

# MODELAGEM MATEMÁTICA DO CRESCIMENTO DE *Byssochlamys fulva* EM SUCO DE MAÇÃ SOLIDIFICADO SOB CONDIÇÕES NÃO-ISOTÉRMICAS, UTILIZANDO MEDIDAS DO DIÂMETRO DA COLÔNIA E DO CONTEÚDO DE ERGOSTEROL

A. TREMARIN<sup>1</sup>, D. A. LONGHI<sup>1,3</sup>; B. C. M. SALOMÃO<sup>2</sup>; G. M. F. ARAGÃO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Centro Tecnológico, Florianópolis/SC, Brasil

<sup>2</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, Centro de Tecnologia, Lagoa Nova, Natal/RN, Brasil

<sup>3</sup> Universidade Federal do Paraná – UFPR, Departamento de Engenharia de Alimentos, Campus Avançado de Jandaia do Sul/PR, Brasil

E-mail para contato: glaucia@enq.ufsc.br

**RESUMO** – O aumento da temperatura pode levar ao aumento da velocidade de crescimento de microrganismos como *Byssochlamys fulva*, que é um fungo termorresistente capaz de crescer em sucos de fruta. O objetivo deste trabalho foi a obtenção de um modelo matemático que possa prever o crescimento de *B. fulva* em condições ambientais não-isotérmicas e que possa ser utilizado para o estabelecimento da vida útil de sucos contaminados por este microrganismo. O crescimento de *B. fulva* em suco de maçã solidificado ao longo do tempo foi avaliado por medidas do diâmetro das colônias e pelo conteúdo de ergosterol. As curvas de crescimento foram descritas pelo modelo de Baranyi e Roberts, e a dependência dos parâmetros com a temperatura foi descrita por modelos secundários apropriados. A predição do crescimento foi realizada para dois diferentes perfis de temperatura para cada método de medição. No primeiro perfil, placas foram incubadas a 10 °C, com aumento gradativo de temperatura até atingir 30 °C, e no segundo perfil houve a diminuição gradativa da temperatura de 30 °C para 10 °C. Os resultados experimentais mostraram que foi possível prever o crescimento de *B. fulva* em suco de maçã solidificado em condições não-isotérmicas com o uso dos modelos matemáticos propostos.

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

## 1. INTRODUÇÃO

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

Muitos modelos matemáticos são baseados em dados experimentais de crescimento microbiano em condições constantes. No entanto, condições tais como temperatura, atividade de água ou composição da atmosfera gasosa são muitas vezes variáveis durante o armazenamento. Diante disso, vários trabalhos tem sido publicados nos últimos anos sobre modelos dinâmicos, que são modelos que permitem prever o crescimento de microrganismos sob condições que variam ao longo do tempo de armazenamento, principalmente condições não-isotérmicas (Gospavic et al., 2008; Gougoli e Koutsoumanis, 2010). A temperatura é um fator importante na deterioração de alimentos especialmente deterioração microbiana, uma vez que a velocidade de crescimento específico e a fase de adaptação são altamente dependentes da temperatura (Corradini e Peleg, 2005; Giannuzzi et al., 1998; Longhi et al., 2013).

Estudos prévios sobre o efeito da temperatura no crescimento de fungos têm sido realizados em condições isotérmicas. No entanto, flutuações de temperatura são frequentemente encontradas durante a distribuição e armazenamento de alimentos (Koutsoumanis, 2001; Laguerre et al., 2002). Embora vários modelos publicados façam a previsão de crescimento bacteriano em condições de temperatura dinâmicas (Gougouli et al., 2008, Koutsoumanis, 2001; Zwietering et al., 1994; Longhi et al., 2013), trabalhos sobre o comportamento de fungos em condições não-isotérmicas ainda são escassos.

O desenvolvimento de um modelo preditivo de crescimento para condições não-isotérmicas envolve dois passos principais. No primeiro passo, os parâmetros de crescimento são obtidos a partir do ajuste dos modelos primários aos dados experimentais obtidos sob diferentes condições isotérmicas. Depois disso, no segundo passo, a influência da temperatura sobre os parâmetros de crescimento é descrita por modelos secundários. Para estimar o crescimento microbiano sob condições não-isotérmicas, a forma diferencial do modelo primário de crescimento deve ser utilizada (Corradini e Peleg, 2005)

O objetivo do presente estudo foi estabelecer um modelo para prever o crescimento de *B. fulva* em condições não-isotérmicas através da medida do diâmetro da colônia e do conteúdo de ergosterol e validar o modelo com dados experimentais obtidos em diferentes perfis de temperatura.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Microrganismos e Meios de Crescimento

