,61	15,10 ± 1,22	22,17 ± 1,61	13,40 ± 0,97	23,41 ± 0,55	17,78 ± 2,23
			10	16,00 ± 0,27	10,85 ± 0,47	18,79 ± 0,40	14,64 ± 0,52	17,39 ± 0,38	12,81 ± 0,45	20,14 ± 0,06	19,10 ± 0,97
5		0	18,64 ± 0,97	9,96 ± 1,30	21,91 ± 1,37	13,95 ± 1,07	20,26 ± 1,19	12,16 ± 1,02	22,15 ± 1,29	16,18 ± 1,78	
		5	19,42 ± 0,16	11,97 ± 0,68	23,23 ± 0,48	15,78 ± 0,64	21,43 ± 0,45	13,93 ± 0,63	23,85 ± 0,53	18,88 ± 0,95	
		10	16,15 ± 1,67	11,37 ± 2,77	20,19 ± 1,01	17,15 ± 2,78	18,56 ± 1,11	14,86 ± 3,12	20,19 ± 4,55	18,68 ± 5,96	
6	0	19,33 ± 1,26	10,67 ± 1,65	22,83 ± 1,54	14,84 ± 2,00	21,11 ± 1,53	13,07 ± 2,12	23,19 ± 1,98	17,00 ± 2,13		
	5	19,21 ± 0,64	10,22 ± 0,22	22,87 ± 1,14	13,72 ± 0,26	21,11 ± 1,03	11,94 ± 0,28	22,53 ± 0,60	16,03 ± 0,37		
	10	16,61 ± 0,67	9,62 ± 1,21	19,71 ± 0,87	13,06 ± 1,25	18,21 ± 0,83	11,29 ± 1,24	19,89 ± 1,24	16,40 ± 1,66		

Trabalhos similares a este foram conduzidos por Valík e Piecková (2001) e Panagou *et al.* (2010). Os primeiros pesquisadores citados estudaram o crescimento de *B. fulva* em ágar Sabouraud; no trabalho foi adotado o modelo de Baranyi para avaliar os parâmetros de crescimento. Valík e Piecková (2001) reportaram valores para o parâmetro  $\mu$  da ordem de 20 mm.dia<sup>-1</sup>, em pH igual a 6,0 e temperatura de 25°C. Os valores encontrados para esse parâmetro neste trabalho, pelo modelo Baranyi, em temperatura de 28°C e pH igual a 6,0, oscilou entre 13,8 e 18,2 mm.dia<sup>-1</sup>. Acredita-se que esse valor, moderadamente inferior ao reportado na literatura, deve-se a diferenças nas cepas e nos meios de cultura utilizados em cada estudo, assim como nos procedimentos de obtenção dos parâmetros da curva de crescimento.

Panagou *et al.* (2010), por sua vez, estudaram o crescimento desse fungo em meio ágar extrato de malte. Na temperatura de 35°C, obtiveram taxa de crescimento próximo a 26 mm.dia<sup>-1</sup> e, a 20°C, 10 mm.dia<sup>-1</sup>, utilizando o modelo de Baranyi. No presente estudo, pelo mesmo modelo primário, a maioria dos valores de taxa de crescimento, a 36°C, esteve entre 19,9 e 23,9 mm.dia<sup>-1</sup>, enquanto a 20°C os valores oscilaram entre 8,5 e 10,8 mm.dia<sup>-1</sup>. Portanto, constata-se que os valores obtidos neste trabalho são semelhantes aos citados na literatura. Com relação ao tempo de duração da fase lag, os valores encontrados por Panagou *et al.* (2010), a 20°C (35 a 42 h), são um pouco inferiores aos observados neste trabalho (41 a 53 h), na mesma temperatura. A 35°C, os valores encontrados por esses pesquisadores (15 a 24 h) são semelhantes aos obtidos neste estudo, em que  $\lambda$  oscilou entre 14 e 19 horas.

### 5.3.1 Comparação entre modelos preditivos primários

Os quatro modelos preditivos primários adotados neste estudo (Eq. 5.1 a 5.4) foram ajustados a cada uma das curvas de crescimento, obtidas experimentalmente. A qualidade do ajuste de cada modelo aos dados experimentais foi avaliada pelos índices estatísticos apresentados na Seção 5.2.6. Tal comparação contemplou 317 pares de dados (modelo x experimental). A Tabela 5.2 mostra os resultados dessa análise.

Para o índice bias, quanto mais próximo de 1 for seu valor, melhor é o desempenho do modelo ao ajustar-se aos dados experimentais. De acordo com Ross (1999) *apud* Mellefont *et al.* (2003), se o fator BIAS estiver entre 0,90 e 1,05, o modelo matemático pode ser considerado bom. Assim, conclui-se que todos os modelos mostraram desempenho satisfatório, destacando-se o modelo logístico para o qual se obteve o valor de BIAS mais próximo de 1.

**Tabela 5.2** - Valores dos índices estatísticos obtidos para cada modelo preditivo primário, utilizados para comparar e selecionar o modelo que melhor ajustou-se aos dados experimentais

Índice	Modelos Primários			
	Linear	Logístico	Gompertz	Baranyi
BIAS	0,977	0,994	0,975	1,033
AF	1,083	1,057	1,065	1,115
RMSE	0,154	0,094	0,065	0,117
BIC	-836	-1348	-1651	-1012

O índice de desempenho AF, por sua vez, informa o percentual de erro do modelo ao prever o comportamento dos dados experimentais. Neste caso, os modelos linear, logístico e Gompertz modificados mostraram valores similares, oscilando entre 5,7 e 8,3%. Contudo, ainda é necessário considerar nessa comparação o número de parâmetros utilizados em cada modelo primário. O modelo linear e de Baranyi simplificado utilizam apenas dois parâmetros ( $\mu$  e  $\lambda$ ), enquanto o modelo logístico e Gompertz modificados necessitam de um terceiro parâmetro, relacionado ao tamanho máximo que a colônia de fungos poderá atingir, em determinadas condições experimentais ( $y_{\max}$ ). Para considerar esse aspecto na avaliação, foram utilizados os índices RMSE e BIC. Quanto menores forem os seus valores, melhor é o desempenho do modelo ao ajustar os dados experimentais. De acordo com esses critérios, observa-se a superioridade do modelo Gompertz modificado em relação aos demais. Esse resultado, associado aos dos índices bias e AF permitiram concluir que o modelo Gompertz modificado foi o que melhor descreveu o comportamento de crescimento de *B. fulva* nos meios de cultura estudados. Por isso, ele foi selecionado para dar continuidade às etapas seguintes do trabalho.

### 5.3.2 Estudo dos efeitos dos fatores ambientais sobre os parâmetros do modelo Gompertz

Para a obtenção de modelos preditivos secundários, inicialmente, realizou-se o teste de análise de variância (ANOVA) a fim de verificar que fatores ambientais (T, pH e teor de glicose) apresentavam efeito significativo sobre os parâmetros do modelo Gompertz modificado ( $\mu$ ,  $\lambda$ ,  $y_{\max}$ ). Antes, porém, foi necessário estudar a variabilidade observada nos dados experimentais e procurar minimizar seu efeito. É comum encontrar tal variabilidade em estudos sobre o crescimento de microrganismos, principalmente em relação ao parâmetro  $\lambda$ , o que pode comprometer a exatidão dos modelos secundários derivados desses dados. No trabalho realizado por Baty e Delignette-Muller (2004), verificou-se que o coeficiente de variação (CV) para o parâmetro  $\lambda$ , estimado pelo modelo

Baranyi, oscilou entre 4 e 60%, enquanto que, no modelo Gompertz, foram observados valores de CV entre 13 e 112%. Alguns autores sugerem que seja efetuada a transformação dos dados originais para reduzir a sua variabilidade e, por consequência, melhorar sua homocedasticidade. Nos trabalhos de Valík *et al.* (1999) e de Gougouli e Koutsoumanis (2010) tal procedimento foi adotado. No presente estudo, optou-se por analisar criteriosamente o conjunto de dados experimentais e excluir as curvas que geraram previsões para os parâmetros  $\mu$  e  $\lambda$  muito distintas dos demais valores observados dentro de um mesmo tratamento.

Com os dados filtrados, avaliou-se o efeito do pH e do teor de glicose sobre os parâmetros da curva de crescimento em cada uma das temperaturas estudadas. Assim, foi possível averiguar como o pH e o teor de glicose influenciam o crescimento do fungo em condições de temperatura ótima e subótima. Os resultados obtidos, em termos de valor-p, são mostrados na Tabela 5.3. Nessa tabela, nota-se que, em todas as temperaturas consideradas no estudo, o teor de glicose e a interação pH x glicose apresentaram efeito significativo sobre a taxa de crescimento radial. Em relação ao pH individualmente, seu efeito sobre esse parâmetro foi significativo somente na temperatura de 28°C.

**Tabela 5.3** - Efeito do pH, do teor de glicose e da interação pH x glicose sobre os parâmetros da curva de crescimento de *B. fulva*, preditos pelo modelo Gompertz modificado, em termos de valor-p.

Fatores intrínsecos	T = 20°C			T = 28°C			T = 36°C		
	$\mu$	$\lambda$	$y_{\max}$	$\mu$	$\lambda$	$y_{\max}$	$\mu$	$\lambda$	$y_{\max}$
pH	0,09	0,03	$10^{-4}$	0,002	$10^{-5}$	$10^{-5}$	0,11	0,43	0,24
glicose	$10^{-5}$	0,39	0,001	$10^{-4}$	0,073	$10^{-5}$	$10^{-5}$	0,13	0,006
pH x glicose	0,012	0,82	0,016	$10^{-5}$	$10^{-7}$	$10^{-5}$	0,011	0,01	0,30

Em relação ao tempo de duração da fase lag, observou-se o efeito significativo do pH nas temperaturas de 20 e 28°C. O teor de glicose não influenciou o tempo de duração da fase lag de *B. fulva*, dentro da faixa de valores estudados. A interação pH x glicose mostrou efeito significativo sobre o comportamento do parâmetro  $\lambda$  apenas a 28°C e a 36°C, principalmente, quando o efeito do pH também era significativo. Por esses motivos, optou-se por excluir o teor de glicose e a interação pH x glicose do equacionamento para o tempo de duração da fase lag.

Para o raio máximo alcançado pela colônia, nota-se que o pH, o teor de glicose e a interação pH x glicose apresentaram efeito significativo a 20 e a 28°C. A 36°C, somente o

teor de glicose interferiu significativamente no comportamento desse parâmetro. Portanto, todas as parcelas das Equações (5.9) e (5.10) foram consideradas na modelagem matemática desse parâmetro do modelo Gompertz modificado. Salieta-se que, embora o equacionamento para o parâmetro raio máximo da colônia seja questionável quanto ao real valor de seu significado físico, ainda assim modelou-se o comportamento desse parâmetro neste estudo, pois o autor entende que ele é importante para descrever corretamente o formato da curva de crescimento do microrganismo.

### 5.3.3 Comparação entre os modelos preditivos secundários

Os coeficientes de ajuste das Equações (5.9) e (5.10), que descrevem o efeito dos fatores ambientais sobre os parâmetros  $\mu$ ,  $\lambda$  e  $y_{\max}$ , são mostrados na Tabela 5.4. Nessa tabela, também são apresentados os valores dos índices estatísticos adotados para comparar os modelos preditivos secundários. Constata-se que a influência dos fatores ambientais sobre a taxa de crescimento radial do microrganismo foi melhor descrita pelo modelo Gibson. Todos os índices apontaram melhor desempenho desse modelo em relação ao modelo polinomial.

**Tabela 5.4** - Valores dos parâmetros de ajuste e dos índices de desempenho dos modelos preditivos secundários

	Modelo Polinomial					Modelo Gibson						
	Valores dos coeficientes	Bias	AF	RMSE	BIC	Valores dos coeficientes	Bias	AF	RMSE	BIC		
Taxa de crescimento radial	a <sub>0</sub>	-36,37				a <sub>0</sub>	-2,021					
	a <sub>1</sub>	3,0351				a <sub>1</sub>	0,278					
	a <sub>2</sub>	-0,0418				a <sub>2</sub>	-0,004					
	a <sub>3</sub>	-0,1739				a <sub>3</sub>	0,108					
	a <sub>4</sub>	0,0661	1,001	1,048	1,073	20,7	a <sub>4</sub>	-0,017	1,000	1,016	0,06	-132
	a <sub>5</sub>	0,7011				a <sub>5</sub>	0,066					
	a <sub>6</sub>	-0,0418				a <sub>6</sub>	0,013					
	a <sub>7</sub>	-0,0635				a <sub>7</sub>	-0,004					
Tempo de duração da fase lag	a <sub>0</sub>	0,0742				a <sub>0</sub>	4,6846					
	a <sub>1</sub>	0,0075				a <sub>1</sub>	0,2502					
	a <sub>2</sub>	-7,3.10 <sup>-5</sup>				a <sub>2</sub>	-0,003					
	a <sub>3</sub>	-0,068				a <sub>3</sub>	-					
	a <sub>4</sub>	0,0066	1,012	1,140	0,012	-221	a <sub>4</sub>	-	1,002	1,043	0,198	-71
	a <sub>5</sub>	-				a <sub>5</sub>	-10,76					
	a <sub>6</sub>	-				a <sub>6</sub>	2,3844					
	a <sub>7</sub>	-				a <sub>7</sub>	-					

(continua)

**Tabela 5.4** - Valores dos parâmetros de ajuste e dos índices de desempenho dos modelos preditivos secundários (continuação)

	Modelo Polinomial					Modelo Gibson						
	Valores dos coeficientes	Bias	AF	RMSE	BIC	Valores dos coeficientes	Bias	AF	RMSE	BIC		
Raio máximo da colônia	a <sub>0</sub>	-9,5913					a <sub>0</sub>	-10,25				
	a <sub>1</sub>	-0,2375					a <sub>1</sub>	-0,069				
	a <sub>2</sub>	0,0032					a <sub>2</sub>	0,0010				
	a <sub>3</sub>	7,5781	1,010	1,103	0,97	15	a <sub>3</sub>	0,0835	1,003	1,057	0,17	-80
	a <sub>4</sub>	-0,7416					a <sub>4</sub>	-0,074				
	a <sub>5</sub>	-0,0646					a <sub>5</sub>	11,651				
	a <sub>6</sub>	-0,0132					a <sub>6</sub>	-2,596				
	a <sub>7</sub>	0,0220					a <sub>7</sub>	0,006				

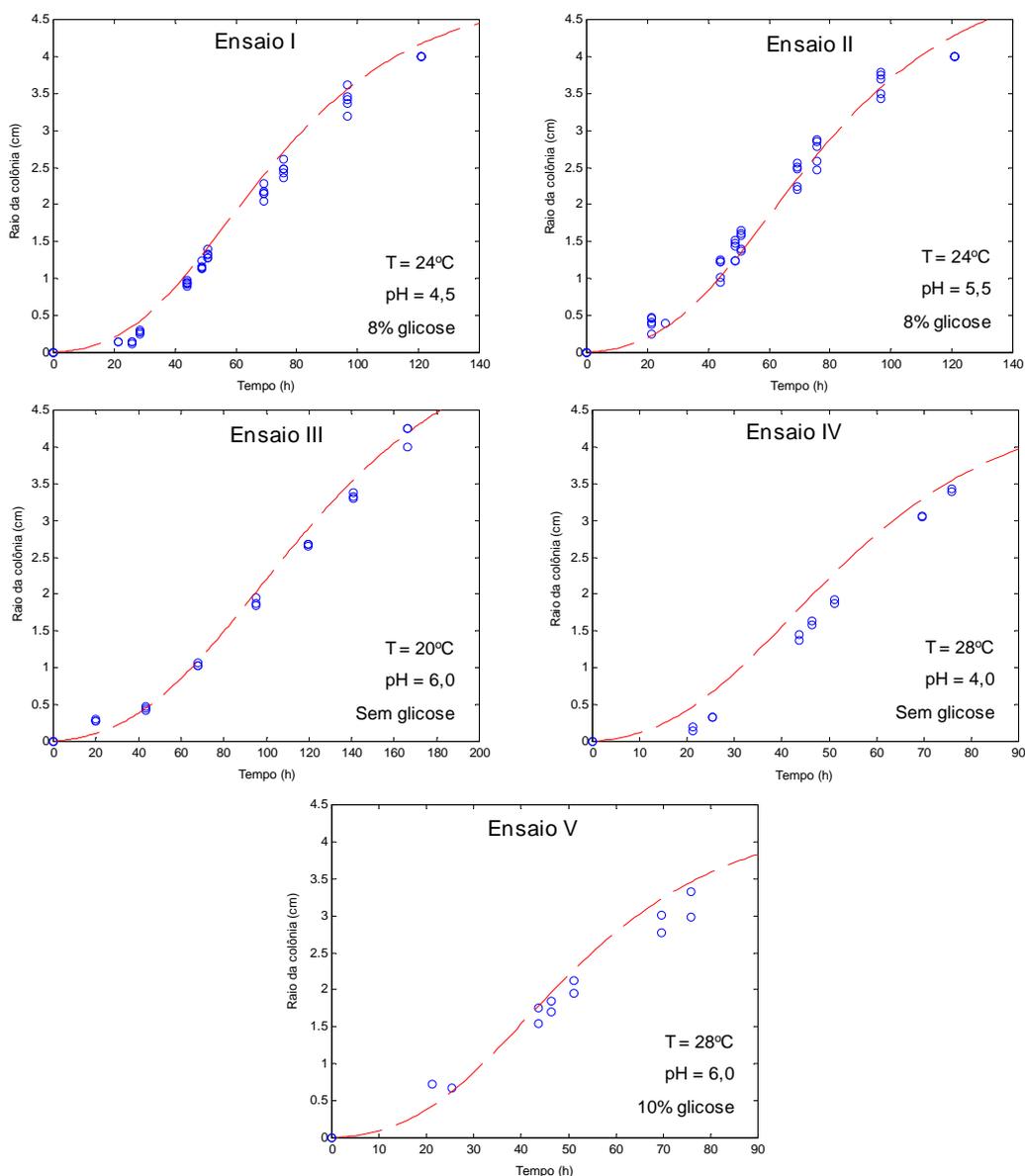
Para o ajuste do tempo de duração fase lag do microrganismo em função da temperatura e do pH, os resultados da Tabela 5.4 permitem concluir que o modelo Gibson apresentou melhor desempenho para os índices bias e AF. Já o modelo polinomial mostrou melhor desempenho para os índices RMSE e BIC. Como os valores de bias e AF encontrados para o modelo polinomial também foram razoáveis, optou-se por privilegiar o resultado dos índices RMSE e BIC e, portanto, o modelo polinomial foi selecionado para descrever o comportamento do parâmetro  $\lambda$ .

No que diz respeito à dependência entre o raio máximo da colônia e os fatores ambientais, o modelo Gibson foi, novamente, a equação que melhor expressou essa relação, conforme todos os índices estatísticos utilizados na análise.

#### 5.3.4 Validação do modelo cinético global

O modelo preditivo primário e secundário desenvolvido nas etapas anteriores foi empregado para gerar curvas de crescimento de *Byssochlamys fulva* para cada um dos ensaios utilizados na validação, apresentados no Quadro 5.2. Essas curvas foram comparadas com dados de experimentos independentes. Os gráficos obtidos na etapa de validação são mostrados na Figura 5.2.

Percebe-se pelos gráficos da Figura 5.2 que o modelo cinético global, constituído pelo modelo de Gompertz modificado e pelos modelos polinomial e Gibson, foi capaz de descrever satisfatoriamente o crescimento do microrganismo nos ensaios I, II e III. Para os ensaios IV e V, o desempenho do equacionamento matemático foi razoável, pois é notável o desvio existente entre os valores preditos pelo modelo e os dados experimentais.



**Figura 5.2** - Curvas de crescimento de *B. fulva* obtidas para cada um dos ensaios utilizados na validação do modelo cinético global desenvolvido (linha vermelha) comparado com dados experimentais (pontos azuis).

Para melhor avaliar o desempenho do modelo em cada ensaio de validação, foram calculados os valores dos índices bias e fator de exatidão (AF) para cada curva utilizada nesta etapa. Os valores desses índices são mostrados na Tabela 5.5.

**Tabela 5.5** – Faixa de valores do índice bias e do fator de exatidão (AF) obtidos para cada ensaio utilizado para a validação do modelo cinético global de crescimento microbiano.

Índices	Ensaio de validação				
	(I)	(II)	(III)	(IV)	(V)
BIAS	1,155 – 1,269	0,821 – 1,001	0,89 – 0,923	1,414 – 1,447	1,007 – 1,066
AF	1,158 – 1,269	1,059 – 1,219	1,198 – 1,204	1,414 – 1,447	1,091 – 1,195

Os resultados apresentados na Tabela 5.5 indicam que a exatidão do modelo desenvolvido oscilou de 55% (ensaio IV) a 94% (ensaio II), com valor típico próximo a 80%. Para o índice bias, observa-se que nos ensaios I, IV e V, o modelo mostrou falha segura (BIAS > 1), enquanto nos ensaios II e III, seu desvio concentrou-se na região de falha insegura (BIAS < 1). Confrontando esses resultados com as condições testadas em cada ensaio utilizado para a validação do modelo, infere-se que o equacionamento desenvolvido apresenta previsões insatisfatórias apenas quando o microrganismo cresce em substrato com baixo teor de glicose e de pH (ensaio IV).

### 5.3.5 Estimativa do tempo de vida útil de alimento

O modelo cinético global, constituído pelo modelo Gompertz modificado e pelos modelos Gibson e polinomial, foi utilizado para estimar o tempo de vida útil de polpas de mamão, a partir dos valores típicos de pH e de teor de glicose desse alimento encontrados na literatura (SHINAGAWA, 2009) e em diferentes condições de temperatura de armazenamento. Os resultados das simulações são mostrados na Tabela 5.6. Os valores encontrados fornecem apenas uma estimativa do tempo necessário para o aparecimento de colônias de *B. fulva* nesse alimento. Dependendo da presença de outros componentes químicos que constituem a polpa de mamão, o crescimento do fungo pode ser inibido ou favorecido, alterando o tempo de vida útil do produto.

**Tabela 5.6** - Tempo de vida útil para a polpa de mamão, estimado pela aplicação do modelo cinético global desenvolvido neste estudo

Alimento	pH	Teor de glicose (%)	Temperatura (°C)	Tempo de vida útil (h)	Referência
Polpa de mamão formosa	5,10	3,78	20	28,7	Shinagawa (2009)
			30	11,0	
Polpa de mamão golden	5,42	4,58	20	28,4	
			30	11,01	
Polpa de mamão sunrise	5,35	3,55	20	28,3	
			30	10,9	

A partir das simulações efetuadas, nota-se que pequenas oscilações na constituição do alimento, em termos de pH e de teor de glicose, não alteram significativamente o seu tempo de vida útil. Contudo, a temperatura de armazenamento do produto mostrou intenso efeito sobre essa variável. Tais resultados permitem concluir que o abuso de temperatura durante o armazenamento do alimento contaminado com esporos de *B. fulva* pode comprometer significativamente seu tempo de vida útil, pois propicia o rápido surgimento de colônias visíveis no produto. Desta forma, o ajuste apropriado de temperatura durante o

armazenamento de polpas de frutas mostra-se como a uma estratégia para estender o tempo de vida útil desse gênero alimentício, justificando estudo mais detalhados sobre o tema.

#### 5.4 CONCLUSÕES

---

Este estudo demonstrou que a temperatura, o pH e o teor de glicose apresentam efeito significativo sobre a cinética de crescimento de *Byssochlamys fulva*. De maneira geral, todos os modelos preditivos primários e secundários testados conseguiram descrever adequadamente o comportamento do microrganismo. Contudo, o modelo primário de Gompertz modificado, associado aos modelos secundário de Gibson e polinomial, apresentou melhor desempenho, de acordo com os índices estatísticos aplicados neste trabalho.

As análises estatísticas mostraram também que o pH, na faixa de valores analisados, tem efeito significativo sobre a taxa de crescimento de *B. fulva* apenas na condição de temperatura subótima (28°C). O teor de glicose, por sua vez, não mostrou efeito sobre o tempo de duração da fase lag, considerando a faixa de valores explorados no estudo.

A validação do modelo em diferentes cenários permitiu identificar as condições em que suas predições são confiáveis e as regiões em que seu desempenho não é satisfatório. Neste aspecto, verificou-se que o modelo deve ser utilizado com cautela em regiões de baixo pH e baixo teor de glicose.

As potencialidades de aplicação do modelo matemático para prever o crescimento de *B. fulva* em alimentos reais foram exploradas. Com o modelo desenvolvido, estimou-se o tempo de vida útil de polpa de mamão contaminada com esporos desse fungo, em função de seu pH, de seu teor de glicose e da temperatura de armazenamento. As simulações indicaram que a temperatura tem maior efeito sobre essa variável do que o pH e o teor de glicose.

#### AGRADECIMENTOS

À professora Sueli van der Sand, por ter cedido as instalações do Laboratório de Micologia Ambiental para que parte deste estudo pudesse ser realizado. À doutoranda Michele Mann, por ter dedicado seu tempo para auxiliar na execução dos ensaios laboratoriais efetuados neste trabalho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baty, F., Delignette-Muller, M-L., 2004. Estimating the bacterial lag time: which model, which precision? *Int. J. Food Microbiol.* 91, 261-277.
- Chapman, B., Winley, E., Fong, A.S.W., Hocking, A. D., Stewart, C.M., Buckle, K.A., 2007. Ascospore inactivation and germination by high pressure processing is affected by ascospore age. *Innovative Food Sci. Emerging Technol.* 8, 531-534.
- Cuppers, H.G.A.M., Oomes, S., Brul, S., 1997. A model for combined effects of temperature and salt concentration on growth rate of food spoilage molds. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3764-3769.
- Dantigny, P., Guilmart, A., Bensoussan, M., 2005. Basis of predictive mycology. *Int. J. Food Microbiol.* 100, 187-196.
- Garcia, D., Ramos, A.J., Sanchis, V., Marín, S., 2009. Predicting mycotoxins in foods: a review. *Food Microbiol.* 26, 757-769.
- Gibson, A.M., Baranyi, J.I., Pitt, J.I., Eyles, M.J., Roberts, T.A., 1994. Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. *Int. J. Food Microbiol.* 23, 419-431.
- Giffel, M.C., Zwietering, M.H., 1999. Validation of predictive models describing the growth of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 46, 135-149.
- Gougouli, M., Kalantzi, K., Beletsiotis, E., Koutsoumanis, K.P., 2011. Development and application of predictive models for fungal growth as tools to improve quality control in yogurt production. *Food Microbiol.* 28, 1453-1462.
- Gougouli, M., Koutsoumanis, K.P., 2010. Modelling growth of *Penicillium expansum* and *Aspergillus niger* at constant and fluctuating temperature conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 140, 254-262.
- Huis In't Veld, J.H.J., 1996. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *Int. J. Food Microbiol.* 33, 1-18.
- Kotzekidou, P., 1997. Heat resistance of *Byssoschlamys nivea*, *Byssoschlamys fulva* and *Neosartorya fischeri* isolated from canned tomato paste. *J. Food Sci.* 62, 410-437.

López, S., Prieto, M., Dijkstra, J., Dhanoa, M.S., France, J., 2004. Statistical evaluation of mathematical models for microbial growth. *Int. J. Food Microbiol.* 96, 289-300.

Mellefont, L.A., McMeekin, T.A., Ross, T., 2003. Performance evaluation of model describing the effects of temperature, water activity, pH and lactic acid concentration on the growth of *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.* 82, 45-58.

Mousa, W., Ghazali, F.M., Jinap, S., Ghazali, H.M., Radu, S., 2011. Modelling the effect of water activity and temperature on growth rate and aflatoxin production by two isolates of *Aspergillus flavus* on paddy. *J. Appl. Microbiol.* 111, 1262-1274.

Panagou, E.Z., Chelonas, S., Chatzipavlidis, I., Nychas, G.E., 2010. Modelling the effect of temperature and water activity on the growth rate and growth/no growth interface of *Byssoschlamys fulva* and *Byssoschlamys nivea*. *Food Microbiol.* 27, 618-627.

Panagou, E.Z., Kodogiannis, V., Nychas, G.J.E., 2007. Modelling fungal growth using radial basis function neural networks: the case of the ascomycetous fungus *Monascus ruber* van Tieghem. *Int. J. Food Microbiol.* 117, 276-286.

Parra, R., Magan, N., 2004. Modelling the effect of temperature and water activity on growth of *Aspergillus niger* strains and applications for food spoilage moulds. *J. Appl. Microbiol.* 97, 429-438.

Sant'Ana, A.S., Simas, R.C., Almeida, C.A.A., Cabral, E.C., Rauber, R.H., Mallmann, C.A., Eberlin, M.N., Rosenthal, A., Massaguer, P.R., 2010. Influence of package, type of apple juice and temperature on the production of patulin by *Byssoschlamys nivea* and *Byssoschlamys fulva*. *Int. J. Food Microbiol.*, 142, 156-163.

Shinagawa, F.B., 2009. Avaliação das características bioquímicas da polpa de mamão (*Carica papaya* L.) processada por alta pressão hidrostática. Dissertação de Mestrado – Escola de Química, UFRJ, 125 p.

Silva, A.R., Sant'Ana, A.S., Massaguer, P.R., 2010. Modelling the lag time and growth rate of *Aspergillus* section *Nigri* IOC 4573 in mango nectar as a function of temperature and pH. *J. Appl. Microbiol.* 109, 1105-1116.

Taniwaki, M.H., Hocking, A.D., Pitt, J.I., Fleet, G.H., 2010. Growth and mycotoxin production by fungi in atmospheres containing 80% carbon dioxide and 20% oxygen. *Int. J. Food Microbiol.* 143, 218-225.

Tassou, C.C., Panagou, E.Z., Natskoulis, P., Magan, N., 2007. Modelling the effect of temperature and water activity on the growth of two ochratoxigenic strains of *Aspergillus carbonarius* from Greek wine grapes. *J. Appl. Microbiol.* 103, 2267-2276.

Valík, L., Baranyi, J., Görner, F., 1999. Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Penicillium roqueforti*. *Int. J. Food Microbiol.* 47, 141-146.

Valík, L., Piecková, E., 2001. Growth modelling of heat-resistant fungi: the effect of water activity. *Int. J. Food Microbiol.* 63, 11-17.

Van Boekel, M.A.J.S., Zwietering, M.H. Experimental design, data processing and model fitting in predictive microbiology. In: Brul, S., van Gerwen, S., Zwietering, M., 2007. *Modelling microorganisms in food*, CRC Press LCC: Boca Raton, 23-43.

Welke, J.E., Hoeltz, M., Dottori, H.A., Noll, I.B., 2009. Ocorrência de fungos termorresistentes em suco de maçã. *Braz. J. Food Technol. II SSA*, 78-83.

Whiting, R.C., Buchanan, R.L., 1993. A classification of models in predictive microbiology – a reply to K. R. Davey. *Food Microbiol.*, 10, 175-177.

## CAPÍTULO 6

### Resultados e Discussão: artigo 3

No terceiro artigo desta tese, foram tratadas as seguintes questões de pesquisa:

- i. o abuso na temperatura inicial de armazenamento da polpa de mamão contaminada com esporos de *Byssochlamys fulva* pode ser compensado pelas condições de refrigeração a que é submetido o produto, sem comprometer seu tempo de vida útil?
- ii. qual é o efeito da temperatura inicial do produto e da velocidade do ar da corrente de refrigeração sobre o tempo de vida útil da polpa de mamão refrigerada e contaminada com esporos de *B. fulva*?

No apêndice C, apresentam-se os dados experimentais utilizados neste estudo, as curvas de ajuste dos modelos preditivos primários aos dados experimentais e os valores de seus respectivos parâmetros de ajuste. Outras informações complementares sobre este estudo também são descritas nesse apêndice.

Este artigo foi publicado no periódico *Journal of Food Engineering*, v. 118, p. 279-288, 2013.

## INTEGRATING A KINETIC MICROBIAL MODEL WITH A HEAT TRANSFER MODEL TO PREDICT

*BYSSOCHLAMYS FULVA* GROWTH IN REFRIGERATED PAPAYA PULP

Paulo Ricardo Santos da Silva\*; Isabel Cristina Tessaro; Ligia Damasceno Ferreira Marczak  
Laboratório de Tecnologia e Processamento de Alimentos – Departamento de Engenharia  
Química – UFRGS – Brasil

## Abstract

Integrating mathematical modeling of process engineering with kinetic microbial models is a promising option for improving the food safety. In this study the effects of refrigeration air stream velocity and initial product temperature on the time taken for stored papaya pulp to be spoiled by *Byssochlamys fulva* were evaluated. A predictive model to describe the influence of temperature on the growth of this mould was developed. This model was then integrated with equations describing heat transfer in an infinite slab with a convective boundary condition. Several different refrigeration process scenarios were simulated. The results showed that the modified Gompertz model combined with the extended square root model and hyperbolic model offered the best description of the fungus's behavior in papaya pulp. The simulations showed that product's shelf-life can be reduced up to 76% in storage conditions of high temperature and low air velocity.

Keywords: heat transfer – predictive microbiology– refrigeration – fungus – fruit pulp.

## 6.1 INTRODUCTION

Spoilage of food by fungi is an important subject both because of economic issues and because of questions of food safety. The low pH of most fruit means that they are predominantly spoiled by fungi. Particular attention should be given to minimally processed fruit because the technological processes involved in production (peeling, slicing and intensive handling) provoke release of nutrients and intracellular enzymes. So, these products are more susceptible to microbial activity than the raw materials from which they are produced (BRUNO *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2005).

Many different species of fungi are significant in food science, but *Byssochlamys fulva* is of particular concern because it produces heat-resistant spores (KOTZEKIDOU, 1997); it grows in low-oxygen environments and even in modified atmospheres (CHAPMAN *et al.*, 2007; TANIWAKI *et al.*, 2010); it is capable of producing mycotoxins at concentrations greater than the upper limits defined as free from health risks to consumers (SANT'ANA *et al.*, 2010a); and because its colonies have a rapid radial growth rates, which can be as fast as 20 mm.day<sup>-1</sup>, at 25°C (VALÍK, PIECKOVÁ, 2001).

Nomenclature			
$a_i$	Coefficients of second-order polynomial model	$T_{max}$	Maximum temperature for fungal growth (K)
$b$	Coefficient of extended square-root model	$T_{min}$	Minimum temperature for fungal growth (K)
$Bi$	Biot number	$T_S$	Temperature on upper surface of product (K)
$c$	Coefficient of extended square-root model	$x$	Spatial position inside product (m)
$C_i$	Coefficients of Arrhenius-Davey model	$W$	Length of plate (m)
$Fo$	Fourier number	$y$	Radius of fungus colony (m)
$k$	Thermal conductivity of product ( $W.m^{-1}.K^{-1}$ )	$y_0$	Initial radius of fungus colony (m)
$k_f$	Thermal conductivity of air ( $W.m^{-1}.K^{-1}$ )	$y_{max}$	Maximum radius of fungus colony (m)
$L$	Thickness of food (m)	$y_O$	Radius of colony observed experimentally (m)
$L_C$	Characteristic length (m)	$y_P$	Radius of fungus colony predicted by model (m)
$Nu$	Nusselt number	$y_{crit}$	Critical colony radius for product rejection (m)
$\rho$	Number of parameters of a model	$z$	Parameter of primary predictive model
$q_1$	Parameter of hyperbolic model	$\alpha$	Thermal diffusivity of food ( $m^2.s^{-1}$ )
$q_2$	Parameter of hyperbolic model	$\lambda$	Duration of lag phase time (s)
$Pr$	Prandtl number	$\mu$	Radial growth rate ( $m.s^{-1}$ )
$Re$	Reynolds number	$\mu_{max}$	Maximum radial growth rate ( $m.s^{-1}$ )
$T$	Temperature (K)	$\nu$	Kinematic viscosity ( $m^2.s^{-1}$ )
$t$	Time (s)	$U_{INF}$	Refrigeration air stream velocity ( $m.s^{-1}$ )
$T_{INF}$	Temperature of refrigeration air stream (K)		

Silva *et al.* (2011) conducted a comparative study designed to identify fruits that were more susceptible to spoilage by *B. fulva*. They found that substrates made with pulp from melons, tomatoes or papayas supported the fastest *B. fulva* growth rates.

In order to achieve a given food's optimum shelf-life it is necessary to study the effect of different storage conditions on the growth of microorganisms in that product. Mathematical modeling and simulation of the phenomena involved in these processes is a useful technique for conducting such analyses. Mafart (2005) proposed the idea that in order to simulate these processes, for the purposes of risk assessment and process optimization, it is necessary to combine models from food process engineering with techniques from predictive microbiology. This suggestion has been taken up and has become a subject of research over recent years.