Neste estudo, o crescimento de *Byssochlamys fulva* IOC 4518 isolado de suco concentrado de maçã (Salomão et al., 2008) foi analisado. O suco de maçã clarificado foi elaborado a partir do suco de maçã concentrado (70 °Brix) fornecido pela empresa de sucos

Fischer S/A de Videira/SC. A correção do pH do suco foi realizada com soluções de hidróxido de sódio 1 M ou ácido clorídrico 1 M, conforme a necessidade, até atingir o pH de 3,8. Para o ajuste dos valores de concentração de sólidos solúveis e de  $a_w$  do suco, foram utilizados o suco concentrado e água destilada. O teor de sólidos solúveis foi ajustado com o auxílio de um refratômetro (AR200 Reichert) e, posteriormente, foi realizada a medição da  $a_w$  no medidor de  $a_w$  modelo Aqua Lab Models Series 3TE. Após formulação do suco, adicionou-se 1,5 g de ágar para cada 100 mL de suco e as amostras foram tratadas termicamente a 115 °C/1 min.

## 2.2 Avaliação do Crescimento de *B. fulva*

A avaliação do crescimento de *B. fulva* foi realizada através da medida do diâmetro das colônias e pela avaliação do conteúdo de ergosterol, de acordo com Tremarin (2013). Os dados experimentais obtidos foram utilizados para validar as previsões geradas nas simulações dos modelos matemáticos em condições não-isotérmicas.

## 2.3 Modelagem do Crescimento Microbiano em Condições Não-Isotérmicas

O modelo matemático simplificado (sem fase estacionária) de Baranyi e Roberts (1994), Equação 1, foi utilizado para prever o crescimento dos fungos em condições não-isotérmicas. Na Equação 1,  $D(t)$  é a variável do crescimento dos fungos em função do tempo  $t$ , ou seja, diâmetro das colônias [mm] ou conteúdo de ergosterol [mg/L],  $\lambda$  é a duração da fase de adaptação [h],  $\mu_{\max}$  é a velocidade máxima de crescimento [mm/h ou mg/Lh]. Em estudos anteriores, os parâmetros do modelo primário foram obtidos a partir de dados de crescimento sob condições isotérmicas, de onde os modelos secundários das Equações (2), (3), (4) e (5) foram obtidos, os quais descrevem a dependência dos parâmetros  $\mu_{\max}$  e  $\lambda$  com a temperatura.

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

$$\sqrt{\mu_{\max \text{ dia}}(T(t))} = 0,046(T - 5,88) \quad (2)$$

$$\mu_{\max \text{ erg}}(T(t)) = 0,00124T + 0,0111 \quad (3)$$

$$\sqrt{1/\lambda_{\text{dia}}(T(t))} = 0,0051(T + 2,93) \quad (4)$$

$$\sqrt{1/\lambda_{\text{erg}}(T(t))} = 0,0036(T - 1,46) \quad (5)$$

As Equações (1), (2) e (4) foram utilizadas para prever o crescimento do diâmetro das colônias de *B. fulva* em condições não-isotérmicas, enquanto que as Equações (1), (3) e (5) foram utilizadas para prever o crescimento do conteúdo de ergosterol de *B. fulva* em condições não-isotérmicas.

Dois perfis de temperatura diferentes foram utilizados para simular condições de crescimento não-isotérmicas. Na primeira condição estudada, a incubação das placas ocorreu na temperatura inicial de 10 °C, aumentando gradativamente (cerca de 1,27 °C a cada 24 h) até atingir a temperatura de 30 °C, permanecendo nesta temperatura até que o crescimento atingisse toda a placa. Na segunda condição estudada, incubaram-se as placas na temperatura inicial de 30 °C, diminuindo gradativamente (cerca de 1,27 °C a cada 24 h) até atingir a temperatura de 10 °C, permanecendo nesta temperatura até que o crescimento atingisse toda a placa. Os perfis de temperatura podem ser observados nas Figuras 1, 2, 3 e 4.

O aplicativo computacional Matlab 7.10 foi utilizado para resolver numericamente o problema matemático, gerando as predições do crescimento de *B. fulva* nos dois diferentes perfis de temperatura. As equações foram resolvidas numericamente utilizando-se a função ode23.

## 2.4 Análises Estatísticas

Os índices estatísticos coeficiente de correlação ( $R^2$ ), raiz do erro médio quadrático (RMSE), e fatores bias e exatidão (Ross, 1996) foram utilizados para avaliar a capacidade dos modelos matemáticos em prever o crescimento microbiano em condições não-isotérmicas (processo de validação).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Modelos para Predição do Crescimento pelo Diâmetro das Colônias

As Figuras 1 e 2 apresentam as curvas de crescimento de *B. fulva* predito e observado para os respectivos perfis de temperatura não-isotérmicos. Os dados obtidos dos experimentos nas condições não-isotérmicas propostas apresentaram valores próximos à curva de predição pelos modelos matemáticos de crescimento. Para o perfil de temperatura de 10 para 30 °C os dados experimentais ficaram um pouco acima da curva de predição, apresentando uma falha segura de predição. Para o perfil de temperatura de 30 para 10 °C os dados experimentais ficaram próximos da curva de predição, apresentando uma falha segura até o tempo de 168 h, passando então para falha perigosa quando o fungo está com diâmetro elevado.

Os valores dos índices estatísticos de comparação entre os dados experimentais e a curva de predição do modelo matemático foram obtidos. Os valores de  $R^2 = 0,997$ , RMSE = 5,64, fator bias = 1,12 e fator exatidão = 1,12 foram obtidos para o perfil de 10 a 30 °C, e os valores de  $R^2 = 0,953$ , RMSE = 11,92, fator bias = 1,15 e fator exatidão = 1,21 foram obtidos para o perfil de 30 a 10 °C. Os valores encontrados para os índices estatísticos indicam que o modelo avaliado fornece predições satisfatórias do crescimento de *B. fulva* avaliando-se o diâmetro das colônias.

Silva et al. (2013) avaliaram o desempenho de um modelo baseado no modelo de Gompertz para prever o crescimento do diâmetro de colônias de *B. Fulva* em polpa de papaia em condições de flutuação de temperatura variando de 15 a 35 °C. Os autores também obtiveram resultados satisfatórios da capacidade do modelo para prever o comportamento de crescimento

dos fungos quando ocorre mudança suave de temperatura. Gougouli e Koutsoumanis (2010) obtiveram resultados semelhantes em estudo realizado com *Penicillium expansum* e *Aspergillus niger*. O modelo linear de duas fases foi utilizado pelos autores.

A literatura afirma que resultados obtidos em meio de cultura podem ser utilizados para compreender o comportamento dos fungos e estudar o crescimento em produtos alimentares (Gougouli e Koutsoumanis, 2010). Neste trabalho, as curvas de crescimento de *B. fulva* foram avaliadas em suco de maçã solidificado e, por isso, o presente estudo é importante devido a sua aplicação em alimentos.

Figura 1 – Curvas do crescimento de *B. fulva* predita pelo modelo matemático (linha contínua) e obtida experimentalmente (pontos) obtidas através de medidas do diâmetro das colônias para as condições não-isotérmicas (linha pontilhada) do perfil de temperatura 1 (10-30 °C).

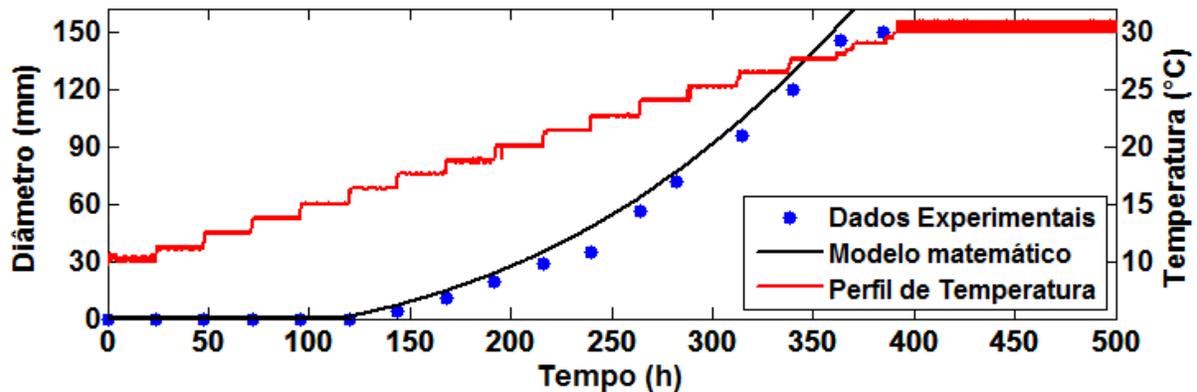
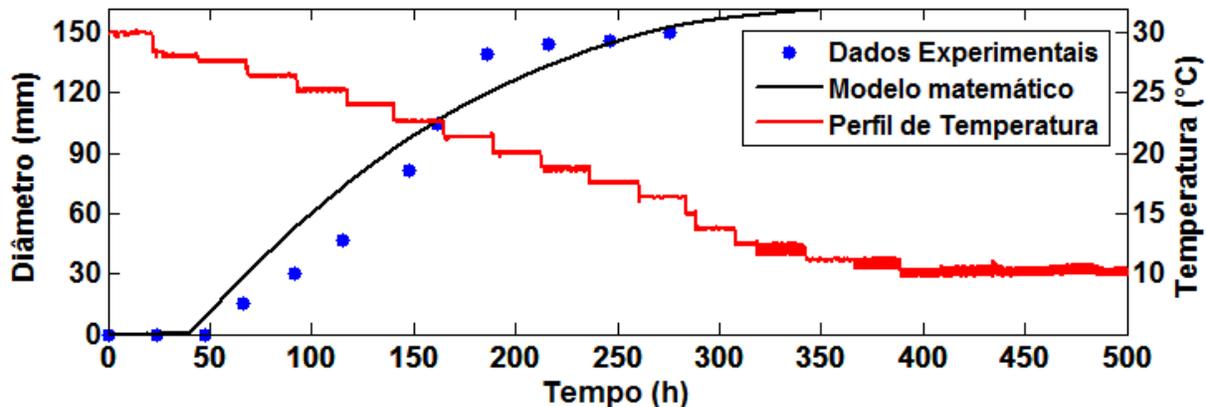