Bellara *et al.* (2000) combined predictive models with purely diffusive heat transfer equations in order to describe the growth of *E. coli* in an artificial culture medium, as a function of temperature during refrigeration. Fujikawa (2011) and Ben Yaghlene *et al.* (2009) have also conducted similar studies. One such study undertaken by Ben Yaghlene *et al.* (2009) involved simulating the growth of *E. coli* in agar in the format of infinite slab subjected

to convective boundary condition. They then evaluated the effects of product thickness, refrigeration temperature and convective heat transfer coefficient on the microorganism's growth profile over a range of different refrigeration cycles.

Lebert *et al.* (2005) integrated models of mass transfer, thermodynamics and the kinetics of microbial growth in order to predict *Listeria innocua* growth on the surface of an artificial medium during a drying process. They simulated three distinct drying scenarios with varying relative humidity and drying air velocity.

Amézquita *et al.* (2005) developed a model integrating equations describing the kinetics of microbial growth and heat transfer in unsteady state, combining three different mechanisms of heat transfer (convection, radiation and evaporation) in an attempt to determine the effects of failures during the refrigeration process on growth of *Clostridium perfringens* in cooked ham. They simulated three refrigeration scenarios, varying the refrigeration system down time.

In the literature there are fewer studies of fungal growth in foods than studies of bacteria, concerning this integration approach. Among those, the work of Gougouli and Koutsoumanis (2010) described the investigations of the effect of temperature fluctuations during transport, distribution and storage on the shelf-life of yogurt contaminated with spores of *Aspergillus niger* and *Penicillium expansum* strains. The same investigators have recently published further studies on the subject (GOUGOULI *et al.*, 2011; GOUGOULI, KOUTSOUMANIS, 2012). However, the thermal model used in these studies was limited to the adoption of a preestablished temperature profile, whereas the true temperature profile is the result of phenomena involving heat transfer. There is therefore a lack of studies investigating integration of mathematical models to describe the growth of fungi in real food substrates with the same level of detail as has been explored in studies investigating bacteria.

The objectives of this study were therefore to: i) identify primary and secondary predictive models capable of describing the influence of temperature on kinetic growth of *B. fulva* in papaya pulp; ii) to integrate this model with heat transfer equations in order to predict the temperature profile and growth curve of the fungus on the surface of the food over time; and iii) to investigate the effect of variations in refrigeration air velocity and initial product temperature on the time taken for the microorganism to spoil the food.

---

## 6.2 MATERIALS AND METHODS

---

### 6.2.1 Inoculum preparation

Lyophilized spores of *B. fulva* (NRRL 1125 strain) isolated from fruit juice were obtained from the Fundação André Tosello's tropical cultures collection (Campinas, SP). The spores were rehydrated in sterile water in the laboratory, following a specific protocol provided by the supplier. They were then transferred to a Petri dish containing a potato-dextrose-agar culture medium (PDA) and incubated in a bacteriological chamber (Biopar, Brazil) at 28°C for 12 days to allow the colony matrix to form, followed by refrigerated storage until their use in the experiments. Fragments of the colony were transferred into test tubes containing malt-extract-agar culture medium (MEA) and returned to the bacteriological chamber at 28°C for 21 days.

In a horizontal laminar flow chamber, the surface of the fungus colony grown in MEA was washed in two 1 mL aliquots of an aqueous solution of Tween-20 at 5% (v/v). The resulting spore suspension was then stored in a falcon tube. The suspension was then mixed and standardized to a concentration of approximately  $3 \times 10^6$  spores/mL. This suspension was used immediately after preparation and no thermal spore activation treatment was used, following a similar procedure to that described by Panagou *et al.* (2010).

### 6.2.2 Preparation of the substrate

Papaya (*Carica papaya* L) fruit were obtained from a local market and washed, peeled and blended in the laboratory using an Ultra Mixer (Britânia, Brazil). Next, 0.5% (w/v) of agar was added to the fruit pulp to obtain a semi-solid culture medium, making it possible to monitor the growth of the colony. The pulp was then sterilized by heat treatment (121°C/15 minutes) in an autoclave (Phoenix AV 50, Brazil). The material was then transferred to Petri dishes and refrigerated until inoculation.

### 6.2.3 Inoculation and growth monitoring

An automatic pipette was used to inoculate the center of each plate with 2  $\mu$ L of the spore suspension, immediately after preparation. Plates were then placed in growth chambers (Tecnal, Brazil) at temperatures of 12, 15, 20, 24, 28, 36 and 40°C. The growth chambers used in the experiments are bacteriological chamber with the control of the temperature at the range of -10°C to 60°C (accuracy of  $\pm 0.4^\circ\text{C}$ ). Inside the chamber a forced air circulation is kept by a ventilator, inducing high convective heat transfer. The

edges of the plates were sealed with plastic film to prevent water loss from the culture medium and to avoid contamination during the experiment.

The sizes of the fungal colonies were monitored, periodically marking the diameter reached in four different directions. Monitoring was stopped when the entire surface of the culture medium was covered and diameters were measured with a ruler and recorded, thereby providing the data on radius versus time to be used in the mathematical modeling stage. Calculations were based on mean radii calculated from all four diameter measurements taken at any given point.

#### 6.2.4 Kinetic microbial model

Kinetic models to describe microbial growth are usually subdivided into two categories: primary predictive models, which describe how the microorganism population varies over time; and secondary predictive models, which describe how the primary models' parameters ( $\mu$ ,  $\lambda$ ) respond to environmental variations (T, pH, water activity).

Four primary models were fitted to the experimental data of colony radius *versus* time: linear (Eq. 6.1), logistic (Eq. 6.2), modified Gompertz (Eq. 6.3) and simplified Baranyi (Eq. 6.4), as shown in Table 6.1. The logistic and modified Gompertz models used in this study were proposed by Zwietering *et al.* (1990). The linear model was adjusted using Microsoft Excel 2010. The remaining models were fitted using an algorithm developed in Matlab version 5.3 by MathWorks, using its internal *lsqnonlin* function, based on the Levenberg-Marquardt method.

**Table 6.1** - Primary predictive models used to fit the experimental data

Models	Equations	References
Linear	$y = y_0 + \mu(t - \lambda)$	(Eq. 6.1)
Logistic	$y = y_0 + \frac{y_{\max}}{\left[1 + \exp\left(\frac{4\mu}{y_{\max}}(\lambda - t) + 2\right)\right]}$	(Eq. 6.2)
Modified Gompertz	$y = y_0 + y_{\max} \exp\left\{-\exp\left[\left(\frac{\mu \exp(1)}{y_{\max}}\right)(\lambda - t) + 1\right]\right\}$	(Eq. 6.3)
Simplified Baranyi	$y = y_0 + \mu \left\{t + \frac{1}{\mu} \ln[\exp(-\mu t) + \exp(-\mu \lambda) - \exp(-\mu t - \mu \lambda)]\right\}$	(Eq. 6.4)

In order to identify the primary predictive model that best described the behavior of the experimental data, some statistical indices were used, namely bias factor (Eq. 6.5),

accuracy factor – AF (Eq. 6.6), root mean square error – RMSE (Eq. 6.7) and Bayesian information criterion – BIC (Eq. 6.8). RMSE and BIC indices take the number of parameters of the model into account and introduce a penalty when a model has more parameters.

$$BIAS = 10^{\frac{\sum_{i=1}^n \log(y_{P,i}) - \log(y_{O,i})}{n}} \quad (\text{Eq. 6.5})$$

$$AF = 10^{\frac{\sum_{i=1}^n |\log(y_{P,i}) - \log(y_{O,i})|}{n}} \quad (\text{Eq. 6.6})$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_{P,i} - y_{O,i})^2}{n - p}} \quad (\text{Eq. 6.7})$$

$$BIC = n \cdot \ln\left(\frac{RSS}{n}\right) + p \cdot \ln(n) \quad (\text{Eq. 6.8})$$

In the equation (6.8), RSS is the sum of squares of residuals. The indices bias, AF, RMSE and BIC were calculated for each growth curve and for each model. The model with the best performance in the four indices was chosen.

According to Giffel and Zwietering (1999), bias factor gives the structural deviations of the model. If there is no structural deviation, bias = 1. Accuracy factor is a measure of how close, on average, predictions are to observations. The greater the AF factor, the less exact the model is at describing the experimental data. A perfect model would have AF = 1. For RMSE and BIC indices, the model that has the lowest values performs the best, from a statistical point of view.

Once the primary model had been chosen, the next step was to select equations to describe the influence of temperature on its parameters. Before adjustment, analysis of variance (ANOVA) was conducted using an Excel spreadsheet, in order to determine which parameters were significantly affected by temperature (p-value < 0.05).

The secondary models tested were as follows: Arrhenius-Davey (Eq. 6.9), second-order polynomial (Eq. 6.10), extended square root (Eq. 6.11) and hyperbolic model (Eq. 6.12), as illustrated in Table 6.2. The Arrhenius-Davey model was introduced by Davey (1989) to describe the effect of the temperature and the water activity on the specific growth rate of microorganisms. This model was successfully used in the work of Panagou *et al.* (2003) to model the effect of environmental variables on the growth of *Monascus ruber*, a heat-resistant fungus. The extended square root model was introduced by Ratkowsky *et al.* (1983) to include temperature superoptimal for microbial growth on the original Belehrádek

model. The hyperbolic model was presented in the study of van Impe *et al.* (1992) and originally was developed by Zwietering *et al.* (1991).

**Table 6.2** - Secondary predictive models used to describe the effect of temperature on growth parameters

Models	Equations	References
Arrhenius-Davey	$\ln(z) = C_0 + \frac{C_1}{T} + \frac{C_2}{T^2}$	(Eq. 6.9)
Second-order polynomial	$z = a_0 + a_1 \cdot T + a_2 \cdot T^2$	(Eq. 6.10)
Extended Square Root	$\sqrt{z} = b \cdot (T - T_{\min}) \left[ 1 - e^{-c \cdot (T - T_{\max})} \right]$	(Eq. 6.11)
Hyperbolic model	$\ln(z) = \frac{q_1}{T - q_2}$	(Eq. 6.12)

For this table,  $z = \mu$  or  $z = 1/\lambda$ , except in hyperbolic model in which  $z = \lambda$ .

The curves for the secondary models were also adjusted using the multivariate regression function in Excel or the dedicated algorithm developed in Matlab. Once more, comparisons between the performances of different mathematical models were based on their bias, AF, RMSE and BIC indices.

#### 6.2.5 Validation of the kinetic model

The validation of the kinetic model was carried out at isothermal and non-isothermal conditions. During the modeling step some growth curves were not used, so that they would be available for use in the validation stage on isothermal conditions. The models chosen in the earlier steps were now used to generate growth curves for the microorganism at temperatures of 12, 15, 20, 24, 28 and 36°C. They were then compared with the curves for the experimental data that had not been used during construction of the mathematical models. The predictive capacity of the models was then tested for each temperature using bias and accuracy factors.

The developed kinetic models were further validated at fluctuating temperature conditions. In this case, the kinetic model was rewritten in the implicit form, as proposed by van Impe *et al.* (1992). The dynamic model was solved numerically using the 4<sup>th</sup> Runge-Kutta method.

For obtaining experimental data at dynamic condition to validate the model, the temperature of the bacteriological chamber was changed in order to produce the profiles shown in Table 6.3. This table also shows the number of growth curve used in each validation test. For comparing to the model, the average colony radii calculated from the experimental growth curve was used.

**Table 6.3** - Dynamic temperature used in the validation stage

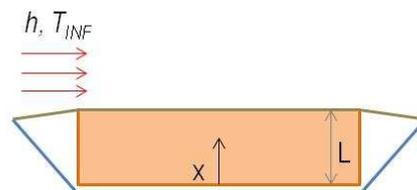
Non-isothermal validation test	Temperature evolution over time	Number of the growth curves used in validation
(1)	35°C / 42 h + 30°C / 58 h	4
(2)	35°C / 37 h + 30°C / 26 h + 15°C / 104 h	4
(3)	30°C / 48 h + 15°C / 48 h + 30°C / 48 h + 15°C / 48 h	7

The heat transfer effects on the substrate in this step can be neglected because it has a very thin thickness (about 5 mm) with a high superficial area. In addition, the chamber worked at high forced air circulation, maximizing the heat transfer. So it was possible assume that the substrate temperature instantaneously reaches the fluctuating temperature.

The prediction of growth at such conditions was based on the assumption that after a temperature shift, the growth rate is adopted instantaneously to the new temperature environment. Again, predictive capacity of the models was tested for each validation test using bias and accuracy factors.

#### 6.2.6 Heat transfer model

Figure 6.1 illustrates the physical system that was modeled mathematically and simulated in this study. The system consists of a slice of papaya on a polystyrene tray with a convective boundary condition along its upper surface.



**Figure 6.1** - Illustration of the physical system simulated in this study

The temperature profile inside the product is obtained by solving the heat diffusion equation. Assuming that no heat is generated inside the product and assuming that the

product has constant thermophysical properties, the heat transfer model for rectangular coordinates is as follows:

$$\frac{\partial T}{\partial t} = \alpha \cdot \frac{\partial^2 T}{\partial x^2} \quad (\text{Eq. 6.13})$$

The initial condition and the boundary conditions applicable to the system are as follows:

$$\text{at } t = 0, T = T_0$$

$$\text{at } x = 0, \frac{\partial T}{\partial x} = 0$$

$$\text{at } x = L, h \cdot (T_s - T_\infty) = -k \cdot \frac{\partial T}{\partial x}$$

In turn, the convective heat transfer coefficient ( $h$ ), is a function of the geometry of the problem, the flow conditions, the air stream velocity and the thermal properties of the fluid. The value of  $h$  was determined from the mathematical correlation that gives the Nusselt number:

$$Nu = \frac{h \cdot W}{k_f} \quad (\text{Eq. 6.14})$$

For laminar flow regime ( $Re < 5 \times 10^5$ )

$$Nu = 0.664 \cdot Re^{1/2} \cdot Pr^{1/3} \quad (\text{Eq. 6.15})$$

For combined laminar and turbulent flow regime ( $5 \times 10^5 < Re < 10^8$ )

$$Nu = \left( 0.037 \cdot Re^{4/5} - 871 \right) \cdot Pr^{1/3} \quad (\text{Eq. 6.16})$$

where

$$Re = \frac{U_\infty \cdot W}{\nu} \quad (\text{Eq. 6.17})$$

Incropera and De Witt (1998) have presented exact solutions for these problems, as follows:

$$\frac{T - T_\infty}{T_0 - T_\infty} = \sum_{n=1}^{\infty} C_n \cdot \cos(\xi_n \cdot x^*) \cdot \exp(-\xi_n^2 \cdot Fo) \quad (\text{Eq. 6.18})$$

The coefficient  $C_n$  in Equation (6.18) is given by:

$$C_n = \frac{4 \cdot \text{sen}(\xi_n)}{2 \cdot \xi_n + \text{sen}(2 \cdot \xi_n)} \quad (\text{Eq. 6.19})$$

and the discrete values of  $\xi_n$  are the positive roots of the transcendental Equation (6.20).

$$\xi_n \cdot \text{tg}(\xi_n) = Bi \quad (\text{Eq. 6.20})$$

$F_0$  and  $Bi$  in Equations (6.18) and (6.20) are the dimensionless Fourier and Biot numbers, defined as:

$$F_0 = \frac{\alpha \cdot t}{L_c^2} \quad (\text{Eq. 6.21})$$

$$Bi = \frac{h \cdot L_c}{k} \quad (\text{Eq. 6.22})$$

The heat transfer model obtained from the equations above was resolved using an algorithm implemented in Matlab version 5.3.

#### 6.2.7 Simulation of refrigeration scenarios

The kinetic growth model was integrated with the heat transfer model and resolved numerically. Since the problem is transient, the equations that make up the kinetic model were rewritten as differential equations as described before. The heat transfer model provides the temperature profile at the product surface under given operating conditions at each point in time. These temperatures are used to calculate the parameters for the growth curves ( $\mu$ ,  $\lambda$ ), using the secondary models; and, finally, the primary model is used to provide a colony radius at that point in time. The time unit used in both mathematical models was one minute. Table 6.4 lists the values of the parameters for the models used in the simulations.

In order to investigate the effect of changing refrigeration air stream velocity and initial product temperature on the rate at which *B. fulva* spoils the papaya pulp, 35 simulations were run combining different values for the variables, within the ranges given in Table 6.4. In all simulations, the temperature of the air stream was 14°C and initial colony radius was set at 0.

For the purposes of these simulations, the product was defined as spoiled when the colony radius reached 1.5 mm. According to Gibson *et al.* (1994) fungal colonies of this size are visible to the naked eye and therefore lead consumers to reject the product.

**Table 6.4** - Values of the parameters for the mathematical models used in the simulations

Parameter	Value	Source
$k_{PAPAYA}$	0.60 W/(m.K)	Kurozawa <i>et al.</i> (2005)
$L$	0.04 m	Model assumption
$T_{\infty}$	14°C	Spoto and Gutierrez (2006)
$\alpha_{PAPAYA}$	$1.11 \times 10^{-7} \text{ m}^2/\text{s}$	Kurozawa <i>et al.</i> (2005)
$W$	0.15	Model assumption
$k_{AIR}$	0.026 W/(m.K)*	
$\alpha_{AIR}$	$2.25 \times 10^{-5} \text{ m}^2/\text{s}^*$	ASHARE (1981) <i>apud</i> Incropera and DeWitt (1998)
$\nu_{AIR}$	$1.59 \times 10^{-5} \text{ m}^2/\text{s}^*$	
$Pr$	0.707*	
$y_{CRIT}$	0.0015 m	Gibson <i>et al.</i> (1994)
$T_0$	16 to 28°C	Model assumption
$U_{\infty}$	0.2 to 5 m/s	Kondjoyan (2006)

\*Thermal properties of air evaluated at 300 K

### 6.3 RESULTS AND DISCUSSION

#### 6.3.1 Selection of the primary predictive model

The experiments yielded 36 different *B. fulva* growth curves at the temperatures adopted for the study. Twelve of these curves were reserved for the validation procedure. The remaining data were used in the modeling stage. The curves showed that higher temperatures increased the radial growth rate and decreased the lag phase time.

Each of the primary predictive models (Table 6.1) used in the mathematical modeling stage was adjusted to the experimental data. After, the colony radii predicted by the models were compared with the radii observed experimentally, using the statistical indices (Eq. 6.5 to 6.8). The results of this procedure are shown in Table 6.5. The maximum, minimum and average values of bias, AF, RMSE and BIC indices for each model are given in this table. The percentage of the growth curves that were better adjusted by each primary model according to each statistical index is also shown in Table 6.5.

Observing the results in Table 6.5, it will be noted that all of the primary predictive models considered in this study were capable of describing the behavior of *B. fulva* growth since the average values of bias and AF factors are close to 1. According to bias factor, 62.5% of the experimental curves were better fitted by the modified Gompertz model.

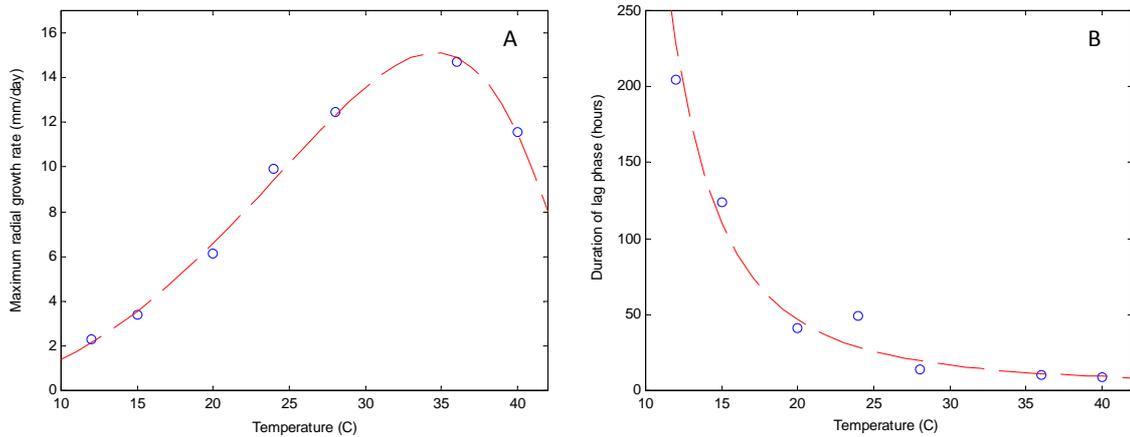
Considering the accuracy factor index, 70.8% of the growth curves were also better described by modified Gompertz equation. The same percentage was obtained for RMSE and BIC indices for this model. So, according to the statistical analysis performed in this study, the modified Gompertz model was the best equation to fit the experimental data.

**Table 6.5** - Summary of the comparison of the primary predictive models using the statistical indices bias, AF, RMSE and BIC

Indices	Primary models				
	Linear	Logistic	Modified Gompertz	Simplified Baranyi	
Bias	Maximum	1.058	1.034	1.022	1.090
	Minimum	0.830	0.901	0.868	0.853
	Average	0.999	0.993	0.993	1.020
	Percentage	25%	12.5%	62.5%	-
AF	Maximum	1.312	1.148	1.212	1.227
	Minimum	1.004	1.015	1.001	1.001
	Average	1.079	1.049	1.037	1.081
	Percentage	16.7%	4.2%	70.8%	8.3%
RMSE	Maximum	0.532	0.488	0.364	0.395
	Minimum	0.012	0.041	0.003	0.005
	Average	0.157	0.135	0.083	0.144
	Percentage	8.3%	4.2%	70.8%	16.7%
BIC	Maximum	-9.2	-9.9	-15.2	-11.6
	Minimum	-67.1	-64.3	-80.7	-70.8
	Average	-30.2	-29.7	-38.4	-30.5
	Percentage	8.3%	4.2%	70.8%	16.7%

### 6.3.2 Selection of the secondary predictive model

The microbial growth curve described by the modified Gompertz model has three adjustable parameters: maximum growth rate ( $\mu$ ), lag phase duration ( $\lambda$ ) and maximum colony radius ( $y_{\max}$ ). Analysis of variance (ANOVA) was used to identify whether any of these parameters were significantly influenced by temperature. It was found that the parameters  $\mu$  ( $p = 3 \times 10^{-11}$ ) and  $\lambda$  ( $p = 1 \times 10^{-9}$ ) were temperature-dependent, whereas  $y_{\max}$  not ( $p = 0.06$ ). Therefore, the next step was to select a secondary predictive model capable of satisfactorily describing this dependency, as shown in Figure 6.2. The graphs in Figure 6.2 show that increasing the temperature reduced the lag phase duration and increased the colony growth rate, peaking close to 35°C.



**Figure 6.2** - Behavior of maximum radial growth rate (A) and lag phase duration (B) as functions of temperature from experimental data (o) and from mathematical model (---).

Table 6.6 lists the results of the adjusted values for each function's parameters of  $\mu$  and  $\lambda$  as functions of temperature expressed by Equations (6.9), (6.10), (6.11) and (6.12) and the statistical indices used to compare the models.

The behavior of the parameter  $\mu$  as function of temperature was best described by extended square root model, taking the four statistical indices adopted in this work into account. This model also provides estimates for the minimum and maximum temperatures necessary for the fungus to grow. Panagou *et al.* (2010) reported estimated values of 282.25 K and 319.65 K for the minimum and maximum temperatures necessary for the DSM 1808 strain of *B. fulva* to grow in artificial culture medium (MEA). Those values are close to the results found here for a different strain of this microorganism growing in a real food medium.

The behavior of the parameter  $\lambda$  as function of temperature was best fitted by Arrhenius-Davey model, extended square root model and hyperbolic model, considering the bias factor. However, taking the accuracy factor into account just extended square root model and hyperbolic model show values close to 1. The accuracy of these models was about 80%. While extended square root model has four adjustable parameters, hyperbolic equation has just two parameters. So, RMSE and BIC indices indicate better values for the hyperbolic model. Therefore, this model was the equation that best described the relation between the lag phase duration and the temperature.

Since the parameter  $y_{\max}$  was independent of the temperature, the average value predicted by modified Gompertz equation ( $y_{\max} = 5.02$  cm) was used for modeling purposes.

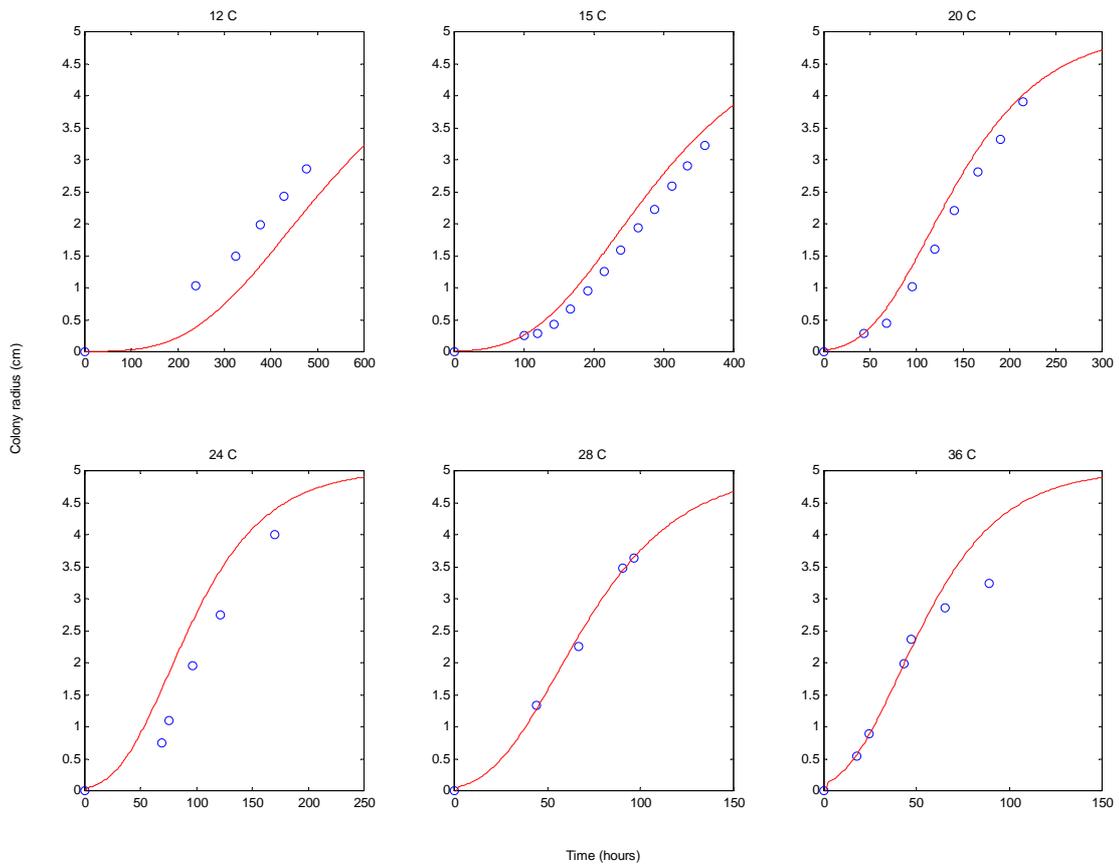
**Table 6.6** - Statistical indices and adjusted coefficient values for each secondary predictive model used to fit the behavior of maximum growth rate and lag phase duration as functions of the temperature.

Maximum radial growth rate ( $\mu$ )						
Models	Coefficient	Adjusted value	Bias	AF	RMSE	BIC
Arrhenius-Davey	$C_0$	$2.03 \times 10^1$				
	$C_1$	$-5.42 \times 10^3$	1.000	1.283	3.93	21.10
	$C_2$	$-1.10 \times 10^4$				
Second-order Polynomial	$a_0$	$-1.24 \times 10^3$				
	$a_1$	7.975	1.516	1.516	4.57	23.21
	$a_2$	$-1.26 \times 10^{-2}$				
Extended square root	$b$	$1.43 \times 10^{-1}$				
	$c$	$1.45 \times 10^{-1}$				
	$T_{\min}$	274.78 K	1.000	1.039	0.43	-10.06
	$T_{\max}$	319.82 K				
Lag phase duration ( $\lambda$ )						
Models	Coefficient	Adjusted value	Bias	AF	RMSE	BIC
Arrhenius-Davey	$C_0$	$3.04 \times 10^1$				
	$C_1$	$-1.00 \times 10^4$	1.001	1.303	26.02	47.55
	$C_2$	$-2.08 \times 10^4$				
Second-order Polynomial	$a_0$	5.70				
	$a_1$	$-4.19 \times 10^{-2}$	0.596	1.704	80.84	63.41
	$a_2$	$7.71 \times 10^{-5}$				
Extended square root	$b$	$1.05 \times 10^{-2}$				
	$c$	$8.09 \times 10^{-1}$				
	$T_{\min}$	279.21 K	0.998	1.208	33.28	50.92
	$T_{\max}$	316.86 K				
Hyperbolic	$q_1$	105.05	1.006	1.215	15.69	40.08
	$q_2$	265.80				

### 6.3.3 Validation of the kinetic microbial model

The global kinetic model was constituted by modified Gompertz model, extended square root model and hyperbolic model. Before the global kinetic model was integrated with the heat transfer equations, a validation of the predictive growth models was conducted at isothermal and non-isothermal conditions. Figure 6.3 illustrates the comparison between the predicted growth curves and the actual growth observed experimentally, at six different temperatures.

The experimental data depicted in Figure 6.3 were not used in the modeling stage. Table 6.7 shows the bias factor and accuracy factor obtained for each validation curve at isothermal condition.



**Figure 6.3** - Comparison between growth curves predicted by the kinetic model (red line) and experimental observations (blue points) at temperatures from 12°C to 36°C.

**Table 6.7** - Bias and accuracy factors for each validation curve at isothermal condition

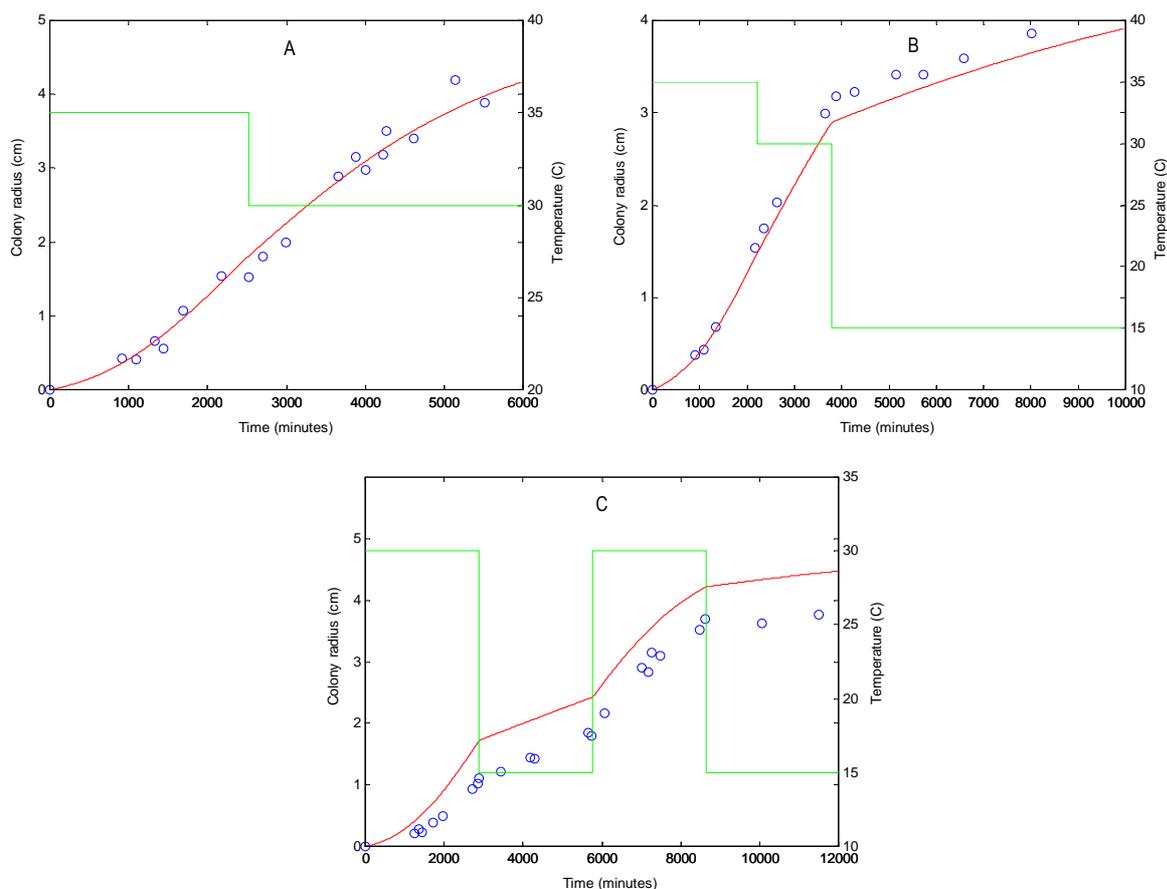
Temperature	12°C	15°C	20°C	24°C	28°C	36°C	Average value
Bias	0.62	1.21	1.17	1.45	0.98	0.97	1.06
AF	1.62	1.21	1.17	1.45	1.04	1.14	1.27

The validation showed that the kinetic model developed was capable of satisfactorily describing the behavior of *B. fulva* at different temperatures evaluated. As demonstrated in Table 6.7, the bias factor of the overall model ranged from 0.62 (12°C) to 1.45 (24°C). The best values for this index were observed at 28°C (0.98) and 36°C (0.97). Furthermore, for temperatures between 15°C and 24°C, the model is fail-safe (bias > 1), i.e. predicted growth is greater than observed growth. Considering the accuracy factor, the values ranged from 1.04 (28°C) to 1.62 (12°C). The average accuracy of the kinetic model during the isothermal validation stage was 73%.

Giffel and Zwietering (1999) discussed the use of statistical indices to validate mathematical models in the field of predictive microbiology. They explained that accuracy

factor varied from 1.7 to 3.5 when studying *Listeria monocytogenes* growth in a variety of food substrates and suggested that the accuracy is reduced when the growth medium is a real food rather than an artificial culture medium. Similar conclusion was reported in the research conducted by Baert *et al.* (2007). They validated a growth kinetic model for *Penicillium expansum* on an artificial substrate and a real food. The validation analysis showed better values for bias and accuracy factors on artificial medium than for real food in which bias factor ranged from 0.36 to 0.81 and accuracy factor from 1.26 to 3.00. Baert *et al.* (2007) attributed the unsatisfactory performance of the model to the estimation for lag phase time. These findings are in agreement with the present work since the AF values obtained to the growth rate model were better than those achieved to the lag phase time model (Table 6.6).

In order to evaluate the performance of the model in predicting the growth behavior of *B. fulva* in non-isothermal conditions, three non-isothermal validation tests were investigated, as shown in the Table 6.3. The results are depicted in Figure 6.4.



**Figure 6.4** - Growth curves of *B. fulva* predicted by the global kinetic model (red line) compared with experimental data (blue points) under non-isothermal validation test 1 (graph A), 2 (graph B) and 3 (graph C). The green lines are the evolution of the temperature over time in each validation test.

The values of bias and accuracy factors obtained for each non-isothermal validation test are presented in Table 6.8.

**Table 6.8** - Bias and accuracy factors (AF) for each non-isothermal validation test using the global kinetic model developed

Validation test	(1)	(2)	(3)
Bias	1.08	1.01	1.49
AF	1.11	1.07	1.49

At scenario (1), the capacity of the model to predict the growth behavior of the fungi in a little shift of temperature was tested (Figure 6.4.a). In this case, the model performance was satisfactory since the values achieved for bias and accuracy factors were 1.08 and 1.11 respectively. At scenario (2), the response of the model to a large change of temperature with an intermediate step was evaluated (Figure 6.4.b). Again, predicted and observed data are in good agreement once the accuracy of the model was 93%. At scenario (3) a cyclic temperature fluctuation was simulated (Figure 6.4.c). In this case, the model over predicted the growth of *B. fulva*. The accuracy of the model was 51%. However, the predictions were in the fail-safe side and the growth tendency was described by the model satisfactorily.

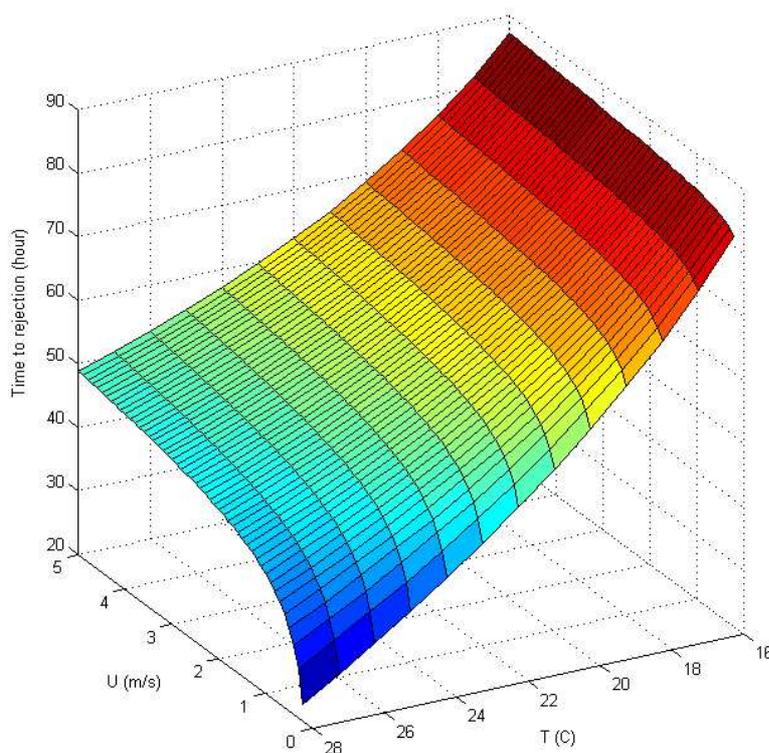
Similar conclusions were reported in the study of Gougouli and Koutsoumanis (2010) with *Penicillium expansum* and *Aspergillus niger*. Their model also overestimated the growth of these fungi at cyclic fluctuation of the temperature. Gougouli and Koutsoumanis (2010) reported that this condition and especially cold-shock conditions may induce a stress during fungal growth and so interfering in the growth behavior.

From the discussion above, it is possible to conclude that the kinetic growth equations developed in this study were able to describe accurately the behavior of the fungus when a smooth shift in the temperature is applied. That is the situation observed during the refrigeration of the food.

#### 6.3.4 The influence of storage conditions on the growth of *B. fulva*

The mathematical model integrating the equations of heat transfer and growth kinetics of *B. fulva* was used to simulate different papaya pulp storage conditions, varying initial product temperature and refrigeration air stream velocity within the ranges listed in the last two rows of Table 6.4. Considering the findings in the isothermal validation stage, the initial temperatures of the product used at the simulation are in the range in which the model is fail-safe. A total of 35 simulations were run. The growth behavior at 14°C was taken as a reference to express the reduction in the product's shelf-life.

The response variable monitored during the simulations was the time taken for the colony radius to reach 1.5 mm, which, for the purposes of this study, is defined as the time taken before the product exhibits the first signs of spoilage. Figure 6.5 illustrates the results of simulations in the form of a response surface plot.



**Figure 6.5** - Reduction in the time taken to reject products contaminated with *B. fulva* spores as a function of the refrigeration air stream velocity (U) and of the initial temperature of the product (T).

It can be observed that the response variable was sensitive to changes in initial product temperature and refrigeration air stream velocity, mainly in high temperatures and low air velocity. Simulations also showed that detection time of *B. fulva* growing in papaya pulp varied from 24 to 87 hours. This result is in agreement with literature. Sant'Ana *et al.* (2010b) studied the growth of *B. fulva* in apple juice and verified that early signals of spoilage appeared one to four days after processing depending on storage conditions and initial level of ascospores. Similar results were shown in the study performed by Valík and Piecková (2001). In a comparative assay using three different heat resistant moulds, according to their study *B. fulva* was the one which reached the detection level in the shortest time, in the range of one to four days.

Table 6.9 shows the effect of initial temperature and refrigeration air stream velocity on the percentage of reduction of product's shelf-life. Evaluation was done comparing the

detection time at a given temperature and at the reference temperature (14°C), in which the time to rejection was 101 hours.

**Table 6.9** - Percentage of reduction in product's shelf-life as a function of initial product temperature ( $T_0$ ) and refrigeration air stream velocity ( $U_\infty$ ), taken the initial product temperature of 14°C as a reference.

$U_\infty$ (m.s <sup>-1</sup> )	$T_0$ (°C)						
	28	26	24	22	20	18	16
0.2	76.4	70.4	63.4	54.9	45.1	33.4	18.9
0.5	68.2	62.1	55.6	48.3	40.0	29.9	17.2
1	61.9	56.5	50.8	44.5	37.1	28.0	16.2
3	54.4	50.1	45.5	40.2	33.8	25.6	14.9
5	51.8	47.9	43.6	38.6	32.5	24.7	14.3

It can be observed that reduction in shelf-life reaches 76%, if initial product temperature increases and air velocity decreases. Low air velocity corresponds to the weak convective heat transfer. Therefore, the time to decrease product temperature will be longer than at high air velocity and spores will germinate rapidly. Intensifying the convective heat transfer by increasing refrigeration air velocity to 5 m.s<sup>-1</sup>, the initial product temperature has effect on the response variable yet. However in this case percentage of reduction of shelf-life was below 52%.

These results indicate that high enough temperature at the start of the refrigeration process, combined with deficient heat transfer, compromises microbiological product safety. In a strong convective heat transfer, an abuse of temperature has a minor effect on time taken to reject the product. Along these lines, Gougouli and Koutsoumanis (2012) demonstrated that the optimum temperature for spores of the fungi *Penicillium expansum* and *Aspergillus niger* to germinate is in the range of 25 to 33°C. Under these conditions it takes very little time for spores to germinate, oscillating between 6 and 8 hours. As a result, these spores germinate rapidly at high temperatures and colonies of the fungi soon appear on the product. A similar process can be considered to take place with *B. fulva*, which was investigated here, explaining the results observed.

In terms of their significance for production strategies and for defining operational variables, the results of this study allow for the conclusion that refrigerating papaya before processing is a more effective strategy for extending the product's shelf-life.

---

## 6.4 CONCLUSIONS

---

This study showed that the modified Gompertz primary model was capable of satisfactorily describing the increase in *Byssochlamys fulva* colony radius growing on papaya pulp at isothermal and non-isothermal conditions. The influence of temperature on the growth curve parameters was predicted with greater accuracy once the extended square root and the hyperbolic secondary models were also employed.

Integrating the kinetic growth model for this microorganism with equations that describe the product's behavior during cooling revealed that the most efficient operating strategy for increasing its shelf-life is to refrigerate the fruit before it is processed (peeled and pulped), which is the point at which contamination typically occurs.

Summing up, *B. fulva* spores can significantly reduce the shelf-life of papaya pulp if storage temperatures are not controlled and refrigeration system is deficient.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for providing funds for this research.

## REFERENCES

- Amézquita, A., Weller, C.L., Wang, L., Thippareddi, H., Burson, D.E., 2005. Development of an integrated model for heat transfer and dynamic growth of *Clostridium perfringens* during the cooling of cooked boneless ham. *Int. J. Food Microbiol.* 101, 123-144.
- Baert, K., Valero, A., De Meulenaer, B., Samapundo, S., Ahmed, M.M., Debevere, J., Devlieghere, F., 2007. Modeling the effect of temperature on the growth rate and lag phase of *Penicillium expansum* in apples. *Int. J. Food Microbiol.*, 118, 139-150.
- Bellara, S.R., McFarlane, C.M., Thomas, C.R., Fryer, P.J., 2000. The growth of *Escherichia coli* in a food simulant during conduction cooling: combining engineering and microbiological modeling. *Chem. Eng. Sci.* 55, 6085-6095.
- Ben Yaghlene, H., Leguerinel, I., Hamdi, M., Mafart, P., 2009. A new predictive dynamic model describing the effect of the ambient temperature and the convective heat transfer coefficient on bacterial growth. *Int. J. Food Microbiol.* 133, 48-61.

Bruno, L.M., Queiroz, A.A.M., Andrade, A.P.C., Vasconcelos, N.M., Borges, M.F., 2005. Avaliação microbiológica de hortaliças e frutas minimamente processadas comercializadas em Fortaleza (CE). Boletim CEPPA, 23(1), 75-84.

Chapman, B., Winley, E., Fong, A.S.W., Hocking, A.D., Stewart, C.M., Buckle, K.A., 2007. Ascospore inactivation and germination by high pressure processing is affected by ascospore age. Innovative Food Sci. Emerging Technol. 8, 531-534.

Davey, K.R., 1989. A predictive model for combined temperature and water activity on microbial growth during the growth phase. J. Appl. Bacteriol. 67, 483-488.

Fujikawa, H., 2011. Application of the new logistic model to microbial growth prediction in food. Biocontrol Sci. 16 (2), 47-54.

Gibson, A.M., Baranyi, J.I., Pitt, J.I., Eyles, M.J., Roberts, T.A., 1994. Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. Int. J. Food Microbiol. 23, 419-431.

Giffel, M.C., Zwietering, M.H., 1999. Validation of predictive models describing the growth of *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol. 46, 135-149.

Gougouli, M., Kalantzi, K., Beletsiotis, E., Koutsoumanis, K.P., 2011. Development and application of predictive models for fungal growth as tools to improve quality control in yogurt production. Food Microbiol. 28, 1453-1462.

Gougouli, M., Koutsoumanis, K.P., 2012. Modeling germination of fungal spores at constant and fluctuating temperature conditions. Int. J. Food Microbiol. 152, 153-161.

Gougouli, M., Koutsoumanis, K.P., 2010. Modelling growth of *Penicillium expansum* and *Aspergillus niger* at constant and fluctuating temperature conditions. Int. J. Food Microbiol. 140, 254-262.

Incropera, F.P., De Witt, D.P., 1998. Fundamentos de transferência de calor e de massa, 4th ed. LTC, Rio de Janeiro.

Kondjoyan, A.A., 2006. Review on surface heat and mass transfer coefficients during air chilling and storage of food products. Int. J. Refrig. 29, 863-875.

Kotzekidou, P., 1997. Heat resistance of *Byssochlamys nivea*, *Byssochlamys fulva* and *Neosartorya fischeri* isolated from canned tomato paste. J. Food Sci. 62, 410-437.

Kurozawa, L.E., El-Aouar, A.A., Simões, M.R., Azoubel, P.M., Murr, F.E.X., 2005. Determination of thermal conductivity and thermal diffusivity of papaya (*Carica papaya* L.) as a function of temperature. In: 2nd Mercosur Congress on Chemical Engineering – 4th Mercosur Congress on Process Systems Engineering, Rio de Janeiro.

Lebert, I., Dussap, C.G., Lebert, A., 2005. Combined physico-chemical and water transfer modeling to predict bacterial growth during food processes. *Int. J. Food Microbiol.* 102, 305-322.

Mafart, P., 2005. Food engineering and predictive microbiology: on the necessity to combine biological and physical kinetics. *Int. J. Food Microbiol.* 100, 239-251.

Panagou, E.Z., Chelonas, S., Chatzipavlidis, I., Nychas, G.E., 2010. Modelling the effect of temperature and water activity on the growth rate and growth/no growth interface of *Byssochlamys fulva* and *Byssochlamys nivea*. *Food Microbiol.* 27, 618-627.

Panagou, E.Z., Skandamis, P.N., Nychas, G.J.E., 2003. Modelling the combined effect of temperature, pH and  $A_w$  on the growth rate of *Monascus ruber*, a heat-resistant fungus isolated from green table olives. *J. Appl. Microbiol.* 94, 146-156.

Ratkowsky, D.A., Lowry, R.K., McMeekin, T.A., Stokes, A.N., Chandler, R.E., 1983. Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. *J. Bacteriol.* 154, 1222-1226.

Sant'Ana, A.S., Simas, R.C., Almeida, C.A.A., Cabral, E.C., Rauber, R.H., Mallmann, C.A., Eberlin, M.N., Rosenthal, A., Massaguer, P.R., 2010a. Influence of package, type of apple juice and temperature on the production of patulin by *Byssochlamys nivea* and *Byssochlamys fulva*. *Int. J. Food Microbiol.* 142, 156-163.

Sant'Ana, A.S., Dantigny, P., Tahara, A.C.; Rosenthal, A., Massaguer, P.R., 2010b. Use of a logistic model to assess spoilage by *Byssochlamys fulva* in clarified apple juice. *Int. J. Food Microbiol.* 173, 299-302.

Silva, P.R.S., Mann, M.B., Marczak, L.D.F., Tessaro, I.C.; Vand Der Sand, S.T., 2011. Avaliação da velocidade de crescimento radial e do tempo de duração da fase lag de *Byssochlamys fulva* em polpas de frutas. In: X Oktoberforum – PPGEQ, Porto Alegre.

Souza, B.S., Durigan, J.F., Donadon, J.R., Lima, M.A., 2005. Qualidade e comportamento fisiológico do mamão “formosa” minimamente processado. *Braz. J. Food Technol.* 8 (3), 243-247.

Spoto, M.H.F., Gutierrez, A.S.D., 2006. Qualidade pós-colheita de frutas e hortaliças. In: Oetterer, M., Regitano-d'Arce, M.A.B., Spoto, M.H.F. Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Manole, Barueri, pp. 403-452.

Taniwaki, M.H., Hocking, A.D., Pitt, J.I., Fleet, G.H., 2010. Growth and mycotoxin production by fungi in atmospheres containing 80% carbon dioxide and 20% oxygen. *Int. J. Food Microbiol.* 143, 218-225.

Valík, L., Piecková, E., 2001. Growth modelling of heat-resistant fungi: the effect of water activity. *Int. J. Food Microbiol.* 63, 11-17.

Van Impe, J.F., Nicolai, B.M., Martens, T., Baerdemaeker, J.D., Vandewalle, J., 1992. Dynamic mathematical model to predict microbial growth and inactivation during food processing. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2901-2909.

Zwietering, M.H., de Koos, J.T., Hasenack, B.E., de Wit, J.C., van't Riet, K., 1991. Modeling bacterial growth as a function of temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1094-1101.

Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., van't Riet, K., 1990. Modelling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1875-1881.

## CAPÍTULO 7

### Resultados e Discussão: artigo 4

No quarto e último artigo desta tese, abordaram-se as seguintes questões de pesquisa:

- i. se houver abuso na temperatura inicial de armazenamento da polpa de mamão contaminada com esporos de *Byssochlamys fulva* e o sistema de refrigeração for limitado quanto à transferência de calor por convecção, o tempo de vida útil do produto poderá não ser comprometido, se forem propiciadas condições para ocorrer o efeito do resfriamento provocado pela evaporação da água superficial em complementação ao resfriamento estritamente convectivo na superfície do alimento?
- ii. comparando o processo de resfriamento do alimento exclusivamente por convecção com o processo que conjuga os efeitos convectivo e evaporativo, qual é o ganho no tempo de vida útil do alimento?

Este artigo será submetido para publicação em periódico internacional – qualis A na área de Engenharias II.

## MODELAGEM E SIMULAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *BYSSOCHLAMYS FULVA* EM POLPA DE MAMÃO SUBMETIDO AO PROCESSO DE RESFRIAMENTO COM EFEITO EVAPORATIVO

Paulo Ricardo Santos da Silva\*; Isabel Cristina Tessaro; Ligia Damasceno Ferreira Marczak  
Laboratório de Tecnologia e Processamento de Alimentos – Departamento de Engenharia  
Química UFRGS – Brasil

### Resumo

A refrigeração é uma tecnologia de conservação de alimentos muito utilizada pelo setor industrial. Contudo, condições impróprias de temperatura e de umidade do ar durante a sua aplicação podem comprometer a qualidade do produto. Neste trabalho, estudou-se o efeito da temperatura inicial do produto, da velocidade e da umidade relativa do ar do sistema de refrigeração sobre o tempo de vida útil de polpa de mamão contaminada com esporos de *Byssochlamys fulva*, considerando o efeito evaporativo no fenômeno de resfriamento do alimento. Foi desenvolvido um modelo matemático integrando a cinética de crescimento microbiano com equações que descrevem os fenômenos de transferência de calor e de massa na superfície do alimento. Tal modelo foi implementado no *software* Matlab e resolvido numericamente pelo método das diferenças finitas explícitas. Verificou-se que, nesse processo, o tempo de vida útil do alimento é influenciado principalmente pela temperatura inicial do produto. Concluiu-se que o resfriamento com efeito evaporativo oferece resultados significativos, em termos de vida útil, se houve abuso na temperatura inicial do produto, associado à baixa velocidade do ar do sistema de refrigeração. Nestas condições, as simulações demonstraram haver um aumento de até 70% no tempo de vida útil da polpa de mamão, comparativamente ao processamento sem o efeito evaporativo.

Palavras-chave: transferência de calor – efeito evaporativo – crescimento – fungo – alimento

### 7.1 INTRODUÇÃO

A refrigeração é uma operação muito empregada pelo setor alimentício para manter a qualidade de seus produtos desde a produção até o consumo final. Por meio da redução de temperatura é possível realizar o controle microbiológico, fisiológico, bioquímico e de alterações físicas no produto. Condições impróprias de temperatura e de umidade durante o processo de refrigeração podem provocar perdas de qualidade e comprometer a segurança dos alimentos. Segundo dados do Instituto Internacional de Refrigeração (2009), a perda de alimentos perecíveis devido às deficiências no sistema de refrigeração chega a 20% da produção mundial. Especificamente para frutas e hortaliças, esse índice alcança o valor de 35% (LAGUERRE *et al.*, 2013).

Nomenclatura	$Sc$ número de Schmidt
$A_W$ atividade de água na superfície do produto	$t$ tempo (h)
$b$ parâmetro do modelo da raiz quadrada estendida	$T$ temperatura (K)
$c$ parâmetro do modelo da raiz quadrada estendida	$T_0$ temperatura inicial do produto (K)
$C_{A,\infty}$ concentração de água na corrente livre ( $gmol.m^{-3}$ )	$T_S$ temperatura na superfície do produto (K)
$C_{A,S}$ concentração de água na superfície do produto ( $gmol.m^{-3}$ )	$T_\infty$ temperatura do ar na corrente livre (K)
$C_P$ calor específico do fluido ( $kJ.kg^{-1}.K^{-1}$ )	$T_{min.}$ temperatura mínima de crescimento (K)
$h$ coeficiente de transferência de calor convectivo ( $W.m^{-2}.K^{-1}$ )	$T_{max.}$ temperatura máxima de crescimento (K)
$k$ condutividade térmica do produto ( $W.m^{-1}.K^{-1}$ )	$U_\infty$ velocidade do ar na corrente livre ( $m.s^{-1}$ )
$k_f$ condutividade térmica do fluido ( $W.m^{-1}.K^{-1}$ )	$W$ comprimento da camada de produto (m)
$k_C$ coeficiente de transferência de massa convectivo ( $m.s^{-1}$ )	$y$ raio da colônia no instante $t$ (cm)
$L$ espessura do produto (m)	$y_0$ raio inicial da colônia (cm)
$N_A$ fluxo de água na superfície do produto ( $gmol.m^{-2}.s^{-1}$ )	$y_{MAX}$ raio máximo da colônia (cm)
$Nu$ número de Nusselt	$z$ posição no interior do produto (m)
$p$ parâmetro do modelo hiperbólico	$\alpha$ difusividade térmica do alimento ( $m^2.s^{-1}$ )
$P_{A,S}^0$ pressão de vapor da água na superfície do produto (Pa)	$\mu$ taxa de crescimento radial da colônia ( $mm.dia^{-1}$ )
$P_{A,\infty}^0$ pressão de vapor da água na corrente livre (Pa)	$\nu$ viscosidade cinemática ( $m^2.s^{-1}$ )
$Pr$ número de Prandtl	$\rho$ massa específica do ar ( $kg.m^{-3}$ )
$q$ parâmetro do modelo hiperbólico	$\lambda$ tempo de duração da fase lag (h)
$R$ constante universal dos gases ( $J.mol^{-1}.K^{-1}$ )	$\Delta H_{A,VAP}$ entalpia de vaporização da água ( $J.gmol^{-1}$ )
$Re_L$ número de Reynolds	$\phi$ umidade relativa do ar

Os fenômenos de transferência de calor e de massa associados à refrigeração são complexos devido à interdependência entre os fatores que influenciam no processo. Limitações no conhecimento desses fenômenos em equipamentos de refrigeração resultam em elevado consumo de energia, perda excessiva de umidade, redução do tempo de vida útil e perda de qualidade de produtos alimentícios (LAGUERRE *et al.*, 2013). Neste aspecto, a modelagem e a simulação de processos surgem como ferramentas úteis para a análise dos fenômenos envolvidos na refrigeração de alimentos. Por meio desta abordagem, diferentes condições de operação podem ser virtualmente investigadas, de forma rápida e econômica (WANG, SUN, 2003).

O resfriamento com efeito evaporativo é um caso particular de aplicação dos fenômenos de transferência de calor e de massa no processamento de alimentos. Ele intensifica a taxa de redução de temperatura dos produtos devido ao efeito provocado pela evaporação da umidade da superfície do alimento. Chuntranuluck *et al.* (1998a) afirmaram que, em um processo de resfriamento típico aplicado a carnes, peixes, frutas e hortaliças, a perda de 1% da umidade superficial do alimento é responsável por 25% da energia

removida do produto durante a refrigeração. Isto evidencia a importância em considerar esse fenômeno na análise dos processos de resfriamento de alimentos.

Na literatura encontram-se diversas propostas de modelos matemáticos para descrever os processos de refrigeração, inclusive contemplando o fenômeno evaporativo (CHUNTRANULUCK *et al.*, 1998a,b,c; TANNER *et al.*, 2002; SIMPSON *et al.*, 2004; FERRUA, SINGH, 2009; MORAGA *et al.*, 2012; CEPEDA *et al.*, 2013). No entanto, é limitado o número de estudos que abordaram a integração entre os modelos que descrevem o comportamento térmico do alimento e as equações que quantificam seu efeito sobre reações bioquímicas (desnaturação enzimática), inativação e crescimento microbiano e alterações mecânicas no produto (estresse térmico). A propósito, este fato já havia sido apontado no trabalho de Wang e Sun (2003). Tais pesquisadores, assim como Mafart (2005), Lebert e Lebert (2006) e Ben Yaghlene *et al.* (2009), defenderam a ideia de que a integração entre modelos de transferência de calor e de massa com modelos microbianos permite melhor avaliar a segurança e a qualidade de alimentos durante os processos de aquecimento e de resfriamento.

A integração entre modelos de transferência de calor e de massa, contemplando o efeito do resfriamento provocado pela evaporação da umidade superficial do produto, e a cinética de crescimento microbiano é um tema pouco abordado nos trabalhos encontrados na literatura. Foram identificados apenas dois estudos que trataram dessa temática, conduzidos por Amézquita *et al.* (2005) e Cepeda *et al.* (2013). Mesmo assim, o foco desses estudos foi a análise do comportamento de crescimento de bactérias. Para fungos, não foram encontrados registros de estudos em que tal temática foi considerada.

Recentemente, Silva *et al.* (2013) propuseram um equacionamento para avaliar o efeito da temperatura inicial do produto e da velocidade do ar da corrente de refrigeração sobre o crescimento de *Byssochlamys fulva* em polpa de mamão refrigerado. Os pesquisadores concluíram que o abuso na temperatura inicial do produto reduz significativamente o seu tempo de vida útil, mesmo intensificando a transferência de calor por convecção. No referido trabalho, o efeito evaporativo não foi considerado, uma vez que a redução de temperatura do alimento foi avaliada com o produto já embalado.

Desta forma, os objetivos deste estudo foram: (i) desenvolver um modelo de transferência de calor e de massa contemplando o fenômeno de resfriamento com efeito evaporativo; (ii) integrá-lo ao modelo cinético que descreve o crescimento de *B. fulva* em polpa de mamão; (iii) investigar e quantificar o efeito das condições de processamento (temperatura inicial do produto, velocidade do ar da corrente de refrigeração e sua umidade

relativa) sobre o crescimento do microrganismo; e, finalmente, (iv) comparar os resultados obtidos com os dois modelos de transferência de calor (com e sem o efeito evaporativo) em relação ao tempo de vida útil do produto.

## 7.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 7.2.1 Modelo do crescimento microbiano

O modelo cinético para descrever o crescimento de *B. fulva* utilizado neste estudo foi desenvolvido e validado por Silva *et al.* (2013) em condições dinâmicas de temperatura. De acordo com esse trabalho, o aumento do raio da colônia do microrganismo foi melhor descrito pelo modelo Gompertz modificado (Eq. 7.1).

$$y = y_0 + y_{MAX} \cdot \exp\left\{-\exp\left[\frac{\mu \cdot \exp(1)}{y_{MAX}} \cdot (\lambda - t) + 1\right]\right\} \quad (\text{Eq. 7.1})$$

O efeito da temperatura sobre a taxa de crescimento radial ( $\mu$ ) e sobre o tempo de duração da fase lag ( $\lambda$ ) foi equacionado por meio do modelo da raiz quadrada estendida (Eq. 7.2) e pelo modelo hiperbólico (Eq. 7.3), respectivamente.

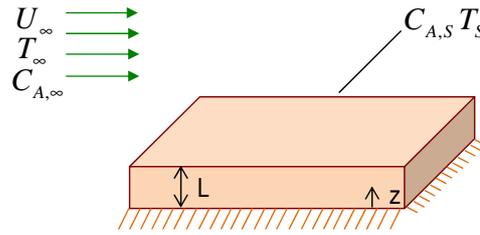
$$\sqrt{\mu} = b \cdot (T - T_{\min.}) \cdot \{1 - \exp[c \cdot (T - T_{\max.})]\} \quad (\text{Eq. 7.2})$$

$$\ln(\lambda) = \frac{p}{T - q} \quad (\text{Eq. 7.3})$$

Silva *et al.* (2013) não observaram a existência de dependência entre o raio máximo alcançado pela colônia ( $y_{MAX}$ ) e a temperatura. Por este motivo, no modelo Gompertz modificado foi utilizado, para esse parâmetro, o valor médio de raio máximo da colônia obtido nos diversos experimentos realizados para construir o modelo matemático, ou seja, 5,02 cm.

### 7.2.2 Modelo de transferência de calor

A Figura 7.1 representa o sistema físico que foi modelado matematicamente neste estudo. Consiste em uma fatia de mamão, cujo formato foi aproximado por uma placa plana, disposta sobre uma bandeja de poliestireno. Em sua superfície superior há uma condição de contorno convectiva e evaporativa. Diferentemente do estudo realizado por Silva *et al.* (2013), em que o alimento estava coberto por um filme de polietileno, neste trabalho avaliou-se o comportamento térmico do mamão fatiado e não embalado. Desta forma, justifica-se a necessidade de considerar o efeito evaporativo no equacionamento do fenômeno físico.



**Figura 7.1** - Representação esquemática do sistema físico modelado matematicamente

A evolução temporal do campo de temperaturas no produto é obtida a partir da resolução da equação de difusão do calor. Assumindo que a transferência de calor é unidimensional (apenas na direção  $z$ ), que não há geração de calor no interior do produto e que ele é isotrópico, a equação de difusão de calor em coordenadas retangulares reduz-se a:

$$\frac{\partial T}{\partial t} = \alpha \cdot \frac{\partial^2 T}{\partial z^2} \quad (\text{Eq. 7.4})$$

A condição inicial e as condições de contorno aplicáveis ao problema térmico são:

- Em  $t = 0$ ,  $T = T_0$
- Em  $z = 0$ ,  $\frac{\partial T}{\partial z} = 0$
- Em  $z = L$ ,  $-k \cdot \frac{\partial T}{\partial z} = h \cdot (T_S - T_\infty) + N_A \cdot \Delta H_{A,VAP}$

Assumindo comportamento ideal para o vapor d'água, seu fluxo a partir da superfície do produto ( $N_A$ ) é expresso por:

$$N_A = \frac{k_C}{R} \cdot \left( \frac{A_W \cdot P_{A,S}^0}{T_S} - \frac{\phi \cdot P_{A,\infty}^0}{T_\infty} \right) \quad (\text{Eq. 7.5})$$

Segundo Chuntranuluck *et al.* (1998a), uma simplificação frequentemente adotada na Equação (7.5) consiste em considerar que a atividade de água ( $A_W$ ) na superfície do produto é igual a 1. Esses pesquisadores argumentaram que tal simplificação é válida para alimentos cuja superfície possui proteção natural à perda de água e quando seus tecidos não foram expostos ao ar na natureza. Desta forma, como a polpa de mamão satisfaz esses critérios, entendeu-se pertinente aplicar tal hipótese neste trabalho. Além disso, se durante o processo de resfriamento for borrifado água sobre o alimento, garante-se que sua atividade de água superficial seja mantida igual à unidade.

Para avaliar a pressão de vapor da água (em mmHg) na superfície do produto ( $P_{A,S}^0$ ) e na corrente livre ( $P_{A,\infty}^0$ ) em uma dada temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) foi empregada a equação de Antoine (Eq. 7.6).

$$\log(P_A^0) = 7,96681 - \frac{1668,21}{228 + T} \quad (\text{Eq. 7.6})$$

A entalpia de vaporização da água na temperatura da superfície do alimento pode ser estimada por meio da Equação (7.7) apresentada no trabalho de Chuntranuluck *et al.* (1998a). Nesta equação, a entalpia de vaporização é obtida em J/gmol e a temperatura da superfície do alimento deve ser expressa na escala absoluta.

$$\Delta H_{A,VAP} = 2,5 \cdot 10^6 - 2,5 \cdot 10^3 \cdot T_S \quad (\text{Eq. 7.7})$$

O valor do coeficiente de transferência de calor convectivo ( $h$ ), por sua vez, depende da geometria do problema, do regime de escoamento, da velocidade e das propriedades termofísicas do fluido. Incropera e De Witt (1998) apresentaram as seguintes correlações que permitem estimar o valor do parâmetro  $h$ :

- Regime de escoamento laminar ( $Re_L < 5 \cdot 10^5$ )

$$Nu_L = \frac{h \cdot W}{k_f} = 0,664 \cdot Re_L^{1/2} \cdot Pr^{1/3} \quad (\text{Eq. 7.8})$$

- Regime de escoamento misto – laminar e turbulento ( $5 \cdot 10^5 < Re_L < 1 \cdot 10^8$ )

$$Nu_L = \frac{h \cdot W}{k_f} = \left( 0,037 \cdot Re_L^{4/5} - 871 \right) \cdot Pr^{1/3} \quad (\text{Eq. 7.9})$$

O número de Reynolds na placa plana ( $Re_L$ ), que aparece nas Equações (7.8) e (7.9), é expresso por

$$Re_L = \frac{U_{\infty} \cdot W}{\nu} \quad (\text{Eq. 7.10})$$

O valor do coeficiente de transferência de massa convectivo ( $k_c$ ) também depende da geometria do problema, do regime de escoamento, da velocidade e das propriedades termofísicas do fluido. Ele pode ser estimado a partir do coeficiente de transferência de calor, desde que seja válida a analogia de Chilton-Colburn, expressa pela Equação (7.11). Para aplicar essa equação, deve-se certificar que  $0,6 < Sc < 2500$  e  $0,6 < Pr < 100$ .

$$k_c = \frac{h}{\rho \cdot C_p} \cdot \left( \frac{Pr}{Sc} \right)^{\frac{2}{3}} \quad (\text{Eq. 7.11})$$

onde o número de Prandtl ( $Pr$ ) é a razão entre a difusividade de quantidade de movimento ( $\nu$ ) e a difusividade térmica ( $\alpha$ ); o número de Schmidt ( $Sc$ ) é a razão entre a difusividade de quantidade de movimento ( $\nu$ ) e a difusividade mássica ( $D_{A,B}$ ).

### 7.2.3 Integração entre os modelos cinético e térmico

O modelo cinético microbiano foi integrado ao equacionamento que descreve os fenômenos de transferência de calor e de massa no alimento. Com isso, foi possível simular o efeito da velocidade do ar da corrente livre ( $U_\infty$ ), da umidade relativa do ar ( $\phi$ ) e da temperatura inicial do produto ( $T_0$ ) sobre o comportamento de crescimento do microrganismo.

A partir de determinadas condições de processo ( $U_\infty, \phi$  e  $T_0$ ), encontrou-se a evolução de temperatura na superfície do alimento ao longo do tempo. Essa evolução temporal da temperatura superficial foi utilizada para avaliar o crescimento do microrganismo sob tais condições. Por fim, obteve-se a estimativa do tempo necessário para que a colônia de fungos atingisse o tamanho crítico. Segundo Gibson *et al.* (1994), colônias com 1,5 mm de raio tornam-se visíveis ao consumidor, o que provoca a rejeição do produto. Portanto, essa medida de raio da colônia foi considerada nos cálculos como o raio crítico. O tempo correspondente para que o microrganismo atingisse o raio crítico foi denominado neste trabalho de tempo de vida útil do alimento.

Como o crescimento do microrganismo ocorre em condições dinâmicas de temperatura, foi necessário utilizar a forma diferencial do modelo de Gompertz modificado, conforme proposto por van Impe *et al.* (1992).

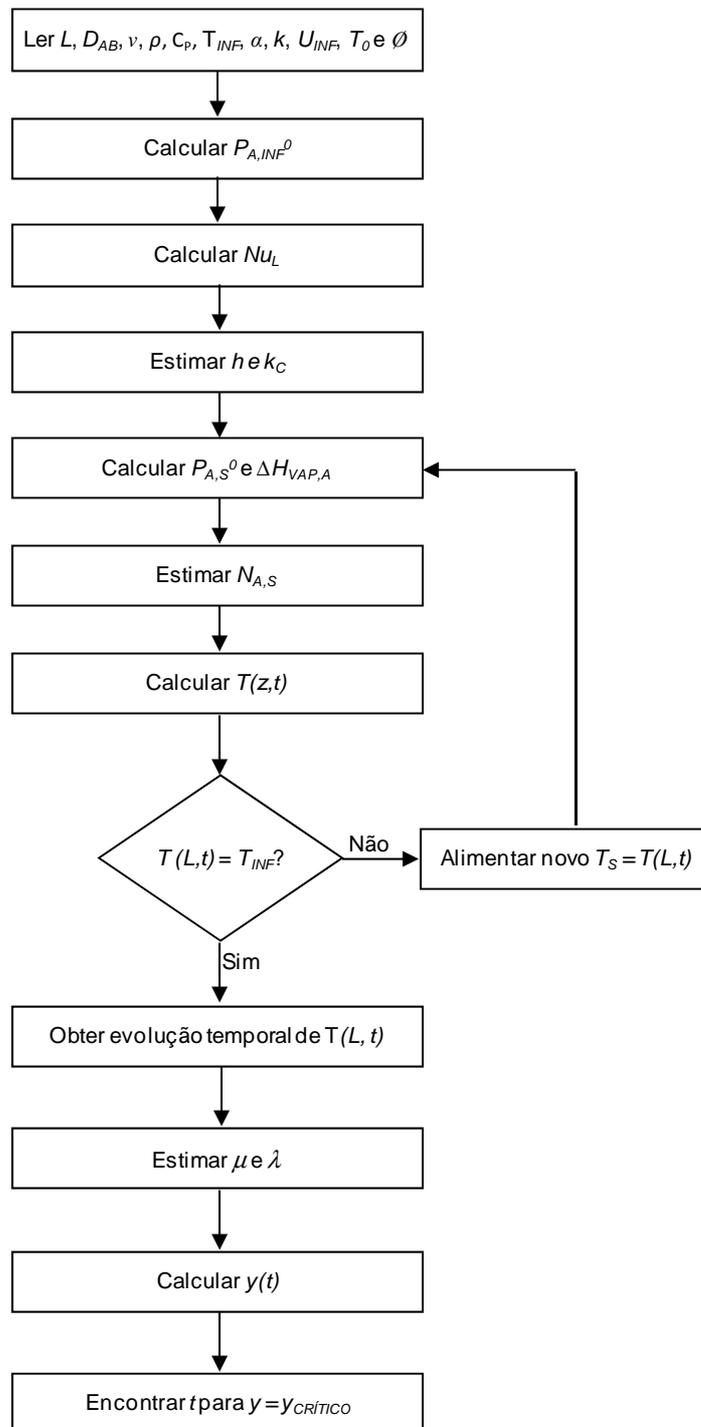
$$\frac{dy}{dt} = \frac{\mu \cdot \exp(1)}{y_{MAX}} \cdot y \cdot \ln\left(\frac{y_{MAX}}{y}\right) \quad (\text{Eq. 7.12})$$

A condição inicial associada à Equação (7.12) é expressa por

$$y_0 = y_{MAX} \cdot \exp\left\{-\exp\left[\frac{\mu \cdot \exp(1)}{y_{MAX}} \cdot \lambda + 1\right]\right\} \quad (\text{Eq. 7.13})$$

O conjunto de equações obtido foi implementado em um algoritmo desenvolvido no *software* Matlab versão 5.3 da MathWorks®, cuja estrutura é mostrada na Figura 7.2. As equações diferenciais foram resolvidas numericamente. Para o modelo de transferência de

calor foi empregado o método de diferenças finitas centrais (variável espacial) e diferenças finitas ascendentes (variável temporal). Para a resolução do modelo cinético microbiano na forma diferencial, foi utilizado o método de Runge-Kutta de 4ª ordem.