Figura 2 – Curvas do crescimento de *B. fulva* predita pelo modelo matemático (linha contínua) e obtida experimentalmente (pontos) obtidas através de medidas do diâmetro das colônias para as condições não-isotérmicas (linha tracejada) do perfil de temperatura 2 (30-10 °C).



### 3.2 Modelos para Predição do Crescimento pelo Conteúdo do Ergosterol

As Figuras 3 e 4 apresentam as curvas de crescimento de *B. fulva* predito e observado para os respectivos perfis de temperatura não-isotérmicos. Para o perfil de temperatura de 10 para 30 °C os dados obtidos dos experimentos nas condições não-isotérmicas propostas apresentaram valores próximos à curva de predição pelos modelos matemáticos de crescimento. Por sua vez, para o perfil de temperatura de 30 para 10 °C os dados obtidos dos experimentos nas condições não-isotérmicas propostas apresentaram valores acima da curva de predição pelos modelos matemáticos de crescimento, indicando que o modelo apresenta falha perigosa.

Os valores dos índices estatísticos de comparação entre os dados experimentais e a curva de predição do modelo matemático foram obtidos. Os valores de  $R^2 = 0,900$ , RMSE = 0,59, fator bias = 0,86 e fator exatidão = 1,47 foram obtidos para o perfil de 10 a 30 °C, e os valores de  $R^2 = 0,856$ , RMSE = 1,33, fator bias = 0,41 e fator exatidão = 2,43 foram obtidos para o perfil de 30 a 10 °C. Os valores encontrados para os índices estatísticos indicam que experimentos adicionais do conteúdo de ergosterol são necessários para a validação do modelo matemático.

Figura 3 – Curvas do crescimento de *B. fulva* em condições não-isotérmicas predita pelo modelo matemático (linha contínua) e obtida experimentalmente (pontos) obtidas através de medidas do conteúdo de ergosterol para o perfil de temperatura 1 (10-30 °C).