**Figura 7.2** - Estrutura do algoritmo implementado no Matlab para efetuar as simulações e avaliar o efeito da temperatura inicial do produto, da velocidade e da umidade do ar sobre o tempo de vida útil do alimento.

### 7.2.4 Validação do modelo térmico

Há solução exata para o modelo de transferência de calor, apresentado na Seção 7.2.2, quando o efeito do resfriamento provocado pela evaporação da umidade superficial não é significativo. Tal fato foi utilizado para avaliar a exatidão da solução numérica para o modelo neste caso particular. Para tanto, o perfil temporal de temperatura obtido por solução numérica foi comparado ao perfil temporal de temperatura encontrado a partir da solução analítica do modelo matemático simplificado. Esse procedimento permitiu, inclusive, determinar o número de pontos na malha de discretização da temperatura capaz de minimizar o esforço computacional, sem comprometer a exatidão do modelo.

A validação parcial do modelo térmico foi efetuada para quatro cenários de operação distintos, como mostra o Quadro 7.1. Em todos os casos, foi atribuído o valor nulo para o fluxo de evaporação de água da superfície do produto ( $N_A$ ). A temperatura do ar da corrente livre ( $T_\infty$ ) foi ajustada para 14°C e a evolução temporal de temperatura na superfície do produto foi avaliada no intervalo de 8.000 segundos.

**Quadro 7.1** - Cenários de operação do processo utilizados na validação do modelo numérico para a descrição do fenômeno de transferência de calor simplificado

Cenário de operação	$U_\infty$ (m/s)	$T_0$ (°C)
(I)	5	28
(II)	5	18
(III)	0,5	28
(IV)	0,5	18

Como critério para avaliar o desempenho do modelo numérico, foram comparados os valores de temperatura avaliados em cada instante de tempo ( $t$ ) pelo modelo numérico ( $T_t^{num}$ ) e pela solução exata ( $T_t^{exato}$ ). Para operacionalizar a comparação, foi utilizado o índice RSS – soma do quadrado dos resíduos, ponderada pelo número de pontos avaliados, conforme a Equação 7.14. Foi admitido desempenho satisfatório para o modelo quando o RSS fosse inferior a 0,01. Isto representa a diferença de 0,1°C entre as duas previsões de temperatura.

$$RSS = \frac{\sum_{t=1}^n (T_t^{num} - T_t^{exato})^2}{n} \quad (\text{Eq. 7.14})$$

### 7.2.5 Simulações de condições de processo

O modelo matemático integrando o equacionamento de transferência de calor e a cinética de crescimento microbiano foi simulado para diferentes combinações de

temperatura inicial do produto (na faixa de 16 a 28°C), velocidade do ar da corrente livre (de 0,5 a 5 m/s) e umidade relativa do ar (de 50 a 90%). Foram executadas 48 simulações. Em todos os cenários simulados, a variável de resposta monitorada foi o tempo necessário para que a colônia atingisse o raio crítico. A simulação do modelo térmico era finalizada quando a superfície do produto alcançava 14°C, mantendo-se esse valor constante até a finalização da simulação do modelo cinético. De acordo com Spoto e Gutierrez (2006), temperaturas inferiores a 14°C provocam injúrias pelo frio no mamão.

Os valores dos parâmetros utilizados no modelo matemático integrado são apresentados no Quadro 7.2.

**Quadro 7.2** - Valores dos parâmetros utilizados nas simulações efetuadas com o modelo matemático desenvolvido neste estudo

	Parâmetro	Valor	Fonte
Modelo de transferência de calor e de massa	$T_{AR}$	14°C	Spoto e Gutierrez (2006)
	$k_{AR}$	0,026 W/(m.K)*	ASHARE (1981) <i>apud</i> Incropera e DeWitt (1998)
	$\alpha_{AR}$	$2,25 \times 10^{-5} \text{ m}^2/\text{s}^*$	
	$\nu_{AR}$	$1,59 \times 10^{-5} \text{ m}^2/\text{s}^*$	
	$\rho_{AR}$	1,1614 kg/m <sup>3</sup> *	
	$C_{P,AR}$	1,007 kJ/(kg.K)*	
	$Pr$	0,707*	
	$U_{AR}$	0,5 – 5 m/s	Assumido pelo modelo
	$\phi_{AR}$	50 – 90 %	
	$T_0$	16 – 28°C	
	$k_{MAMÃO}$	0,60 W/(m.K)	Kurozawa <i>et al.</i> (2005)
	$\alpha_{MAMÃO}$	$1,11 \times 10^{-7} \text{ m}^2/\text{s}$	
	L	0,04 m	Assumido pelo modelo
W	0,15 m		
R	8,314 J/(gmol.K)	Marrero e Mason (1972) <i>apud</i> Simpson <i>et al.</i> (2004)	
$D_{ÁGUA-AR}$	$2,44 \times 10^{-5} \text{ m}^2/\text{s}$		
Modelo cinético microbiano	b	0,143	Silva <i>et al.</i> (2013)
	c	0,145	
	$T_{MIN}$	274,8 K	
	$T_{MAX}$	319,8 K	
	p	105,05	
	q	265,80	
	$y_0$	0	
	$y_{MAX}$	5,02 cm	
$y_{CRITICO}$	1,5 mm	Gibson <i>et al.</i> (1994)	

\* Propriedades térmicas do ar avaliadas a 300 K

### 7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 7.3.1 Validação do modelo térmico simplificado

O modelo simplificado que descreve o fenômeno de transferência de calor (sem o efeito evaporativo) foi resolvido numericamente para diferentes tamanhos de malhas de discretização para o campo de temperatura. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 7.1.

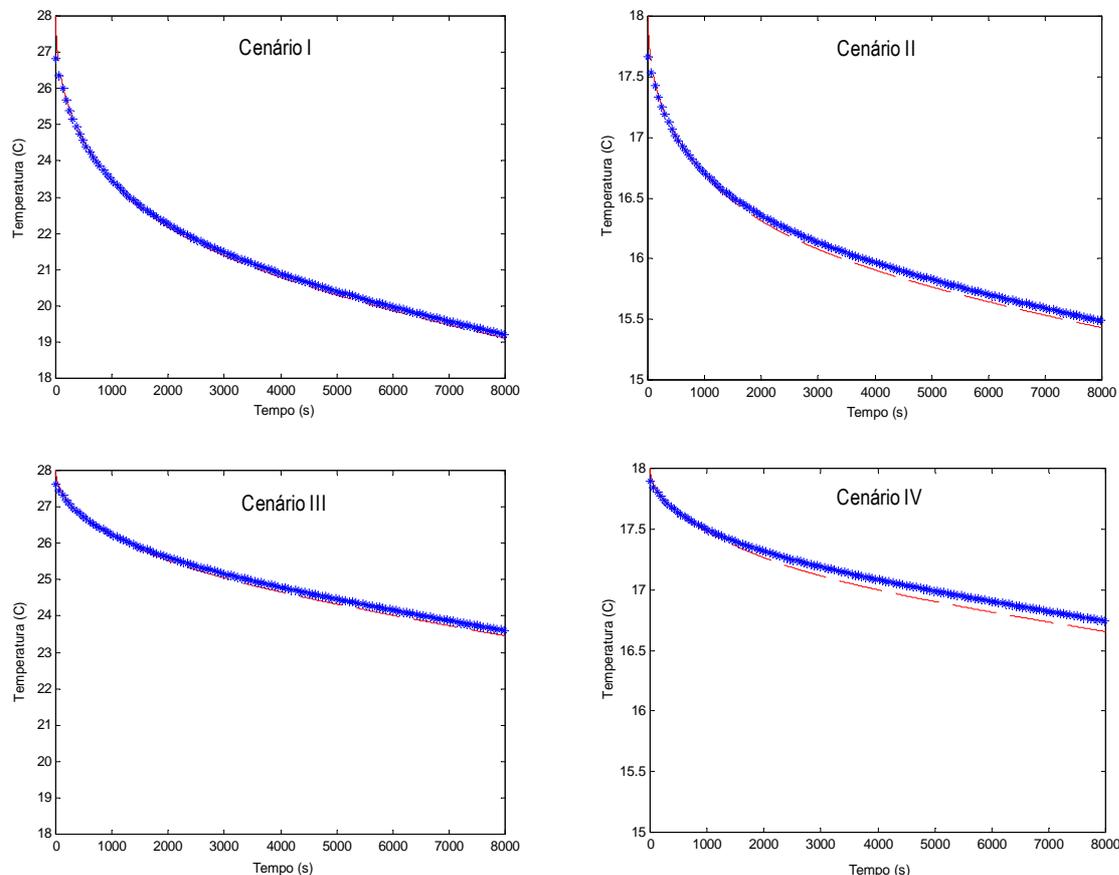
**Tabela 7.1** - Valor da soma dos quadrados dos resíduos (RSS) para malhas de discretização com diferentes números de pontos (N) para o campo de temperatura, nos diversos cenários de operação estudados

N	Cenários de operação			
	(I)	(II)	(III)	(IV)
10	0,6127	0,2232	1,1307	0,4462
20	0,1331	0,0482	0,2423	0,0956
40	0,0325	0,0113	0,0562	0,0221
60	0,0153	0,0050	0,0245	0,0096
80	0,0094	0,0029	0,0137	0,0053

A partir da Tabela 7.1, constata-se que o aumento no número de pontos da malha de discretização do campo de temperatura tornou mais exato os resultados do modelo numérico. Tal comportamento já era esperado. As simulações mostraram inclusive que apenas a malha com 80 pontos conseguiu satisfazer o critério de desempenho desejado ( $RSS < 0,01$ ) para a maioria dos cenários testados. Esclarece-se que malhas com mais de 80 pontos geram instabilidades numéricas. Por esta razão, a investigação sobre o número de pontos na malha limitou-se a esse valor. Portanto, para as demais simulações realizadas neste trabalho, foi empregada essa malha para a discretização do campo de temperaturas. Para a discretização no tempo, adotou-se o intervalo de 1 segundo entre avaliações sucessivas de temperatura em um mesmo ponto da malha.

A Figura 7.3 apresenta a comparação entre o perfil temporal de temperatura predito pelo modelo numérico e pela solução exata para cada cenário testado, na superfície do produto. Os gráficos da Figura 7.3 revelam que a solução numérica do modelo de transferência de calor simplificado descreveu satisfatoriamente o perfil de temperatura na superfície do produto, quando comparada com a solução exata para o problema físico. Isto demonstra a validade do modelo numérico ao equacionar o fenômeno de transferência de calor. Considerando que o efeito evaporativo aparece apenas como uma parcela aditiva na

condição de contorno do problema físico, entende-se que isto não altera a estrutura essencial do modelo numérico e, portanto, nem a sua validação.

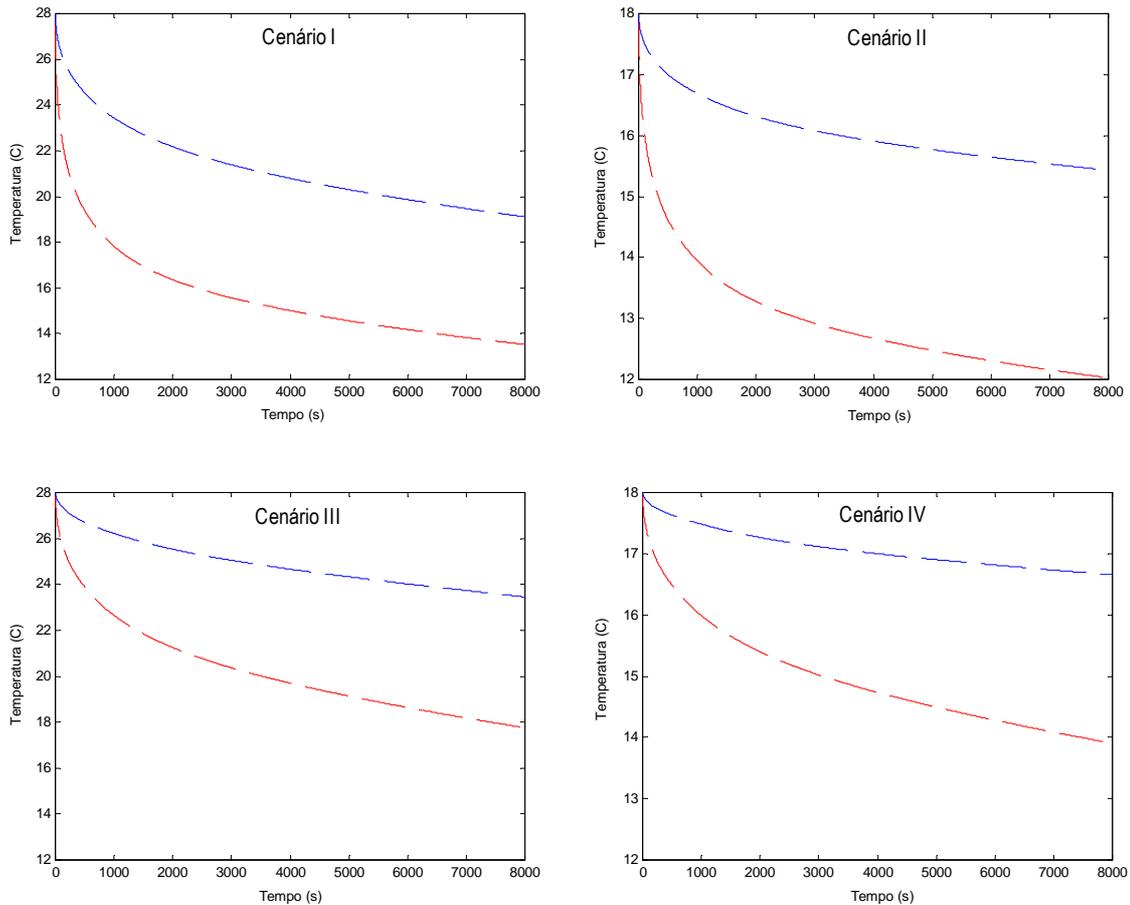


**Figura 7.3** - Comparação entre a evolução temporal da temperatura superficial determinada pela solução numérica (linha vermelha) e pela solução exata (pontos azuis) da equação de difusão de calor nos diferentes cenários de operação simulados.

### 7.3.2 Avaliação do efeito evaporativo na evolução de temperatura superficial do produto

Para cada um dos cenários de operação propostos no Quadro 7.1, comparou-se a evolução temporal de temperatura na superfície do alimento obtida no fenômeno com o efeito evaporativo e sem considerá-lo no equacionamento matemático. A Figura 7.4 ilustra os resultados dessa comparação. Em todos os casos, adotou-se o valor de 70% para a umidade relativa do ar na corrente livre de refrigeração.

Os gráficos da Figura 7.4 evidenciam o efeito significativo da evaporação da umidade superficial do produto sobre a sua taxa de resfriamento. Similar conclusão foi obtida por Cepeda *et al.* (2013) ao estudar o efeito evaporativo durante o resfriamento de carnes. Esses pesquisadores observaram que os valores de taxa de resfriamento eram subestimados, quando a evaporação não era considerada na análise.



**Figura 7.4** - Comparação entre a evolução temporal da temperatura na superfície do alimento com o efeito evaporativo (linha vermelha) e sem esse efeito (linha azul), para diferentes cenários de operação, mantendo  $\phi = 70\%$ .

Na Figura 7.4, nota-se, inclusive, que a superfície do produto atinge temperaturas inferiores à temperatura da corrente do ar de refrigeração, o que é esperado para esse tipo de fenômeno, devido ao efeito da temperatura de bulbo úmido. A propósito, o valor de temperatura de bulbo úmido predito pelo modelo numérico foi comparado ao obtido em cartas psicrométricas e observou-se coerência entre os resultados. Isto demonstra a validade do modelo para a condição limite de estado estacionário.

Avaliou-se, também, o efeito da umidade relativa do ar sobre a evolução temporal da temperatura na superfície do produto. A Tabela 7.2 mostra o tempo necessário para que a superfície do alimento atinja  $14^{\circ}\text{C}$ , em diferentes condições de operação.

**Tabela 7.2** - Tempo para a superfície do produto atingir 14°C para diferentes condições de umidade relativa ( $\phi$ ), de temperatura inicial do produto ( $T_0$ ) e de velocidade da corrente do ar de refrigeração ( $U_\infty$ ).

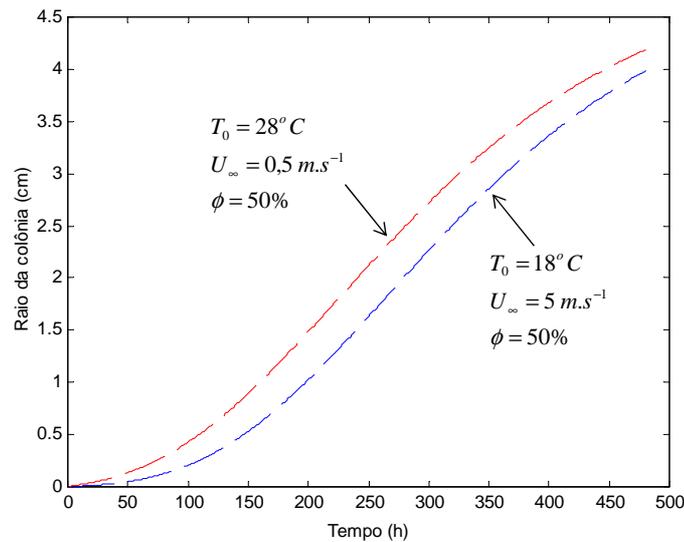
$T_0$ (°C)	$U_\infty$ (m/s)	$\phi$ (%)	Tempo (min)	$T_0$ (°C)	$U_\infty$ (m/s)	$\phi$ (%)	Tempo (min)
18	0,5	50	59	28	0,5	50	251
		70	125			70	356
		90	331			90	613
18	5	50	6	28	5	50	54
		70	16			70	109
		90	92			90	250

A partir dos resultados mostrados na Tabela 7.2, observa-se que o alimento com maior temperatura inicial e submetido à troca convectiva deficiente (baixo valor de  $U_\infty$ ) necessitou de maior tempo para atingir a temperatura de 14°C. Também, nota-se a existência de uma relação direta e expressiva entre a umidade relativa do ar e a variável de resposta. Ao aumentar a umidade relativa do ar, reduz-se a diferença de concentração de água entre a superfície do produto e a corrente de ar de refrigeração. Consequentemente, há diminuição do fluxo de evaporação, comprometendo o efeito evaporativo, conforme descrito pela Equação 7.5.

A análise mais detalhada da Tabela 7.2 revela que o efeito da umidade relativa sobre o tempo para o resfriamento do alimento é mais significativo quando a sua temperatura inicial é menor. Reportando-se novamente à Equação 7.5, verifica-se que nesta condição a pressão de vapor da água na superfície do produto e na corrente livre assume valores mais próximos, o que potencializa o efeito da umidade relativa.

### 7.3.3 Avaliação do efeito evaporativo no crescimento microbiano

As simulações anteriores indicaram que o efeito evaporativo acelera a taxa de resfriamento do alimento. Por sua vez, esta rápida diminuição de temperatura tem como efeito a redução da taxa de crescimento de microrganismos e a extensão do tempo de vida útil do produto. Para quantificar a magnitude desse efeito sobre o crescimento de *B. fulva*, o modelo cinético, integrado ao equacionamento que descreve o fenômeno de transferência de calor, foi utilizado para simular diferentes condições de operação. A Figura 7.5 mostra os resultados das simulações para duas condições extremas de operação.

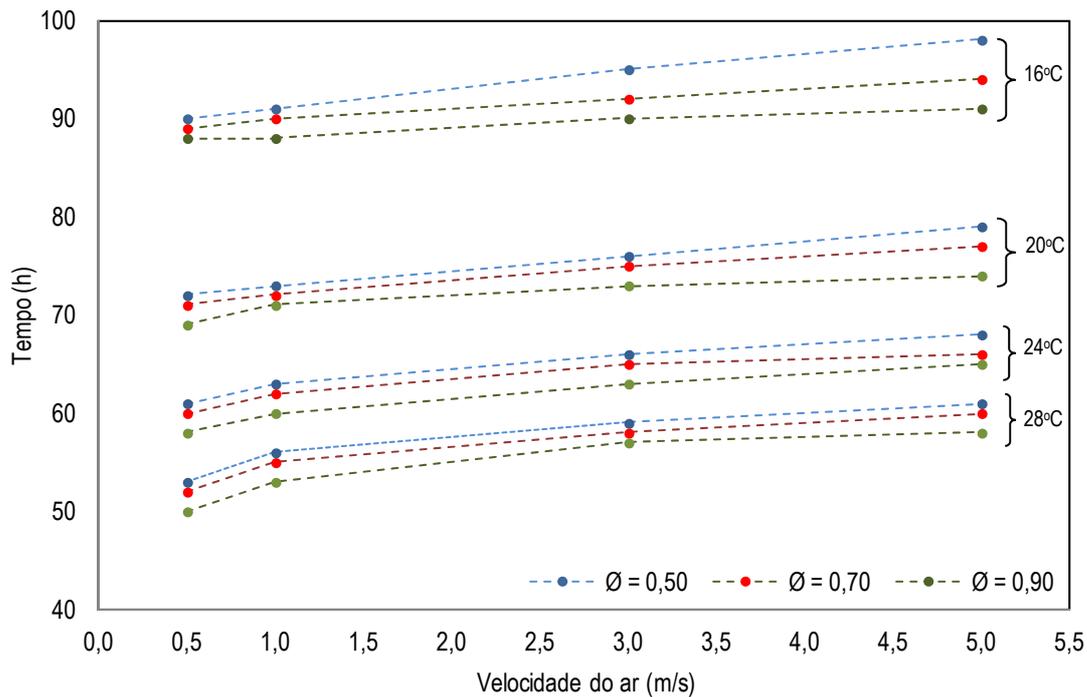


**Figura 7.5** - Curvas de crescimento de *B. fulva* em duas diferentes temperaturas iniciais do produto e em distintas condições de refrigeração.

A Figura 7.5 revela que o formato da curva de crescimento do microrganismo é influenciado pelas condições do processo de resfriamento do produto. O aumento da temperatura inicial do produto e a redução da velocidade da corrente de ar do sistema de refrigeração favorecem o crescimento do fungo. Isto ocorre porque os esporos do microrganismo ficam expostos a uma condição que permite sua germinação de forma mais rápida. Por consequência, tal condição também interfere no tempo de vida útil do alimento.

O modelo integrado permitiu investigar o efeito da temperatura inicial do produto, da velocidade e da umidade relativa do ar da corrente de refrigeração sobre o tempo necessário para que a colônia de microrganismos atingisse o raio crítico. Os resultados destas simulações são mostrados no gráfico da Figura 7.6.

A Figura 7.6 indica o efeito preponderante da temperatura inicial do produto sobre o tempo de vida útil do alimento. Enquanto a  $16^\circ C$  a colônia de fungos tornar-se-ia visível, aproximadamente, 90 horas após a contaminação, a  $28^\circ C$ , esse intervalo de tempo reduz-se significativamente, ficando inferior a 60 horas. Também, evidencia-se o razoável efeito direto que a velocidade da corrente do ar de refrigeração apresenta sobre o tempo de vida útil do alimento. Maiores velocidades de ar de refrigeração promovem aumento do coeficiente de transferência de calor e de massa por convecção. Consequentemente, a temperatura na superfície do produto reduz-se rapidamente e, nestas condições, o crescimento do fungo torna-se mais lento.

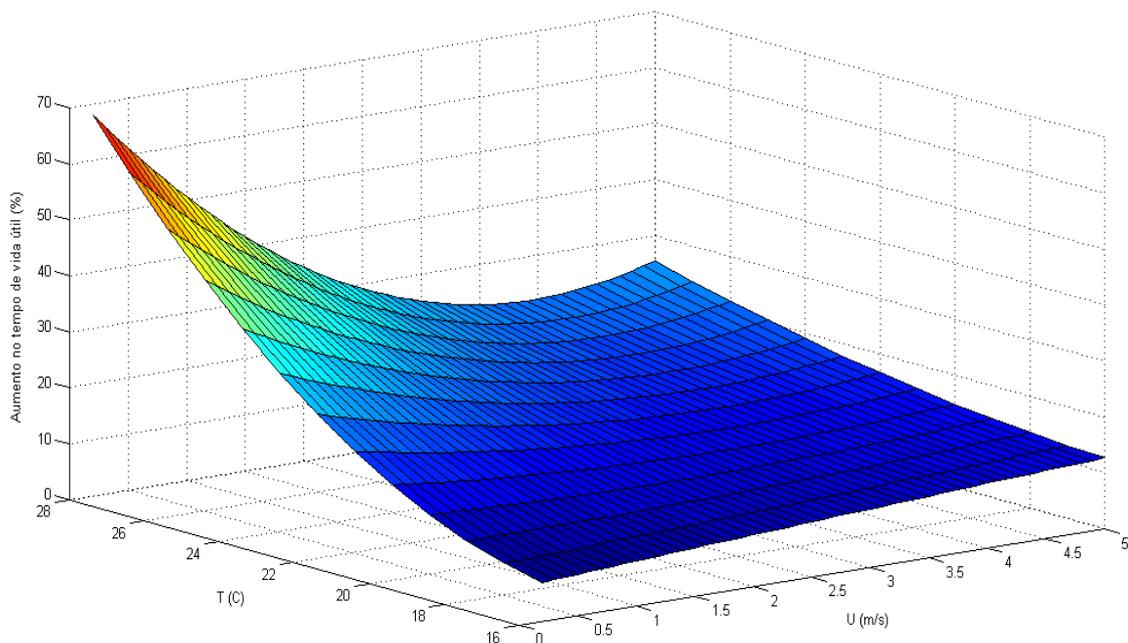


**Figura 7.6** - Efeito da temperatura inicial do produto, da velocidade e da umidade relativa do ar ( $\phi$ ) da corrente de refrigeração sobre o tempo para a colônia de fungos atingir o raio crítico.

Com relação à umidade relativa do ar, os resultados das simulações mostraram que seu efeito é pouco expressivo sobre o tempo de vida útil do alimento, para as mesmas condições de temperatura inicial e velocidade do ar de refrigeração. Contudo, pode-se perceber na Figura 7.6 que a redução do tempo de vida útil do alimento com o aumento da umidade relativa do ar é mais importante para valores maiores de velocidade do ar de refrigeração e menor temperatura inicial do produto. Como mencionado anteriormente, quando a temperatura do produto aproxima-se da temperatura da corrente livre, a umidade relativa do ar passa a ter efeito significativo sobre o fluxo de evaporação de água. Nesta condição, ao aumentar a umidade relativa do ar, reduz-se a diferença de concentração de água entre a superfície do produto e o ar e, então, diminui-se o fluxo de evaporação. Desta forma, o resfriamento da superfície do produto torna-se mais lento. Assim, os esporos do fungo ficam expostos ao abuso de temperatura por um intervalo maior de tempo, germinando rapidamente. Logo, as colônias do fungo tornam-se visíveis a olho nu em um menor intervalo de tempo. Quando a temperatura inicial do produto é maior, o efeito da umidade relativa do ar é pouco expressivo, pois o próprio abuso de temperatura é suficiente para promover a germinação antecipada dos esporos.

### 7.3.4 Comparação entre as duas estratégias de processamento do alimento

O gráfico da Figura 7.4 mostrou que o perfil temporal de temperatura na superfície do produto é fortemente influenciado pelo efeito evaporativo. Portanto, é conveniente comparar a magnitude deste efeito sobre o tempo necessário para que a colônia de fungos alcance o raio crítico. Os resultados dessa avaliação são mostrados na Figura 7.7. No gráfico dessa figura, avaliou-se como o efeito evaporativo pode contribuir para aumentar o tempo de vida útil do alimento comparativamente aos resultados obtidos por Silva *et al.* (2013), em cujo estudo tal efeito foi desconsiderado. Além da temperatura inicial do produto e da velocidade do ar da corrente de refrigeração, analisou-se o efeito da umidade relativa do ar. Contudo, os gráficos de superfície de resposta obtidos para os diferentes valores de umidade relativa eram praticamente idênticos. Portanto, optou-se por apresentar apenas o gráfico para  $\phi$  igual a 50%.



**Figura 7.7** - Aumento percentual no tempo de vida útil do produto em função de sua temperatura inicial (T) e da velocidade do ar de refrigeração (U), para  $\phi = 50\%$ , em comparação com o resfriamento do alimento sem considerar o efeito evaporativo.

A partir da Figura 7.7, conclui-se que o efeito evaporativo aumenta significativamente o tempo de vida útil do alimento para a condição de alta temperatura inicial do produto e baixa velocidade do ar do sistema de refrigeração. Em tais condições, há um aumento aproximado de 70% no tempo necessário para que a colônia de fungos torne-se visível. À medida que a temperatura inicial do produto é reduzida e a velocidade do ar de refrigeração aumenta, nota-se que o ganho no tempo de vida útil do alimento reduz-se para 10%.

Desta forma, conclui-se que o resfriamento da polpa de mamão descascado e fatiado, fora da embalagem, é uma estratégia de processamento útil quando há abuso na temperatura inicial do produto associado a um sistema de refrigeração pouco eficiente. Para situações em que a velocidade do ar do sistema de refrigeração é superior a 3 m/s ou quando a temperatura inicial do produto é inferior a 20°C, o emprego desta estratégia de produção não é interessante. Em tais condições, o ganho no tempo de vida útil do alimento, comparado ao resfriamento com o produto embalado, não é expressivo. Além disso, o resfriamento da polpa fora da embalagem representa um risco de ocorrer sua contaminação por outros microrganismos, inclusive patogênicos, e pode provocar alterações nas propriedades sensoriais do alimento, devido à evaporação da umidade superficial.

#### 7.4 CONCLUSÕES

---

A redução da temperatura é uma forma de conservação de alimentos muito utilizada pela indústria para estender o tempo de vida útil de produtos alimentícios, inclusive em relação à questão microbiológica. Diversos fatores afetam o desempenho das operações de refrigeração no controle do crescimento de bactérias e de fungos nesse meio. Neste trabalho, investigou-se o efeito da temperatura inicial do produto, da velocidade e da umidade relativa da corrente de ar do sistema de refrigeração sobre o tempo necessário para que esporos de *Byssochlamys fulva* formem colônias visíveis sobre a polpa de mamão submetida ao processo de resfriamento considerando o efeito evaporativo.

O estudo demonstrou que o efeito evaporativo acelera significativamente a taxa de resfriamento do alimento. Contudo, em termos de controle microbiológico, verificou-se que apenas em condições de abuso de temperatura do produto ( $T_0 > 24^\circ\text{C}$ ) e em sistemas que propiciam baixa capacidade de transferência de calor por convecção ( $U_\infty < 1 \text{ m/s}$ ), o efeito evaporativo apresenta aumento expressivo no tempo de vida útil do alimento.

Constatou-se, ainda, que o tempo para o surgimento de colônias visíveis desse fungo no alimento é influenciado principalmente pela temperatura inicial do produto. A velocidade e a umidade relativa do ar da corrente de refrigeração apresentaram efeito secundário sobre essa variável.

Considerando os riscos de contaminação do produto e de possíveis alterações sensoriais, por mantê-lo fora da embalagem para que o efeito evaporativo possa se estabelecer, concluiu-se que o uso desta estratégia de processamento do alimento é viável apenas em condições restritas, como aquelas mencionadas anteriormente.

---

**AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Amézquita, A., Weller, C.L., Wang, L., Thippareddi, H., Burson, D.E., 2005. Development of an integrated model for heat transfer and dynamic growth of *Clostridium perfringens* during the cooling of cooked boneless ham. *Int. J. Food Microbiol.* 101, 123-144.

Ben Yaghlene, H., Leguerinel, I., Hamdi, M., Mafart, P., 2009. A new predictive dynamic model describing the effect of the ambient temperature and the convective heat transfer coefficient on bacterial growth. *Int. J. Food Microbiol.* 133, 48-61.

Cepeda, J.F., Weller, C.L., Thippareddi, H., Negahban, M., Subbiah, J., 2013. Modeling cooling of ready-to-eat meats by 3D finite element analysis: Validation in meat processing facilities. *J. Food Eng.* 116, 450-461.

Chuntranuluck, S., Wells, C.M., Cleland, A.C., 1998a. Predicting of chilling times of foods in situations where evaporative cooling is significant – Part 1. Method development. *J. Food Eng.* 37, 111-125.

Chuntranuluck, S., Wells, C.M., Cleland, A.C., 1998b. Predicting of chilling times of foods in situations where evaporative cooling is significant – Part 2. Experimental Testing. *J. Food Eng.* 37, p. 127-141.

Chuntranuluck, S., Wells, C.M., Cleland, A.C., 1998c. Predicting of chilling times of foods in situations where evaporative cooling is significant – Part 3. Applications. *J. Food Eng.* 37, 143-157.

Ferrua, M.J., Singh, R.P., 2009. Modeling the forced-air cooling process of fresh strawberry packages, Part I: Numerical model. *Int. J. Refrig.* 32, 335-348.

Gibson, A.M., Baranyi, J.I., Pitt, J.I., Eyles, M.J., Roberts, T.A., 1994. Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. *Int. J. Food Microbiol.* 23, 419-431.

Incropera, F.P., De Witt, D.P., 1998. Fundamentos de transferência de calor e de massa. 4ª Ed. LTC, Rio de Janeiro.

Kurozawa, L.E., El-Aouar, A.A., Simões, M.R., Azoubel, P.M., Murr, F.E.X., 2005. Determination of thermal conductivity and thermal diffusivity of papaya (*Carica papaya* L.) as a function of temperature. In: 2nd Mercosur Congress on Chemical Engineering – 4th Mercosur Congress on Process Systems Engineering, Rio de Janeiro.

Laguerre, O., Hoang, H.M., Flick, D., 2013. Experimental investigation and modelling in the food cold chain: Thermal and quality evolution. Trends Food Sci. Technol. 29, 87-97.

Lebert, I., Lebert, A., 2006. Quantitative prediction of microbial behavior during food processing using an integrated modeling approach: a review. Int. J. Refrig. 29, 968-984.

Mafart, P., 2005. Food engineering and predictive microbiology: on the necessity to combine biological and physical kinetics. Int. J. Food Microbiol. 100, 239-251.

Moraga, N.O., Jauriat, L.A.; Lemus-Mondaca, R.A., 2012. Heat and mass transfer in conjugate food freezing/air natural convection. Int. J. Refrig. 35, 880-889.

Silva, P.R.S., Tessaro, I.C., Marczak, L.D.F., 2013. Integrating a kinetic microbial model with a heat transfer model to predict *Byssochlamys fulva* growth in refrigerated papaya pulp. J. Food Eng. 118, 279-288.

Simpson, R.J., Almonacid, S.F., Acevedo, C.A., Cortés, C.A., 2004. Simultaneous heat and mass transfer applied to non-respiring foods packed in modified atmosphere. J. Food Eng. 61, 279-286.

Spoto, M.H.F., Gutierrez, A.S.D., 2006. Qualidade pós-colheita de frutas e hortaliças. In: Oetterer, M., Regitano-D'Arce, M.A.B., Spoto, M.H.F. Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Manole, Barueri, pp. 403-452.

Tanner, D.J., Cleland, A.C., Opara, L.U., 2002. A generalized mathematical modeling methodology for the design of horticultural food packages exposed to refrigerated conditions. Part 2. Heat transfer modeling and testing. Int. J. Refrig. 25, 43-53.

Van Impe, J.F., Nicolai, B.M., Martens, T., Baerdemaeker, J.D., Vandewalle, J., 1992. Dynamic mathematical model to predict microbial growth and inactivation during food processing. Appl. Environ. Microbiol. 58, 2901-2909.

---

Wang, L., Sun, D.W., 2003. Recent developments in numerical modeling of heating and cooling processes in the food industry – a review. Trends Food Sci. Technol. 14, 408-423.

## CAPÍTULO 8

### Considerações Finais

Neste capítulo, os resultados apresentados separadamente nas seções anteriores serão analisados transversalmente e confrontados. Tal abordagem permitirá obter conclusões mais abrangentes sobre a temática de estudo desta tese. Após, serão respondidas as questões de pesquisa que foram apresentadas no Quadro 2.4. O capítulo encerra-se com a retomada das principais conclusões da tese, inseridas na perspectiva de sua contribuição para o estado da arte, e com sugestões de trabalhos que poderão complementar ou explorar aspectos superficialmente tratados neste estudo.

#### 8.1 DISCUSSÃO GERAL DOS RESULTADOS

---

Ao longo deste trabalho, o crescimento de *Byssochlamys fulva* foi avaliado em diferentes substratos (artificiais e alimentícios), utilizando técnicas de inoculação distintas (discos com micélio e suspensão de esporos). Foram ajustados quatro modelos preditivos primários aos dados experimentais (linear, logístico, Gompertz modificado, Baranyi simplificado), a fim de verificar qual melhor descrevia o comportamento desse fungo filamentoso. Em praticamente todos os casos, o modelo Gompertz modificado foi o que apresentou melhor desempenho, segundo os índices estatísticos utilizados. Apenas em polpa de pêssago o crescimento desse microorganismo foi melhor descrito pelo modelo linear.

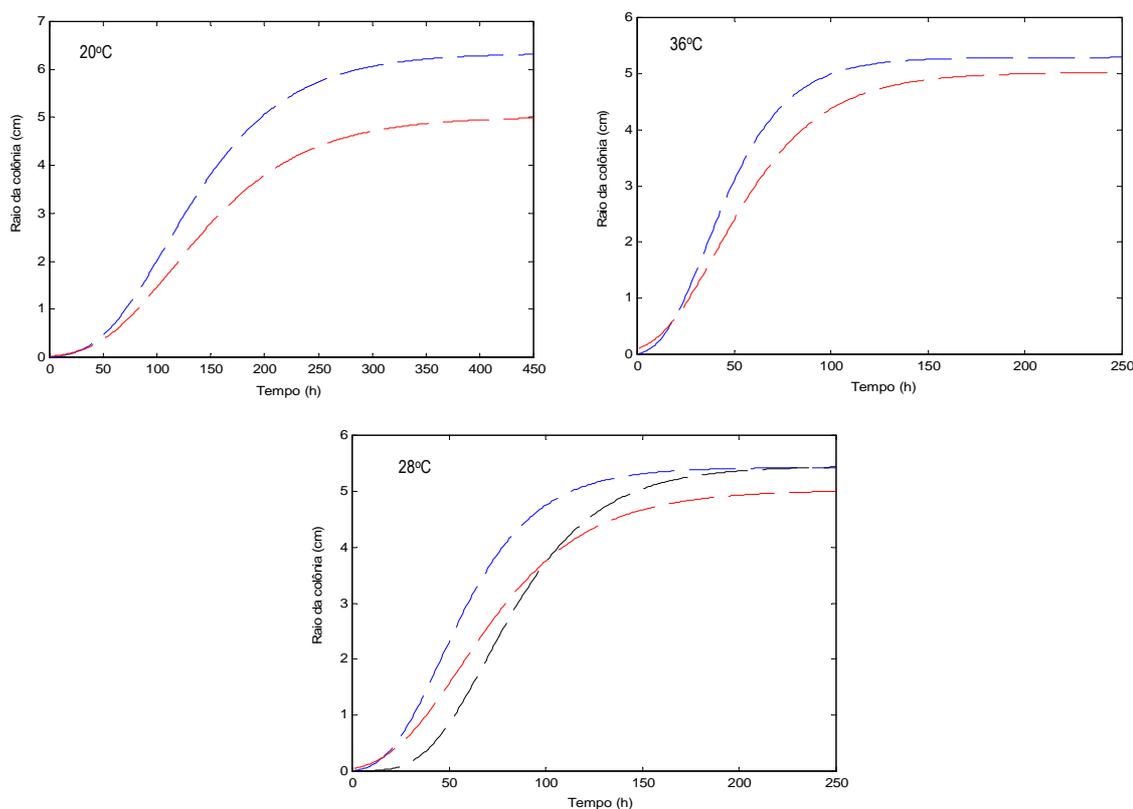
Ainda que o modelo Gompertz modificado receba críticas na literatura por não ter sido desenvolvido a partir de bases biológicas, estes resultados demonstram suas potencialidades ao ser empregado para descrever a dinâmica de aumento de raio da colônia

de fungos. Portanto, conclui-se que é conveniente considerá-lo na modelagem matemática do crescimento microbiano, principalmente para outras cepas de *B. fulva*.

### 8.1.1 Natureza do substrato e parâmetros de crescimento

Utilizando o modelo Gompertz modificado, foram estimados os parâmetros de crescimento desse fungo filamentososo, em polpa de mamão, a partir de três perspectivas distintas: (i) com a polpa inoculada com discos de micélio e mantida em condições de temperatura constante – artigo 1; (ii) com a utilização de suspensão de esporos do fungo como inóculo em um meio de cultura artificial que procura reproduzir a constituição do mamão, também em condições de temperatura constante – artigo 2; e (iii) com a utilização de suspensão de esporos para inocular polpa de mamão e estudar o crescimento do fungo em condições dinâmicas de temperatura – artigo 3.

Na Figura 8.1, compara-se o crescimento microbiano predito pelos modelos matemáticos apresentados nos artigos 1, 2 e 3, em condições isotérmicas.



**Figura 8.1** - Curvas de crescimento de *B. fulva*, a 20°C, 28°C e 36°C, em polpa de mamão inoculada com discos de micélio (linha preta), em polpa de mamão inoculada com esporos (linha vermelha) e em meio de cultura artificial inoculado com esporos do fungo (linha azul).

Tal comparação revela que o crescimento de *B. fulva* em meio de cultura artificial, com pH e teor de glicose ajustados para valores típicos da polpa de mamão (linha azul, Figura 8.1), é acentuadamente mais rápido do que o observado no substrato alimentício real, independentemente de a inoculação ter sido feita com discos de micélio (linha preta, Figura 8.1) ou suspensão de esporos (linha vermelha, Figura 8.1). Isto é um reflexo dos valores estimados para os parâmetros da curva de crescimento, a partir dos modelos apresentados nos artigos 1, 2 e 3.

No primeiro artigo, em que se utilizaram discos de micélio como inóculo, encontrou-se para a taxa de crescimento radial e para o tempo de duração da fase lag os valores 15,3 mm/dia e 38 h, respectivamente, a 28°C. Nessa mesma temperatura, em meio de cultura artificial (artigo 2), os valores preditos para os parâmetros do modelo Gompertz em polpa de mamão, utilizando o equacionamento desenvolvido, foram  $\mu$  igual a 18 mm/dia e  $\lambda$  igual a 18 h. No artigo 3, por sua vez, o modelo desenvolvido permitiu estimar os valores de 12,4 mm/dia e 20 h, para a taxa de crescimento radial e o tempo de duração da fase lag, respectivamente, também a 28°C. Confrontando esses resultados, conclui-se que o modelo desenvolvido para meio de cultura artificial superestimou o valor da taxa de crescimento radial desse microrganismo. Em relação ao tempo de duração da fase lag, nota-se similaridade entre os valores obtidos em polpa de mamão e em meio de cultura artificial, quando ambos os substratos foram inoculados com suspensão de esporos.

Ainda na Figura 8.1, observa-se que, a 36°C, as duas curvas de crescimento aproximam-se. Por outro lado, a 20°C, o desvio no comportamento do fungo torna-se mais acentuado. Conclui-se, portanto, que em temperaturas mais elevadas e próximas da condição ótima de crescimento desse fungo, modificações no meio de cultura apresentam pouca interferência sobre sua dinâmica de crescimento. Contudo, em condições de temperatura que não favorecem o seu crescimento, o efeito da natureza do substrato é expressivo.

Estes resultados indicam que, se o modelo desenvolvido em meio de cultura artificial fosse utilizado para prever o crescimento do fungo em polpa de mamão, ele apresentaria falha segura, pois o valor predito para o raio da colônia por esse equacionamento seria maior do que o observado na polpa de fruta real. Embora o resultado seja conservativo, o modelo desenvolvido no artigo 2 para prever o crescimento de *B. fulva* em polpas de frutas deve ser utilizado com muita cautela.

Como consequência do que foi descrito acima, entende-se que os valores de tempo de vida útil das polpas de mamão apresentados na Tabela 5.6 são inferiores aos registrados

em polpas reais. Novamente, isto demonstra o caráter de falha segura do modelo desenvolvido no artigo 2.

Esse comportamento de crescimento distinto de fungos em meio de cultura artificial e em substratos alimentícios reais também foi observado por Baert *et al.* (2007) em seu trabalho com *Penicillium expansum* em maçãs. Tais pesquisadores observaram extensão no tempo de duração da fase lag e redução na taxa de crescimento, quando compararam o desenvolvimento do fungo em maçãs com os valores preditos pelo modelo matemático, desenvolvido para meio de cultura artificial.

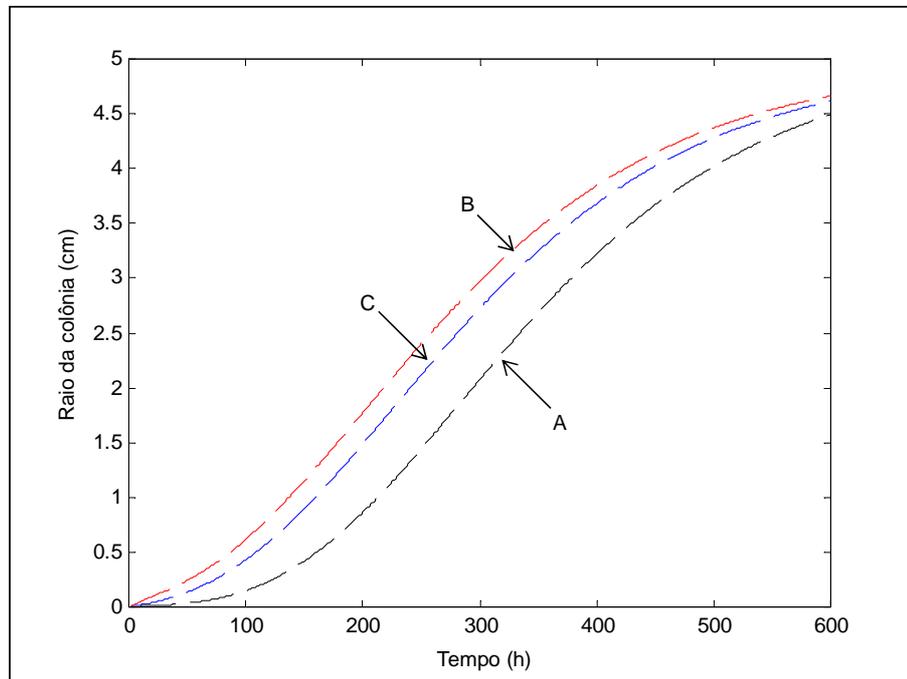
A partir desses resultados, conclui-se que, para avaliar corretamente o comportamento do microrganismo em um alimento, os experimentos devem ser efetuados utilizando o próprio alimento como meio de cultura. Conclusão similar foi apresentada por Baert *et al.* (2007) em seu trabalho. Como foi constatado neste estudo, inferir o crescimento de um fungo em um alimento a partir do que se observa em um meio de cultura artificial, ainda que ele procure reproduzir as características do alimento, pode gerar resultados não confiáveis. Entretanto, essa é uma prática relativamente comum em microbiologia preditiva, haja vista a composição do meio de cultura utilizado na maioria dos trabalhos de integração entre modelos descritos na Seção 2.6. Neste aspecto, este estudo representa um avanço em relação aos trabalhos citados, uma vez que os modelos utilizados no equacionamento integrado foram desenvolvidos para o substrato alimentício real.

#### 8.1.2 Efeito de condições dinâmicas de temperatura

É comum em estudos de microbiologia preditiva assumir que a superfície do alimento atinge instantaneamente a temperatura do meio em que ele se encontra. Esta hipótese foi assumida explicitamente como verdadeira nos trabalhos de Bellara *et al.* (2000) e de Mackey *et al.* (2006). No estudo conduzido por Gougouli e Koutsoumanis (2010), tal hipótese aparece de forma implícita no equacionamento matemático. De fato, quando as condições físicas propiciam altos valores para o coeficiente de transferência de calor convectivo, os fenômenos de transferência de calor entre a superfície do produto e os fluidos de aquecimento/resfriamento podem ser negligenciados. Contudo, os estudos apresentados nos artigos 3 e 4 mostraram que tal hipótese precisa ser avaliada criteriosamente.

Embora seja pequeno o intervalo de tempo necessário para que a superfície do alimento atinja a temperatura do meio de resfriamento, em comparação com o tempo total

de armazenamento do produto, é notável a sua influência no perfil de crescimento de fungos, como mostra a comparação proposta na Figura 8.2.



**Figura 8.2** - Curvas de crescimento de *B. fulva* em condição isotérmica (A) e dinâmica de temperatura, sem considerar o efeito do resfriamento provocado pela evaporação da umidade superficial do produto (B) e inserindo-o na modelagem matemática (C).

Na Figura 8.2, mostra-se o crescimento de *B. fulva* em três situações distintas: (A) quando a temperatura do alimento é mantida constante (14°C) ao longo de todo o processo; (B) quando há abuso na temperatura inicial do produto (28°C) e o resfriamento de sua superfície ocorre apenas por convecção forçada, utilizando ar a 14°C e com velocidade de 0,5 m/s; e (C) quando há abuso na temperatura inicial (28°C) e o resfriamento do alimento é promovido pelos mecanismos convectivo e evaporativo, empregando ar a 14°C, com velocidade de 0,5 m/s e com 50% de umidade relativa. Evidencia-se que, dependendo da situação considerada, o perfil de crescimento do microrganismo sofre alterações significativas, principalmente na fase inicial, condição que está diretamente ligada com a estimativa do tempo de vida útil do alimento.

O estudo proposto no artigo 4 mostrou que, ao negligenciar o efeito evaporativo em situações que propiciam a ocorrência desse fenômeno, há variações significativas principalmente nas predições de temperatura da superfície do material. Em termos do efeito dessa simplificação do modelo sobre o crescimento microbiano, esse trabalho revelou que o

efeito evaporativo torna-se importante quando a temperatura da superfície do produto é elevada e a velocidade do ar da corrente de refrigeração é baixa.

A partir desta análise e das conclusões obtidas nos artigos apresentados nos capítulos anteriores, é possível responder as questões de pesquisa formuladas no Quadro 2.4.

## 8.2 DISCUSSÃO DAS QUESTÕES DE PESQUISA

---

A primeira questão de pesquisa analisada nesta tese foi: “a taxa de crescimento de *B. fulva* em polpa de mamão é maior do que em polpas de melão, tomate, pêssego, abacaxi e morango, devido à sua constituição química, particularmente ao seu pH moderado?” No artigo 1, demonstrou-se que, de fato, o crescimento desse fungo filamentoso é favorecido em polpa de mamão, quando comparado com polpas de pêssego, abacaxi e morango. Contudo, a maior taxa de crescimento foi observada em polpa de melão. O estudo mostrou ainda a existência de correlação moderada entre o pH do meio e a taxa de crescimento do microrganismo.

No artigo 2, constatou-se que essa correlação é válida apenas para a temperatura de 28°C. Em temperaturas maiores ou menores do que essa, as análises estatísticas demonstraram a inexistência de relação significativa entre o pH e esse parâmetro de crescimento. Desta forma, a terceira questão de pesquisa do estudo (“o pH do substrato tem efeito significativo no desenvolvimento de *Byssochlamys fulva* apenas nas condições de temperatura ótima – 36°C – e subótima – 28°C – de crescimento?”) também pôde ser respondida.

Outra questão de pesquisa avaliada neste trabalho foi: “o abuso na temperatura inicial de armazenamento de polpa de mamão contaminada com esporos de *Byssochlamys fulva* pode ser compensado pelas condições de refrigeração a que é submetido o produto, sem comprometer o seu tempo de vida útil?”. O estudo conduzido no artigo 3 mostrou que a resposta para essa questão é negativa. Como pode ser observado na Tabela 6.9, mesmo para um pequeno aumento de temperatura inicial do produto (16°C) e submetendo-o a uma condição que promova a transferência de calor convectiva mais intensa (5 m/s), a redução no tempo de vida útil da polpa de mamão é de 14,3%. Em situações extremas (maior abuso de temperatura inicial, menor capacidade de troca térmica convectiva) esse percentual aumenta para 76%. Portanto, não é plausível afirmar que o abuso de temperatura apresenta interferência mínima no tempo de vida útil do alimento, em tais circunstâncias.

O modelo cinético desenvolvido no artigo 3 revelou que, se a polpa de mamão fosse mantida a 14°C durante todo o período de armazenamento, a taxa de crescimento microbiano e o tempo de duração da fase lag seriam, respectivamente, 3,07 mm/dia e 139 h. Desta forma, estimou-se que o tempo necessário para o surgimento de colônias visíveis neste alimento seria de 103 h. Quando esse valor é comparado àqueles mostrados na Figura 7.6, verifica-se que a sétima questão de pesquisa avaliada nesta tese (“se houver abuso na temperatura inicial de armazenamento da polpa de mamão contaminada com esporos de *Byssochlamys fulva* e o sistema de refrigeração for limitado quanto à transferência de calor por convecção, o tempo de vida útil do produto poderá não ser comprometido, se for considerado o efeito do resfriamento causado pela evaporação da umidade superficial do produto em complementação ao resfriamento estritamente convectivo na superfície do alimento?”) pode ser respondida. Neste caso, se a temperatura inicial do produto for 16°C, a velocidade da corrente do ar do sistema de refrigeração e sua umidade relativa forem, respectivamente, 5 m/s e 50%, então a resposta é positiva. Contudo, essa foi a única condição que gerou um valor de tempo de vida útil do alimento que mais se aproximou do valor observado caso não tivesse havido abuso em sua temperatura inicial.

Em relação às demais questões de pesquisa formuladas no Quadro 2.4, entende-se que elas foram adequadamente respondidas ao longo da discussão feita acima e na Seção 8.1 deste capítulo.

### 8.3 CONCLUSÕES

---

O mamão é uma das principais frutas consumidas pela população brasileira sob a forma *in natura* ou como produto industrializado (polpas, sucos, geleias), devido ao seu sabor levemente adocicado e por suas propriedades terapêuticas. O pH moderado dessa fruta favorece a ação de microrganismos, o que torna esse alimento bastante perecível, principalmente na forma minimamente processada. Neste trabalho, verificou-se que o fungo filamentosso *Byssochlamys fulva* é uma espécie de microrganismo que cresce rapidamente sobre esse substrato, principalmente se o alimento não for mantido refrigerado ou se houver abuso em sua temperatura durante o início do armazenamento.

O equacionamento matemático desenvolvido mostrou que o surgimento de colônias do microrganismo na polpa de mamão ocorre entre 20 e 90 horas após a sua contaminação com esporos, dependendo da temperatura inicial do produto e das condições de armazenamento.

Em síntese, a contribuição desta tese para o estado da arte situa-se no estudo do crescimento de um fungo em condições dinâmicas de temperatura, estabelecidas a partir do equacionamento que descreve os fenômenos de transferência de calor em um alimento durante o seu resfriamento. Embora tal abordagem já tenha sido utilizada no estudo do crescimento de bactérias patogênicas, tal tratamento aplicado ao estudo do comportamento de fungos, e especificamente para *Byssochlamys fulva*, é inédito, dentro do escopo da revisão bibliográfica realizada sobre o tema. Sob o ponto de vista de relevância tecnológica, os modelos propostos permitiram comparar duas estratégias de produção de polpa de mamão minimamente processado e refrigerado (com e sem o efeito evaporativo). Com esse equacionamento foi possível verificar em que situações o resfriamento do alimento fora da embalagem (com efeito evaporativo) proporciona ganhos significativos em termos de tempo de vida útil do produto.

Ainda que em uma abordagem preliminar, a comparação do crescimento desse fungo em diferentes polpas de frutas, para identificar os substratos mais suscetíveis a sua ação deteriorante, é outra contribuição do presente trabalho para a evolução dos estudos de microbiologia dos alimentos. Tal aspecto também tem relevância para o setor industrial, pelo fato de ter-se demonstrado que polpas de melão, tomate e mamão são meios propícios ao crescimento de *Byssochlamys fulva*.

#### 8.4 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

---

Para complementar ou explorar aspectos superficialmente discutidos neste estudo, sugere-se para trabalhos futuros:

- estudar o crescimento de *Byssochlamys fulva* na polpa de mamão em diferentes estágios de maturação, como forma de investigar se isto interfere na dinâmica de aumento de raio da colônia do microrganismo;
- comparar o crescimento de diferentes cepas de *Byssochlamys fulva* sobre um mesmo substrato alimentício, com o objetivo de reproduzir a variabilidade natural existente dentro de uma espécie de microrganismo;
- avaliar o efeito da espessura do produto e da variabilidade de suas propriedades termofísicas sobre a dinâmica de crescimento desse fungo, uma vez que essas variáveis têm efeito direto sobre o perfil de temperatura do alimento; e, por fim,

- 
- avaliar o crescimento desse fungo filamentoso em condições não determinísticas, visando reproduzir a existência de oscilações na temperatura, na velocidade e na umidade relativa da corrente de ar do sistema de refrigeração, para aproximar ainda mais o modelo matemático da realidade constatada em processos industriais.

## REFERÊNCIAS

- AMÉZQUITA, A.; WELLER, C. L.; WANG, L.; THIPPAREDDI, H.; BURSON, D. E. Development of an integrated model for heat transfer and dynamic growth of *Clostridium perfringens* during the cooling of cooked boneless ham. **International Journal of Food Microbiology**, v. 101, p. 123-144, 2005.
- ARAÚJO, D. C.; CORRÊA, L. S.; BOLIANI, A. C. Cultivo do mamoeiro (*Carica papaya* L.) em ambiente protegido: efeitos sobre a produção dos frutos e controle do mosaico. **Cultura Agrônômica**, v. 15, p. 1-13, 2006.
- BAERT, K.; VALERO, A.; DE MEULENAER, B.; SAMAPUNDO, S.; AHMED, M. M.; DEBEVERE, J.; DEVLIEGHERE, F. Modeling the effect of temperature on the growth rate and lag phase of *Penicillium expansum* in apples. **International Journal of Food Microbiology**, v. 118, p. 139-150, 2007.
- BARANYI, J.; ROBERTS, T. A. Mathematics of predictive food microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 26, p. 199-218, 1995.
- BARANYI, J.; ROBINSON, T. P.; KALOTI, A.; MACKEY, B. M. Predicting growth of *Brochothrix thermosphacta* at changing temperature. **International Journal of Food Microbiology**, v. 27, p. 61-75, 1995.
- BATY, F.; DELIGNETTE-MULLER, M.-L. Estimating the bacterial lag time: which model, with precision? **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, p. 261-277, 2004.
- BELLARA, S. R.; FRYER, P. J.; MCFARLANE, C. M.; THOMAS, C. R.; HOCKING, P. M.; MACKEY, B. M. Visualization and modelling of the thermal inactivation of bacteria in a model food. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 3095-3099, 1999.
- BELLARA, S. R.; MCFARLANE, C. M.; THOMAS, C. R.; FRYER, P. J. The growth of *Escherichia coli* in a food simulant during conduction cooling: combining engineering and microbiological modeling. **Chemical Engineering Science**, v. 55, p. 6085-6095, 2000.
- BEN YAGHLENE, H.; LEGUERINEL, I.; HAMDY, M.; MAFART, P. A new predictive dynamic model describing the effect of the ambient temperature and the convective heat transfer coefficient on bacterial growth. **International Journal of Food Microbiology**, v. 133, p. 48-61, 2009.
- BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotechnologia Industrial – Fundamentos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.
- BRASIL, 1981. Ministério da Agricultura. Laboratório de Referência Animal. **Métodos analíticos oficiais para controle de produtos animais e seus ingredientes**. Brasília, v. 2 – Métodos físicos e químicos, 1981.
- Brasiliannfruit. Programa de Promoção das Exportações das Frutas Brasileiras e Derivados. Disponível em: <[http://www.brasiliannfruit.org/Pbr/Informacao\\_Consumer](http://www.brasiliannfruit.org/Pbr/Informacao_Consumer)>. Acesso em: 18/08/2013.
- BRUNO, L. M.; QUEIROZ, A. A. M.; ANDRADE, A. P. C.; VASCONCELOS, N. M.; BORGES, M. F. Avaliação microbiológica de hortaliças e frutas minimamente processadas comercializadas em Fortaleza (CE). **Boletim CEPPA**, v. 23, n. 1, p. 75-84, 2005.

CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Bioestatística – Princípios e Aplicações**. São Paulo: Artmed, 2003.

CDC – CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/features/dsfoodnet2012>>. Acesso em 02/06/2013.

ÇENGEL, Y. **Heat transfer – A practical approach**, São Paulo: McGraw Hill, 1998.

CEPEDA, J. F.; WELLER, C. L.; THIPPAREDDI, H.; NEGAHBAN, M.; SUBBIAH, J. Modeling cooling of ready-to-eat meats by 3D finite element analysis: Validation in meat processing facilities. **Journal of Food Engineering**, v. 116, p. 450-461, 2013.

CHAPMAN, B.; WINLEY, E.; FONG, A. S. W.; HOCKING, A. D.; STEWART, C. M.; BUCKLE, K. A. Ascospore inactivation and germination by high pressure processing is affected by ascospore age. **Innovative Food Science and Emerging Technology**, v. 8, p. 531-534, 2007.

CHENG, K.-C.; DEMIRCI, A.; CATCHMARK, J. M.; PURI, V. M. Modeling of pullulan fermentation by using a color variant strain of *Aureobasidium pullulans*. **Journal of Food Engineering**, v. 98, p. 353-359, 2010.

CHUNTRANULUCK, S.; WELLS, C. M.; CLELAND, A. C. Predicting of chilling times of foods in situations where evaporative cooling is significant – Part 1. Method development. **Journal of Food Engineering**, v. 37, p. 111-125, 1998a.

CHUNTRANULUCK, S.; WELLS, C. M.; CLELAND, A. C. Predicting of chilling times of foods in situations where evaporative cooling is significant – Part 2. Experimental Testing. **Journal of Food Engineering**, v. 37, p. 127-141, 1998b.

CHUNTRANULUCK, S.; WELLS, C. M.; CLELAND, A. C. Predicting of chilling times of foods in situations where evaporative cooling is significant – Part 3. Applications. **Journal of Food Engineering**, v. 37, p. 143-157, 1998c.

CORRADINI, M. G.; PELEG, M. The non-linear kinetics of microbial inactivation and growth in foods. In: BRUL, S.; VAN GERWEN, S.; ZWIETERING, M. **Modelling microorganisms in food**. Boca Raton: CRC Press, p. 129-160, 2007.

CUPPERS, H. G. A. M.; OOMES, S.; BRUL, S. A model for combined effects of temperature and salt concentration on growth rate of food spoilage molds. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3764-3769, 1997.

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

DANTIGNY, P.; MANSUR, C. S.; SAUTOUR, M.; TCHOBANOV, I.; BENSOUSSAN, M. Relationship between spore germination kinetics and lag time during growth of *Mucor racemosus*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, p. 395-398, 2002.

DANTIGNY, P.; NANGUY, S. P. M. Significance of the physiological state of fungal spores. **International Journal of Food Microbiology**, v. 134, p. 16-20, 2009.

DANTIGNY, P.; BENSOUSSAN, M.; VASSEUR, V.; LEBRIHI, A.; BUCHET, C.; ISMAILI-ALAOUI, M.; DEVLIEGHIERE, F.; ROUSSOS, S. Standardisation of methods for assessing mould germination: a workshop report. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 286-291, 2006.

DAVEY, K. R. A predictive model for combined temperature and water activity on microbial growth during the growth phase. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 67, p. 483-488, 1989.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAOSTAT 2011. Disponível em: <<http://www.fao.org/corp/statistics>>. Acesso em: 19/02/2013.

FENG, Y.-L.; LI, W.-Q.; WU, X.-Q.; CHENG, J.-W.; MA, S.-Y. Statistical optimization of media for mycelial growth and exo-polysaccharide production by *Lentinus edodes* and a kinetic model study of two growth morphologies. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, p. 104-112, 2010.

FERREIRA, E. H. R.; MASSON, L. M. P.; ROSENTHAL, A.; SOUZA, M. L.; MASSAGUER, P. R. Termorresistência de fungos filamentosos isolados de néctares de frutas envasados assepticamente. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, p. 164-171, 2011.

FERRUA, M. J.; SINGH, R. P. Modeling the forced-air cooling process of fresh strawberry packages, Part I: Numerical model. **International Journal of Refrigeration**, v. 32, p. 335-348, 2009.

FILTENBORG, O.; FRISVAD, J. C.; THRANE, U. Moulds in food spoilage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, p. 85-102, 1996.

FUJIKAWA, H.; KAI, A.; MOROZUMI, S. A new logistic model for bacterial growth. **Journal of the Food Hygienic Society of Japan**, v. 44, n. 3, p. 155-160, 2003.

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

FUJIKAWA, H. Application of the new logistic model to microbial growth prediction in food. **Biocontrol Science**, v. 16, n. 2, p. 47-54, 2011.

GALATI, S.; GIANNUZZI, L.; GINER, S. A. Modelling the effect of temperature and water activity on the growth of *Aspergillus parasiticus* on irradiated Argentinian flint maize. **Journal of Stored Products Research**, v. 47, p. 1-7, 2011.

GARCIA, D.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V.; MARÍN, S. Predicting mycotoxins in foods: a review. **Food Microbiology**, v. 26, p. 757-769, 2009.

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

GIBSON, A. M.; BARANYI, J. I.; 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.

GIFFEL, M. C.; ZWIETERING, M. H. Validation of predictive models describing the growth of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 46, p. 135-149, 1999.

GIL, M. M.; BRANDÃO, T. R. S.; SILVA, C. L. M. A modified Gompertz model to predict microbial inactivation under time-varying temperature conditions. **Journal of Food Engineering**, v. 76, p. 89-94, 2006.

GOUGOULI, M.; KALANTZI, K.; BELETSIOTIS, E.; KOUTSOUMANIS, K. P. Development and application of predictive models for fungal growth as tools to improve quality control in yogurt production. **Food Microbiology**, v. 28, p. 1453-1462, 2011.

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

GOUGOULI, M.; KOUTSOUMANIS, K. P. Modeling germination of fungal spores at constant and fluctuating temperature conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 152, p. 153-161, 2012.

GRIJSPEERDT, K.; DE REU, K. Practical application of dynamic temperature profiles to estimate the parameters of the square root model. **International Journal of Food Microbiology**, v. 101, p. 83-92, 2005.

HAMIDI-ESFAHANI, Z.; SHOJAOSADATI, S. A.; RINZEMA, A. Modelling of simultaneous effect of moisture and temperature on *A. niger* growth in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 21, p. 265-272, 2004.

HUANG, Y.; BEGUM, M.; CHAPMAN, B.; HOCKING, A. D. Effect of reduced water activity and reduced matric potential on the germination of xerophilic and non-xerophilic fungi. **International Journal of Food Microbiology**, v. 140, p. 1-5, 2010.

HUCHET, V.; PAVAN, S.; LOCHARDET, A.; DIVANAC'H, M. L.; POSTOLLEC, F.; THUAULT, D. Development and application of a predictive model of *Aspergillus candidus* growth as a tool to improve shelf life of bakery products. **Food Microbiology**, v. 36, p. 254-259, 2013.

HUIS INT'T VELD, J. H. J. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, p. 1-18, 1996.

INCROPERA, F. P.; DE WITT, D. P. **Fundamentos de transferência de calor e de massa**, 4ª edição. Rio de Janeiro: LTC, 1998.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**, 6ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2005.

KONDJOYAN, A. A. Review on surface heat and mass transfer coefficients during air chilling and storage of food products. **International Journal of Refrigeration**, v. 29, p. 863-875, 2006.

KOTZEKIDOU, P. Heat resistance of *Byssochlamys nivea*, *Byssochlamys fulva* and *Neosartorya fischeri* isolated from canned tomato paste. **Journal of Food Science**, v. 62, p. 410-437, 1997.

KRISHNA, K. L.; PARIDHAVI, M.; PATEL, J. A. Review on nutritional, medicinal and pharmacological properties of Papaya (*Carica papaya* Linn.). **Natural Product Radiance**, v. 74, p. 364-373, 2008.

KUROZAWA, L. E.; EL-AOUAR, A. A.; SIMÕES, M. R.; AZOUBEL, P. M.; MURR, F. E. X. Determination of thermal conductivity and thermal diffusivity of papaya (*Carica papaya* L.) as a function of temperature. In: **2nd Mercosur Congress on Chemical Engineering – 4th Mercosur Congress on Process Systems Engineering**, Rio de Janeiro, 2005.

LAGUERRE, O.; HOANG, H. M.; FLICK, D. Experimental investigation and modelling in the food cold chain: Thermal and quality evolution. **Trends in Food Science & Technology**, v. 29, p. 87-97, 2013.

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

LEBERT, I.; DUSSAP, C. G.; LEBERT, A. Combined physico-chemical and water transfer modeling to predict bacterial growth during food processes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, p. 305-322, 2005.

LEBERT, I.; LEBERT, A. Quantitative prediction of microbial behavior during food processing using an integrated modeling approach: a review. **International Journal of Refrigeration**, v. 29, p. 968-984, 2006.

LEE, H. B.; MAGAN, N. The influence of environmental factors on growth and interactions between *Embellisia allii* and *Fusarium oxysporum* f. sp. cepae isolated from garlic. **International Journal of Food Microbiology**, v. 138, p. 238-242, 2010.

LEMUS-MONDACA, R. A.; ZAMBRA, C. E.; VEGA-GÁLVEZ, A.; MORAGA, N. O. Coupled 3D heat and mass transfer model for numerical analysis of drying process in papaya slices. **Journal of Food Engineering**, v. 116, p. 109-117, 2013.

LIMA, L. M.; MORAIS, P. L. D.; MEDEIROS, E. V.; MENDONÇA, V.; XAVIER, I. F.; LEITE, G. A. Qualidade pós-colheita do mamão formosa 'Tainung 01' comercializado em diferentes estabelecimentos no município de Mossoró – RN. **Revista Brasileira de Fruticultura Jaboticabal**, v. 31, n. 3, p. 902-906, 2009.

LIU, J.-Z.; WENG, L.-P.; ZHANG, Q.-L.; XU, H.; JI, L.-N. A mathematical model for gluconic acid fermentation by *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 14, p. 137-141, 2003.

LONGHI, D. A.; DALCANTON, F.; ARAGÃO, G. M. F.; CARCIOFI, B. A. M.; LAURINDO, J. B. Assessing the prediction ability of different mathematical models for the growth of *Lactobacillus plantarum* under non-isothermal conditions. **Journal of Theoretical Biology**, v. 335, p. 88-96, 2013.

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.

MACKEY, B. M.; KELLY, A. F.; COLVIN, J. A.; ROBBINS, P. T.; FRYER, P. J. Predicting the thermal inactivation of bacteria in a solid matrix: simulation studies on the relative effects of microbial thermal resistance parameters and process conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 107, p. 295-303, 2006.

MAFART, P. Food engineering and predictive microbiology: on the necessity to combine biological and physical kinetics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 100, p. 239-251, 2005.

MARÍN, S.; CUEVAS, D.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V. Fitting of colony diameter and ergosterol as indicators of foodborne mould growth to know growth models in solid medium. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, p. 139-149, 2008.