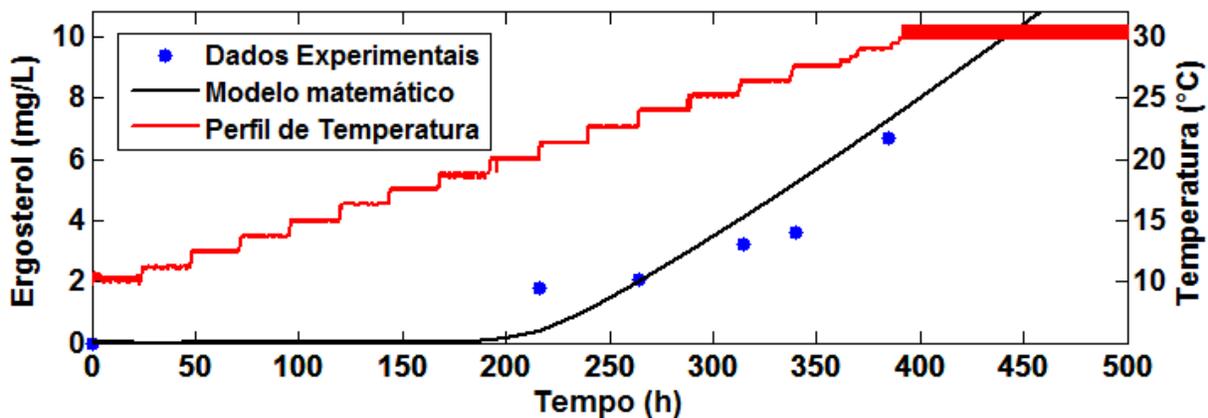
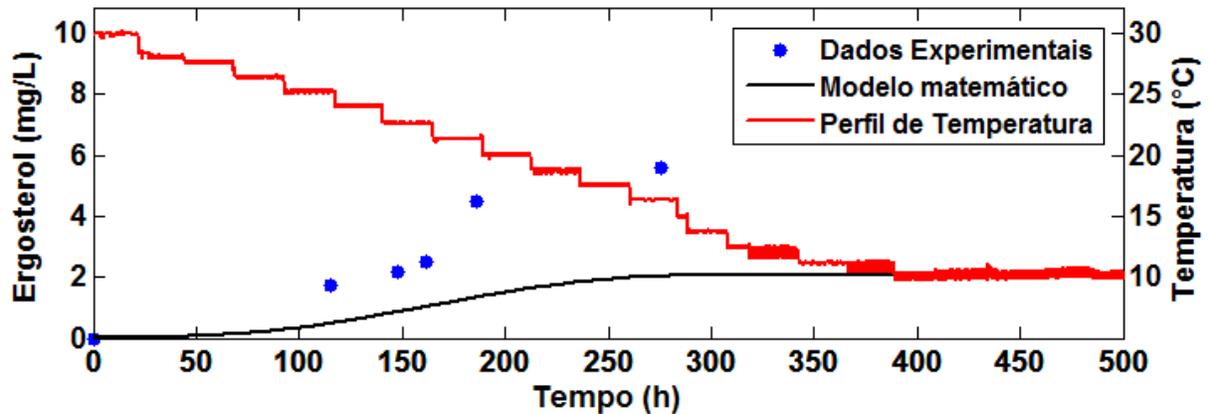


Figura 4 – Curvas do crescimento de *B. fulva* em condições não-isotérmicas predita pelo modelo matemático (linha contínua) e obtida experimentalmente (pontos) obtidas através de medidas do conteúdo de ergosterol para o perfil de temperatura 2 (30-10 °C).



## 4. CONCLUSÕES

Os modelos matemáticos propostos (modelo primário de Baranyi e Roberts simplificado e outros modelos secundários apropriados) para prever o crescimento do diâmetro da colônia de *B. fulva* em suco de maçã solidificado apresentaram resultados muito próximos dos dados experimentais obtidos em condições não-isotérmicas, indicando que o modelo tem validade prática. Por sua vez, os modelos matemáticos propostos para a predição do crescimento do conteúdo de ergosterol de *B. fulva* em suco de maçã solidificado apresentaram resultados insatisfatórios pois não mostraram uma boa predição, indicando que experimentos adicionais são necessários para validar o modelo. Os modelos matemáticos propostos e validados neste trabalho podem ser úteis para prever o crescimento de *B. fulva* na faixa de temperaturas estudadas, possibilitando a predição na prática da vida útil de sucos de maçã.

## 5 REFERÊNCIAS

- BARANYI, J., ROBERTS, T.A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 277-294.
- CORRADINI, M.; PELEG, M. (2005). Estimating non-isothermal bacterial growth in foods from isothermal experimental data. *Journal of Applied Microbiology*, v. 99, n. 1, p. 187-200.
- GIANNUZZI, L., PINOTTI, A., ZARITZKY, N. (1998). Mathematical modeling of microbial growth in packaged refrigerated beef at different temperature. *International Journal of Food Microbiology*, v.39, p.101-110.
- GOSPAVIC, R., KREYENSHIMIDT, J., BRUCKNER, S., POPOV, V., HAQUE, N. (2008) Mathematical modeling for predicting the growth of *Pseudomonas* spp. in poultry under variable temperature conditions. *International Journal of Food Microbiology*, v.127, p.290-297.

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

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

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

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

LONGHI, D. A., 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.

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

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

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

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

TREMARIN, A. (2013) Modelagem matemática do crescimento de *Byssochlamys fulva* e *Neosarthorya fischeri* em suco de maçã solidificado sob condições isotérmicas e não-isotérmicas. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis/SC/Brasil.

ZWIETERING, M. H.; DE WIT, J.C.; CUPPERS, H.G.A.M.; VAN'T RIET, K., (1994). Modeling of bacterial-growth with shifts in temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 60, n. 1, p. 204-213.