- MASSAGUER, P.R. **Microbiologia dos Processos Alimentares**, São Paulo: Varela, 2006.
- MCDONALD, K.; SUN, D. Predictive food microbiology for the meat industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 52, p. 1-27, 1999.
- MCMEEKIN, T. A.; OLLEY, J.; RATKOWSKY, D. A.; ROSS, T. Predictive microbiology: towards the interface and beyond. **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, p. 395-407, 2002.
- MCMEEKIN, T. A.; MELLEFONT, L. A.; ROSS, T. Predictive microbiology: past, present and future. In: BRUL, S.; VAN GERWEN, S.; ZWIETERING, M. **Modelling microorganisms in food**. Boca Raton: CRC Press, p. 7-21, 2007.
- MELLEFONT, L. A.; MCMEEKIN, T. A.; ROSS, T. Performance evaluation of model describing the effects of temperature, water activity, pH and lactic acid concentration on the growth of *Escherichia coli*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, p. 45-58, 2003.
- MEMBRÉ, J.-M.; KUBACZKA, M. Predictive modelling approach applied to spoilage fungi: growth of *Penicillium brevicompactum* on solid media. **Letters in Applied Microbiology**, v. 31, p. 247-250, 2000.
- MONTGOMERY, D. C.; RUNGER, G. C.; HUBELE, N. F. **Estatística Aplicada à Engenharia**, Rio de Janeiro: LTC, 2004.
- MORAGA, N. O.; JAURIAT, L. A.; LEMUS-MONDACA, R. A. Heat and mass transfer in conjugate food freezing/air natural convection. **International Journal of Refrigeration**, v. 35, p. 880-889, 2012.
- MOUSA, W.; GHAZALI, F. M.; JINAP, S.; GHAZALI, H. M.; RADU, S. Modelling the effect of water activity and temperature on growth rate and aflatoxin production by two isolates of *Aspergillus flavus* on paddy. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, p. 1262-1274, 2011.
- NAKASHIMA, S. M. K.; ANDRÉ, C. D.; FRANCO, B. D. G. M. Aspectos básicos da Microbiologia Preditiva. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 3, p. 41-51, 2000.
- PANAGO, E. Z.; CHELONAS, S.; CHATZIPAVLIDIS, I.; NYCHAS, G.E. Modelling the effect of temperature and water activity on the growth rate and growth/no growth interface of *Byssoschlamys fulva* and *Byssoschlamys nivea*. **Food Microbiology**, v. 27, p. 618-627, 2010.
- PANAGO, E. Z.; KODOGIANNIS, V.; NICHANS, G. J. Modelling fungal growth using radial basis function neural networks: the case of the ascomycetous fungus *Monascus ruber* van Tieghem. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, p. 276-286, 2007.
- PANAGO, E. Z.; SKANDAMIS, P. N.; NYCHAS, G. J. E. Modelling the combined effect of temperature, pH and Aw on the growth rate of *Monascus ruber*, a heat-resistant fungus isolated from green table olives. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 146-156, 2003.
- PARDO, E.; MARÍN, S.; SOLSONA, A.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J. Modeling of germination and growth of ochratoxigenic isolates of *Aspergillus ochraceus* as affected by water activity and temperature on a barley-based medium. **Food Microbiology**, v. 21, p. 267-274, 2004.
- PARRA, R.; MAGAN, N. Modelling the effect of temperature and water activity on growth of *Aspergillus niger* strains and applications for food spoilage moulds. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 429-438, 2004.

PATRIARCA, A.; VAAMOND, G.; PINTO, V. F.; COMERIO, R. Influence of water activity and temperature on growth of *Wallemia sebi*: application of a predictive model. **International Journal of Food Microbiology**, v. 68, p. 61-67, 2001.

PLAZL, I.; LAKNER, M.; KOLOINI, T. Modeling of temperature distributions in canned tomato based dip during industrial pasteurization. **Journal of Food Engineering**, v. 75, p. 400-406, 2006.

POSE, G.; PATRIARCA, A.; KYANKO, V.; PARDO, A.; PINTO, V. F. Effect of water activity and temperature on growth of *Alternaria alternata* on a synthetic tomato medium. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, p. 60-63, 2009.

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

ROCHA, R. H. C.; NASCIMENTO, S. R. C.; MENEZES, J. B.; NUNES, G. H. S.; SILVA, E. O. Qualidade pós-colheita do mamão formosa armazenado sob refrigeração. **Revista Brasileira de Fruticultura Jaboticabal**, v. 27, n. 3, p. 386-389, 2005.

RODOLFO JÚNIOR, F.; TORRES, L. B. V.; CAMPOS, V. B.; LIMA, A. R.; OLIVEIRA, A. D.; MOTA, J. K. M. Caracterização físico-química de frutos de mamoeiro comercializados na empresa de Campina Grande – PB. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 9, n. 1, p. 53-58, 2007.

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

ROSSO, L.; LOBRY, J. R.; BAJARD, S.; FLANDROIS, J. P. Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 610-616, 1995.

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

SANT'ANA, A. S.; DANTIGNY, P.; TAHARA, A. C.; ROSENTHAL, A.; MASSAGUER, P. R. Use of a logistic model to assess spoilage by *Byssoschlamys fulva* in clarified apple juice. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, p. 299-302, 2010a.

SANT'ANA, A. S.; SIMAS, R. C.; ALMEIDA, C. A. A.; CABRAL, E. C.; RAUBER, R. H.; MALLMANN, C. A.; EBERLIN, M. N.; ROSENTHAL, A.; MASSAGUER, P. R. Influence of package, type of apple juice and temperature on the production of patulin by *Byssoschlamys nivea* and *Byssoschlamys fulva*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 142, p. 156-163, 2010b.

SANTANA, L. R. R.; MATSUURA, F. C. A. U.; CARDOSO, R. L. Genótipos melhorados de mamão (*Carica papaya* L.): avaliação tecnológica dos frutos na forma de sorvete. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 23 (Supl), p. 151-155, 2003.

SHINAGAWA, F. B. **Avaliação das características bioquímicas da polpa de mamão (*Carica papaya* L.) processada por alta pressão hidrostática**. 2009. 125f. Dissertação (Mestrado em Química) -- Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, 2009.

- SILVA, F. V. M.; SILVA, C. L. M. Quality optimization of hot filled pasteurized fruit purees: container characteristics and filling temperatures. **Journal of Food Engineering**, v. 32, p. 351-364, 1997.
- SILVA, A. R.; SANT'ANA, A. S.; MASSAGUER, P. R. Modelling the lag time and growth rate of *Aspergillus* section *Nigri* IOC 4573 in mango nectar as a function of temperature and pH. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, p. 1105-1116, 2010.
- SILVA, P. R. S.; MANN, M. B.; MARCZAK, L. D. F.; TESSARO, I. C.; VAND DER SAND, S. T. Avaliação da velocidade de crescimento radial e do tempo de duração da fase lag de *Byssoschlamys fulva* em polpas de frutas. In: X Oktoberforum – PPGEQ, Porto Alegre, 2011.
- SILVA, P. R. S.; TESSARO, I. C.; MARCZAK, L. D. F. Integrating a kinetic microbial model with a heat transfer model to predict *Byssoschlamys fulva* growth in refrigerated papaya pulp. **Journal of Food Engineering**, v. 118, p. 279-288, 2013.
- SIMPSON, R. J.; ALMONACID, S. F.; ACEVEDO, C. A.; CORTÉS, C. A. Simultaneous heat and mass transfer applied to non-respiring foods packed in modified atmosphere. **Journal of Food Engineering**, v. 61, p. 279-286, 2004.
- SOUZA, B. S.; DURIGAN, J. F.; DONADON, J. R.; LIMA, M. A. Qualidade e comportamento fisiológico do mamão “formosa” minimamente processado. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 3, p. 243-247, 2005.
- SPOTO, M. H. F.; GUTIERREZ, A. S. D. Qualidade pós-colheita de frutas e hortaliças. In: OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. F. **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Barueri: Manole, p. 403-452, 2006.
- TANIWAKI, M. H.; HOCKING, A. D.; PITT, J. I.; FLEET, G. H. Growth and mycotoxin production by food spoilage fungi under high carbon dioxide and low oxygen atmospheres. **International Journal of Food Microbiology**, v. 132, p. 100-108, 2009.
- TANIWAKI, M. H.; HOCKING, A. D., PITT, J. I.; FLEET, G. H. Growth and mycotoxin production by fungi in atmospheres containing 80% carbon dioxide and 20% oxygen. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, p. 218-225, 2010.
- TANNER, D. J.; CLELAND, A. C.; OPARA, L. U. A generalized mathematical modeling methodology for the design of horticultural food packages exposed to refrigerated conditions. Part 2. Heat transfer modeling and testing. **International Journal of Refrigeration**, v. 25, p. 43-53, 2002.
- TASSOU, C. C.; PANAGOU, E. Z.; NATSKOULIS, P.; MAGAN, N. Modelling the effect of temperature and water activity on the growth of two ochratoxigenic strains of *Aspergillus carbonarius* from Greek wine grapes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 2267-2276, 2007.
- TOURNAS, V. Heat resistant fungi of importance to the food and beverage industry. **Critical Review in Microbiology**, v. 20, p. 243-263, 1994.
- VALDRAMIDIS, V. P.; GEERAERD, A. H.; GAZE, J. E.; KONDOYAN, A.; BOYD, A. R.; SHAW, H. L.; VAN IMPE, J. F. Quantitative description of *Listeria monocytogenes* inactivation kinetics with temperature and water activity as the influencing factors; model prediction and methodological validation on dynamic data. **Journal of Food Engineering**, v. 76, p. 79-88, 2006.

- VALÍK, L.; BARANYI, J.; GÖRNER, F. Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Penicillium roqueforti*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 47, p. 141-146, 1999.
- VALÍK, L.; PIECKOVÁ, E. Growth modelling of heat-resistant fungi: the effect of water activity. **International Journal of Food Microbiology**, v. 63, p. 11-17, 2001.
- VAN BOEKEL, M. A. J. S.; ZWIETERING, M. H. Experimental design, data processing and model fitting in predictive microbiology. In: BRUL, S.; VAN GERWEN, S.; ZWIETERING, M. **Modelling microorganisms in food**, Boca Raton: CRC Press, p. 23-43, 2007.
- VAN DE LAGEMAAT, J.; PYLE, D. L. Modeling the uptake and growth kinetics of *Penicillium glabrum* in a tannic acid containing solid state fermentation for tannase production. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1773-1782, 2005.
- VAN IMPE, J. F.; POSCHET, F.; GEERAERD, A. H.; VEREecken, K. M. Towards a novel class of predictive microbial growth models. **International Journal of Food Microbiology**, v. 100, p. 97-105, 2005.
- VAN IMPE, J. F.; NICOLAI, B. M.; MARTENS, T.; BAERDEMAEKER, J. D.; VANDEWALLE, J. Dynamic mathematical model to predict microbial growth and inactivation during food processing. **Applied Environmental Microbiology**, v. 58, p. 2901-2909, 1992.
- WANG, L.; SUN, D. W. Recent developments in numerical modeling of heating and cooling processes in the food industry – a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 14, p. 408-423, 2003.
- WELKE, J. E.; HOELTZ, M.; DOTTORI, H. A.; NOLL, I. B. Ocorrência de fungos termorresistentes em suco de maçã. **Brazilian Journal of Food Technology**, IISSA, p. 78-83, 2009.
- WELTI-CHANES, J.; VERGARA-BALDERAS, F.; BERMÚDEZ-AGUIRRE, D. Transport phenomena in food engineering: basic concepts and advances. **Journal of Food Engineering**, v. 67, p. 113-128, 2005.
- WHITING, R. C.; BUCHANAN, R. L. A classification of models in predictive microbiology – a reply to K. R. Davey. **Food Microbiology**, v. 10, p. 175-177, 1993.
- ZIMMERMANN, M.; MIORELLI, S.; MASSAGUER, P. R.; ARAGÃO, G. M. F. Modeling the influence of water activity and ascospore age on the growth of *Neosartorya fischeri* in pineapple juice. **LWT – Food Science & Technology**, v. 44, p. 239-243, 2011.
- ZWIETERING, M. H.; DE KOOS, J. T.; HASENACK, B. E.; DE WIT, J. C.; VAN'T RIET, K. Modeling bacterial growth as a function of temperature. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 1094-1101, 1991.
- ZWIETERING, M. H.; JONGENBURGER, I.; ROMBOUTS, F. M.; VAN'T RIET, K. Modelling of the bacterial growth curve. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 1875-1881, 1990.

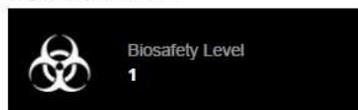
## ANEXO A

INFORMAÇÕES SOBRE A CEPA DE *BYSSOCHLAMYS FULVA* UTILIZADA NO ESTUDO

Product Sheet

***Byssochlamys fulva* Olliver  
et Smith, teleomorph  
(ATCC® 10099™)**

Please read this FIRST

**Intended Use**

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

**Citation of Strain**

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Byssochlamys fulva* Olliver et Smith, teleomorph (ATCC® 10099™)

American Type Culture Collection  
PO Box 1549  
Manassas, VA 20108 USA  
[www.atcc.org](http://www.atcc.org)

800.638.6597 or 703.365.2700  
Fax: 703.365.2750  
Email: [Tech@atcc.org](mailto:Tech@atcc.org)

Or contact your local distributor

Page 1 of 2

**Description**

**Strain Designation:** USDA BPI (as C. Thom 5367.6a) [CBS 146.48, IMI 40021, LSHB BB134, LSHB Pa24, NRRL 1125]

**Product Description:**

An ampoule containing viable cells (may include spores and mycelia) suspended in cryoprotectant.

**Propagation**

The information recommended in this section is to assist users in obtaining living culture(s) for their studies. The recommendation does not imply that the conditions or procedures provided below are optimum. Experienced researchers may initiate the growth of a culture in their own way.

ATCC® Medium 312: Czapek's agar

**Growth Conditions**

**Temperature:** 24.0°C

**Notes**

No special notes.

Additional, updated information on this product may be available on the ATCC web site at [www.atcc.org](http://www.atcc.org).

**DNA Sequence**

No DNA sequencing was performed in house on this product.

**Isolation**

bottled fruit, England

**References**

References and other information relating to this product are available online at [www.atcc.org](http://www.atcc.org).

**Biosafety Level: 1**

Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* from the U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.

**ATCC Warranty**

The viability of ATCC® products is warranted for 30 days from the date of shipment, and is valid only if the product is stored and cultured according to the information included on this product information sheet. ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this strain. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this strain. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.

**Disclaimers**

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans.

While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate.

This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to insure authenticity and reliability of strains on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of cultures.



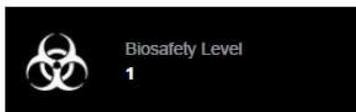
Product Sheet

***Byssochlamys fulva* Olliver  
et Smith, teleomorph  
(ATCC® 10099™)**

Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is also available on our Web site at [www.atcc.org](http://www.atcc.org)

Additional information on this culture is available on the ATCC web site at [www.atcc.org](http://www.atcc.org).  
© ATCC 2013. All rights reserved. ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection. [02/03]

Please read this **FIRST**



**Intended Use**

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

**Citation of Strain**

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Byssochlamys fulva* Olliver et Smith, teleomorph (ATCC® 10099™)

American Type Culture Collection  
PO Box 1549  
Manassas, VA 20108 USA  
[www.atcc.org](http://www.atcc.org)

800.638.6597 or 703.365.2700  
Fax: 703.365.2750  
Email: [Tech@atcc.org](mailto:Tech@atcc.org)

Or contact your local distributor

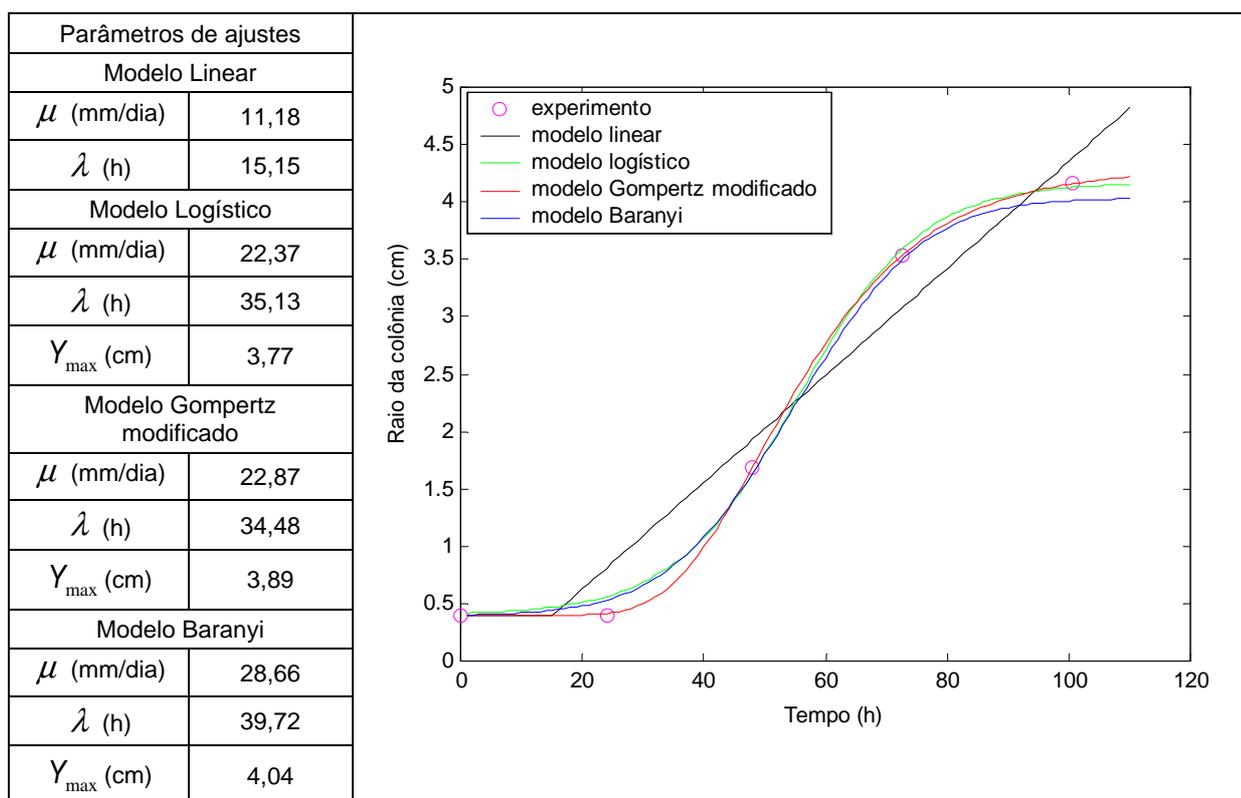
Page 2 of 2

## APÊNDICE A

## INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES AO ARTIGO 1

A.1 Medidas de raio da colônia de *B. fulva* em função do tempo, obtidas experimentalmente durante o crescimento do fungo em polpa de melão, curvas de ajuste dos modelos preditivos primários aos dados experimentais e valores de seus respectivos parâmetros de ajuste.

Amostra 1					
Tempo (h)	Raio experimental (cm)	Raio predito pelo modelo primário (cm)			
		LIN	LOG	GOM	BAR
0	0,40	0,40	0,42	0,40	0,40
24	0,40	0,81	0,56	0,42	0,53
48	1,69	1,93	1,63	1,69	1,63
72,5	3,53	3,07	3,58	3,53	3,49
100,5	4,16	4,37	4,13	4,16	4,01



Para as amostras 2 e 3, não são apresentados os gráficos com as curvas de ajuste dos modelos preditivos primários, pois eles são semelhantes ao obtido para a amostra 1.

Amostra 2					
Tempo (h)	Raio experimental (cm)	Raio predito pelo modelo primário (cm)			
		LIN	LOG	GOM	BAR
0	0,40	0,40	0,41	0,40	0,40
24	0,40	1,05	0,56	0,43	0,55
48	1,76	1,98	1,70	1,76	1,71
72,5	3,33	2,92	3,41	3,33	3,43
100,5	3,81	4,00	3,75	3,81	3,83

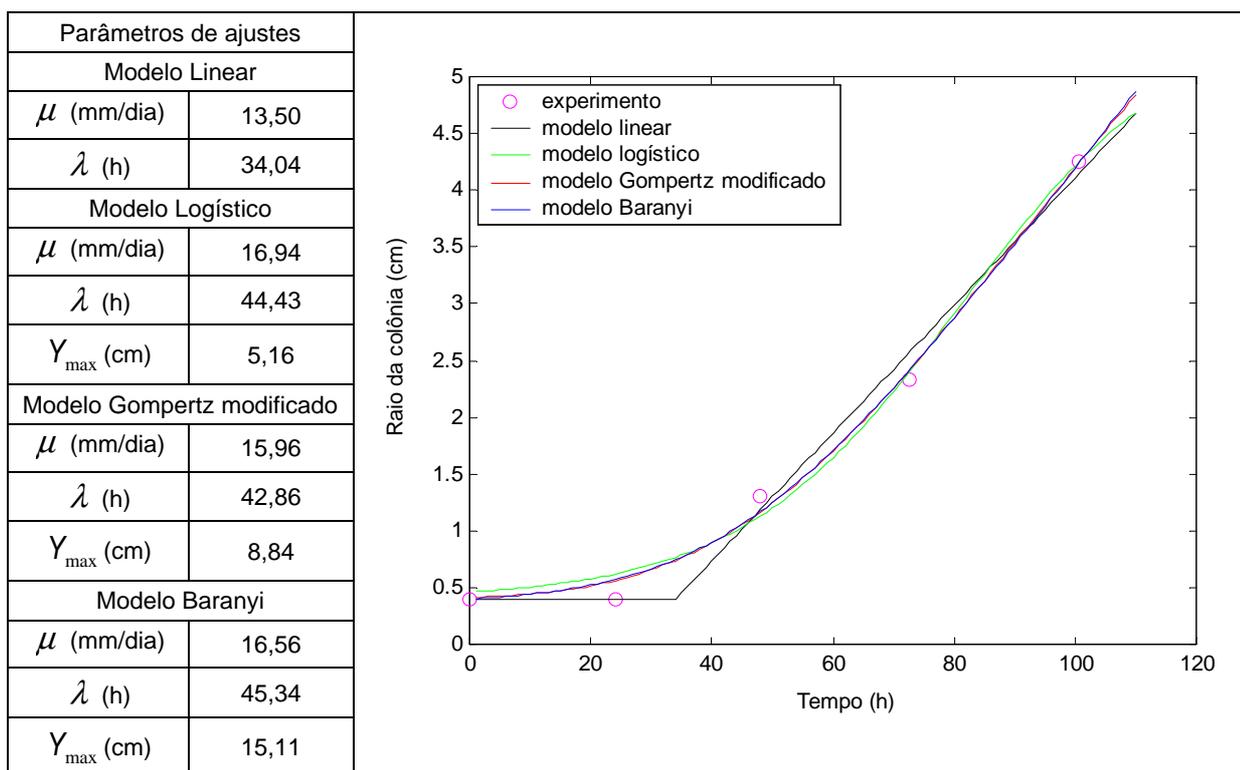
Parâmetros de ajuste do modelo	Modelos preditivos primários			
	Linear	Logístico	Gompertz modificado	Baranyi
$\mu$ (mm/dia)	9,25	21,38	21,22	28,68
$\lambda$ (h)	7,06	33,53	32,63	38,64
$Y_{\max}$ (cm)	-	3,37	3,50	3,85

Amostra 3					
Tempo (h)	Raio experimental (cm)	Raio predito pelo modelo primário (cm)			
		LIN	LOG	GOM	BAR
0	0,40	0,40	0,41	0,40	0,40
24	0,40	1,13	0,54	0,42	0,54
48	1,80	2,03	1,75	1,80	1,76
72,5	3,38	2,94	3,46	3,38	3,49
100,5	3,79	3,99	3,73	3,79	3,82

Parâmetros de ajuste do modelo	Modelos preditivos primários			
	Linear	Logístico	Gompertz modificado	Baranyi
$\mu$ (mm/dia)	8,95	22,72	22,73	30,31
$\lambda$ (h)	4,31	33,79	33,23	38,51
$Y_{\max}$ (cm)	-	3,34	3,45	3,83

A.2 Medidas de raio da colônia de *B. fulva* em função do tempo, obtidas experimentalmente durante o crescimento do fungo em polpa de mamão, curvas de ajuste dos modelos preditivos primários aos dados experimentais e valores de seus respectivos parâmetros de ajuste.

Amostra 1					
Tempo (h)	Raio experimental (cm)	Raio predito pelo modelo primário (cm)			
		LIN	LOG	GOM	BAR
0	0,40	0,40	0,46	0,41	0,40
24	0,40	0,40	0,62	0,56	0,57
48	1,31	1,19	1,13	1,17	1,17
72,5	2,33	2,56	2,39	2,41	2,41
100,5	4,25	4,14	4,24	4,23	4,23



Para as amostras 2 e 3, não são apresentados os gráficos com as curvas de ajuste dos modelos preditivos primários, pois eles são semelhantes ao obtido para a amostra 1.

Amostra 2					
Tempo (h)	Raio experimental (cm)	Raio predito pelo modelo primário (cm)			
		LIN	LOG	GOM	BAR
0	0,40	0,40	0,44	0,40	0,40
24	0,40	1,13	0,61	0,52	0,65
48	1,38	2,03	1,25	1,30	1,36
72,5	2,73	2,94	2,79	2,77	2,60
100,5	4,25	3,99	4,24	4,23	4,32

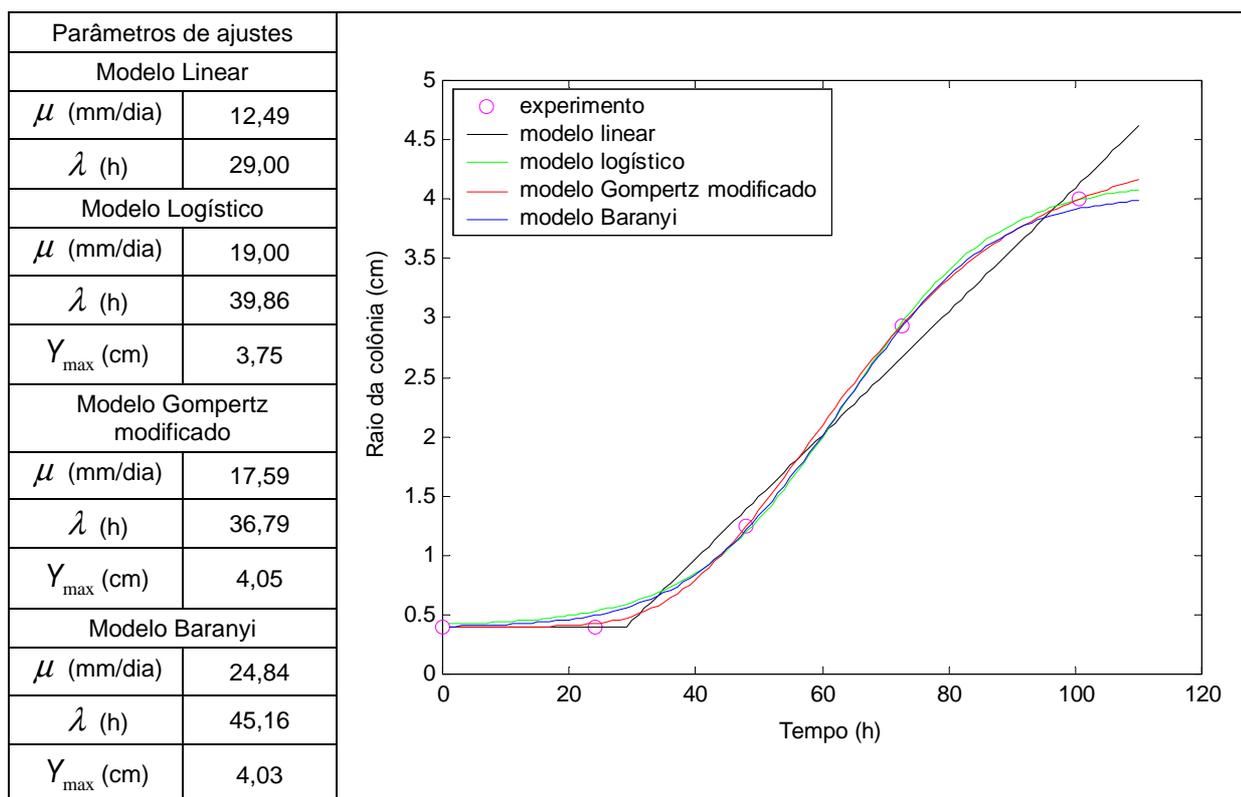
Parâmetros de ajuste do modelo	Modelos preditivos primários			
	Linear	Logístico	Gompertz modificado	Baranyi
$\mu$ (mm/dia)	13,14	17,17	15,10	15,48
$\lambda$ (h)	30,14	39,15	34,70	40,00
$Y_{\max}$ (cm)	-	4,33	5,33	14,10

Amostra 3					
Tempo (h)	Raio experimental (cm)	Raio predito pelo modelo primário (cm)			
		LIN	LOG	GOM	BAR
0	0,40	0,40	0,45	0,40	0,4
24	0,40	1,13	0,61	0,53	0,6
48	1,34	2,03	1,20	1,25	1,3
72,5	2,59	2,94	2,65	2,64	2,5
100,5	4,25	3,99	4,24	4,23	4,3

Parâmetros de ajuste do modelo	Modelos preditivos primários			
	Linear	Logístico	Gompertz modificado	Baranyi
$\mu$ (mm/dia)	13,34	16,92	14,88	15,89
$\lambda$ (h)	31,83	40,65	36,35	42,02
$Y_{\max}$ (cm)	-	4,51	6,02	12,91

A.3 Medidas de raio da colônia de *B. fulva* em função do tempo, obtidas experimentalmente durante o crescimento do fungo em polpa de tomate, curvas de ajuste dos modelos preditivos primários aos dados experimentais e valores de seus respectivos parâmetros de ajuste.

Amostra 1					
Tempo (h)	Raio experimental (cm)	Raio predito pelo modelo primário (cm)			
		LIN	LOG	GOM	BAR
0	0,40	0,40	0,42	0,40	0,40
24	0,40	0,40	0,53	0,42	0,49
48	1,25	1,39	1,19	1,25	1,21
72,5	2,93	2,66	2,95	2,93	2,92
100,5	4,00	4,12	3,99	4,00	3,92



Para as amostras 2 e 3, não são apresentados os gráficos com as curvas de ajuste dos modelos preditivos primários, pois eles são semelhantes ao obtido para a amostra 1.

Amostra 2					
Tempo (h)	Raio experimental (cm)	Raio predito pelo modelo primário (cm)			
		LIN	LOG	GOM	BAR
0	0,40	0,40	0,44	0,40	0,4
24	0,40	0,62	0,62	0,49	0,6
48	1,66	1,79	1,53	1,62	1,6
72,5	3,24	2,99	3,32	3,28	3,2
100,5	4,25	4,36	4,22	4,23	4,0

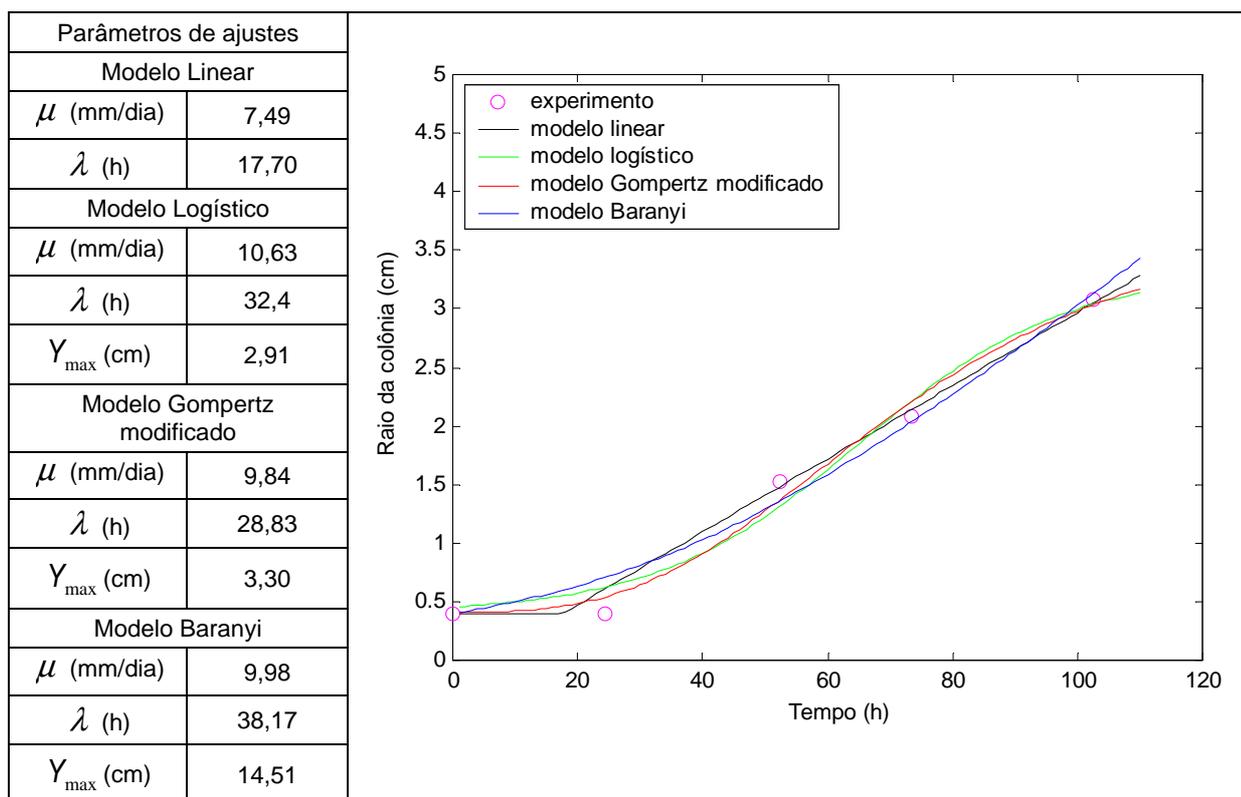
Parâmetros de ajuste do modelo	Modelos preditivos primários			
	Linear	Logístico	Gompertz modificado	Baranyi
$\mu$ (mm/dia)	11,75	18,84	17,83	23,42
$\lambda$ (h)	19,56	34,30	31,64	39,13
$Y_{\max}$ (cm)	-	3,97	4,25	4,13

Amostra 3					
Tempo (h)	Raio experimental (cm)	Raio predito pelo modelo primário (cm)			
		LIN	LOG	GOM	BAR
0	0,40	0,40	0,43	0,40	0,4
24	0,40	0,40	0,60	0,47	0,6
48	1,50	1,62	1,39	1,47	1,4
72,5	3,11	2,89	3,16	3,14	3,1
100,5	4,25	4,35	4,23	4,24	4,0

Parâmetros de ajuste do modelo	Modelos preditivos primários			
	Linear	Logístico	Gompertz modificado	Baranyi
$\mu$ (mm/dia)	12,50	18,71	17,30	23,11
$\lambda$ (h)	24,64	36,60	33,35	41,24
$Y_{\max}$ (cm)	-	4,03	4,41	4,15

A.4 Medidas de raio da colônia de *B. fulva* em função do tempo, obtidas experimentalmente durante o crescimento do fungo em polpa de abacaxi, curvas de ajuste dos modelos preditivos primários aos dados experimentais e valores de seus respectivos parâmetros de ajuste.

Amostra 1					
Tempo (h)	Raio experimental (cm)	Raio predito pelo modelo primário (cm)			
		LIN	LOG	GOM	BAR
0	0,4	0,40	0,45	0,40	0,40
24,5	0,4	0,61	0,62	0,54	0,71
52,5	1,525	1,49	1,32	1,37	1,36
73,5	2,075	2,14	2,21	2,21	2,04
102,5	3,075	3,05	3,04	3,03	3,13



Para as amostras 2 e 3, não são apresentados os gráficos com as curvas de ajuste dos modelos preditivos primários, pois eles são semelhantes ao obtido para a amostra 1.

Amostra 2					
Tempo (h)	Raio experimental (cm)	Raio predito pelo modelo primário (cm)			
		LIN	LOG	GOM	BAR
0	0,4	0,40	0,46	0,40	0,4
24,5	0,4	0,62	0,64	0,56	0,7
52,5	1,575	1,52	1,34	1,39	1,4
73,5	2,0875	2,19	2,24	2,24	2,1
102,5	3,1625	3,12	3,12	3,12	3,2

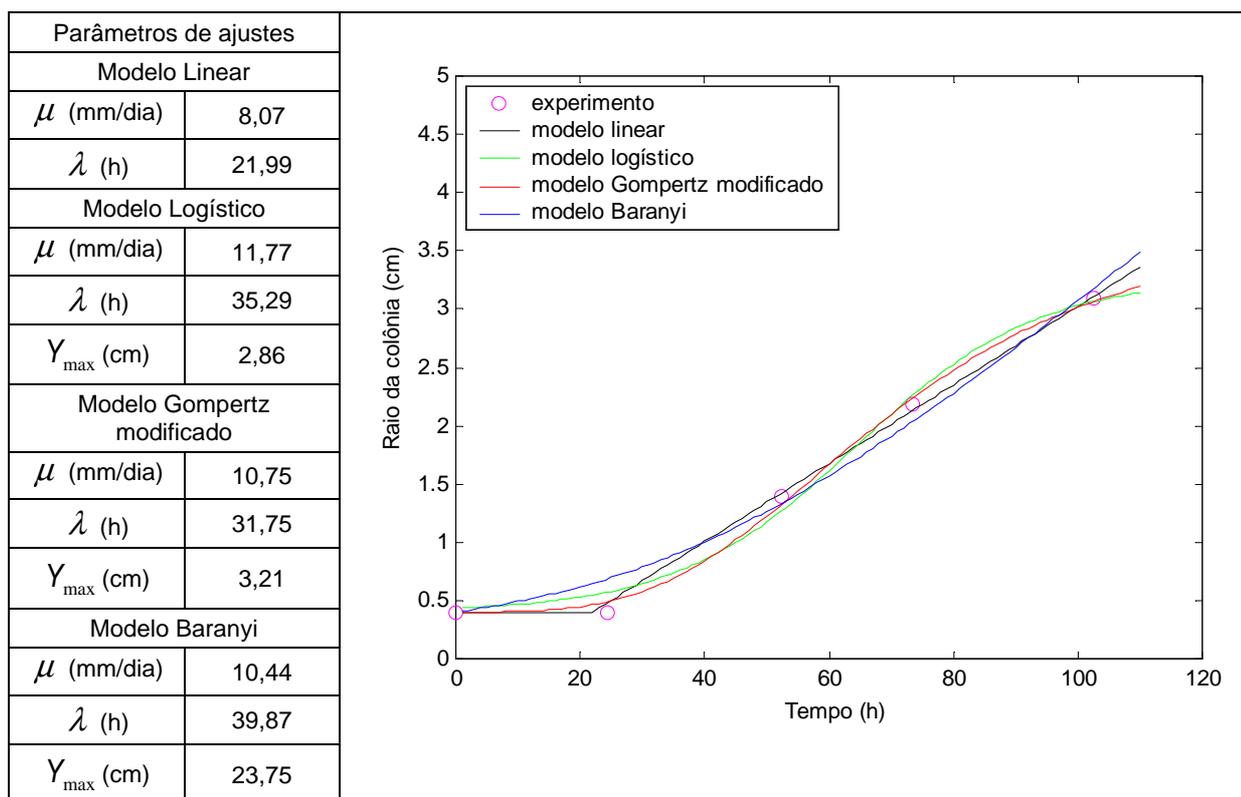
Parâmetros de ajuste do modelo	Modelos preditivos primários			
	Linear	Logístico	Gompertz modificado	Baranyi
$\mu$ (mm/dia)	7,70	10,71	9,91	10,22
$\lambda$ (h)	17,71	32,25	28,49	37,81
$Y_{\max}$ (cm)	-	3,05	3,50	16,60

Amostra 3					
Tempo (h)	Raio experimental (cm)	Raio predito pelo modelo primário (cm)			
		LIN	LOG	GOM	BAR
0	0,4	0,40	0,46	0,40	0,4
24,5	0,4	0,66	0,64	0,55	0,7
52,5	1,6	1,56	1,37	1,43	1,4
73,5	2,15	2,23	2,30	2,30	2,1
102,5	3,1875	3,16	3,14	3,14	3,2

Parâmetros de ajuste do modelo	Modelos preditivos primários			
	Linear	Logístico	Gompertz modificado	Baranyi
$\mu$ (mm/dia)	7,68	11,01	10,23	10,18
$\lambda$ (h)	16,40	31,86	28,38	36,55
$Y_{\max}$ (cm)	-	3,02	3,41	13,54

A.5 Medidas de raio da colônia de *B. fulva* em função do tempo, obtidas experimentalmente durante o crescimento do fungo em polpa de morango, curvas de ajuste dos modelos preditivos primários aos dados experimentais e valores de seus respectivos parâmetros de ajuste.

Amostra 1					
Tempo (h)	Raio experimental (cm)	Raio predito pelo modelo primário (cm)			
		LIN	LOG	GOM	BAR
0	0,40	0,40	0,43	0,40	0,40
24,5	0,40	0,48	0,57	0,49	0,69
52,5	1,40	1,43	1,27	1,33	1,34
73,5	2,18	2,13	2,26	2,24	2,04
102,5	3,09	3,11	3,06	3,07	3,18



Para as amostras 2 e 3, não são apresentados os gráficos com as curvas de ajuste dos modelos preditivos primários, pois eles são semelhantes ao obtido para a amostra 1.

Amostra 2					
Tempo (h)	Raio experimental (cm)	Raio predito pelo modelo primário			
		LIN	LOG	GOM	BAR
0	0,40	0,40	0,44	0,40	0,4
24,5	0,40	0,41	0,58	0,50	0,7
52,5	1,39	1,40	1,26	1,31	1,3
73,5	2,16	2,14	2,24	2,22	2,0
102,5	3,16	3,17	3,14	3,14	3,2

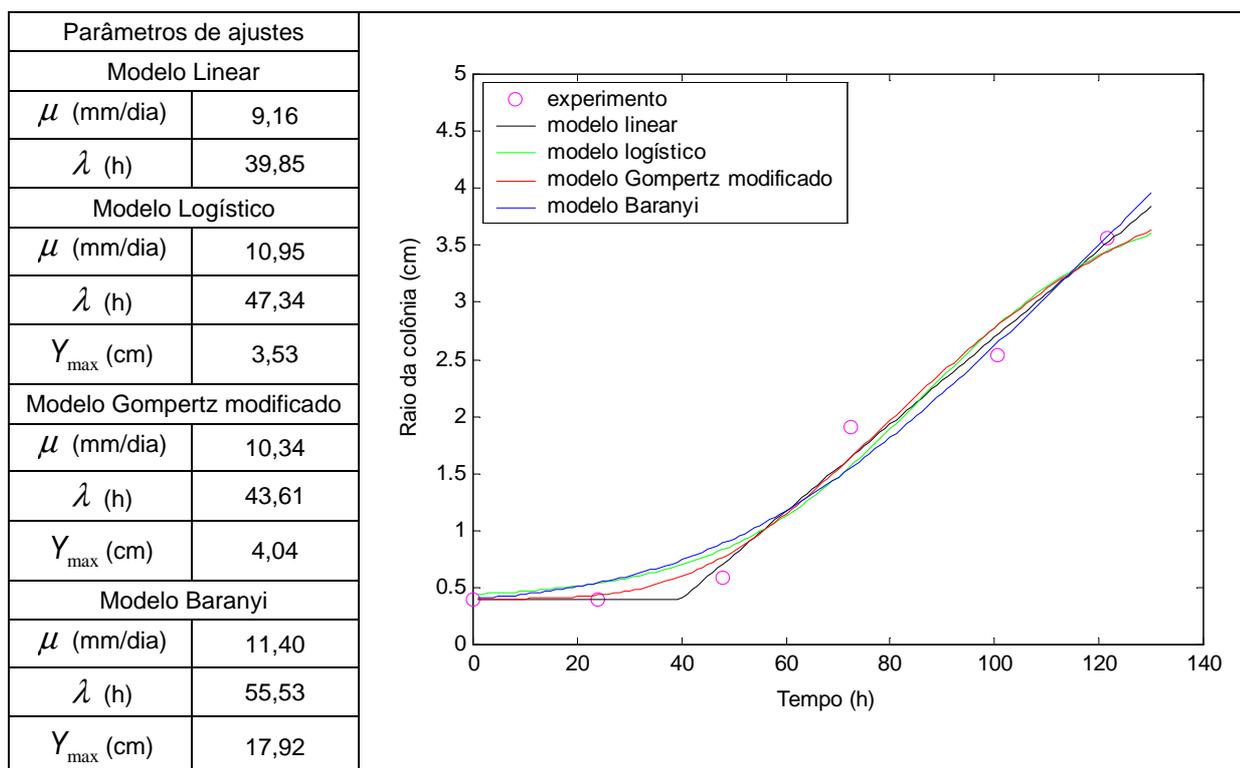
Parâmetros de ajuste do modelo	Modelos preditivos primários			
	Linear	Logístico	Gompertz modificado	Baranyi
$\mu$ (mm/dia)	8,51	11,82	10,70	10,90
$\lambda$ (h)	24,31	36,00	32,21	41,18
$Y_{\max}$ (cm)	-	2,99	3,44	22,52

Amostra 3					
Tempo (h)	Raio experimental (cm)	Raio predito pelo modelo primário			
		LIN	LOG	GOM	BAR
0	0,40	0,40	0,43	0,40	0,4
24,5	0,40	0,69	0,56	0,46	0,6
52,5	1,50	1,58	1,40	1,46	1,5
73,5	2,38	2,24	2,46	2,42	2,6
102,5	3,10	3,16	3,07	3,08	3,4

Parâmetros de ajuste do modelo	Modelos preditivos primários			
	Linear	Logístico	Gompertz modificado	Baranyi
$\mu$ (mm/dia)	7,58	13,00	12,31	20,50
$\lambda$ (h)	15,19	34,27	31,81	43,52
$Y_{\max}$ (cm)	-	2,76	2,96	3,54

A.6 Medidas de raio da colônia de *B. fulva* em função do tempo, obtidas experimentalmente durante o crescimento do fungo em polpa de pêssego, curvas de ajuste dos modelos preditivos primários aos dados experimentais e valores de seus respectivos parâmetros de ajuste.

Amostra 1					
Tempo (h)	Raio experimental (cm)	Raio predito pelo modelo primário			
		LIN	LOG	GOM	BAR
0	0,40	0,40	0,44	0,40	0,40
24	0,40	0,40	0,54	0,43	0,54
48	0,59	0,71	0,83	0,77	0,89
72,5	1,91	1,65	1,57	1,65	1,55
100,5	2,53	2,71	2,80	2,80	2,64
121,5	3,56	3,52	3,44	3,44	3,57



Para as amostras 2 e 3, não são apresentados os gráficos com as curvas de ajuste dos modelos preditivos primários, pois eles são semelhantes ao obtido para a amostra 1.

Amostra 2					
Tempo (h)	Raio experimental (cm)	Raio predito pelo modelo primário			
		LIN	LOG	GOM	BAR
0	0,40	0,40	0,44	0,40	0,4
24	0,40	0,40	0,52	0,44	0,5
48	0,53	0,56	0,74	0,68	0,8
72,5	1,58	1,46	1,28	1,35	1,4
100,5	2,26	2,49	2,44	2,50	2,4
121,5	3,49	3,26	3,41	3,35	3,2
150,5	4,25	4,32	4,26	4,27	4,4

Parâmetros de ajuste do modelo	Modelos preditivos primários			
	Linear	Logístico	Gompertz modificado	Baranyi
$\mu$ (mm/dia)	8,80	11,64	10,27	10,54
$\lambda$ (h)	43,53	58,40	51,48	59,05
$Y_{\max}$ (cm)	-	4,31	5,24	16,21

Amostra 3					
Tempo (h)	Raio experimental (cm)	Raio predito pelo modelo primário			
		LIN	LOG	GOM	BAR
0	0,40	0,40	0,43	0,40	0,4
24	0,40	0,40	0,50	0,41	0,6
48	0,50	0,64	0,73	0,63	0,9
72,5	1,58	1,55	1,38	1,46	1,5
100,5	2,70	2,59	2,74	2,78	2,5
121,5	3,58	3,38	3,64	3,57	3,3
150,5	4,25	4,46	4,20	4,23	4,5

Parâmetros de ajuste do modelo	Modelos preditivos primários			
	Linear	Logístico	Gompertz modificado	Baranyi
$\mu$ (mm/dia)	8,95	12,59	11,64	10,25
$\lambda$ (h)	41,69	55,83	50,93	54,23
$Y_{\max}$ (cm)	-	4,00	4,40	15,91

## APÊNDICE B

## INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES AO ARTIGO 2

B.1. Dados de raio da colônia de *B. fulva* (em cm) em função do tempo (em horas) obtidos experimentalmente, durante seu crescimento em meio de cultura artificial

Tempo (h)	T = 20°C – pH = 4			T = 20°C – pH = 4			T = 20°C – pH = 4		
	0% glicose			5% glicose			10% glicose		
	Amostra 01	Amostra 02	Amostra 03	Amostra 01	Amostra 02	Amostra 03	Amostra 01	Amostra 02	Amostra 03
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16,00	0,24	0,15							
40,67	0,45	0,35	0,53	0,54	0,38		0,29	0,15	0,50
69,00	1,08	1,00	1,21	1,19	1,14	1,14	1,03	0,94	1,23
96,00	2,09	1,98	2,20	2,23	2,11	2,31	2,04	1,93	2,30
144,25	3,50	3,53	3,51	3,69	3,46	3,68	3,40	3,46	3,51

Tempo (h)	T = 20°C – pH = 5			T = 20°C – pH = 5			T = 20°C – pH = 5		
	0% glicose			5% glicose			10% glicose		
	Amostra 01	Amostra 02	Amostra 03	Amostra 01	Amostra 02	Amostra 03	Amostra 01	Amostra 02	Amostra 03
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16,00	0,33	0,36	0,35		0,10		0,31		0,13
40,67	0,40	0,51	0,43	0,35	0,24	0,35	0,48	0,41	0,33
69,00	1,11	1,00	1,06	1,03	1,08	1,16	1,14	1,10	0,99
96,00	2,00	2,08	1,99	2,06	2,11	2,24	2,20	2,18	2,06
144,25	3,55	3,56	3,50	3,69	4,00		3,58	3,54	3,48

Tempo (h)	T = 20°C – pH = 6			T = 20°C – pH = 6			T = 20°C – pH = 6		
	0% glicose			5% glicose			10% glicose		
	Amostra 01	Amostra 02	Amostra 03	Amostra 01	Amostra 02	Amostra 03	Amostra 01	Amostra 02	Amostra 03
0	0	0	0	0	0		0	0	0
16,00				0,18	0,19		0,20	0,20	0,15
19,75	0,28	0,20	0,25						
40,67				0,38	0,35		0,41	0,33	0,30
43,58	0,43	0,40	0,40						
67,92	1,05	1,08	1,00						
69,00				1,19	1,10		1,13	1,04	0,98
95,17	1,88	1,83	1,88						
96,00				2,30	2,16		2,01	1,91	1,80
119,58	2,68	2,53	2,65						
140,92	3,30	3,28	3,30						
144,00				4,00	3,75		3,6125	3,4875	3,41
166,50	4,08	4,00	4,03						

Tempo (h)	T = 28°C – pH = 4 0% glicose			T = 28°C – pH = 4 5% glicose			T = 28°C – pH = 4 10% glicose		
	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra
	01	02	03	01	02	03	01	02	03
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16,25	0,30	0,24	0,20	0,55	0,56	0,30	0,20	0,20	
22,83	0,44	0,39	0,46	0,91	0,88	0,67	0,43	0,49	0,34
40,67	1,43	1,40	1,56	2,20	2,24	2,03			
69,00	3,21	3,08	3,19	3,43	3,53	3,43	3,00	2,99	2,98

Tempo (h)	T = 28°C – pH = 5 0% glicose			T = 28°C – pH = 5 5% glicose			T = 28°C – pH = 5 10% glicose		
	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra
	01	02	03	01	02	03	01	02	03
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16,25	0,36	0,26	0,38				0,30	0,23	0,39
22,83	0,56	0,54	0,56				0,48	0,44	0,53
24,50				0,30	0,25	0,28			
40,67	1,65	1,75	1,59				1,55	1,55	1,74
47,00				1,28	1,26	1,19			
69,00	3,36	3,64	3,41				3,14	3,18	3,26
71,50				2,63	2,66	2,58			
94,00				4,25	4,25	3,79			

Tempo (h)	T = 28°C – pH = 6 0% glicose			T = 28°C – pH = 6 5% glicose			T = 28°C – pH = 6 10% glicose		
	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra
	01	02	03	01	02	03	01	02	03
0	0,00	0	0	0	0	0	0	0	
16,25	0,24						0,24	0,19	
19,75		0,34	0,34	0,48	0,51	0,54			
22,83	0,49						0,41	0,41	
22,92		0,59	0,54						
25,75		0,75	0,69	0,78	0,84	0,85			
40,67	1,76						1,59	1,59	
43,58		1,81	1,76	1,85	1,98	1,95			
67,92		3,21	3,18	3,35	3,33	3,31			
69,00	3,76						3,33	3,33	
95,17		3,45	3,41						

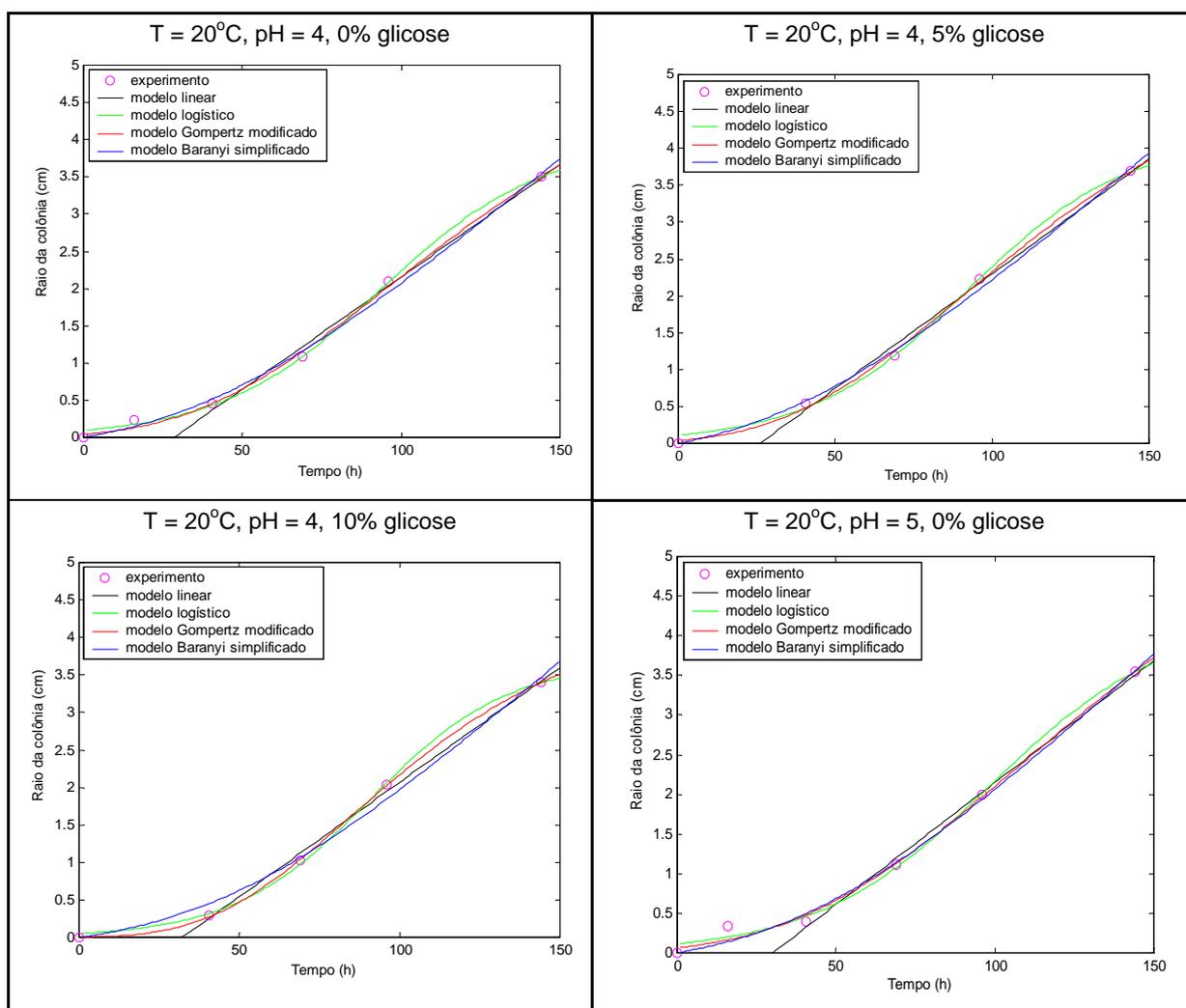
Tempo (h)	T = 36°C – pH = 4 0% glicose			T = 36°C – pH = 4 5% glicose			T = 36°C – pH = 4 10% glicose		
	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra
	01	02	03	01	02	03	01	02	03
0	0	0		0	0	0	0	0	0
17,5	0,78	0,55		0,45	0,43	0,58	0,49	0,38	0,43
24,17	1,21	1,09		1,01	0,93	1,18	0,94	0,88	0,91
42,17	2,44	2,40		2,45	2,41	2,78	2,11	1,98	2,10
49,5	2,91	3,04		2,99	2,98	3,20	2,68	2,53	2,58

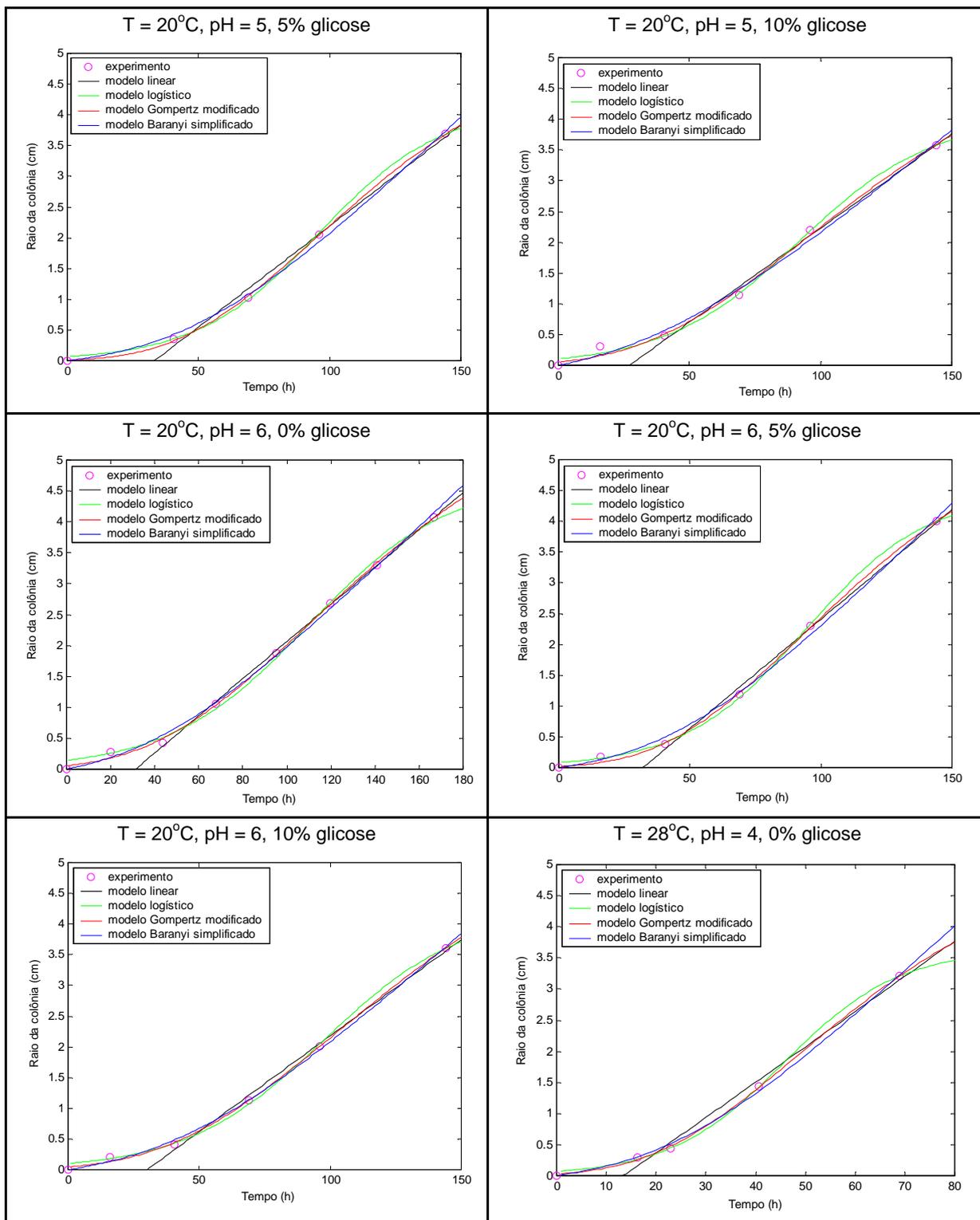
Tempo (h)	T = 36°C – pH = 5 0% glicose			T = 36°C – pH = 5 5% glicose			T = 36°C – pH = 5 10% glicose		
	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra
	01	02	03	01	02	03	01	02	03
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17,5	0,51	0,71	0,61	0,41	0,41	0,54	0,39	0,25	0,48
24,17	1,03	1,18	1,01	1,03	0,91	0,99	0,93	0,69	0,95
42,17	2,54	2,54	2,36	2,44	2,45	2,49	2,06	1,90	2,21
49,5	3,10	3,23	2,95	3,03	2,99	3,08	2,58	2,55	2,79
70,50							3,51		

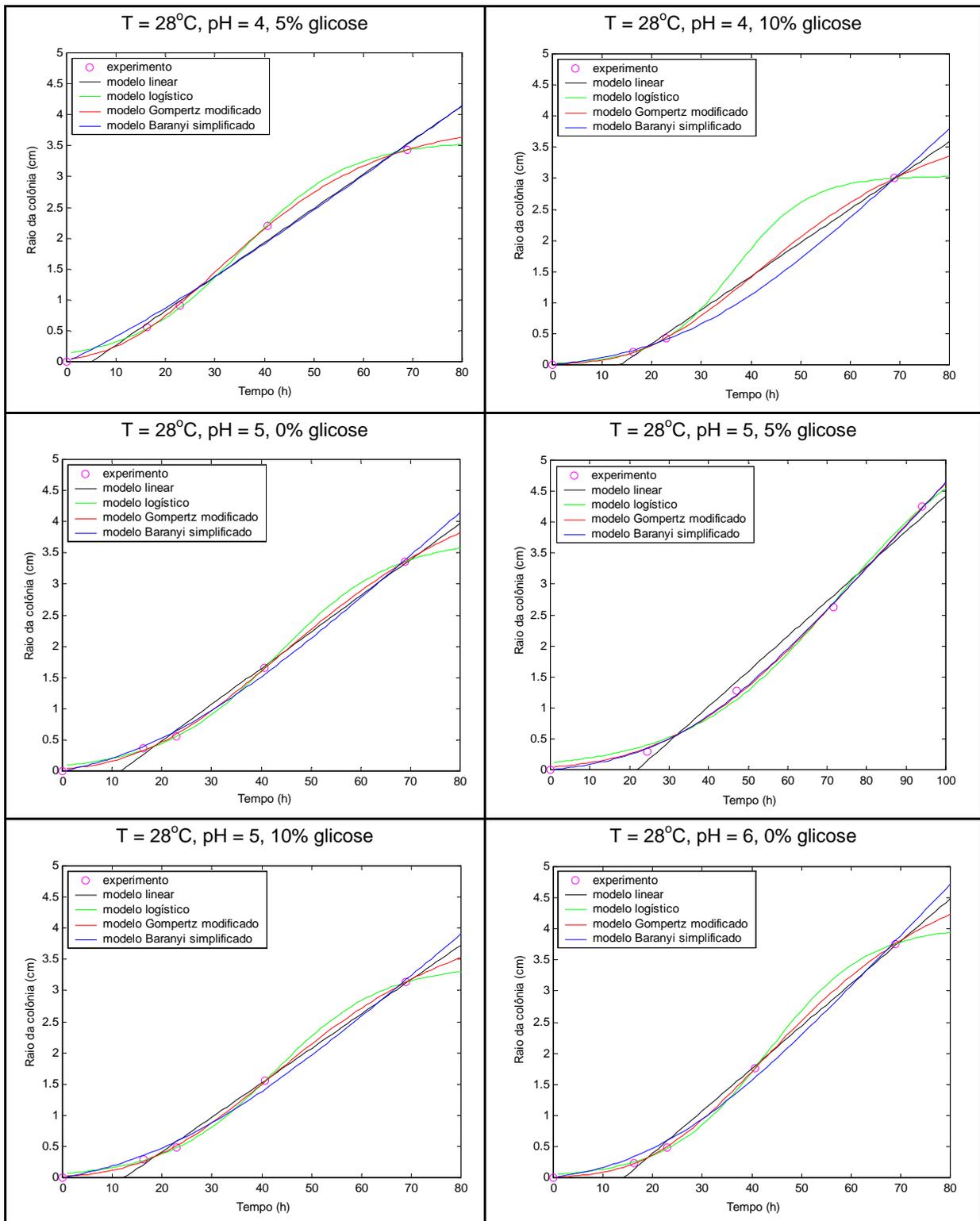
Tempo (h)	T = 36°C – pH = 6 0% glicose			T = 36°C – pH = 6 5% glicose			T = 36°C – pH = 6 10% glicose		
	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra
	01	02	03	01	02	03	01	02	03
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17,5	0,50	0,70	0,53	0,58	0,58	0,55	0,45	0,56	0,55
24,17	1,09	1,09	0,98	1,16	1,14	1,10	0,98	1,05	1,08
42,17	2,58	2,50	2,45	2,56	2,68	2,46	2,26	2,26	2,21
49,5	3,24	3,05	3,15	3,15	3,20	3,05	2,78	2,75	2,74

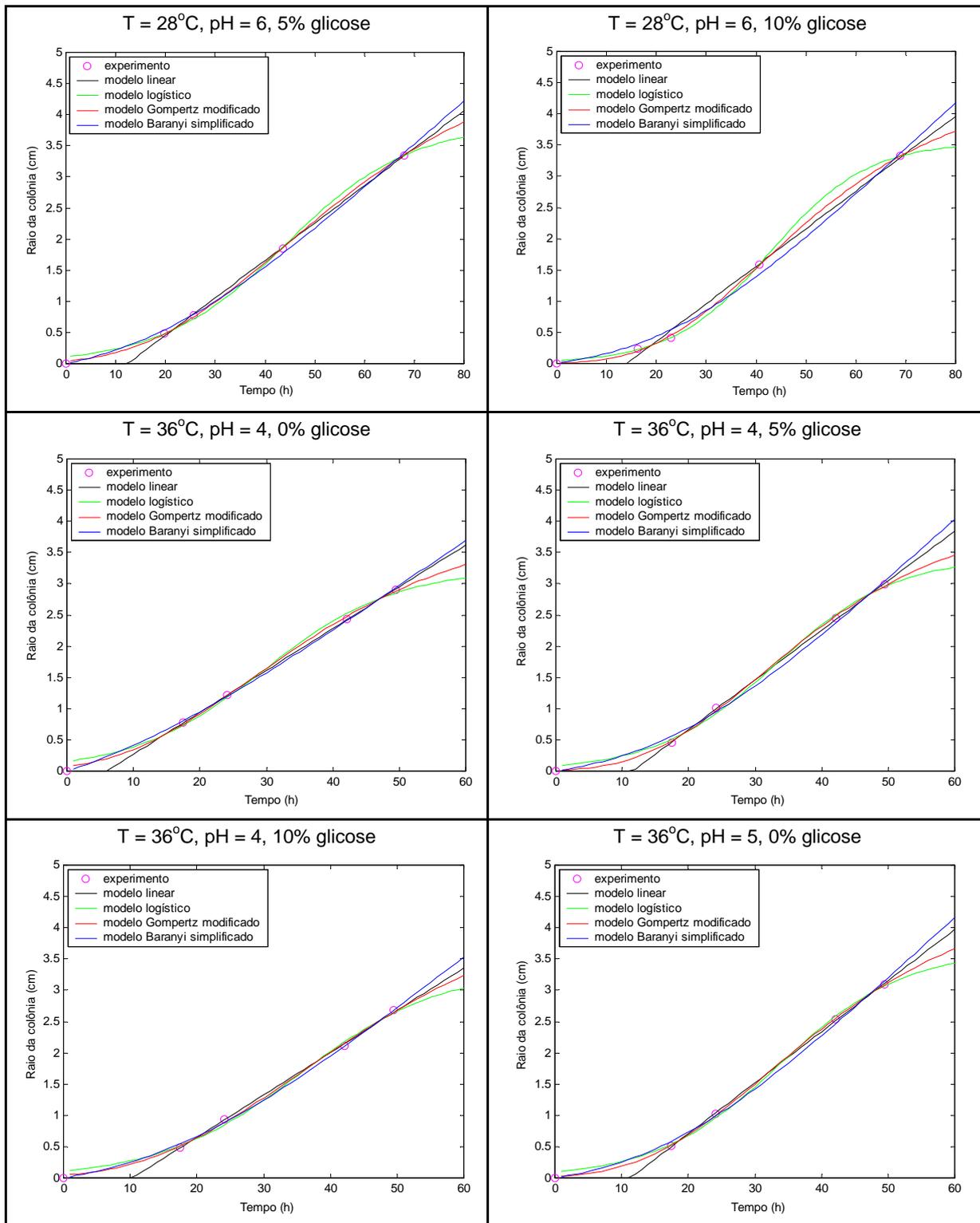
## B.2. Curvas de ajuste dos modelos preditivos primários aos dados obtidos experimentalmente

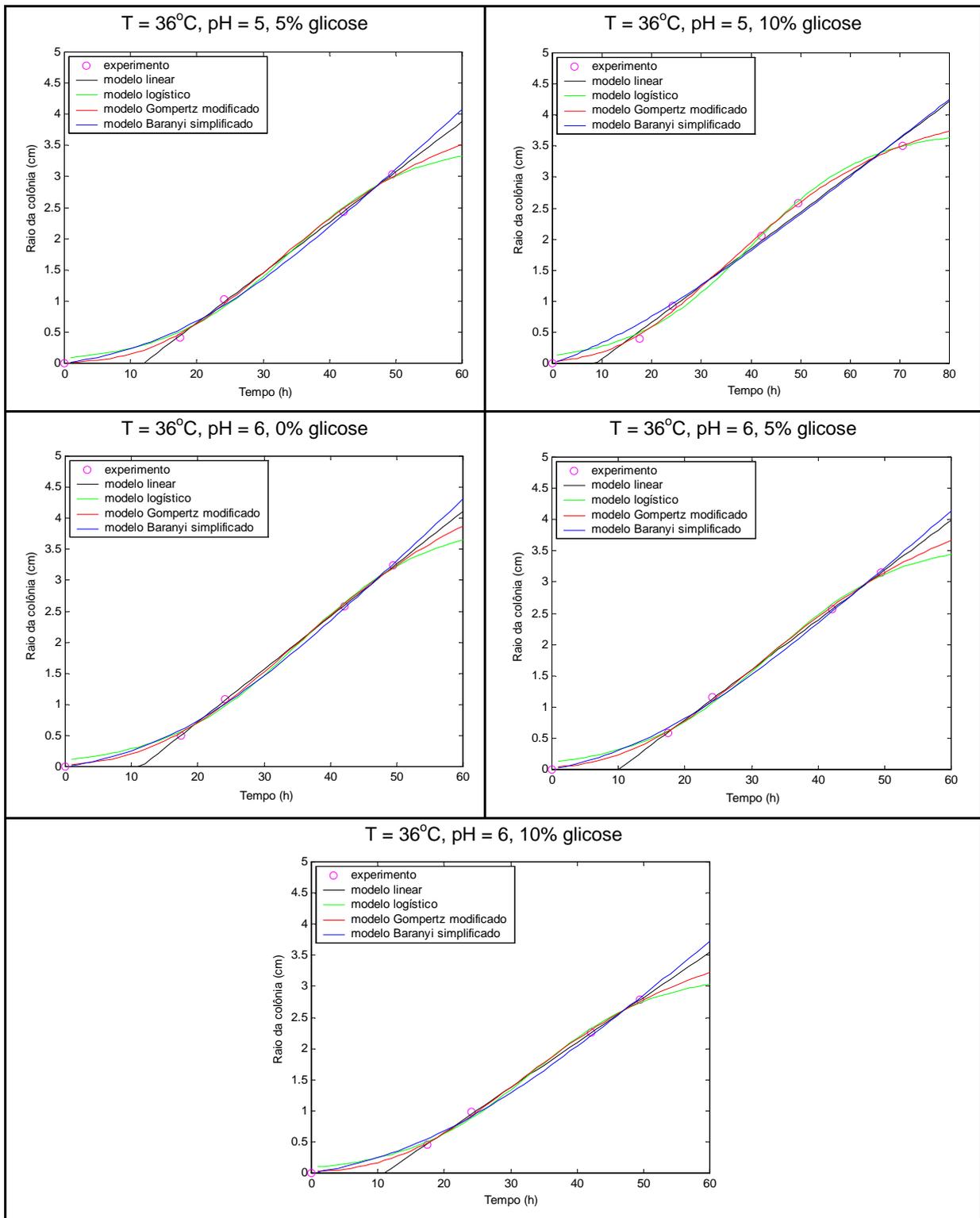
Nesta seção, exemplifica-se a qualidade de ajuste dos modelos preditivos primários aos dados obtidos experimentalmente. Optou-se por apresentar os gráficos referentes às amostras 01 de cada tratamento, pois as curvas de ajuste para as demais amostras, no mesmo tratamento, apresentam comportamento semelhante a esse.











### B.3. Parâmetros de ajuste de cada modelo preditivo primário às curvas de crescimento obtidas experimentalmente.

Nesta seção, são apresentados os valores dos parâmetros de ajuste de cada modelo preditivo primário (linear, logístico, Gompertz modificado e Baranyi simplificado) obtidos durante a modelagem matemática realizada neste estudo.

T	pH	% glicose	amostra	Modelo Linear			Modelo Logístico			Modelo Gompertz Modificado			Modelo Baranyi	
				mi	lambda		mi	lambda	Y max	mi	lambda	Y max	mi	lambda
20	4	0	1	7,23	28,45	9,44	43,06	3,97	8,03	35,49	5,55	8,42	43,84	
			2	7,50	32,66	10,01	48,27	3,99	8,53	41,27	5,56	9,08	50,62	
			3	7,05	24,06	9,38	39,25	3,89	8,15	32,04	4,85	7,98	37,39	
		5	1	7,46	26,06	9,81	41,34	4,16	8,50	34,20	5,45	8,58	40,35	
			2	7,25	28,80	9,88	43,93	3,78	8,61	37,22	4,56	8,38	43,71	
			3	7,94	31,28	11,23	46,25	3,93	10,67	43,51	4,32	8,45	38,65	
		10	1	7,33	32,22	10,30	47,93	3,67	8,94	41,45	4,38	8,68	48,85	
			2	7,77	37,46	11,05	53,36	3,75	9,57	47,18	4,49	9,53	55,90	
			3	7,12	23,98	9,91	39,99	3,78	8,61	32,90	4,49	7,94	36,04	
		5	0	1	7,38	30,09	9,20	43,42	4,22	8,12	37,96	6,60	8,60	45,37
				2	7,34	28,90	9,19	43,04	4,30	8,21	38,78	7,31	8,60	44,58
				3	7,25	29,77	9,00	43,14	4,20	8,02	38,38	6,86	8,48	45,39
	5		1	7,89	33,29	10,67	49,23	4,15	9,19	42,61	5,45	9,53	50,65	
			2	8,82	36,95	12,03	53,00	4,50	10,29	46,38	6,00	10,66	53,52	
			3	8,18	31,87	10,21	41,70	2,99	9,69	40,61	5,24	12,08	53,44	
	10		1	7,35	27,16	9,51	40,92	4,03	8,05	32,98	5,61	8,32	40,23	
			2	7,40	28,90	10,22	44,72	3,86	8,80	37,65	4,72	8,59	43,92	
			3	7,47	32,46	10,47	48,53	3,79	8,81	41,00	4,77	8,92	49,52	
	6		0	1	7,22	31,33	8,86	46,63	4,69	7,94	39,19	6,37	8,16	45,07
				2	7,07	31,49	8,71	47,67	4,68	7,85	40,29	6,37	8,09	46,58
				3	7,22	32,17	8,95	47,55	4,56	7,99	39,96	6,03	8,18	46,26
		5	1	8,53	32,18	11,48	47,36	4,46	9,75	40,05	5,88	9,90	46,23	
			2	8,01	32,35	10,76	47,40	4,18	9,13	40,09	5,55	9,41	47,66	
			3											
10		1	7,50	30,18	9,63	44,97	4,21	8,38	38,53	6,16	8,87	46,50		
		2	7,41	32,71	9,59	47,39	4,04	8,31	41,04	5,87	8,93	50,46		
		3	7,29	34,08	9,50	49,65	4,01	8,30	43,94	5,99	9,05	53,92		

28	4	0	1	13,61	13,48	18,89	22,60	3,64	15,97	19,44	5,31	17,63	25,48	
			2	13,26	14,10	19,25	23,23	3,36	15,78	19,48	4,49	17,29	26,44	
			3	13,81	13,67	20,57	22,36	3,40	16,84	18,37	4,16	17,15	24,17	
		5	1	13,27	5,10	19,74	13,49	3,58	17,68	10,39	3,94	13,70	7,48	
			2	13,75	5,77	20,46	14,13	3,68	18,19	10,93	4,07	14,34	8,66	
			3	14,41	10,43	22,33	18,66	3,55	19,29	15,17	3,92	15,98	16,40	
		10	1	12,98	13,68	24,20	21,42	3,04	15,73	18,47	3,99	17,97	29,52	
			2	12,80	13,05	26,50	20,43	3,00	17,33	17,04	3,44	17,20	27,92	
			3	13,71	16,92	34,24	23,13	2,98	16,95	20,39	3,70	19,03	32,09	
		5	0	1	13,96	11,66	19,24	19,99	3,73	16,17	16,23	4,93	16,87	21,12
				2	15,62	13,42	22,65	22,05	3,93	18,66	18,15	4,98	18,91	22,53
				3	14,12	11,95	19,01	20,55	3,91	16,27	17,30	5,61	17,38	22,05
	5		1	13,59	21,96	17,88	35,33	5,65	16,75	33,24	9,22	16,94	34,37	
			2	13,80	22,62	18,12	35,34	5,42	16,58	32,27	8,17	17,18	34,85	
			3	12,29	21,05	16,08	32,18	4,45	14,35	28,07	5,86	15,07	33,06	
	10		1	13,25	12,45	18,90	20,95	3,41	15,68	17,05	4,34	16,38	22,95	
			2	13,72	13,63	20,44	22,43	3,39	16,70	18,44	4,19	17,14	24,35	
			3	13,55	11,00	19,56	19,35	3,50	16,31	15,36	4,26	15,99	19,65	
	6	0	1	16,38	14,29	24,41	23,31	4,04	19,83	19,36	5,12	20,04	23,59	
			2	14,18	13,31	18,55	19,52	3,50	17,14	16,36	3,67	10,58	8,78	
			3	14,14	13,92	18,70	20,46	3,47	17,06	17,04	3,64	10,68	10,47	
		5	1	14,42	12,42	18,41	19,17	3,85	16,15	15,91	5,09	16,99	20,54	
			2	14,12	11,00	18,43	17,51	3,69	16,25	14,23	4,49	16,06	17,84	
			3	13,93	10,61	17,95	17,14	3,72	15,82	13,80	4,61	15,84	17,48	
10		1	14,44	14,08	21,76	23,15	3,55	17,62	19,14	4,44	18,11	24,70		
		2	14,59	14,52	22,43	23,65	3,52	18,06	19,60	4,32	18,30	25,11		
		3												

T	pH	% glicose	amostra	Modelo Linear		Modelo Logístico			Modelo Gompertz Modificado			Modelo Baranyi	
				mi	lambda	mi	lambda	Y max	mi	lambda	Y max	mi	lambda
36	4	0	1	16,10	6,00	19,71	9,93	3,23	17,97	8,05	4,03	17,87	10,47
			2	18,38	10,24	21,40	14,06	3,75	19,80	12,23	5,04	21,93	16,63
			3										
		5	1	19,06	11,61	22,89	15,15	3,43	21,23	13,39	4,15	23,15	18,34
			2	19,30	12,38	23,15	16,30	3,53	21,27	14,38	4,45	24,05	19,68
			3	20,04	10,18	25,80	13,86	3,43	24,03	12,44	3,95	23,04	15,33
		10	1	16,23	10,37	18,94	14,34	3,34	17,53	12,53	4,57	20,16	18,23
			2	15,70	11,32	18,34	15,24	3,15	16,96	13,32	4,15	20,18	20,15
			3	16,05	10,86	19,09	14,34	2,97	17,67	12,56	3,67	20,06	18,92
	5	0	1	19,59	11,36	23,37	15,07	3,64	21,48	13,22	4,61	23,61	17,81
			2	18,69	8,78	21,72	12,95	4,11	20,20	11,18	5,80	21,63	14,28
			3	17,65	9,75	20,65	13,84	3,69	19,10	12,07	5,19	21,20	16,45
		5	1	19,41	12,00	23,09	15,56	3,52	21,47	13,74	4,27	23,68	18,78
			2	19,60	12,63	23,77	16,50	3,47	21,86	14,62	4,27	24,45	19,88
			3	19,27	11,27	22,84	15,28	3,75	20,96	13,41	5,04	23,43	17,99
		10	1	14,22	8,84	19,19	16,30	3,75	17,41	13,09	4,22	15,17	12,79
			2	17,00	14,32	21,21	20,25	3,55	19,63	18,47	5,27	24,05	24,71
			3	17,22	10,95	20,19	14,89	3,44	18,63	13,03	4,63	21,36	18,54
	6	0	1	20,36	11,53	23,97	15,38	3,94	22,10	13,48	5,13	24,40	17,72
			2	17,92	8,77	21,08	12,62	3,66	19,35	10,77	4,98	20,90	14,60
			3	19,69	11,70	23,45	16,52	4,18	21,88	14,95	6,22	24,26	18,68
		5	1	19,15	10,00	22,64	13,43	3,65	20,93	11,66	4,57	22,34	15,66
			2	19,88	10,43	24,10	13,94	3,61	22,22	12,22	4,40	23,20	16,02
			3	18,61	10,24	21,86	13,78	3,60	20,18	11,96	4,61	22,04	16,40
		10	1	17,37	11,01	20,67	14,50	3,20	19,13	12,72	3,95	21,31	18,31
			2	16,35	9,02	19,49	12,48	3,13	17,93	10,70	3,93	19,34	15,54
			3	16,11	8,84	18,98	12,22	3,14	17,55	10,46	3,95	19,01	15,35

## APÊNDICE C

## INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES AO ARTIGO 3

C.1. Dados de raio da colônia de *B. fulva* (em cm) em função do tempo (em horas) obtidos experimentalmente, durante seu crescimento em polpa de mamão nas diversas temperaturas consideradas no estudo.

T = 12°C									
Amostra 01 *		Amostra 02		Amostra 03		Amostra 04 *		Amostra 05	
Tempo (h)	Raio (cm)	Tempo (h)	Raio (cm)	Tempo (h)	Raio (cm)	Tempo (h)	Raio (cm)	Tempo (h)	Raio (cm)
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
239	1,00	94	0,28	239	0,78	239	1,05	325	1,10
325	1,60	239	0,55	277	0,93	325	1,38	379	1,58
378	2,13	325	1,05	379	1,63	379	1,85	429	2,13
429	2,50	378	1,55	429	2,15	429	2,35	477	2,43
477	2,85	429	2,33	477	2,38	477	2,88	522	2,75
		477	2,73	522	2,73				
		522	3,15						

\* Placa reservada para a etapa de validação do modelo preditivo

T = 15°C							
Amostra 01 *		Amostra 02		Amostra 03 *		Amostra 04	
Tempo (h)	Raio (cm)	Tempo (h)	Raio (cm)	Tempo (h)	Raio (cm)	Tempo (h)	Raio (cm)
0	0	0	0	0	0	0	0
100	0,25	100	0,24	119	0,24	119	0,29
119	0,34	119	0,36	143	0,39	143	0,64
143	0,50	143	0,48	167	0,55	167	0,80
167	0,79	167	0,79	191	0,80	191	1,09
191	1,14	191	1,14	215	1,11	215	1,48
215	1,44	215	1,39	239	1,45	239	1,83
239	1,79	239	1,75	263	1,76	263	2,09
263	2,16	263	2,05	287	2,09	287	2,40
287	2,50	287	2,41	312	2,46	312	2,80
312	2,85	312	2,78	334	2,75	334	3,10
334	3,18	334	3,10	359	3,10	359	3,36
359	3,51	359	3,48				

\* Placa reservada para a etapa de validação do modelo preditivo

T = 15°C							
Amostra 05		Amostra 06		Amostra 07 *		Amostra 08	
Tempo (h)	Raio (cm)	Tempo (h)	Raio (cm)	Tempo (h)	Raio (cm)	Tempo (h)	Raio (cm)
0	0	0	0	0	0	0	0
143	0,63	143	0,40	143	0,39	143	0,29
167	0,91	167	0,65	167	0,65	167	0,58
191	1,19	191	0,95	191	0,91	191	0,76
215	1,46	215	1,25	215	1,19	215	1,16
239	1,58	239	1,63	239	1,51	239	1,50
263	1,93	263	1,94	263	1,86	263	1,63
287	2,25	287	2,31	287	2,08	287	1,81
312	2,59	312	2,68	312	2,41	312	2,36
334	2,96	334	3,01	334	2,76	334	2,66
359	3,05	359	3,36	359	3,04	359	3,03

\* Placa reservada para a etapa de validação do modelo preditivo

T = 20°C											
Amostra 01		Amostra 02		Amostra 03		Amostra 04		Amostra 05 *		Amostra 06 *	
Tempo (h)	Raio (cm)	Tempo (h)	Raio (cm)	Tempo (h)	Raio (cm)						
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
66	0,53	66	0,94	66	1,03	66	0,43	44	0,30	44	0,25
90	0,93	90	1,63	90	1,70	90	0,89	68	0,50	68	0,40
119	1,55	119	2,34	119	2,40	119	1,59	95	1,05	95	0,98
161	2,45	161	3,24	161	3,24	161	2,49	120	1,65	120	1,55
								141	2,25	141	2,15
								167	2,85	167	2,78
								190	3,35	190	3,28
								214	3,93	214	3,88

\* Placa reservada para a etapa de validação do modelo preditivo

T = 24°C							
Amostra 01		Amostra 02		Amostra 03		Amostra 04 *	
Tempo (h)	Raio (cm)	Tempo (h)	Raio (cm)	Tempo (h)	Raio (cm)	Tempo (h)	Raio (cm)
0	0	0	0	0	0	0	0
69	0,80	76	1,23	69	0,65	69	0,74
76	1,23	97	1,96	76	0,95	76	1,10
97	2,18	121	2,79	97	1,71	97	1,96
121	3,13	170	4,00	121	2,53	121	2,75
170	4,00			170	3,63	170	4,00

\* Placa reservada para a etapa de validação do modelo preditivo

T = 28°C									
Amostra 01		Amostra 02 *		Amostra 03		Amostra 04 *		Amostra 05	
Tempo (h)	Raio (cm)	Tempo (h)	Raio (cm)	Tempo (h)	Raio (cm)	Tempo (h)	Raio (cm)	Tempo (h)	Raio (cm)
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0,48	44	1,55	44	1,44	44	1,14	18	0,43
22	0,64	67	2,50	67	2,39	67	2,01	46	1,71
44	1,70	91	3,71	91	3,45	91	3,23	67	2,49
67	2,83					96	3,63	91	2,85
91	4,00								

\* Placa reservada para a etapa de validação do modelo preditivo

T = 36°C											
Amostra 01 *		Amostra 02		Amostra 03		Amostra 04 *		Amostra 05		Amostra 06	
Tempo (h)	Raio (cm)	Tempo (h)	Raio (cm)	Tempo (h)	Raio (cm)	Tempo (h)	Raio (cm)	Tempo (h)	Raio (cm)	Tempo (h)	Raio (cm)
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0,54	24	0,90	24	0,91	24	0,85	24	0,81	24	1,03
24	0,94	43	1,93	43	1,85	43	1,95	43	1,99	47	2,06
43	2,03	47	2,16	66	3,08	66	2,83	66	3,38	66	3,03
47	2,36	66	2,79	89	3,80	89	3,24	89	4,00	89	3,36
66	2,89	89	3,28								
89											

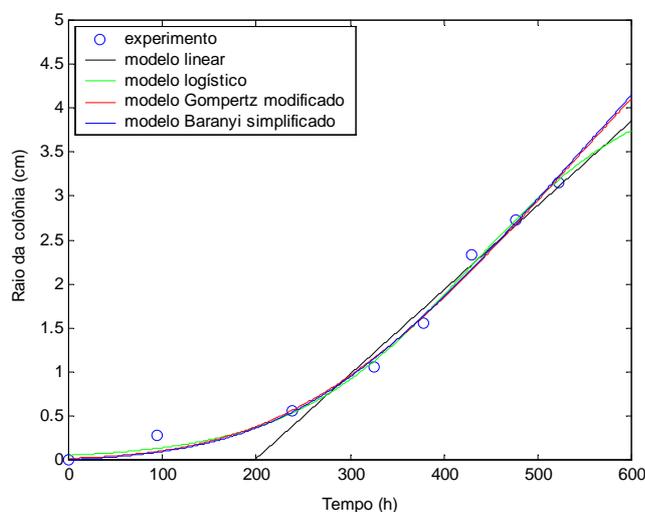
\* Placa reservada para a etapa de validação do modelo preditivo

T = 40°C			
Amostra 01		Amostra 02	
Tempo (h)	Raio (cm)	Tempo (h)	Raio (cm)
0	0	0	0
42	1,55	42	1,35
61	2,60	61	2,80
70	2,87	70	3,31
85	3,48	85	3,86
94	3,84	94	4,36
109	4,25	109	4,74
118	4,58	164	5,93
133	4,75	210	7,50
164	5,40		
210	6,33		

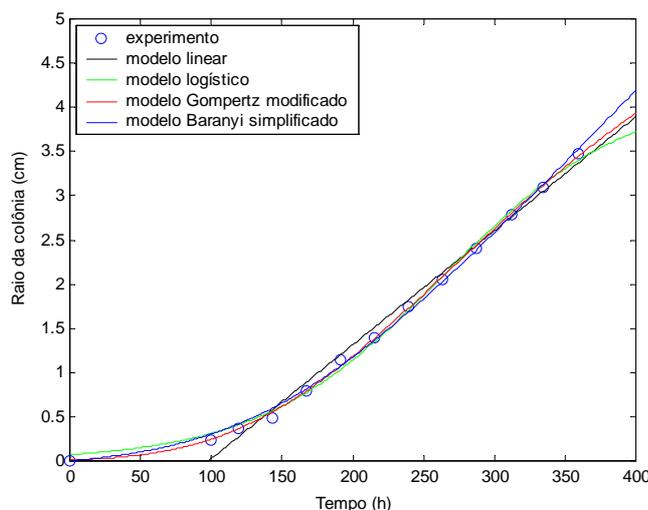
## C.2. Curvas de ajuste dos modelos preditivos primários aos dados obtidos experimentalmente

Para demonstrar visualmente a qualidade de ajuste dos modelos preditivos primários aos dados obtidos experimentalmente, nesta seção são apresentados alguns dos gráficos gerados durante o procedimento de análise. Optou-se por apresentar o gráfico para uma das amostras dentro de cada conjunto de temperatura, uma vez que ele representa satisfatoriamente o comportamento observado para as demais amostras naquele tratamento.

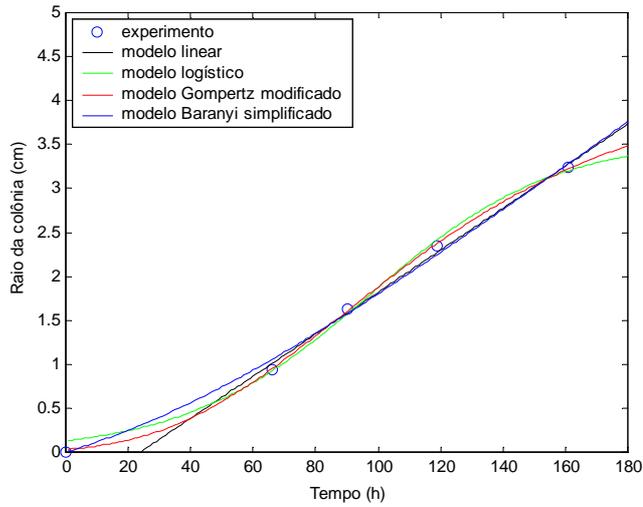
- Temperatura = 12°C (amostra 02)



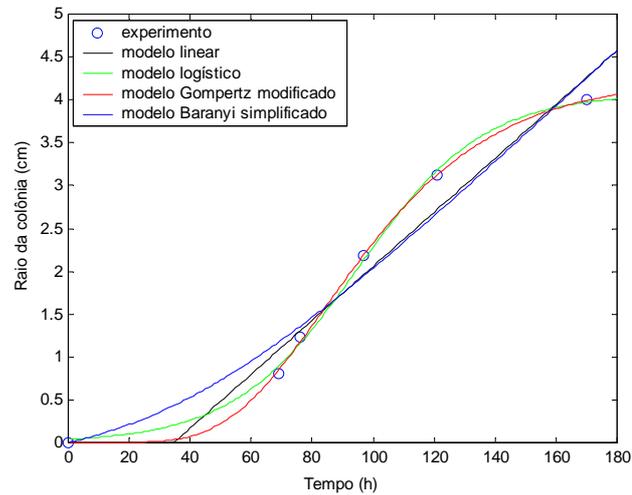
- Temperatura = 15°C (amostra 02)



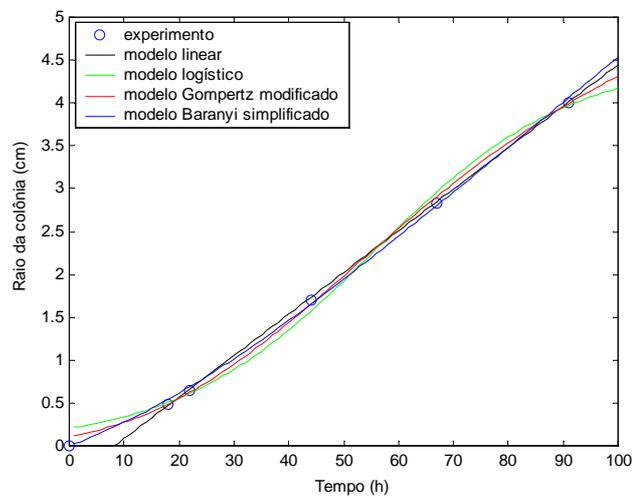
- Temperatura = 20°C (amostra 02)



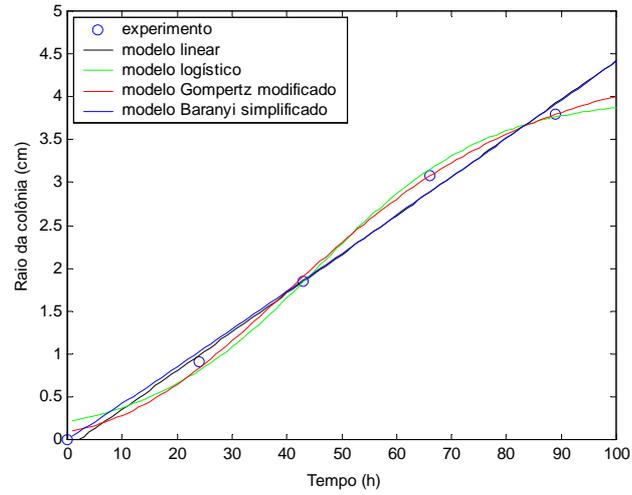
- Temperatura = 24°C (amostra 01)



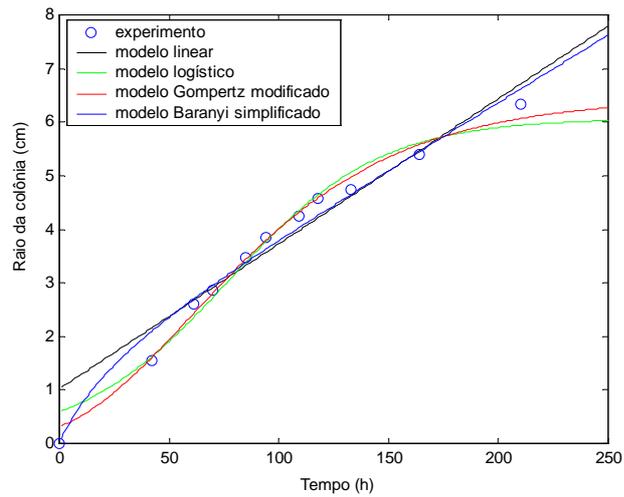
- Temperatura = 28°C (amostra 01)



- Temperatura = 36°C (amostra 03)



- Temperatura = 42°C (amostra 01)



### C.3. Parâmetros de ajuste de cada modelo preditivo primário às curvas de crescimento obtidas experimentalmente.

Nesta seção, são apresentados os valores dos parâmetros de ajuste de cada modelo preditivo primário (linear, logístico, Gompertz modificado e Baranyi simplificado) obtidos durante a modelagem matemática realizada no estudo conduzido no artigo 3.

T (°C)	Amostra	Modelo Linear		Modelo Logístico			Modelo Gompertz modificado			Modelo Baranyi simplificado	
		$\mu$ (mm/dia)	$\lambda$ (h)	$\mu$ (mm/dia)	$\lambda$ (h)	$Y_{\max}$ (cm)	$\mu$ (mm/dia)	$\lambda$ (h)	$Y_{\max}$ (cm)	$\mu$ (mm/dia)	$\lambda$ (h)
12	02	2,4	198,7	2,74	235,9	4,36	2,81	248,2	9,35	2,93	260,9
	03	1,68	138,2	1,92	167,4	3,44	1,8	153,4	4,91	2,06	206,9
	05	1,92	190,3	2,35	215,4	3,21	2,33	211,9	3,72	2,33	237
15	02	3,12	98,1	3,86	133,8	4,18	3,58	123,6	5,97	4,01	149,6
	04	3,12	100,5	3,74	125,8	3,92	3,46	115,2	5,12	3,82	142
	05	2,88	90,8	3,14	111,2	3,98	2,95	102,6	5,69	3,29	129,8
	06	3,36	120,7	3,94	143,9	4,10	3,67	135	5,59	4,15	161,6
	08	2,88	124,1	3,53	151,1	4,08	3,36	144,9	6,13	3,89	174,4
20	01	4,8	42,1	5,76	53,4	3,04	5,28	48,4	4,36	6,24	69,2
	02	5,76	23,9	7,25	38	3,57	6,72	32,8	4,22	6,14	33,6
	03	5,52	18,1	7,2	34,7	3,52	6,67	29,4	4,09	5,78	25,3
	04	5,28	47,3	6,38	58,7	2,91	5,81	53,3	3,73	6,77	73,9
24	01	7,68	34,6	11,90	53,9	4,08	11,95	52,6	4,26	7,92	41,4
	02	6,96	30,4	9,19	46,34	4,38	8,57	41,78	5,04	7,37	37,2
	03	6,96	42,2	9,65	56	3,84	9,17	52,4	4,2	7,78	54,1
28	01	11,52	8,3	15	19,2	4,53	13,32	14,3	5,73	12,82	15,1
	03	10,32	11,2	12,91	20,1	3,97	11,74	16,1	4,97	10,99	15,6
	05	8,16	-0,3*	13,73	16,2	2,93	12,36	11,8	3,16	7,51	-7,4*
36	02	8,64	-8,4*	14,74	11,7	3,27	13,97	9,2	3,50	7,44	-21,9*
	03	10,8	2,2	15,36	14,2	3,99	14,04	10,4	4,49	10,78	1,8
	05	12	4,5	18,31	17,1	4,11	16,90	13,9	4,49	11,88	4,3
	06	8,88	-7,6*	14,66	11,4	3,50	13,85	8,1	3,75	8,06	-17,3*
40**	01	6,48	-37,6*	10,54	7,9	6,07	10,56	6,0	6,46	6,05	-52,7*
	02	7,92	-25,4	13,08	14,9	7,04	12,62	11,4	7,52	7,51	-33,2*

\* Valor estimado pelo modelo matemático sem significado físico. Neste caso, assume-se que o tempo de duração da fase lag é nulo.

\*\* Para os experimentos realizados nesta temperatura, utilizaram-se placas de Petri com 150 mm de diâmetro. Tal escolha teve como objetivo obter maior número de medidas de diâmetro da colônia, pois o crescimento do fungo nessa condição é muito rápido. O uso de placas com 90 mm de diâmetro limitaria a obtenção de dados experimentais.

C.4. Forma diferencial dos modelos preditivos primários para utilização em condições dinâmicas de temperatura, conforme Longhi *et al.*, 2013.

Os modelos preditivos primários, escritos da forma como foram apresentados na Tabela 6.1 (artigo 3), aplicam-se somente em condições isotérmicas. Para serem utilizados em condições não-isotérmicas ou em condições dinâmicas de temperatura é necessário reescrevê-los na forma diferencial, haja vista que os valores de seus parâmetros (taxa de crescimento radial, tempo de duração da fase lag) variam ao longo do tempo. As Equações C.4.1 a C.4.4 mostram as formas diferenciais dos modelos preditivos primários tratados neste estudo e suas respectivas condições iniciais.

- Modelo Linear

$$\frac{dy}{dt} = \begin{cases} 0 & (t \leq \lambda) \\ \mu & (t > \lambda) \end{cases} \quad \text{Eq. C.4.1}$$

$$y(0) = y_0$$

- Modelo Logístico

$$\frac{dy}{dt} = \frac{4\mu}{y_{\max}} \left[ 1 - \frac{y}{y_{\max}} \right] y$$

$$y(0) = y_0 + \frac{y_{\max}}{1 + \exp\left[\left(\frac{4\mu}{y_{\max}}\right)\lambda + 2\right]} \quad \text{Eq. C.4.2}$$

- Modelo Gompertz modificado

$$\frac{dy}{dt} = \frac{\mu \cdot \exp(1)}{y_{\max}} \cdot y \cdot \ln\left(\frac{y_{\max}}{y}\right)$$

$$y(0) = y_0 + y_{\max} \cdot \exp\left\{-\exp\left[\frac{\mu \cdot \exp(1)}{y_{\max}} \cdot \lambda + 1\right]\right\} \quad \text{Eq. C.4.3}$$

- Modelo Baranyi simplificado

$$\frac{dy}{dt} = \mu \left[ \frac{1}{1 + \exp(-Q)} \right] [1 - \exp(y - y_{\max})]$$

$$\frac{dQ}{dt} = \mu \quad \text{Eq. C.4.4}$$

$$y(0) = y_0$$

$$Q(0) = Q_0$$

### C.5. Estudo sobre a convergência da série que constitui a solução exata do modelo de transferência de calor em placa plana

Como se pode perceber pela Equação (6.18), a solução exata para o perfil adimensional de temperatura para a placa plana, utilizada no artigo 3, é constituída por uma série infinita. Desta forma, antes de aplicar essa equação nas simulações realizadas, estudou-se a convergência dessa série, a fim de determinar o número de termos necessários para obter a solução com a exatidão desejada. Para tal avaliação, foram consideradas as condições extremas de velocidade do ar do sistema de refrigeração, ou seja, o menor valor (0,2 m/s) e o maior valor (5 m/s) testados nas simulações. Lembre-se de que os coeficientes dessa série são função do número de Biot ( $Bi$ ) que, por sua vez, depende do valor do coeficiente de transferência de calor convectivo, o qual é função da velocidade do fluido de troca térmica.

A Tabela C.5.1 apresenta os valores de  $\xi_n$  e dos coeficientes  $C_n$  dos oito primeiros termos da série, para cada situação estudada.

**Tabela C.5.1.** Valores de  $\xi_n$  e dos coeficientes  $C_n$  dos oito primeiros termos da série que constitui a solução exata para a placa plana utilizada no estudo conduzido no artigo 3.

Caso 1: $U_\infty = 0,2$ m/s ( $Bi = 0,297$ )								
$\xi_n$	0,5195	3,2332	6,33	9,4561	12,5899	15,7268	18,8653	22,0046
$C_n$	1,0447	-0,055	0,0147	-0,0066	0,0037	-0,0024	0,0017	-0,0012
Caso 2: $U_\infty = 5$ m/s ( $Bi = 1,485$ )								
$\xi_n$	0,9851	3,5389	6,5075	9,5785	12,6829	15,8016	18,9278	22,0583
$C_n$	1,1528	-0,1986	0,0662	-0,0315	0,0182	-0,0118	0,0082	-0,0061

Na Tabela C.5.2, mostra-se a comparação entre os valores da temperatura adimensional (lado esquerdo da Eq. 6.18) calculados para a superfície superior da placa com o uso de um termo (condição 1), dos quatro primeiros termos (condição 2) e dos oito primeiros termos (condição 3) da série, para o caso 1. Nesta tabela, também são apresentados os valores do erro relativo 1, em que se comparam os resultados das condições 1 e 2, e do erro relativo 2, em que se comparam os resultados das condições 2 e 3.

**Tabela C.5.2.** Estimativa para a temperatura adimensional na superfície da placa plana usando a solução exata quando a velocidade do ar é 0,2 m/s, empregando-se apenas o primeiro termo da série (condição 1), os quatro primeiros termos da série (condição 2) e os oito primeiros termos da série (condição 3), com seus respectivos erros relativos – erro 1 (condição 1 x condição 2) e erro 2 (condição 2 x condição 3)

Tempo (s)	Condição 1	Condição 2	Condição 3	Erro 1 (%)	Erro 2 (%)
10	0,9067	0,9815	0,9891	7,63	0,76
20	0,9065	0,9802	0,9865	7,52	0,64
30	0,9063	0,9789	0,9843	7,42	0,54
40	0,9062	0,9777	0,9822	7,31	0,46
50	0,9060	0,9764	0,9803	7,22	0,40
60	0,9058	0,9752	0,9786	7,12	0,34
70	0,9056	0,9741	0,9769	7,03	0,29
80	0,9055	0,9729	0,9754	6,93	0,25
90	0,9053	0,9718	0,9740	6,85	0,22
100	0,9051	0,9708	0,9726	6,76	0,19
200	0,9034	0,9612	0,9617	6,01	0,05
500	0,8984	0,9405	0,9405	4,48	0
1000	0,8900	0,9175	0,9175	2,99	0

A partir dos resultados mostrados na Tabela C.5.2 verifica-se que, em termos de exatidão da solução, o emprego de quatro ou de oito termos na série representa um erro pouco expressivo, pois é inferior a 0,80%. Segundo essa análise, o uso de quatro termos na série não gera resultados muito diferentes daqueles obtidos com o emprego de oito termos. Desta forma, tal resultado conduz à adoção de quatro termos para representar a série, sem comprometer significativamente sua exatidão.

Na Tabela C.5.3, apresenta-se a comparação entre os valores da temperatura adimensional (lado esquerdo da Eq. 6.18) calculados na superfície superior da placa com o uso de um termo (condição 1), dos quatro primeiros termos (condição 2) e dos oito primeiros termos (condição 3) da série, para o caso 2. Nesta tabela, também são apresentados os valores do erro relativo 1, em que se comparam os resultados das condições 1 e 2, e do erro relativo 2, em que se comparam os resultados das condições 2 e 3.

**Tabela C.5.3.** Estimativa para a temperatura adimensional na superfície da placa plana usando a solução exata quando a velocidade do ar é 5 m/s, empregando-se apenas o primeiro termo da série (condição 1), os quatro primeiros termos da série (condição 2) e os oito primeiros termos da série (condição 3), com seus respectivos erros relativos – erro 1 (condição 1 x condição 2) e erro 2 (condição 2 x condição 3)

Tempo (s)	Condição 1	Condição 2	Condição 3	Erro 1 (%)	Erro 2 (%)
10	0,6368	0,9102	0,9469	30,04	3,88
20	0,6364	0,9046	0,9354	29,65	3,29
30	0,6360	0,8992	0,9251	29,27	2,81
40	0,6355	0,8939	0,9159	28,90	2,40
50	0,6351	0,8888	0,9075	28,54	2,07
60	0,6347	0,8839	0,8999	28,19	1,78
70	0,6342	0,8790	0,8928	27,85	1,54
80	0,6338	0,8744	0,8862	27,51	1,33
90	0,6334	0,8698	0,8801	27,18	1,16
100	0,6330	0,8654	0,8743	26,86	1,01
200	0,6287	0,8272	0,8296	24,00	0,29
500	0,6162	0,7509	0,7510	17,93	0,01
1000	0,5958	0,6761	0,6761	11,88	0

A partir dos resultados mostrados na Tabela C.5.3, nota-se novamente que, a aproximação da série apenas pelo seu primeiro termo gera um erro elevado (erro 1 = 30%), quando se compara esse resultado com a aproximação da série pelos quatro primeiros termos. Por outro lado, o emprego dos oito primeiros termos não produz resultados muito diferentes daqueles obtidos com o uso dos quatro primeiros termos. Nesta situação, o erro máximo obtido (erro 2) foi inferior a 4%. Além disso, o erro reduz-se a menos de 1% após cerca de 100 segundos. Isto demonstra mais uma vez a viabilidade de se aproximar a série infinita pelos seus quatro primeiros termos, o que foi adotado no estudo conduzido no artigo 3.